



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**VITÓRIA MORELLI SAVENHAGO**

**TENEURINA-2 E LATROFILINA-1 NO COMPLEXO  
HIPOCAMPAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A  
EPILEPSIA EXPERIMENTAL**

**Araçatuba – SP  
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**VITÓRIA MORELLI SAVENHAGO**

**TENEURINA-2 E LATROFILINA-1 NO COMPLEXO  
HIPOCAMPAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A  
EPILEPSIA EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

**Orientador:** Prof. Dr. Cláudio A. Casatti

**Araçatuba – SP  
2023**

*Dedico esse trabalho primeiramente as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, **Vera Lúcia Morelli Savenhago** e **José Carlos Savenhago**. Obrigada por sempre acreditarem em mim e fazer dos meus sonhos os seus sonhos. Meu eterno amor e gratidão a vocês.*

*A minha avó **Zilda Lourdes Daneluci Savenhago** que tanto sonhou e planejou esse momento comigo, mas que hoje guia meus passos em sua nova morada.*

*A toda minha família por sempre me apoiar e ser abrigo em todos os momentos.*

*Dedico também aos meus amigos de **Braúna**, **Birigui** e **Araçatuba**, por sempre me apoiarem, por deixar essa caminhada mais leve e por se tornarem família. Levarei para sempre no meu coração.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. **Cláudio Aparecido Casatti**, por todo o ensinamento transmitido ao longo desses anos, por toda paciência e por ser sempre solícito em todos os momentos. Minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. **Aláide Gonçalves**, que esteve presente durante minha vida acadêmica transmitindo conhecimento e por todo suporte nesse projeto. Muito obrigada por fazer parte dessa banca examinadora.

Ao Prof. Dr. **Luan Felipe Toro**, por ter aceitado o convite de fazer parte dessa banca examinadora. Desejo muito sucesso em sua vida.

Ao Prof. Dr. **Gestter Willian Lattari Tessarin**, por todo ensinamento e dedicação a esse projeto. Desejo muito sucesso na em vida.

Aos **meus pais** por sorrirem as minhas alegrias e por serem fortaleza nos momentos difíceis. Sem vocês nada disso seria possível e não há palavras suficientes para expressar minha gratidão. Vocês são o meu espelho, são meu exemplo de caráter e exemplo de vida, são exatamente como eu gostaria que qualquer pessoa fosse, e como sempre dizemos “Eu que te amo tanto, ainda nem te amo tudo.”. Minha eterna admiração e gratidão a vocês.

À **Bárbara Stéfani Silva da Costa**, por dividir esse projeto e esses sete anos de faculdade comigo, pela amizade e cumplicidade. Desejo a você todo o sucesso desse mundo, te aplaudirei de pé em todas as suas conquistas pois sei que serão muitas. Minha eterna amizade e gratidão.

Aos meus amigos, **Isabela, Érica, Carolina, Diovana e Leonardo** por cada momento vivido nesses sete anos juntos. Desejo a vocês muito sucesso e conquistas nesse novo capítulo que se inicia. Estarei sempre torcendo e vibrando por vocês.

*"Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!... O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."*

**Guimarães Rosa**

SAVENHAGO, V. M. **Teneurina-2 e latrofilina-1 no complexo hipocampal de ratos adultos submetidos a epilepsia experimental.** 2023. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## RESUMO

As teneurinas são proteínas transmembrana tipo II constituída por quatro membros homólogos (Ten-1, Ten-2, Ten-3, Ten-4), expressas principalmente nos neurônios durante a neurogênese do sistema nervoso central (SNC), colaborando no estabelecimento e estabilização dos circuitos neurais. Essas proteínas estabelecem interações homofílicas entre seus homólogos (Ten-1-4), assim como heterofílicas, especialmente com as latrofilina (LPHN). Estudo desenvolvido em nosso laboratório revelou a presença de Ten-2 nos astrócitos reativos no complexo hipocampal após epilepsia induzida com LiCl-pilocarpina em ratos adultos. Disto posto, o presente estudou visou analisar a presença de LPHN-1 no complexo hipocampal após epilepsia induzida pelo LiCl-pilocarpina. Para isso, ratos machos adultos receberam LiCl-pilocarpina e foram sacrificados 2,5,14,35 e 65 dias após a indução do *status epilepticus* (SE) por meio de perfusão transcardíaca. Os cortes histológicos do complexo hipocampal foram submetidos aos métodos de imunoperoxidase para identificar a proteína LPHN-1 e analisados em microscopia de luz. Os resultados indicaram a presença de astrócitos reativos imunopositivos a LPHN-1 no complexo hipocampal nos animais com indução de epilepsia. Análise quantitativa da densidade de imunorreatividade na subdivisão 3 do Cornu de Ammonis (CA3) do complexo hipocampal revelou aumento significativo de astrócitos reativos e imunopositivos a LPHN-1 ( $P < 0.0001$ ), principalmente nos grupos de 5 e 14 dias após a indução do SE em relação aos grupos controles. Esses resultados indicam que a Ten-2 e a LPHN-1 em astrócitos reativos na epilepsia pode ser um mecanismo de interação proteica de interesse nessa condição patológica e, estudos futuros devem explorar a exata função dessa interação como uma possível função neuroprotetora.

**Palavras-chave:** Latrofilina. Teneurina. Epilepsia. Complexo Hipocampal. Imunohistoquímica.

SAVENHAGO, V. M. **Teneurin-2 and latrophyllin-1 in the hippocampal complex of adult rats submitted to experimental epilepsy**. 2023. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## **ABSTRACT**

Teneurins are type II transmembrane proteins consisting of four homologous members (Ten-1, Ten-2, Ten-3, Ten-4), expressed mainly in neurons during the neurogenesis of the central nervous system (CNS), collaborating in the establishment and stabilization of neural circuits. These proteins establish homophilic interactions between their counterparts (Ten-1-4), as well as heterophilic, especially with latrophylline (LPHN). A study developed in our laboratory revealed the presence of Ten-2 in reactive astrocytes in the hippocampal complex after epilepsy induced with LiCl-pilocarpine in adult rats. Therefore, the present study aimed to analyze the presence of LPHN-1 in the hippocampal complex after epilepsy induced by LiCl-pilocarpine. For this, adult male rats received LiCl-pilocarpine and were sacrificed 2,5,14,35 and 65 days after induction of *status epilepticus* (SE) by transcardiac perfusion. The histological sections of the hippocampal complex were submitted to immunoperoxidase and analyzed in light microscope. The results indicated the presence of reactive astrocytes immunopositive to LPHN-1 in the hippocampal complex in animals with epilepsy induction. Quantitative analysis of the immunoreactivity density in subfield 3 of the Cornu de Ammonis (CA3) revealed a significant increase in reactive astrocytes immunopositive to LPHN-1 ( $P < 0.0001$ ), especially in the groups of 5 and 14 days after the induction of SE in relation to the control groups. These results indicate that Ten-2 and LPHN-1 in reactive astrocytes in epilepsy may be a mechanism of protein interaction of interest in this pathological condition, and future studies should explore the exact function of this interaction as a possible neuroprotective function.

**Keywords:** Latrophyllin. Teneurin. Epilepsy. Hippocampal Complex. Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mostrando o complexo hipocampal, com suas subdivisões e camadas celulares, baseado em suas características citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, Cornu de Ammonis; DG, giro denteado; F, fimbria; H, hilus; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiato; SLM, estrato lacunoso-molecular; SL, estrato lúcido; SM, estrato molecular; SG, estrato granuloso 20

Figura 2 - Fotomicrografia de luz mostrando o padrão de imunorreatividade para LPHN-1 nos cortes histológicos frontais do hipocampo de ratos adultos nos diferentes grupos experimentais. Em A é possível observar as subdivisões do hipocampo, incluindo CA1, CA2, CA3 e o giro denteado. Em E' evidenciam os astrócitos reativos com imunorreatividade a LPHN-1, presentes em todas as camadas da subdivisão CA3 do grupo epiléptico EG14. Em E" são mostradas células distribuídas nos estratos radiato e lacunoso-molecular, evidenciando sua disseminação nas diferentes camadas citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, subdivisões do Cornu de Ammonis; GCF, grupo controle farmacológico; GD, giro denteado; GE2D, grupo epilepsia – 2 dias; GE5D, grupo epilepsia – 5 dias; GE14D, grupo epilepsia – 14 dias; GE35D, grupo epilepsia – 35 dias; GE65D, grupo epilepsia – 65 dias 22

