

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**SARAH FONSECA MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA DE mdr1, TNF- $\alpha$ , ATP6ap2  
E  $\beta$ -ACTINA EM RATO WISTAR AUDIGÊNICO**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2014**

**SARAH FONSECA MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA DE *mdr1*, TNF- $\alpha$ , ATP6 ap2 E  $\beta$ -  
ACTINA EM RATO WISTAR AUDIOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Co-orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

**BELO HORIZONTE – MG**

**2014**

*Dedico este trabalho a todos os pacientes com epilepsia que nunca perderam a esperança de que um dia alcançarão a cura.*

*Dedico também aos familiares destes pacientes que sempre dão forças para não desistirem de serem fortes!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus a quem dou toda honra, glória e majestade, porque foi Ele quem me deu vida, me resgatou e sei que me ama incondicionalmente! Agradeço porque Ele me conduziu e guardou por todo este caminho e sei que continuará. Obrigada pelas grandes experiências que me fortaleceram e amadureceram!

Aos meus pais que me amam, por investirem em mim e que sempre me apoiaram nesta jornada. Obrigada por serem meus pais, amo vocês!!

Ao Professor André por ter aceitado a orientação, por apresentar-me ao NNC e pelo suporte dado nestes dois anos e meio de trabalho. Sei que foi um desafio todo esse trabalho desenvolvido.

Ao Professor Almir de Sousa Martins pela coorientação durante todo o momento no laboratório ensinando todo o trabalho prático e teórico. Agradeço por está aberto a novas ideias e saber do que realmente gosto, pois por meio do programa de pós graduação em Neurociências pude aprender muitas coisas fantásticas. Obrigada pela ajuda durante este trabalho, creio que várias portas se abrirão.

Ao NUFIGEN que hoje possui muitos trabalhos cada vez mais consistentes e pelas portas abertas, o que permitiu o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao NNC por me receber bem e foi onde eu aprendi muitas coisas na área acadêmica. Em especial agradeço a Talita, Ana Raquel, Cristiane, Paula, Daniel e Gabriel pelo suporte no laboratório.

A Deborah, por toda ajuda na realização deste trabalho (manhã, tarde e noite), pela companhia nos momentos mais difíceis, pela amizade e apoio porque sei que posso contar contigo. Obrigada por toda ajuda independente do dia de experimento você estava lá.

A Fabiana e ao Francisco, pela amizade, ajuda nos experimentos até mesmo aos sábados e por todo esse tempo junto de aprendizagem.

Aos meus irmãos Anna e Abraão que são especiais nesta carreira. Obrigada por fazerem parte da minha vida, amo vocês! Claro não poderia esquecer o Ricardo, uma pessoa muito especial para nossa família.

Aos amigos e familiares pelo incentivo neste trabalho e que de certa forma contribuíram para eu chegar até aqui, alcançando mais uma vitória. Em especial agradeço as orações de vocês porque sei que por meio desse caminho o Senhor sustentou em todas as coisas.

A secretaria de pós-graduação em Neurociência por todas as ajudas prestadas nestes dois anos e meio.

A FAPEMIG e CAPES pela bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação exclusiva no desenvolvimento deste trabalho.