Figura 3 - Análise da porcentagem da densidade de imunorreatividade temporal (porcentagem de densidade de pixels/ área) para LPHN-1 na subdivisão CA3 do hipocampo em todos os grupos experimentais. Nota-se um aumento significativo no GE5D e GE14D em relação aos outros grupos. Os valores médios ( $\pm$  erro padrão médio - EPM) de cada grupo experimental foram submetidos à ANOVA “one-way” e ao teste post hoc de Tukey, considerando-se  $p < 0,05$  como significativos. Observação: b, GE5D vs. GCT, GCF, GE2D, GE35D e GE65D ( $p < 0,0001$ ); a, EG2 vs. GCT e GCF ( $p < 0,0001$ ); c, GE14D vs. GCT, GCF e GE60 ( $p < 0,0001$ ); d, GE14D vs. GE2D ( $p < 0,05$ ); e, GE14D vs. GE35D ( $p < 0,01$ ); f, GE14D vs. GE65D ( $p < 0,001$ ); g, GE35D vs. GCT, GCF ( $p < 0,001$ ); h, GE65D vs. GCT ( $p < 0,01$ ); GE65D vs. GCT ( $p < 0,001$ ). Abreviaturas: CA3, subdivisão 3 do Cornu Ammonis do hipocampo; GCP, grupo controle farmacológico; GE2D, grupo epilepsia 2 dias; GE5D, grupo epilepsia 5 dias; GE14D, grupo epilepsia 14 dias; GE35D, grupo epilepsia 35 dias; GE65D, grupo epilepsia 65 dias 23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrometro
aGPCR	Receptor Acoplado à Proteína G de Adesão
AMPc	Adenosina Monofostato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima de troca adenosina trifosfato
BHE	Barreira hemato encefálica
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis
CA1	Subdivisão ou subcampo 1 do Cornu Ammonis do hipocampo
CA2	Subdivisão ou subcampo 2 do Cornu Ammonis do hipocampo
CA3	Subdivisão ou subcampo 3 do Cornu Ammonis do hipocampo
CA4	Subdivisão ou subcampo 4 do Cornu Ammonis do hipocampo
DAB	Tetracloroeto de diaminobenzidina
DG	Giro denteado do hipocampo
EGF	Epidermal growth factor-like
F	Fimbria
FRLT	Proteínas transmembrana ricas em leucina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCF	Grupo controle farmacológico
GCT	Grupo controle total
GE	Grupo epilepsia
GE14D	Grupo epilepsia – 14 dias
GE2D	Grupo epilepsia – 2 dias
GE35D	Grupo epilepsia – 35 dias
GE5D	Grupo epilepsia – 5 dias
GE65D	Grupo epilepsia – 65 dias
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
H	Hilus
i.p	intraperitoneal
KDa	Kilo Dalton
LiCl	Cloreto de Lítio
LPHN	Latrofilina

NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão fosfato de sódio em salina (Phosphate-buffered saline)
PBS-TX	Tampão fosfato de sódio em salina com triton x-100
PMCA	ATPase da membrana plasmática
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SERCA	ATPase de transporte de cálcio
SG	Estrato granuloso
SL	Estrato lúcido
SLM	Estrato lacunoso-molecular
SM	Estrato molecular
SNC	Sistema nervoso central
SO	Estrato oriens
SP	Estrato piramidal
SR	Estrato radiato
SR	Reticulo sarcoplasmático
TCAP	Teneurin C-terminal-associated peptide
TEN	Teneurina
Ten-a	Tenascin-like protein accessory
Ten-m	Tenascin-like protein major

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVO .....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	Animais.....	16
3.2	Epilepsia induzida por cloreto de lítio-pilocarpina.....	16
3.3	Perfusão transcardíaca .....	17
3.4	Técnica imuno-histoquímica.....	17
3.5	Análises qualitativas e quantitativas.....	19
4	RESULTADOS .....	22
4.1	Imunomarcacão para LPHN-1 no hipocampo .....	22
5	DISCUSSÃO .....	25
6	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS .....	33
	ANEXOS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

As teneurinas foram inicialmente identificadas em *Drosophila melanogaster* durante estudos que buscavam encontrar proteínas homólogas às tenascinas. Inicialmente, essas proteínas foram denominadas como Ten-a (tenascin-like protein accessory) e Ten-m (tenascin-like protein major) (BAUMGARTNER *et al.*, 1994; CHIQUET-EHRISMANN *et al.*, 1991). Posteriormente, ficou evidente que as teneurinas constituem uma família composta por quatro membros homólogos (Ten-1, Ten-2, Ten-3, Ten-4), conservados tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Essas proteínas são predominantemente expressas no sistema nervoso central (SNC) durante a neurogênese, o que as diferencia das tenascinas, que têm expressão preponderante no tecido conjuntivo (TUCKER, 2018). Estruturalmente, as teneurinas são constituídas por aproximadamente 2.500 a 2.800 aminoácidos, com um peso molecular em torno de 300 kDa, apresentando uma série de domínios funcionais (TUCKER, 2018). Essas proteínas exibem orientações distintas, com os terminais carboxila e amino direcionados para o exterior e o interior da célula, respectivamente, o que as classifica como proteínas transmembrana do tipo II (MOSCA, 2015). Os domínios intracelulares (N-terminal) e transmembrana são relativamente curtos, compreendendo cerca de 300-375 e 300-400 aminoácidos, respectivamente (TUCKER, 2018). Por outro lado, o domínio extracelular (C-terminal) é composto por aproximadamente 2.300 aminoácidos, contendo diversos resíduos que demonstram afinidade com as moléculas da matriz extracelular. Esse domínio extracelular inclui oito domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (epidermal growth factor-like-EGF), seguidos por uma região rica em cisteínas e sequências repetidas de aminoácidos tirosina e ácido aspártico (TUCKER, 2018).

As teneurinas podem sofrer clivagens em diversos sítios na região extracelular, resultando na formação de proteínas com atividade extracelular, como a família de peptídeos bioativos conhecidos como TCAP (teneurin C-terminal-associated peptide), que consistem em aproximadamente 40-41 aminoácidos (WANG *et al.*, 2005). Esses peptídeos também podem ser produzidos por meio de transcrição alternativa a partir do último éxon do gene da teneurina (CHAND *et al.*, 2013). A isoforma TCAP-1, em particular, demonstrou notável atividade fisiológica,

impactando a resposta ao estresse, comportamentos relacionados ao uso de drogas ilícitas, níveis de glicose no sangue em estudos in vivo, além de exibir uma potente atividade neuroprotetora e estimular a neuroplasticidade em estudos in vitro (HOGG *et al.*, 2018).

Estudos têm indicado que as teneurinas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e em outras partes dos embriões de organismos como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Caenorhabditis elegans* (DEPEW; AIMINO; MOSCA, 2019). Além disso, elas estão envolvidas em diversas outras funções, incluindo a mediação de interações homofílicas e heterofílicas entre células, orientação axonal, regulação da proliferação celular e controle da transcrição gênica (DEPEW; AIMINO; MOSCA, 2019; MOSCA, 2015).

A capacidade de interação das teneurinas desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, envolvendo modificações estruturais, fosforilação e interações não-covalentes (HOGG *et al.*, 2018; HUSIĆ; BARSYTE-LOVEJOY; LOVEJOY, 2019; MOSCA, 2015; TUCKER, 2018). Essas interações têm sido particularmente investigadas em relação ao grupo de proteínas conhecido como latrofilinas (LPHNs), que são proteínas de membrana que interagem com a alfa-latrotóxina, uma toxina de aracnídeos (BOUCARD; MAXEINER; SÜDHOF, 2014; MOSCA, 2015; VYSOKOV *et al.*, 2016; WOELFLE *et al.*, 2015). Existem três isoformas de LPHN (LPHN-1, LPHN-2 e LPHN-3), expressas principalmente no SNC, embora LPHN-2 também seja encontrada em tecidos não neurais (SILVA *et al.*, 2011). A interação heterofílica entre uma forma alternativa da Ten-2 chamada Lasso e LPHN-1 é capaz de modular a atividade neuronal por meio da sinalização intracelular de cálcio (SILVA *et al.*, 2011). A região do TCAP-2 desempenha um papel fundamental nessa interação (BOUCARD; MAXEINER; SÜDHOF, 2014; SILVA *et al.*, 2011; VYSOKOV *et al.*, 2016, 2018; WOELFLE *et al.*, 2015). Recentemente, foi descoberto que a Ten-2 pode ser clivada, gerando diferentes ectodomínios com capacidade de atuar como mediadores parácrinos em células distantes, por meio de sua interação com o receptor LPHN-1 (VYSOKOV *et al.*, 2016, 2018). É relevante mencionar que a Ten-2/TCAP-2 tem despertado grande interesse nos últimos anos devido à complexidade e variabilidade de seu terminal carboxila em diferentes variantes de "splicing", resultando em atividades funcionais distintas em relação a

outras teneurinas e TCAPs (JACKSON *et al.*, 2018; SANDO; JIANG; SÜDHOF, 2019; VYSOKOV *et al.*, 2016, 2018).

Além disso, estudos também sugerem que outras proteínas, como as distroglicanas e as integrinas, podem desempenhar um papel no sistema de adesão e sinalização mediado pelas teneurinas (SUGITA *et al.*, 2001; MOSCA, 2015; WOELFLE *et al.*, 2015). As distroglicanas, por exemplo, são fundamentais para o desenvolvimento cerebral, a sinaptogênese, a plasticidade neural, as interações gliais, a integridade da barreira hematoencefálica e a manutenção da membrana basal (AMTUL; HEPBURN, 2014; SATZ *et al.*, 2010). Por outro lado, as integrinas são proteínas compostas por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que interagem com os filamentos de actina intracelular, funcionam como receptores para células adjacentes e promovem a interação entre os terminais pré e pós-sinápticos na fenda sináptica (PARK; GODA, 2016).