A FAPEMIG/FAPESP pelo financiamento do projeto.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA DE EPILEPSIA.....	17
1.2 TRATAMENTOS PARA EPILEPSIA.....	19
1.2.1 <i>Refratariedade</i> .....	19
1.3 MODELOS DE EPILEPSIA EM ANIMAIS.....	21
1.4 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR).....	24
1.5 EPILEPSIA E INFLAMAÇÃO.....	29
1.6 RECEPTOR DE PRO-RENINA NA EPILEPSIA.....	30
1.7 B-ACTINA COMO AVALIADORA DA PLASTICIDADE TECIDUAL.....	31
1.8 INTERFERÊNCIA POR RNA.....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	35
4.2 ANIMAIS.....	37
4.2.1 <i>Grupos experimentais</i> .....	37
4.2.2 <i>Estímulo sonoro e análise comportamental</i> .....	38
4.2.3 <i>Coleta de materiais</i> .....	39
4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	39
4.3.1 <i>Extração de RNA total e tratamento com DNase</i> .....	39
4.3.2 <i>Oligonucleotídeos iniciadores para transcrição reversa (RT) e PCR em Tempo Real (PCRtr)</i> 40	
4.3.3 <i>Transcrição reversa (RT)</i> .....	41
4.3.4 <i>PCR em tempo real (PCRtr)</i> .....	42
4.4 BLOQUEIO DA TRADUÇÃO DOS TRANSCRITOS (siRNA).....	42
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
5.1 EXPRESSÃO DE MRNAs DOS GENES QUE CODIFICAM <i>MDR1</i> , <i>TNF-A</i> E <i>ATP6AP2</i> EM ANIMAIS WAR COM CINCO DIAS APÓS O TERCEIRO ESTÍMULO.....	44
5.2 VERIFICAÇÃO DA SÍNTESE DO siRNA PARA <i>MDR1</i> .....	45
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNAs DOS GENES QUE CODIFICAM <i>MDR1</i> , <i>TNF-A</i> , <i>ATP6AP2</i> E <i>B-ACTINA</i> NA PQ NOS ANIMAIS WISTAR CONTROLE COMPARADO COM WISTAR TRATADO; WAR 0,23 CONTROLE E TRATADO; WAR 0,85 CONTROLE E TRATADO COM 25 DIAS APÓS O TERCEIRO ESTÍMULO.....	46
5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNAs DOS GENES QUE CODIFICAM <i>MDR1</i> , <i>TNF-A</i> , <i>ATP6AP2</i> E <i>B-ACTINA</i> NA PQ NOS ANIMAIS WAR 0,23 CONTROLE E TRATADO; WAR 0,85 CONTROLE E TRATADO COM 25 DIAS APÓS O TERCEIRO ESTÍMULO.....	49
OS RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS EXPRESSÕES DOS GENES QUE CODIFICAM <i>MDR1</i> (FIGURA 10), <i>TNF-A</i> (FIGURA 11), <i>ATP6AP2</i> (FIGURA 12) E <i>B-ACTINA</i> (FIGURA 13) NA PQ DOS ANIMAIS WAR E WISTAR COM 25 DIAS APÓS O TERCEIRO ESTÍMULO FORAM SIGNIFICATIVOS PARA O <i>MDR1</i> PARA WAR 0,23 CONTROLE	

COMPARADO AO WAR 0,85 CONTROLE ( $P < 0,05$ ) E COMPARADO AO WAR 0,85 TRATADO ( $P < 0,01$ ). EM AMBOS O MDR1 ESTÁ DIMINUÍDO EM RELAÇÃO AO WAR $SI \leq 0,23$ CONTROLE. JÁ A EXPRESSÃO DE MRNA DE TNF-A E DE ATP6AP2 ESTÁ DIMINUÍDA APENAS NO WAR $SI \geq 0,85$ CONTROLE COMPARADO COM O WAR $SI \leq 0,23$ CONTROLE. ....	49
5.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O MRNA DE MDR1 NA PQ ENTRE ANIMAIS COM 5 DIAS E 25 DIAS APÓS O TERCEIRO <i>SCREENING</i> .....	51
5.6 PERÍODO DE LATÊNCIA ENTRE ESTÍMULO AUDIOGÊNICO E RESPOSTA EPILEPTOGÊNICA .....	53
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>60</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## RESUMO