A epilepsia, um distúrbio cerebral crônico caracterizado por disfunção eletrofisiológica que resulta em crises epilépticas espontâneas ou induzidas, também está associada a alterações na sinapse de excitação e inibição, afetando a neurotransmissão e a atividade neuronal em diferentes regiões do cérebro (GUNN; BARAM, 2017; KOBAYASHI *et al.*, 2020; SUPRIYA *et al.*, 2021). Os astrócitos desempenham um papel crucial na homeostase do tecido nervoso, na regulação da excitabilidade e plasticidade dos neurônios, no metabolismo de neurotransmissores e na secreção de moléculas neuroativas, como gliotransmissores e fatores neurotróficos (KINBOSHI; IKEDA; OHNO, 2020; MAGAKI; WILLIAMS; VINTERS, 2018; NEAL; RICHARDSON, 2018; PLATA *et al.*, 2018; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). A expressão do gene Ten-2 foi identificada como alterada em algumas doenças cerebrais, como esclerose lateral amiotrófica (ELA) e na doença de Alexander (ANDRÉS-BENITO *et al.*, 2017; KONDO *et al.*, 2016).

Em estudos recentes conduzidos em nosso laboratório, demonstramos a expressão da Ten-2/TCAP-2 em astrócitos reativos após indução experimental de lesões no córtex cerebral de ratos adultos (TESSARIN *et al.*, 2019). Além disso, observou-se um aumento significativo de Ten-2 em astrócitos reativos no SNC, incluindo no complexo hipocampal, após a indução experimental do "*status epilepticus*" (SE) no modelo cloreto de lítio/cloridrato de pilocarpina (LiCl-pilocarpina)

e no estabelecimento da epilepsia\*. No entanto, a presença de LHPN-1 ainda não tinha sido avaliada nessa condição patológica experimental.

---

\* TESSARIN et al., 2023, em submissão

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é investigar a presença da proteína LPHN-1 no complexo hipocampal de ratos adultos após a indução do status epilepticus no modelo LiCl-pilocarpina, utilizando a técnica de imuno-histoquímica.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos adultos jovens (n=28), com idade aproximada de 60 dias, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 280-300g. Os animais foram obtidos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP). Eles foram alojados individualmente sob condições controladas de iluminação, com ciclo claro-escuro de 12-12 horas, a uma temperatura ambiente de 22°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Os ratos tiveram acesso irrestrito à água e à ração. Os animais foram distribuídos em grupos de lesão e grupo controle, como detalhado a seguir. É importante destacar que este estudo experimental recebeu aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob o número de processo 2018-847.

### 3.2 Epilepsia induzida por cloreto de lítio-pilocarpina

Os animais passaram por uma série de procedimentos antes da indução do status epilepticus (SE). Inicialmente, receberam uma injeção intraperitoneal (i.p) de cloreto de lítio (127 mg/kg, Sigma-Aldrich, MO, USA) 20 horas antes da indução do SE. Isso teve como objetivo potencializar os efeitos da pilocarpina e permitir uma redução na dose deste indutor do SE (CURIA *et al.*, 2008).

Trinta minutos antes da aplicação da pilocarpina, os animais foram submetidos a uma injeção i.p de brometo de metil-escopolamina (1 mg/kg; S8502; Sigma-Aldrich, MO, USA) para inibir ou atenuar os efeitos colinérgicos periféricos provocados pela pilocarpina. Posteriormente, receberam uma injeção i.p de cloridrato de pilocarpina (40 mg/kg, P6503; Sigma-Aldrich, MO, USA) para induzir o SE (CURIA *et al.*, 2008; TURSKI *et al.*, 1989).

Os animais foram cuidadosamente monitorados para verificar a ocorrência de crises convulsivas e, quando estas ocorreram, foram mantidos em SE (grau 5 na escala de Racine, Racine, 1972) por um período de 2-3 horas. Isso teve como objetivo induzir uma lesão epileptogênica no hipocampo. Os animais foram então divididos em grupos, cada um com um período específico de sacrifício após o

SE (GE2D, GE5D, GE14D, GE35D e GE65D, com crises espontâneas, sendo n=4 para cada grupo experimental), além de grupos de controle (controle total - GCT e controle farmacológico - GCF, com n=4 em cada grupo). No grupo de controle farmacológico, os animais receberam as mesmas substâncias, exceto o cloridrato de pilocarpina, que foi substituído por uma solução fisiológica, e foram sacrificados 5 dias após essa administração.

### **3.3 Perfusão transcardíaca**

Os animais foram inicialmente anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (70 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brazil). Em seguida, foram submetidos ao processo de perfusão transcardíaca onde foi administrada uma solução salina heparinizada (150 ml), seguida por uma solução fixadora (500 ml de formaldeído a 4%, Sigma-Aldrich, MO, USA) em tampão fosfato (PBS) 0,1 M com pH 7,4. Após essa etapa, os encéfalos foram cuidadosamente removidos, pós-fixados por 4 horas e, em seguida, submetidos à crioproteção em sacarose a 30%. Os encéfalos crioprotetidos foram cortados no plano coronal em secções seriadas com 30 µm de espessura, usando um micrótomo de congelação (SM 2000R, Leica, HE, Alemanha). As seções foram coletadas sequencialmente em uma série de 12 poços de uma placa de cultura e mantidas em solução anticongelante (PBS 0,1 M pH 7,4, contendo 30% de etilenoglicol e 20% de glicerol) até o momento da realização da técnica de imuno-histoquímica.

### **3.4 Técnica imuno-histoquímica**

Para a execução da técnica imunoistoquímica, foi adotada a técnica da imunoperoxidase indireta. Inicialmente, os cortes histológicos foram lavados em PBS 0,1 M pH 7,4 durante 24 h com finalidade de remoção de toda a solução anticongelante. Em seguida, os cortes histológicos foram submetidos à inativação da peroxidase endógena com solução de PBS 0,1 M pH 7,4 acrescido de 0,03 % de peróxido de hidrogênio (7722-84-1, Dinâmica, SP, Brasil) durante 1 h. Decorrido esse tempo, os cortes histológicos foram novamente submetidos a 3 lavagens de 10

minutos cada em PBS 0,1 M pH 7,4 seguido do bloqueio da biotina endógena com PBS com 0,03 % de triton x-100 (PBS-TX, triton X-100; Sigma-Aldrich, MO, USA) acrescido de 5 % de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé®, SP, Brasil) durante 1 h. Novamente os cortes histológicos foram submetidos a 3 lavagens de 10 minutos cada em PBS 0,1 M pH 7,4 e realizado bloqueio das reações inespecíficas com PBS-TX acrescido de 5 % de BSA (A7906, Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 1 h. Em seguida, 3 novas lavagens de 10 minutos em PBS 0,1 M pH 7,4 foram realizadas e os cortes histológicos foram incubados em PBS-TX acrescido de 2% de soro normal de burro (D9663, Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 12 horas. Seguidamente, os cortes histológicos foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-LPHN-1 feito em coelho (1:1000, ARL-021, Alabome, USA) diluído em PBS-TX acrescido de 2% soro normal de burro durante 48 h a 4 °C. Em seguida, os espécimes foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4 durante 10 minutos e incubados em solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-coelho (1:800, sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) durante 90 minutos e submetidos a novas lavagens em PBS 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados em solução contendo avidina e biotina (*kit* ABC, 1:200, PK-6200, Vector Laboratories, CA, USA) durante 120 minutos. A revelação da reação de imunohistoquímica, sob controle visual, foi realizada através da solução de PBS 0,1 M, pH 7,4 e tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, 0,02 %, 91-95-2, Sigma-Aldrich, MO, USA) como cromógeno acrescido de 0,2 % de peróxido de hidrogênio a 30 %. Para intensificação da coloração, foi adicionado 0,2 % de sulfato de níquel amônia (NAS, A1827, Sigma-Aldrich, MO, USA) diluído em tampão acetato junto à solução de revelação. Após a revelação, os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados à temperatura ambiente seguido da desidratação em séries crescentes de álcoois (álcool 50 °GL e 70 °GL - banhos de 2 minutos; álcool 80 °GL e 95 °GL - banhos de 4 minutos; álcool 100 °GL - 3 banhos de 5 minutos cada) e xilóis (banhos de 5, 10 e 15 minutos) e finalmente protegidos com meio de montagem (Entellan, 107961, Merckmillipore, HE, Alemanha) e lamínula de vidro. Os controles das reações imunohistoquímicas foram realizados através das omissões dos anticorpos primário e secundários. Além disso, a especificidade dos anticorpos empregados foi confirmada em ensaios de teste de adsorção em estudos prévios (TESSARIN *et al.*, 2019).

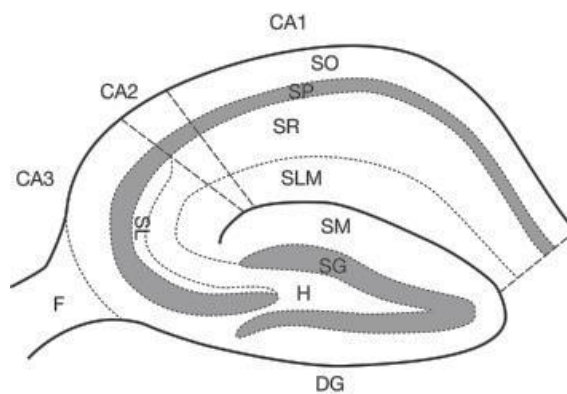
### 3.5 Análises qualitativas e quantitativas

As análises qualitativas das imunorreatividades para LPHN-1 foram realizadas em microscopia de luz (Axiolab A1, Carl Zeiss, BW, Alemanha), de acordo com a sua divisão citoarquitetônica (Jiang e Swann, Figura 1) e baseada no Atlas esterotáxico do SNC de ratos (SWANSON, 1992).

Para análise quantitativa foram capturados 5 campos microfotográficos de cortes histológicos frontais equidistantes em 440  $\mu\text{m}$  de cada animal ( $n=4$ ) para os grupos controles (GCT e GCF) e epiléticos (GE2D, GE5D, GE14D, GE30 e GE60) da subdivisão CA3 do hipocampo, utilizando microscópio óptico em campo claro (Axiolab A1, Carl Zeiss, NI, Alemanha) com objetiva de 10 $\times$ , acoplado à câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, NI, Alemanha) e empregando um *software* específico (Zen2, Carl Zeiss, BW, Alemanha) (Figura 1). A subdivisão CA3 do hipocampo foi selecionada para as análises quantitativas, uma vez que se trata da área hipocampal mais sensível as alterações neuroplásticas induzidas durante processos neuroinflamatórios, neurodegenerativos, sendo também o principal sítio epileptogênico (CHERUBINI; MILLES, 2015) (Figura 1). Vale ressaltar que para a seleção das áreas de interesse e captura das imagens microfotográficas para as análises quantitativas foi adotado como referência anatômica o segundo corte histológico da série que era possível identificar a subdivisão do CA3 do hipocampo. Em seguida, as imagens foram salvas em formato eletrônico TIFF e analisadas, levando em consideração a densidade de imunorreatividade (porcentagem de pixels/área), utilizando o *software* eletrônico de domínio público *Image J* (National Institutes of Health, MD, USA). Vale ressaltar que para esta análise, inicialmente, uma imagem da subdivisão do CA3 pertencente a um animal do grupo GE5D foi convertida em tons de cinza e, em seguida, foram ajustados os padrões de intensidade, contraste, brilho e *threshold* a ponto que fosse possível visualizar com clareza a imunorreatividade para LPHN-1 nos astrócitos. Esses parâmetros foram mantidos para as demais imagens analisadas, conforme descrito por King *et al.* (2002) e Singh *et al.* (2012). Os dados do percentual de área (porcentagem de densidade de pixels/área) exibindo LPHN-1 nas regiões de interesse dos grupos controles e experimentais foram expressos em média ( $\pm$  erro padrão), submetidos ao teste de

normalidade (Shapiro–Wilk) e, em seguida, submetidos ao teste estatístico de análise de variância simples (One way ANOVA) e pós-teste de Tukey utilizando o software *GraphPad Prism* 6.1 (GraphPad Software, CA, USA), considerando  $p < 0,05$  como significante.

**Figura 1 - Esquema mostrando o complexo hipocampal, com suas subdivisões e camadas celulares, baseado em suas características citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, Cornu de Ammonis; DG, giro denteado; F, fimbria; H, hilus; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiato; SLM, estrato lacunoso-molecular; SL, estrato lúcido; SM, estrato molecular; SG, estrato granuloso**



Fonte: Esquema extraído de Hirofumi Noguchi, Guangnan Li, Samuel J Pleasure, 2020.

## 4 RESULTADOS

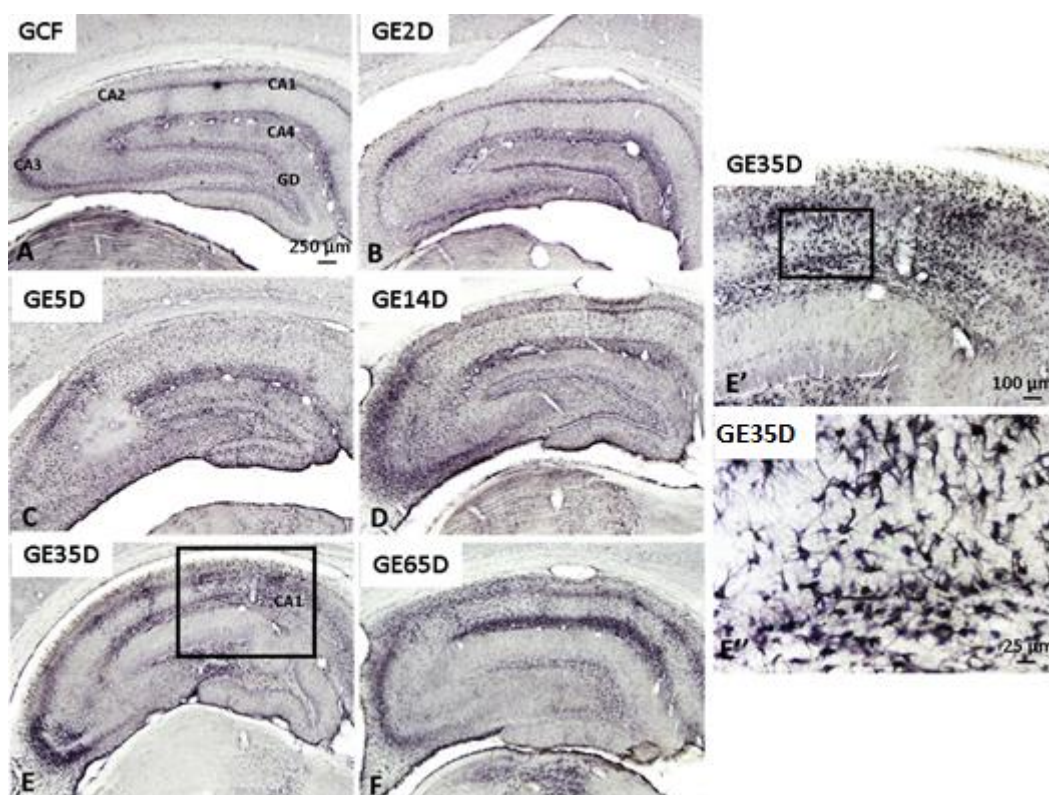
### 4.1 Imunomarcção para LPHN-1 no hipocampo

A análise qualitativa revelou discreta imunorreatividade da LPHN-1 em astrócitos, distribuídos de forma uniforme em todas as camadas do complexo hipocampal nos grupos controle total (GCT) e controle farmacológico (GCF) (Figura 2).

Nos animais experimentais com indução de epilepsia, essas imunomarcções tornaram-se intensas e presentes nos astrócitos reativos (Figura 2). Observou-se uma distribuição heterogênea da imunorreatividade do LPHN-1 no tanto nas subdivisões do CA e do GD e, variando nas camadas celulares, principalmente nos grupos GE14D, GE35D e GE65D (Figura 2). Adicionalmente, em alguns casos, foram observadas diferenças regionais entre os animais pertencentes a um mesmo grupo epilético. A imunorreatividade concentrou-se, em particular, em todas as camadas de CA1, CA2 e GD nos grupos GE35D e GE65D (Figura 2).