Epilepsias são desordens causadas por descargas paroxísticas focais ou generalizadas no cérebro, refletindo em sua função. A placa quadrigêmea (PQ) está diretamente relacionada com a via auditiva e quando estimulada eletricamente, pode causar convulsões em animais normais. Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar audiogênicos (*Wistar Audiogenic Rat* - WAR) como modelo experimental de epilepsia para avaliar a expressão dos genes *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e  *$\beta$ -actina*. Estes animais apresentam índices de severidade (SI) em relação à crise causada pelo estímulo sonoro, que vão de SI $\leq$ 0,23 (resistentes) à SI $\geq$ 0,85 (sensíveis). Para se avaliar a expressão do *mdr1* e *TNF- $\alpha$*  foram analisados os córtices direito e esquerdo, hipocampo e PQ. Para se avaliar a participação destes genes na gravidade da crise, um segundo grupo de animais recebeu siRNA e suas PQs foram extraídas para análise. A gravidade das crises foi medida usando-se a escala do SI. O RNA total foi extraído pelo Trizol® e submetido a RT-PCRtr. Os resultados demonstraram que o grupo com cinco dias após o terceiro estímulo obteve maior expressão do mRNA de *TNF- $\alpha$*  (4,69 $\pm$ 1,0) e de *mdr1* (3,84 $\pm$ 0,7) na PQ de WAR SI $\geq$ 0,85 em relação ao mRNA de *TNF- $\alpha$*  (1,44 $\pm$ 0,4) e *mdr1* (1,25 $\pm$ 0,4) de WAR SI $\leq$ 0,23. No grupo com 25 dias após o terceiro estímulo, a expressão dos mesmos genes em WAR SI $\geq$ 0,85 foi menor (0,52 $\pm$ 0,1) e (0,61 $\pm$ 0,1), respectivamente. Nenhum outro tecido mostrou diferença significativa para estes genes. O mRNA de *ATP6ap2* no primeiro grupo foi sub-expresso (0,52 $\pm$ 0,04) e no segundo super-expresso em relação ao WAR SI $\leq$ 0,23 (1,01 $\pm$ 0,1). A  *$\beta$ -actina* não apresentou diferença significativa entre os subgrupos. O aumento da expressão de mRNA de *TNF- $\alpha$*  e de *mdr1* e a diminuição de *ATP6ap2* na PQ mostram que estes genes estão envolvidos no mecanismo funcional do modelo WAR na epilepsia e que o estímulo influencia na expressão desses mRNAs. A comparação tecidual mostrou que a PQ é a região alvo da diferença genética entre os WARs, pois está relacionada com a via audiogênica. Várias vias e mecanismos celulares envolvendo a região da PQ, relacionados com a epilepsia em ratos SI $\geq$ 0,85, ainda são desconhecidos e precisam ser elucidadas.

Palavras chave: WAR, *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2*,  *$\beta$ -actina*, siRNA.

## ABSTRACT

Epilepsy is a disorder caused by focal or generalized paroxysmal discharges in the brain reflecting in its function. The quadrigeminal plate is directly related to hearing pathway and when electrically stimulated, may cause similar seizures in normal animals as visualized in audiogenic rats. This study used the *Wistar Audiogenic Rats* (WAR) as an experimental model of epilepsy to analyze *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* and  *$\beta$ -actin* genes expression. Those animals present severity index (SI) related to seizures caused by sound stimuli from SI $\leq$ 0.23 (resistant) to SI $\geq$ 0.85 (sensitive). To evaluate gene expression of *mdr1* and *TNF- $\alpha$*  were analyzed right and left cortices, hippocampi and quadrigeminal plate. A second group of animals received siRNA and its quadrigeminal plates were removed for analysis. The seizure severity was analyzed by SI score. Total RNA was extracted by Trizol® and submitted to real time RT-PCR analyze. Data showed that five days after the third stimulus group had higher expression of *TNF- $\alpha$*  (4.69 $\pm$ 1.0) and *mdr1* (3.84 $\pm$ 0.7) mRNA at the quadrigeminal plate of WAR with SI $\geq$ 0.85 compared to *TNF- $\alpha$*  (1.44 $\pm$ 0.4) and *mdr1* (1.25 $\pm$ 0.4) mRNA of WAR SI $\leq$ 0.23. In the 25 days after third stimulus group, the same genes were down-regulated (0.52 $\pm$ 0.1) and (0.61 $\pm$ 0.1), respectively, in WAR with SI $\geq$ 0.85. No other tissue showed difference in the expression of these genes. *ATP6ap2* mRNA was down regulated (0.52 $\pm$ 0.04) in the first group and upregulated in the second group compared to WAR SI $\leq$ 0.23 (1.01 $\pm$ 0.1).  *$\beta$ -actin* mRNA had no significant difference in any subgroups. The higher *TNF- $\alpha$*  and *mdr1* mRNA and lower *ATP6ap2* mRNA expression in quadrigeminal plate show that these genes are involved at the functional mechanism of epilepsy in WAR model. Tissue analysis showed that quadrigeminal plate is the main region for the genetic differences observed among WARs, since it is related to the hearing pathway. Many pathways and cellular mechanisms at quadrigeminal plate linked to epilepsy in rats SI $\geq$ 0.85 are unknown and need to be understood.