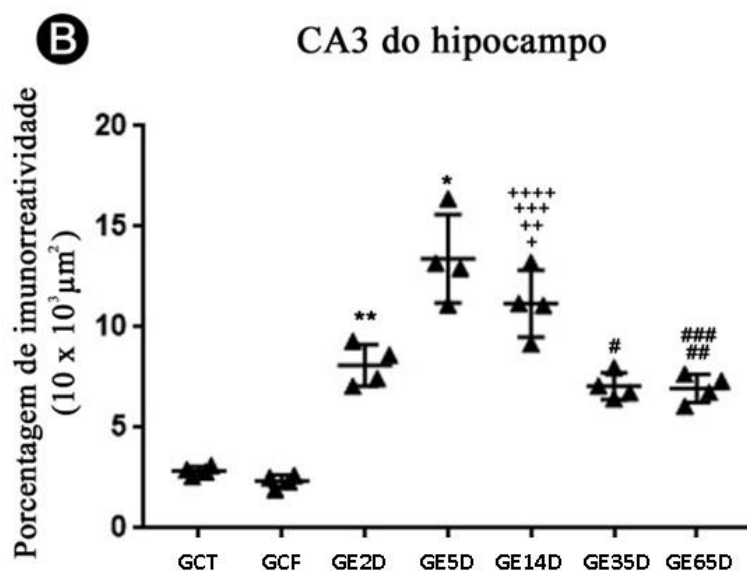
As análises quantitativas (porcentagem de imunorreatividade em pixels por área) das células imunorreativas a LPHN-1 foram restritas a subdivisão CA3 do hipocampo (vide Material e Métodos). No GCT foi observada uma área média de  $11,94 \mu\text{m}^2 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$  e no GCF foi observada  $12 \mu\text{m}^2 \pm 0,8 \mu\text{m}^2$  (Figura 3). A imunorreatividade do LPHN-1 aumentou substancialmente, principalmente nos grupos de animais epiléticos GE5D ( $235 \mu\text{m}^2 \pm 20 \mu\text{m}^2$ ) e GE14D ( $145,3 \mu\text{m}^2 \pm 10,8 \mu\text{m}^2$ ) e permaneceu elevada nos demais grupos epiléticos crônicos (GE35D,  $42,8 \mu\text{m}^2 \pm 2 \mu\text{m}^2$ ; GE65D,  $82,70 \mu\text{m}^2 \pm 4,2 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 3). A análise quantitativa revelou que os grupos GE5D e GE14D apresentaram diferenças significativas em relação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ), enquanto todos os grupos epiléticos exibiram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ ) em comparação com os grupos GCT e GCF (Figura 3). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GCT e GCF (Figura 3).

Figura 2 - Fotomicrografia de luz mostrando o padrão de imunorreatividade para LPHN-1 nos cortes histológicos frontais do hipocampo de ratos adultos nos diferentes grupos experimentais. Em A é possível observar as subdivisões do hipocampo, incluindo CA1, CA2, CA3 e o giro denteado. Em E' evidenciam os astrócitos reativos com imunorreatividade a LPHN-1, presentes em todas as camadas da subdivisão CA3 do grupo epileptico EG14. Em E'' são mostradas células distribuídas nos estratos radiado e lacunoso-molecular, evidenciando sua disseminação nas diferentes camadas citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, subdivisões do Cornu de Ammonis; GCF, grupo controle farmacológico; GD, giro denteado; GE2D, grupo epilepsia - 2 dias; GE5D, grupo epilepsia - 5 dias; GE14D, grupo epilepsia -14 dias, GE35D, grupo epilepsia - 35 dias; GE65D, grupo epilepsia - 65 dias



Fonte: Tessarin et al, 2023

Figura 3 - Análise da porcentagem da densidade de imunorreatividade temporal (porcentagem de densidade de pixels/ área) para LPHN-1 na subdivisão CA3 do hipocampo em todos os grupos experimentais. Nota-se um aumento significativo no GE5D e GE14D em relação aos outros grupos. Os valores médios ( $\pm$  erro padrão médio - EPM) de cada grupo experimental foram submetidos à ANOVA "one-way" e ao teste post hoc de Tukey, considerando-se  $p < 0,05$  como significativos. Observação: b, GE5D vs. GCT, GCF, GE2D, GE35D e GE65D ( $p < 0,0001$ ); a, EG2 vs. GCT e GCF ( $p < 0,0001$ ); c, GE14D vs. GCT, GCF e GE60 ( $p < 0,0001$ ); d, GE14D vs. GE2D ( $p < 0,05$ ); e, GE14D vs. GE35D ( $p < 0,01$ ); f, GE14D vs. GE65D ( $p < 0,001$ ); g, GE35D vs. GCT, GCF ( $p < 0,001$ ); h, GE65D vs. GCT ( $p < 0,01$ ); GE65D vs. GCT ( $p < 0,001$ ). Abreviaturas: CA3, Subdivisão 3 do Cornu Ammonis do hipocampo; GCF, grupo controle farmacológico; GE2D, grupo epilepsia 2 dias; GE5D, grupo epilepsia 5 dias; GE14D, grupo epilepsia 14 dias; GE35D, grupo epilepsia 35 dias; GE65D, grupo epilepsia 65 dias



Fonte: Tessarin et al, 2023

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, por meio da técnica de imunohistoquímica, foi revelado que os animais pertencentes aos grupos que experimentaram *status epilepticus* (SE) apresentaram um aumento notável de astrócitos hipertrofiados (astrócitos reativos) imunorreativos a LPHN-1, proeminente nos grupos GE5D e GE14D. Importante destacar que esses astrócitos reativos persistiram durante todo o período de estudo, sendo especialmente prevalentes em áreas que exibiam degeneração neuronal aguda ou crônica, abrangendo não apenas o complexo hipocampal, mas também os córtices sensoriais, motores, associativos, piriformes e entorrinais, além dos núcleos lateral e anterodorsal do tálamo (dados não apresentados). Estes achados estão em consonância com estudos prévios (SCHOLL; DUDEK; EKSTRAND, 2013; WANG *et al.*, 2008) que também identificaram essas áreas neuronais com degeneração. É importante notar que essas áreas de degeneração neuronal estão consistentemente circundadas por astrócitos reativos imunopositivos para LPHN-1, especialmente nos grupos afetados pela epilepsia, como GE14D, GE35D e GE65D (dados não apresentados). Essas descobertas enfatizam uma relação intrincada entre a ativação dos astrócitos e os processos patológicos associados à epilepsia. Estudos anteriores têm consistentemente documentado a presença de astrócitos reativos em fases tanto precoces quanto tardias da epilepsia, o que corrobora os achados deste estudo (CLASADONTE *et al.*, 2016; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2017; LI; LIU, 2019; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; VIZUETE *et al.*, 2018). Os dados imunohistoquímicos revelaram uma imunoreatividade persistente ao LPHN-1 em astrócitos reativos distribuídos de maneira uniforme no complexo hipocampal nos animais dos grupos GE2D, GE5D e apresentando um padrão irregular e distinto entre animais do mesmo grupo experimental em GE14D, GE35D e GE65D. Com base nessa marcante imunomarcagem de astrócitos reativos, é plausível inferir que o sistema proteico Ten-2/LPHN-1 desempenha um papel relevante após a ocorrência do SE. Pesquisas anteriores também demonstraram a presença de astrócitos reativos com imunoreatividade para Ten-2-LI ou LPHN-1 após a indução de lesão por inserção de agulha no córtex cerebral de ratos adultos (TESSARIN *et al.*, 2019).

É relevante observar que, no presente estudo, não se observou um aumento na expressão de LPHN-1 em neurônios ou em células microgliais e

oligodendrócitos. Isso sugere que os astrócitos reativos são as principais células no hipocampo em que a imunorreatividade ao LPHN-1 está significativamente aumentada após a indução do SE, similarmente ao aumento da imunorreatividade a Ten-2 nessas mesmas células<sup>†</sup>. A interação heterofílica entre Teneurin-2/TCAP-2 e seu receptor endógeno LPHN-1 tem sido objeto de vários estudos recentes. A família de receptores pós-sinápticos acoplados à proteína G de adesão (aGPCR) inclui membros como LPHN-1, LPHN-2 e LPHN-3, conhecidos como latrofilinas (LPHNs) (SILVA; USHKARYOV, 2010). Essas informações contextualizam a importância da interação entre Teneurin-2/TCAP-2 e LPHN-1 no contexto das respostas celulares em condições patológicas, como a epilepsia, e podem fornecer insights valiosos para a compreensão dos mecanismos subjacentes a essas condições.

A LPHN-1 é predominantemente expressa no cérebro, desempenhando um papel fundamental na formação de circuitos neurais e na migração neuronal. Essa função é mediada por interações heterofílicas com diversas moléculas, incluindo teneurinas, neurexina, fibronectina e proteínas transmembrana ricas em leucina (FRLT) (BOUCARD; MAXEINER; SÜDHOF, 2014; HUSIĆ; BARSYTE-LOVEJOY; LOVEJOY, 2019; LI *et al.*, 2018; MORENO-SALINAS *et al.*, 2019; SANDO; SÜDHOF, 2021; SILVA; USHKARYOV, 2010; VYSOKOV *et al.*, 2016; WOELFLE *et al.*, 2015). A interação entre teneurinas e LPHN não se limita à adesão intercelular na sinapse, mas também pode afetar a sinalização intracelular nos neurônios, influenciando os níveis de cálcio e/ou vias do AMPc (LI *et al.*, 2018; MORENO-SALINAS *et al.*, 2019; VYSOKOV *et al.*, 2018). Um estudo anterior revelou a existência de uma variante de splicing da Ten-2, chamada de Lasso, que interage principalmente com a LPHN-1, modulando o influxo de cálcio na região pré-sináptica (SILVA *et al.*, 2011). Em uma análise *in vitro* de astrócitos cerebelares imortalizados, foi demonstrado que essas células expressam TCAP-1-4 e respondem ao tratamento com TCAP-1, resultando em um aumento significativo nos níveis de cálcio intracelular, observado 3 e 6 minutos após o tratamento com TCAP-1 (TESSARIN *et al.*, 2019). Esses achados ressaltam a complexidade das interações envolvendo a LPHN-1 e suas implicações no funcionamento do SNC.