Keywords: WAR, *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2*,  *$\beta$ -actin*, siRNA.

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Comportamentos observados nos animais submetidos à estimulação e respectivos índices de gravidade de acordo com Garcia-Cairasco e Sabbatini (1983) e Garcia-Cairasco e colaboradores (1996)	38
TABELA 2 – Iniciadores de Oligonucleotídeos selecionados para PCRtr.	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Propagação do impulso nervoso pela via auditiva primária. ....	23
Figura 2 – Desenho experimental dos protocolos realizados nos dois grupos. Grupo 1) animais estimulados uma vez por semana e sacrificados cinco dias após o terceiro <i>screening</i> (n=9); Grupo 2A) animais controle estimulados com intervalos de 4 dias e sacrificados 25 dias após o terceiro <i>screening</i> (n=11); Grupo 2B) animais tratados com siRNA para <i>mdr1</i> estimulados com intervalos de 4 dias e sacrificados 25 dias após o terceiro <i>screening</i> (n=11). ....	36
Figura 3 – Transfecção da dupla fita de siRNA complexado com RVG que permite a entrada do siRNA na célula do SNC , ativando a enzima DICER que reconhece o siRNA como molécula estranha tornando-a em fita simples, permitindo assim que esta fita se ligue ao mRNA celular complementar clivado pela endoribonuclease RISC, resultando no silenciamento. ....	43
Figura 4 – Quantificação da expressão de mRNA de <i>mdr1</i> , de TNF- $\alpha$ e de ATP6ap2 e comparação tecidual do animais WAR $SI \leq 0,23$ (n=4) e $SI \geq 0,85$ (n=5) com cinco dias após o terceiro estímulo.....	45
Figura 5 - gel de agarose 2% com controle positivo da síntese de siRNA após a digestão. M=marcador do peso molecular 50pb. ....	46
Figura 6 - Quantificação da expressão de mRNA de <i>mdr1</i> na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=6) e WAR 0,85 (n=7) normalizados pelo mRNA de S26. ....	47
Figura 7 - Quantificação da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=7) e WAR 0,85 (n=6) normalizados pelo mRNA de S26.....	47
Figura 8 - Quantificação da expressão de mRNA de ATP6ap2 na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=7) e WAR 0,85 (n=8) normalizados pelo mRNA de S26. ....	48
Figura 9 - Quantificação da expressão de mRNA de $\beta$ -actina na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=8) e WAR 0,85 (n=8) normalizados pelo mRNA de S26.....	48
Figura 10 - Quantificação da expressão de mRNA de <i>mdr1</i> na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=3) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=3) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26.....	49

Figura 11 - Quantificação da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=3) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26. ....	50
Figura 12 - Quantificação da expressão de mRNA de ATP6ap2 na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=4) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26. ....	50
Figura 13 - Quantificação da expressão de mRNA de $\beta$ -actina na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=4), WAR 0,85 controle (n=4) e WAR 0,85 tratado (n=4) normalizados pelo mRNA de S26.. ....	51
Figura 14 – Comparação da quantificação do gene <i>mdr1</i> expresso na PQ dos animais controles com 5 (n=9) e 25 (n=6) dias após o terceiro estímulo normalizado pelo S26. ....	52
Figura 15 - Comparação da quantificação do gene <i>TNF-<math>\alpha</math></i> expresso na PQ dos animais controles com 5 (n=9) e 25 (n=6) dias após o terceiro estímulo normalizados pelo mRNA de S26. ....	52
Figura 16 - Comparação da quantificação do gene <i>ATP6ap2</i> expresso na PQ em mRNA dos animais controles com 5 (n=7) e 25 (n=8) dias após o terceiro estímulo normalizados pelo mRNA de S26. ....	53
Figura 17 - Período de latência entre estímulo audiogênico e resposta epileptogênica.. ....	54
Figura suplementar 1 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos <i>amplicons</i> alvos para o normalizador S26. ....	73
Figura suplementar 2 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos <i>amplicons</i> alvos para o gene <i>mdr1</i> . ....	74
Figura suplementar 3 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos <i>amplicons</i> alvos para o gene <i>TNF-<math>\alpha</math></i> . ....	75
Figura suplementar 4 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos <i>amplicons</i> alvos para o gene <i>ATP6ap2</i> . ....	76
.....	77
Figura suplementar 5 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos <i>amplicons</i> alvos para o gene $\beta$ -actina. ....	77

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>ABC</b>	<i>ATP Binding Cassete</i> (Cassete de ligação de ATP)
<b>ATP</b>	Adenina Trifosfato
<b>CA</b>	Corno de Amon
<b>CI</b>	Colículo Inferior
<b>CS</b>	Colículo Superior
<b>DAE</b>	Drogas Anti-epilépticas
<b>dNTP</b>	Mix contendo desoxinucleotídeos, citosina (dCTP), guanina (dGTP), timina (dTDP) e adenina (dATP)
<b>DEPC</b>	<i>Diethylpyrocarbonate</i> (Pirocarbonato de dietila)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNase</b>	Enzima desoxirribonuclease
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma
<b>For</b>	<i>Forward</i>
<b>GABA</b>	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i> (Ácido Gama-aminobutírico)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IBE</b>	<i>International Bureau for Epilepsy</i> (Serviço Internacional para Epilepsia)
<b>ILAE</b>	<i>International League Against Epilepsy</i> (Liga Internacional Contra a Epilepsia)
<b>i.v.</b>	Infusão intravenosa
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDA</b>	kilo Dalton
<b>MDR</b>	<i>Multidrug Resistance</i> (Resistência a Múltiplas Drogas)
<b>MRP</b>	<i>Multidrug resistance Protein</i> (Proteína associada a resistência a múltiplas drogas)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NF-κB</b>	Fator Nuclear <i>kappa</i> B

<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
<b>PCRtr</b>	PCR em tempo real
<b>P-gp</b>	Glicoproteína P
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pmol</b>	Picomol
<b>PQ</b>	Placa Quadrigêmea
<b>Pren</b>	Pro-renina
<b>(P)RR</b>	<i>Pro-renin receptor</i> (receptor de pro-renina)
<b>Rev</b>	<i>Reverse</i>
<b>RAS</b>	<i>Renin-angiotensin system</i> (sistema renina-angiotensina)
<b>RN</b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNase</b>	Enzima Ribonuclease
<b>RT</b>	Transcrição reversa
<b>RVG</b>	<i>Rabies virus glycoprotein</i> (Glicoproteína do vírus rábico)
<b>S26</b>	Proteína ribossomal, utilizado como normalizador da reação de PCR
<b>SE</b>	Status epilepticus
<b>SI</b>	<i>Severity index</i> (Índice de gravidade)
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i> (Pequeno RNA de interferência)
<b>SF</b>	Estéreo filtrada
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>sscDNA</b>	<i>Single stranded complementary DNA</i> (DNA de fita simples complementar)
<b>TLE</b>	<i>Temporal lobe epilepsy</i> (Epilepsia de lobo temporal)

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
<b>Tris-HCl</b>	tris(hidroximetil aminometano – ácido clorídrico)
<b>WAR</b>	<i>Wistar Audiogenic Rat</i> (Rato Wistar Audiogênico)
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Micro litro
<b><math>\bar{x}</math></b>	Média aritmética
<b><math>\Delta\text{CT}</math></b>	<i>Delta Cycle Threshold</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Conceito e epidemiologia de epilepsia

Epilepsia é uma desordem comum que afeta 1% - 2% da população, sendo que em países em desenvolvimento tem uma incidência maior e 3% da população geral terá epilepsia em algum momento da vida (LÖSCHER, 1997; ANNEGERS, 2001). Epilepsia não pode ser caracterizada como uma doença única, mas sim uma variedade de desordens que refletem na função cerebral e podem ter diversas causas, como, por exemplo, predisposição genética, estresse, patologia ou danos cerebrais (STAFSTROM; TEMPEL, 2000; FISHER *et al.*, 2005). Hoje em dia é considerada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) e pelo Serviço Internacional para Epilepsia (IBE) como uma doença, apesar de ser referida tradicionalmente como desordem (FISHER *et al.*, 2014).