---

<sup>†</sup> TESSARIN *et al.*, 2023, em submissão

É crucial destacar que a sequência TCAP das teneurinas desempenha um papel fundamental na interação com ADGRL, contribuindo para a estabilização celular e seus papéis funcionais (HUSIĆ; BARSYTE-LOVEJOY; LOVEJOY, 2019; SILVA *et al.*, 2011). Em um estudo conduzido em nosso laboratório, observou-se a colocalização de Ten-2 e LPHN-1 em astrócitos reativos, o que sugere a possibilidade de um mecanismo de autoestimulação ou autoinibição dessas células por meio desse sistema de sinalização. Essa interação pode desempenhar um papel crítico na manutenção da homeostase cerebral após os efeitos prejudiciais da indução do status epilepticus pelo modelo LiCl-pilocarpina<sup>‡</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado que os astrócitos também desempenham um papel significativo em convulsões e transtornos epiléticos (PURNELL; ALVES; BOISON, 2023; SANO *et al.*, 2021; SANZ; GARCIA-GIMENO, 2020; VERHOOG *et al.*, 2020). Os astrócitos liberam gliotransmissores por meio de sinapses tripartidas, onde suas extensões celulares distais se aproximam da fenda sináptica. Entre esses gliotransmissores estão o glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e vários outros neuromoduladores que podem influenciar as funções sinápticas nos neurônios (ARAQUE *et al.*, 1999, 2014; BEN HAIM *et al.*, 2015; BOISON, 2008; COVELO; ARAQUE, 2016; GUNDERSEN; STORM-MATHISEN; BERGERSEN, 2015; MITTERAUER, 2015). Nesse contexto, a influência dos astrócitos na sinapse tripartida pode ser uma resposta à hiperatividade neuronal, como a observada no modelo de epilepsia induzida por LiCl-pilocarpina, que resulta em toxicidade devido ao aumento de cálcio no espaço extracelular (SCORZA *et al.*, 2009). Essas interações complexas entre astrócitos e neurônios podem desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia da epilepsia. É plausível supor que a interação entre Ten-2/TCAP-2 e LPHN-1 em astrócitos reativos possa estar associada ao influxo de cálcio, influenciando assim as funções sinápticas em neurônios hiperativos em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC). Essa interação pode contribuir para a plasticidade sináptica e fornecer neuroproteção, uma vez que astrócitos reativos têm a capacidade de liberar fatores que protegem o SNC e auxiliam na manutenção dos circuitos neuronais (CHIARELI *et al.*, 2021). Além disso, não se

---

<sup>‡</sup> TESSARIN *et al.*, 2023, em submissão

pode descartar a possibilidade de uma interação mecânica mediada entre Ten-2/TCAP-2 e LPHN-1, considerando que astrócitos reativos com imunorreatividade para Ten-2-LI ou LPHN-1 apresentam prolongamentos celulares que se entrelaçam entre si<sup>§</sup>. Os astrócitos também estabelecem comunicação entre si por meio de junções comunicantes, o que facilita o tráfego de substâncias como glicose, metabólitos e diversas moléculas essenciais que podem circular entre células próximas ou distantes, formando redes sinciciais. Essa capacidade dos astrócitos desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase cerebral e no metabolismo energético (PEKNY; NILSSON, 2005). Vale ressaltar que essas funções podem ser estimuladas ou inibidas em condições de distúrbios do SNC (COVELO; ARAQUE, 2016; KIELIAN; ESEN, 2004). Assim, o aumento na imunorreatividade do sistema proteico Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 em astrócitos reativos pode desempenhar um papel importante não apenas nas interações mecânicas, mas também nas interações funcionais entre essas células, contribuindo para a restauração da homeostase local no contexto das alterações patológicas do SNC.

É válido especular que o "splice variant" da Ten-2, conhecido como Lasso, possa ser liberado para o espaço extracelular e interagir com o LPHN-1 modulando os níveis de cálcio e ATP intracelular em neurônios. A colocalização de Ten-2 e LPHN-1 nos mesmos astrócitos reativos sugere a possibilidade de um mecanismo autoregulatório, como mencionado anteriormente. Peptídeos bioativos gerados pela proteólise da Ten-2 em astrócitos reativos podem interagir com LPHN-1, desencadeando uma estimulação autócrina que ativa diversos parâmetros celulares para manter a homeostase do complexo hipocampal, após os efeitos prejudiciais causados pela persistente hiperexcitabilidade neuronal induzida pelo LiCl-pilocarpina. É bem conhecido que a pilocarpina induz estresse neuronal e morte celular. Um dos mecanismos envolvidos nesse processo é a ativação dos receptores NMDA pela liberação de glutamato nas sinapses, o que resulta no influxo de cálcio nas células nervosas e na ativação de numerosos sistemas enzimáticos que culminam em apoptose e necrose neuronal (SCORZA *et al.*, 2009). Durante esses processos, os neurônios ativam mecanismos de homeostase intracelular de cálcio para protegerem-se do estresse metabólico e funcional. Esses mecanismos incluem a redução dos níveis de cálcio intracelular por meio de Ca<sup>2+</sup> ATPases, como a

---

<sup>§</sup> TESSARIN *et al.*, 2023, em submissão

ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoendoplasmático (SR), a ATPase de transporte de cálcio (SERCA) e a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da membrana plasmática (PMCA) (SCORZA *et al.*, 2009). A atividade do PMCA possibilita o efluxo de cálcio dos neurônios para o espaço extracelular, e essa atividade enzimática é evidente após convulsões induzidas pela pilocarpina, tanto na fase aguda quanto na fase tardia após a indução do status epilepticus (SE) (SCORZA *et al.*, 2009). É plausível considerar que o aumento na síntese das proteínas do sistema Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 em astrócitos reativos pode servir como um mecanismo de proteção em sinapses tripartites, auxiliando na captação de cálcio extracelular e, assim, potencialmente minimizando a morte neuronal induzida pela pilocarpina. Essa resposta protetora pode estar relacionada à regulação dos níveis de cálcio intracelular, que desempenham um papel crítico na sobrevivência das células nervosas. Por outro lado, a sinalização mediada pelo cálcio intracelular em astrócitos reativos pode modular múltiplas vias intracelulares potenciais e influenciar o destino desse íon, direcionando-o para compartimentos celulares de armazenamento de cálcio. Esse complexo sistema de regulação do cálcio intracelular em astrócitos pode ter implicações significativas na resposta aos desafios patológicos, como os induzidos pela pilocarpina, e na manutenção da homeostase cerebral. Em resumo, a interação entre astrócitos reativos, o sistema Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 e a regulação do cálcio intracelular representa um aspecto importante na resposta adaptativa do sistema nervoso central a condições patológicas, como convulsões induzidas por pilocarpina, e pode desempenhar um papel crucial na proteção neuronal e na manutenção do equilíbrio no ambiente cerebral.

Os processos terminais dos astrócitos, conhecidos como pés vasculares dos astrócitos, desempenham um papel fundamental no estabelecimento e na manutenção da barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é essencial para regular a permeabilidade na interface entre os vasos sanguíneos e o tecido nervoso do sistema nervoso central (SNC) (DEL ZOPPO; MILNER, 2006; GIOVANNONI; QUINTANA, 2020; GONDO *et al.*, 2014; JANZER; RAFF, 1987; KÁLMÁN *et al.*, 2011; SERLIN *et al.*, 2015). A integridade da BHE é fundamental para controlar a passagem de moléculas e substâncias do sangue para o tecido cerebral. Em várias condições patológicas, como acidente vascular cerebral, infecções e epilepsia, a permeabilidade da BHE pode ser comprometida, levando a alterações na difusão de

várias moléculas dos vasos sanguíneos para o tecido cerebral (BREUER *et al.*, 2017; CAVAGLIA *et al.*, 2001; CHODOBSKI; ZINK; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011). Em modelos animais de epilepsia, induzidos por substâncias como o ácido caínico, pilocarpina ou estimulação elétrica, foi observada a diminuição da expressão das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da distroglicana, bem como alterações na permeabilidade da BHE minutos após o status epilepticus (SE). Essas alterações na BHE podem persistir por vários dias em áreas como o hipocampo, córtex entorrinal, amígdala e tálamo (AGRAWAL *et al.*, 2006; GONDO *et al.*, 2014; HANDFORTH; TREIMAN, 1995; KÁLMÁN *et al.*, 2011; LASSMANN *et al.*, 1984; MICHALAK *et al.*, 2013; MILNER *et al.*, 2008; NDODE-EKANE *et al.*, 2010; SZABO; KÁLMÁN, 2008; VAN LANDINGHAM; LOTHMAN, 1991; VAN VLIET; ARONICA; GORTER, 2015). Essas alterações na BHE podem ser um fator importante na patogênese da epilepsia, permitindo a entrada de substâncias nocivas no cérebro e contribuindo para a hiperexcitabilidade neuronal. Portanto, compreender o papel dos astrócitos e seus processos terminais na regulação da BHE é crucial para desvendar os mecanismos subjacentes à epilepsia e pode oferecer alvos terapêuticos potenciais para o tratamento da doença. A observação da colocalização de astrócitos reativos imunopositivos para LPHN-1 projetando suas extensões celulares para vasos sanguíneos no córtex cerebral e hipocampo é intrigante e sugere a possibilidade de que esses pés-vasculares dos astrócitos desempenhem um papel compensatório em resposta à diminuição da expressão da distroglicana. A interação entre Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 pode estar contribuindo para restabelecer a função normal da barreira hematoencefálica (BHE) e a permeabilidade cerebral. Estudos anteriores demonstraram interações heterofílicas entre a teneurina e a distroglicana, que desempenham um papel na regulação da síntese de colágeno tipo IV em *Caenorhabditis elegans*, sendo também observadas nos testículos de ratos adultos, possivelmente regulando o tamanho testicular e a síntese de testosterona. A colocalização de TCAP-1 e  $\beta$ -distroglicanos também foi observada em células hipocâmpais, o que sugere uma função na organização do citoesqueleto. Nesse contexto, é plausível sugerir que a interação entre Ten-2 e LPHN-1 em astrócitos reativos pode estar contribuindo para a regulação da permeabilidade da BHE. Essa interação pode ser um mecanismo compensatório para manter a integridade da BHE, especialmente em condições patológicas, como epilepsia induzida por

substâncias como a pilocarpina. Investigações adicionais que se concentrem nas possíveis interações entre Ten-2 e LPHN-1 em astrócitos reativos e distroglicanas presentes em células endoteliais e/ou pericitos na BHE são essenciais para compreender melhor o papel neuroprotetor potencial do sistema Ten-/TCAP-2/LPHN-1 no sistema nervoso central. Isso pode abrir novas perspectivas de pesquisa e potencialmente levar a estratégias terapêuticas para melhorar a função da BHE e a proteção cerebral em condições neurológicas comprometidas.

Estudos futuros que utilizem abordagens metodológicas atuais, exemplo animais com edições gênicas das latrofilinas e teneurinas, serão cruciais para aprofundar nossa compreensão das funções detalhadas de Ten, TCAP e LPHN-1 em distúrbios cerebrais, incluindo a epilepsia. O trabalho desenvolvido introduz um novo sistema proteico quanto aos mecanismos subjacentes à epilepsia e oferecer “insights” valiosos sobre como modular esse sistema de sinalização para prevenir ou minimizar os efeitos prejudiciais dos transtornos convulsivos.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que através da técnica da imunoperoxidase indireta que a imunorreatividade a LPHN-1, considerado o principal ligante endógeno de Teneurina-2/TCAP-2, estava aumentada em astrócitos reativos na Subdivisão CA3 do complexo hipocampal de ratos adultos, principalmente dois e cinco dias após o *status epilepticus* usando o modelo de epilepsia LiCl-pilocarpina. Dentro dos limites desse estudo, pode-se especular que o sistema Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 pode ser ativado em astrócitos reativos como um mecanismo neuroprotetor em certos transtornos epiléticos. Estudos adicionais utilizando novas abordagens metodológicas são necessários para investigar as funções detalhadas do sistema proteico da Ten-2/TCAP-2/LPHN-1 em distúrbios cerebrais e avaliar este sistema de sinalização como um alvo terapêutico para prevenir ou minimizar os efeitos deletérios de certos transtornos convulsivos/epilepsia.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. *et al.* Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 1007-1019, 2006.
- AMTUL, Z.; HEPBURN, J. D. Protein markers of cerebrovascular disruption of neurovascular unit: immunohistochemical and imaging approaches. *Reviews in the Neurosciences*, v. 25, n. 4, p. 481-507, 2014.
- ANDRÉS-BENITO, P. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. **Aging**, v. 9, n. 3, p. 823, 2017.
- ARAQUE, A. *et al.* Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 77, n. 9, p. 699-706, 1999.
- ARAQUE, A. *et al.* Gliotransmitters travel in time and space. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 728-739, 2014.
- BAUMGARTNER, S. *et al.* Tenm, a Drosophila gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 16, p. 3728-3740, 1994.
- BEN HAIM, L. *et al.* Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 278, 2015.
- BOISON, D. The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. **Progress in Neurobiology**, v. 84, n. 3, p. 249-262, 2008.
- BOUCARD, A. A.; MAXEINER, S.; SÜDHOF, T. C. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 1, p. 387-402, 2014.
- BREUER, H. *et al.* Multimodality imaging of blood–brain barrier impairment during epileptogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 37, n. 6, p. 2049-2061, 2017.
- CAVAGLIA, M. *et al.* Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. **Brain Research**, v. 910, n. 1-2, p. 81-93, 2001.

CHAND, D. *et al.* C-terminal processing of the teneurin proteins: independent actions of a teneurin C-terminal associated peptide in hippocampal cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 52, p. 38-50, 2013.

CHERUBINI, E.; MILES, R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 19, 2015.

CHIARELI, R. A. *et al.* The role of astrocytes in the neurorepair process. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 665795, 2021.

CHIQUET-EHRISMANN, R. *et al.* Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. **Cell Regulation**, v. 2, n. 11, p. 927-938, 1991.

CHODOBSKI, A.; ZINK, B. J.; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J. Blood–brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. **Translational Stroke Research**, v. 2, p. 492-516, 2011.

CLASADONTE, J. *et al.* Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 91, p. 315-325, 2016.

COVELO, A.; ARAQUE, A. Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. **Neuroscience**, v. 323, p. 62-66, 2016.

CURIA, G. *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-157, 2008.

DEL ZOPPO, G. J.; MILNER, R. Integrin–matrix interactions in the cerebral microvasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 9, p. 1966-1975, 2006.

DEPEW, A. T.; AIMINO, M. A.; MOSCA, T. J. The tenets of teneurin: conserved mechanisms regulate diverse developmental processes in the *Drosophila* nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 27, 2019.

GARCÍA-GARCÍA, L. *et al.* Metyrapone prevents brain damage induced by status epilepticus in the rat lithium-pilocarpine model. **Neuropharmacology**, v. 123, p. 261-273, 2017.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The role of astrocytes in CNS inflammation. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 805-819, 2020.

GONDO, A. *et al.* Sustained down-regulation of  $\beta$ -dystroglycan and associated dysfunctions of astrocytic endfeet in epileptic cerebral cortex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30279-30288, 2014.

GUNDERSEN, V.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H. Neuroglial transmission. *Physiological Reviews*, v. 95, n. 3, p. 695-726, 2015.

GUNN, B. G.; BARAM, T. Z. Stress and seizures: space, time and hippocampal circuits. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 11, p. 667-679, 2017.

HANDFORTH, A.; TREIMAN, D. M. Functional mapping of the late stages of status epilepticus in the lithium-pilocarpine model in rat: a  $^{12}\text{C}$ -2-deoxyglucose study. **Neuroscience**, v. 64, n. 4, p. 1075-1089, 1995.

HOGG, D. W. *et al.* A novel role of the corticotrophin-releasing hormone regulating peptide, teneurin C-terminal associated peptide 1, on glucose uptake into the brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 4, p. e12579, 2018.

HUSIĆ, M.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; LOVEJOY, D. A. Teneurin C-terminal associated peptide (TCAP)-1 and latrophilin interaction in HEK293 Cells: evidence for modulation of intercellular adhesion. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 22, 2019.

JACKSON, V. A. *et al.* Structures of Teneurin adhesion receptors reveal an ancient fold for cell-cell interaction. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1079, 2018.

JANZER, R. C.; RAFF, M. C. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, v. 325, n. 6101, p. 253-257, 1987.

KÁLMÁN, M. *et al.* Alterations of the perivascular dystrophin-dystroglycan complex following brain lesions. An immunohistochemical study in rats. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 11, p. 1435-1452, 2011.

KIELIAN, T.; ESEN, N. Effects of neuroinflammation on glia–glia gap junctional intercellular communication: a perspective. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2-3, p. 429-436, 2004.

KINBOSHI, M.; IKEDA, A.; OHNO, Y. Role of astrocytic inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels in epileptogenesis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 626658, 2020.

KING, T. W. *et al.* Quantification of vascular density using a semiautomated technique for immunostained specimens. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 24, n. 1, p. 39-48, 2002.

KOBAYASHI, K. *et al.* Action of antiepileptic drugs on neurons. **Brain and Development**, v. 42, n. 1, p. 2-5, 2020.

KONDO, T. *et al.* Modeling Alexander disease with patient iPSCs reveals cellular and molecular pathology of astrocytes. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2016.

LASSMANN, H. *et al.* The role of brain edema in epileptic brain damage induced by systemic kainic acid injection. **Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 691-704, 1984.

LI, F.; LIU, L. Comparison of kainate-induced seizures, cognitive impairment and hippocampal damage in male and female mice. **Life Sciences**, v. 232, p. 116621, 2019.