Segundo Löscher (1997) a definição de epilepsia é espontânea, com crises epilépticas recorrentes, pode ser ou não convulsiva e pode causar uma descarga parcial ou generalizada no cérebro. Entretanto, o termo epilepsia espontânea é questionável, pois há crises que são provocadas por algum fator desde que não seja uma condição tóxico-metabólico e/ou febril (COMMISSION, 1993). Já Fisher e colaboradores (2005), definem a epilepsia como uma desordem cerebral caracterizada por interrupções recorrentes e imprevisíveis da função normal do cérebro. É uma doença causada por vários distúrbios que refletem disfunção cerebral subjacente que pode resultar de muitas causas diferentes.

A atual definição conceitual de crise e de epilepsia foi estabelecida em 2005 pela força tarefa da ILAE dizendo que:

uma crise epiléptica é uma ocorrência transiente de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro. A epilepsia é uma desordem no cérebro caracterizada por uma predisposição persistente que gera crises epilépticas, por consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epiléptica (FISHER *et al.*, 2014, p.476).

Em seguida, foi formulado também um conceito operacional (prático) clínico de epilepsia que diz:

epilepsia é uma desordem do cérebro definido por algumas das condições a seguir: (1) pelo menos duas crises não-provocadas (ou reflexas) ocorridas

em mais de 24 horas independentemente; (2) uma crise reflexa ou não-provocada e uma possibilidade de novas crises semelhante ao risco de recorrência geral (pelo menos 60%), após duas crises não-provocadas, ocorrentes nos próximos 10 anos; (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER et al, 2014, p. 477).

A palavra crise se origina do grego que significa tomar posse (FISHER *et al.*, 2005). Segundo Stafstrom e Tempel (2000), crise é uma alteração da função neurológica causada por disparos paroxísticos dos neurônios em sincronia.

Crise epiléptica tem ocorrência transiente de sinais e os sintomas são devidos a atividades neuronais excessivas anormais ou síncronas. É caracterizada como transiente porque tem início e fim, entretanto o término pode ser menos evidente que o começo da crise (FISHER *et al.*, 2005). A crise convulsiva epiléptica está dentro do quadro das epilepsias e tem abalos motores parciais ou generalizados como característica principal (FONSECA, 2000).

De acordo com as Comissões feitas pela ILAE em 1981 e 1989, as crises foram classificadas de acordo com suas características clínicas:

**Parciais:** as crises se originam apenas de um hemisfério cerebral com um ou mais focos bem localizados. Subdivididas em crise parcial simples e crise parcial complexa com perda de consciência.

**Generalizadas:** começa simultaneamente nos dois hemisférios do cérebro ou surge em um dos hemisférios e se propaga para o outro levando a perda de consciência, podendo ser ou não convulsiva. Os tipos são: crises de ausência, crises atônicas e crises acinéticas.

Acredita-se que a maioria das epilepsias parciais é resultado de uma ou mais injúrias no sistema nervoso central (SNC), contudo em muitos casos a natureza e os insultos nunca são identificados (BANCAUD *et al.*, 1981; COMMISSION, 1989; CHANG; FONSECA, 2000; LOWENSTEIN, 2003). Um exemplo é a epilepsia de lobo temporal (TLE) caracterizada por crises do tipo parcial complexa, sendo mais comum em adultos e, frequentemente, refratária ao tratamento (FORSGREN, 1995).

*Status epilepticus* (SE) é uma circunstância especial com crises prolongadas e recorrentes, contudo exames clínicos e EEG, geralmente, permitem diagnosticar o SE. O início e o fim de uma crise epiléptica podem ser determinados pelo comportamento ou pelo EEG (FISHER *et al.*, 2005).

Em torno de 10 mil genes são necessários para o desenvolvimento e manutenção do funcionamento normal do cérebro. Dado a complexidade das redes neuronais é bem provável que mutações em alguns desses genes responsáveis por expressão ou função leve a mudanças na excitabilidade do SNC, levando a uma predisposição a epilepsia. Entretanto nem todo gene envolvido na excitabilidade levará a epilepsia, mas pode causar outras doenças neurológicas como ataxia, hiperatividade, ou paralisia (STAFSTROM; TEMPEL, 2000). Sabe-se que 21 genes estão relacionados com epilepsia idiopática, a maioria está ligada aos canais iônicos e alguns aos receptores de neurotransmissores (REES, 2010).

## **1.2 Tratamentos para epilepsia**

Muitos medicamentos antiepilépticos já foram estudados, até mesmo reformulados e introduzidos ao longo do tempo. Há em torno de 20 drogas antiepilépticas (DAE) disponíveis para o tratamento (LÖSCHER; LEPPIK, 2002). As drogas chamadas de primeira geração são: fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, valproato dentre outras; e as de segunda geração são: lamotrigina, felbamato, gabapentina dentre outras. Elas atuam no bloqueio de canais de sódio, ou de cálcio, ou aumentam a inibição de GABA (LERCHE et al., 2013). Aproximadamente 70-80% dos pacientes que começam o tratamento tem as crises reduzidas e ao longo do tempo ficam livres dessas crises em monoterapia ou politerapia (KALE, 2002; LÖSCHER; LEPPIK, 2002).

### **1.2.1 Refratariedade**

Mesmo usando os medicamentos 25% dos pacientes permanecem com as crises, assim chamados de pacientes refratários (LÖSCHER; LEPPIK, 2002; SILLANPÄÄ; SCHMIDT, 2006; BRODIE *et al.*, 2012). Sendo necessária intervenção cirúrgica em alguns possíveis casos (GUERREIRO *et al.*, 2000). Apesar do avanço dos estudos dessas drogas e dos benefícios apresentados na maioria dos pacientes, o entendimento sobre mecanismos celular e molecular, pelos quais a epilepsia se desenvolve, é ainda incompleto (STAFSTROM; TEMPEL, 2000 CHANG; LOWENSTEIN, 2003).

A epilepsia pode ser intratável desde o início ou se tornar intratável durante o tratamento crônico. A definição para epilepsia intratável pode variar. Há várias

expressões usadas para se referir à incapacidade de parar a ocorrência de crises, por exemplo, epilepsia intratável, dificuldade para o tratamento, epilepsia resistente à droga ou fármaco-resistente, epilepsia refratária e crises persistentes (LÖSCHER, 1997).

É importante definir bem os termos refratário e resistente, porque há aqueles pacientes que realmente não respondem a nenhuma droga e há aqueles que não respondem, pois a dose utilizada não alcançou níveis suficientemente altos no cérebro apesar de estar adequada no plasma (POTSCHKA; LÖSCHER, 2001; LÖSCHER; LEPPIK, 2002). Entretanto se o nível alto chegar no cérebro causaria toxicidade no organismo (LÖSCHER; LEPPIK, 2002). Segundo Potschka e Löscher (2001), esta é a explicação mais provável a não responsividade as drogas.

Pensando nisto, há uma ideia de que o modelo de pacientes fármaco-resistentes é a chave para a identificação de novas DAE. Contudo, não há possibilidade de uma validação positiva, porque nenhuma DAE é eficaz em pacientes com epilepsia fármaco-resistente (LÖSCHER; LEPPIK, 2002).

Heinemann e colaboradores (1994) levaram hipóteses para epilepsias intratáveis são elas: (a) anormalidades no desenvolvimento do cérebro durante a maturação; (b) neurodegeneração em regiões propensas a crise tal como o hipocampo em resposta ao SE; (c) reorganização do tecido cortical em resposta a perturbações induzidas por crise; (d) ou fenômeno *kindling*.

Esse fenômeno *kindling*, também chamado de abrasamento, é a manifestação de que epilepsia induz epilepsia. Isto é, administrações repetidas de estímulos subconvulsivantes resultam em uma intensificação progressiva de atividade epiléptica (GODDARD, 1967). Isso ocorre através de um mecanismo com *feedback* positivo, com descarga local epileptiforme, confinada inicialmente, a um pequeno foco ou rede que tende a se difundir por todo espaço com uma certa gravidade e até mesmo levando a uma crise generalizada (LÖSCHER, 1997; FONSECA, 2000).