LI, J. *et al.* Structural basis for teneurin function in circuit-wiring: a toxin motif at the synapse. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 735-748. e15, 2018.

MAGAKI, S. D.; WILLIAMS, C. K.; VINTERS, H. V. Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain. **Neuropharmacology**, v. 134, p. 218-225, 2018.

MICHALAK, Z. *et al.* Spatio-temporally restricted blood–brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. **Epilepsy Research**, v. 103, n. 2-3, p. 167-179, 2013.

MILNER, R. *et al.* Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. **Stroke**, v. 39, n. 1, p. 191-197, 2008.

MITTERAUER, B. J. Model of the reticular formation of the brainstem based on glial–neuronal interactions. **Cognitive Computation**, v. 7, n. 1, p. 64-73, 2015.

MORENO-SALINAS, A. L. *et al.* Latrophilins: a neuro-centric view of an evolutionary conserved adhesion G protein-coupled receptor subfamily. **Frontiers in Neuroscience**, p. 700, 2019.

MOSCA, T. J. On the Teneurin track: a new synaptic organization molecule emerges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 204, 2015.

NDODE-EKANE, X. E. *et al.* Vascular changes in epilepsy: functional consequences and association with network plasticity in pilocarpine-induced experimental epilepsy. **Neuroscience**, v. 166, n. 1, p. 312-332, 2010.

NEAL, M.; RICHARDSON, J. R. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1864, n. 2, p. 432-443, 2018.

NOGUCHI, H.; LI, G.; PLEASURE, S. J. Migration in the hippocampus. *In: RUBENSTEIN, J. et al. (Edit.). Cellular migration and formation of axons and dendrites: comprehensive developmental neuroscience*. 2. ed. London: Science Direct, 2020. p. 365-379.

PARK, Y. K.; GODA, Y. Integrins in synapse regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 745-756, 2016.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-434, 2005.

PLATA, A. *et al.* Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca<sup>2+</sup> activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 215, 2018.

PURNELL, B. S.; ALVES, M. P.; BOISON, D. Astrocyte-neuron circuits in epilepsy. **Neurobiology of Disease**, p. 106058, 2023.

SANDO, R.; JIANG, X.; SÜDHOF, T. C. Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins. **Science**, v. 363, n. 6429, p. eaav7969, 2019.

SANDO, R.; SÜDHOF, T. C. Latrophilin GPCR signaling mediates synapse formation. **Elife**, v. 10, p. e65717, 2021.

SANO, F. *et al.* Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus. **JCI Insight**, v. 6, n. 9, 2021.

SANZ, P.; GARCIA-GIMENO, M. A. Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4096, 2020.

SATZ, J. S. *et al.* Distinct functions of glial and neuronal dystroglycan in the developing and adult mouse brain. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 43, p. 14560-14572, 2010.

SCHOLL, E. A.; DUDEK, F. E.; EKSTRAND, J. J. Neuronal degeneration is observed in multiple regions outside the hippocampus after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in the immature rat. **Neuroscience**, v. 252, p. 45-59, 2013.

SCORZA, F. A. *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, p. 345-365, 2009.

SERLIN, Y. *et al.* Anatomy and physiology of the blood–brain barrier. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 38, p. 2-6, 2015.

SILVA, J. P. *et al.* Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 12113-12118, 2011.

SILVA, J. P.; USHKARYOV, Y. A. The latrophilins, “split-personality” receptors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 706, p. 59-75, 2010.

SINGH, R. *et al.* Fibroblast growth factor 22 contributes to the development of retinal nerve terminals in the dorsal lateral geniculate nucleus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 61, 2012.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, p. 7-35, 2010.

SUGITA, Shuzo *et al.* A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. **The Journal of cell biology**, v. 154, n. 2, p. 435-446, 2001.

SUPRIYA, S. *et al.* Epilepsy detection from EEG using complex network techniques: A review. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, v. 16, p. 292-306, 2021.

SWANSON, L. W. Structure of the rat brain. 1st edition, **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, Netherlands, 1992.

SZABO, A.; KALMAN, M. Post traumatic lesion absence of  $\beta$ -dystroglycan-immunopositivity in brain vessels coincides with the glial reaction and the immunoreactivity of vascular laminin. **Current Neurovascular Research**, v. 5, n. 3, p. 206-213, 2008.

TESSARIN, G. W. L. *et al.* A putative role of Teneurin-2 and its related proteins in astrocytes. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 655, 2019.

TUCKER, R. P. Teneurins: domain architecture, evolutionary origins, and patterns of expression. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 938, 2018.

TURSKI, L. *et al.* Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-171, 1989.

VAN LANDINGHAM, K. E.; LOTHMAN, E. W. Self-sustaining limbic status epilepticus.: I. Acute and chronic cerebral metabolic studies: Limbic hypermetabolism and neocortical hypometabolism. **Neurology**, v. 41, n. 12, p. 1942-1942, 1991.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. Blood–brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 38, p. 26-34, 2015.

VERHOOG, Q. P. *et al.* Astrocytes as guardians of neuronal excitability: mechanisms underlying epileptogenesis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 591690, 2020.

VIZUETE, A. F. K. *et al.* Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 1-14, 2018.

VYSOKOV, N. V. *et al.* Proteolytically released Lasso/teneurin-2 induces axonal attraction by interacting with latrophilin-1 on axonal growth cones. **Elife**, v. 7, p. e37935, 2018.

VYSOKOV, N. V. *et al.* The mechanism of regulated release of Lasso/Teneurin-2. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, p. 59, 2016.

WANG, L. *et al.* Teneurin proteins possess a carboxy terminal sequence with neuromodulatory activity. **Molecular Brain Research**, v. 133, n. 2, p. 253-265, 2005.

WANG, L. *et al.* Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. **Brain Research**, v. 1241, p. 157-167, 2008.

WOELFLE, R. *et al.* Ancient interaction between the teneurin C-terminal associated peptides (TCAP) and latrophilin ligand-receptor coupling: a role in behavior. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 146, 2015.

## ANEXOS

### ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado **"Avaliação das teneurinas e de suas proteínas de interação no sistema nervoso central de ratos adultos durante indução experimental de neuroinflamação e epilepsia"**, Processo FOA nº 2018-847, sob responsabilidade de Cláudio Aparecido Casatti e colaboração de Gestter Willian Lattari Tessarin, Alaíde Gonçalves, José de Anchieta de Castro Horta Júnior, David Alan Lovejoy, David Willian Hogg, Bárbara Stéfani Silva da Costa, Vitória Morelli Savenhago e Viviam Barbuglio Del Priore foi aprovado pela CEUA em 22 de Agosto de 2023.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of teneurins and theirs interaction proteins in the adult rat central nervous system with experimentally-induced neuroinflammation and epilepsy"**, Process FOA nº 2018-847, under the supervision of Cláudio Aparecido Casatti and collaboration of Gestter Willian Lattari Tessarin, Alaíde Gonçalves, José de Anchieta de Castro Horta Júnior, David Alan Lovejoy, David Willian Hogg, Bárbara Stéfani Silva da Costa, Vitória Morelli Savenhago and Viviam Barbuglio Del Priore had its the Final Report approved by the CEUA on August 22, 2023.

**Prof. Assoc. Marcos Franke Pinto**  
Vice-Coordenador da CEUA  
CEUA Vice-Coordinator

---

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: [ceua.foa@unesp.br](mailto:ceua.foa@unesp.br)

## Anexo B – Paper a ser submetido a revista International Journal of Molecular Sciences.

*PLOsONE*

TENEURIN-2 AND ITS RELATED PROTEINS IN REACTIVE ASTROCYTES IN THE HIPPOCAMPUS AND CEREBRAL CORTEX IN A LITHIUM CHLORIDE-PILOCARPINE RAT MODEL OF EPILEPSY. AN IMMUNOHISTOCHEMICAL, HISTOCHEMICAL AND GENE EXPRESSION ANALYSIS

Gestter Willian Lattari Tessarin<sup>1,2,3,\*</sup>, David Willian Hogg<sup>4</sup>, Alaide Gonçalves<sup>1</sup>, Daniel Vieira Casatti<sup>1</sup>, Bárbara Stéfani Silva da Costa<sup>1</sup>, Vitória Morelli Savenhago<sup>1</sup>, Viviam Barbuglio Del Priore<sup>1</sup>, David Alan Lovejoy<sup>4</sup>, José Anchieta de Castro Horta-Júnior<sup>2</sup>, Cláudio Aparecido Casatti<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University (UNESP), 16015-050, Araçatuba, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

<sup>3</sup>University Center North Paulista (Unorp), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Cell and Systems Biology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

\* Corresponding author: [claudio.casatti@unesp.br](mailto:claudio.casatti@unesp.br)

[Number of words: 16,223](#)

[Number of figures: 11](#)

[Number of tables: 1](#)

Keywords: Cerebral cortex; Epilepsy; Hippocampus; adhesion G protein-coupled receptor L; Latrophilin; Lithium; Pilocarpine; Rats; Reactive astrocytes; *Status epilepticus*; TCAP; Teneurin;

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.