Assim, é necessário desenvolver um modelo animal para tentar solucionar a refratariedade.

### 1.3 Modelos de epilepsia em animais

Os modelos existentes para estudar as crises epilépticas induzidas e os efeitos das DAE são: teste de eletrochoque com eletrodos na amígdala ou hipocampo; teste usando pentilenotetrazol, ou cainato, ou pilocarpina, ou lítio/pilocarpina; hipóxia perinatal e crises recorrentes espontâneas após o SE induzido por pilocarpina (LEITE; CAVALHEIRO, 1995; MELDRUM; BESTER, 2006).

Modelos animais de epilepsia podem ser utilizados a fim de abordar se a epilepsia é uma doença progressiva (LÖSCHER; LEPPIK, 2002). O modelo ideal para a TLE, por exemplo, deve mostrar crises espontâneas, recorrentes e que se assemelha ao comportamento da esclerose temporal mesial. Técnicas experimentais para induzir a epilepsia crônica são baseadas na indução de danos nas estruturas do cérebro antes do início das crises espontâneas (LEITE; CAVALHEIRO, 1995).

Um modelo animal amplamente utilizado e difundido nos laboratórios apresenta crise audiogênica, a qual se assemelha à crise tônico-clônica generalizada em humanos causada por TLE. Há determinadas linhagens de ratos que são utilizadas para tal experimento, entretanto sabe-se que há diferenças neuroanatômicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas entre essas linhagens. Contudo a neuroetologia quantitativa é comum, pois caracteriza o quanto o animal é resistente ou sensível ao estímulo sonoro (GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993). O primeiro modelo foi descrito por pesquisadores soviéticos que desenvolveram uma linhagem Krushinsky-Molodkina a partir de Wistar (KRUSHINSKY *et al.* 1970). Outra linhagem desenvolvida foram os GEPR (*Genetic Epilepsy Prone Rats*) derivados de Sprague-Dawley. No processo de seleção gênica surgiram dois fenótipos GEPR-3, com crises moderadas e o GEPR-9, com crises severas (DAILEY *et al.* 1989). Na França e no Brasil também foram desenvolvidas linhagens a partir de Wistar (KIESMANN, 1988; GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983).

*Wistar Audiogenic Rat* (WAR) é uma linhagem que veio do cruzamento consanguíneo de ratos Wistar sensíveis ao estímulo, sendo a sua origem na escola de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983; GARCIA-CAIRASCO; DORETTO; LOBO, 1990; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992). A estimulação da crise audiogênica é feita em alta frequência acústica de

120dB (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1991; JOBE *et al.*, 1991). Esses animais têm comportamentos característicos que são quantificados através do índice de gravidade (SI) e que são engatilhados no mesencéfalo (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; ROSSETTI *et al.*, 2006). De acordo com Garcia-Cairasco e Sabbatini (1989) há uma série de comportamentos que irão resultar no *score* após o estímulo sonoro. Os comportamentos dos animais sensíveis são: corrida de fuga, seguida de pulos e quedas atônicos, assim como arqueamento do corpo e finalmente uma crise clônica generalizada, resultando na depressão pós-ictal (GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993). Essa depressão é caracterizada por apneia, exoftalmia, perda de reflexo de endireitamento, taquicardia e refratariedade a uma nova crise além das mudanças neuroendócrinas e neuroquímicas (FONSECA, 2000).

O som ativa a circuitaria auditiva começando pela membrana basilar, na superfície do órgão de Corti que possui células pilosas que recebem a vibração da membrana. Terminações do nervo coclear fazem sinapses com as células pilosas levando os impulsos nervosos até a porção superior do bulbo. Os neurônios de segunda ordem continuam o processo de transmissão chegando ao lado oposto e também ipsilateralmente do tronco cerebral para terminar no núcleo olivar superior. Deste a via auditiva segue para o leminisco lateral e outras fibras se desviam chegando ao colículo inferior (CI). Por fim, a via prossegue para o corpo geniculado medial onde saem neurônios fazendo sinapses no córtex auditivo primário e associativo, localizado no giro superior transversal do lobo temporal (FONSECA, 2000; MACHADO, 2004) (Figura 1).

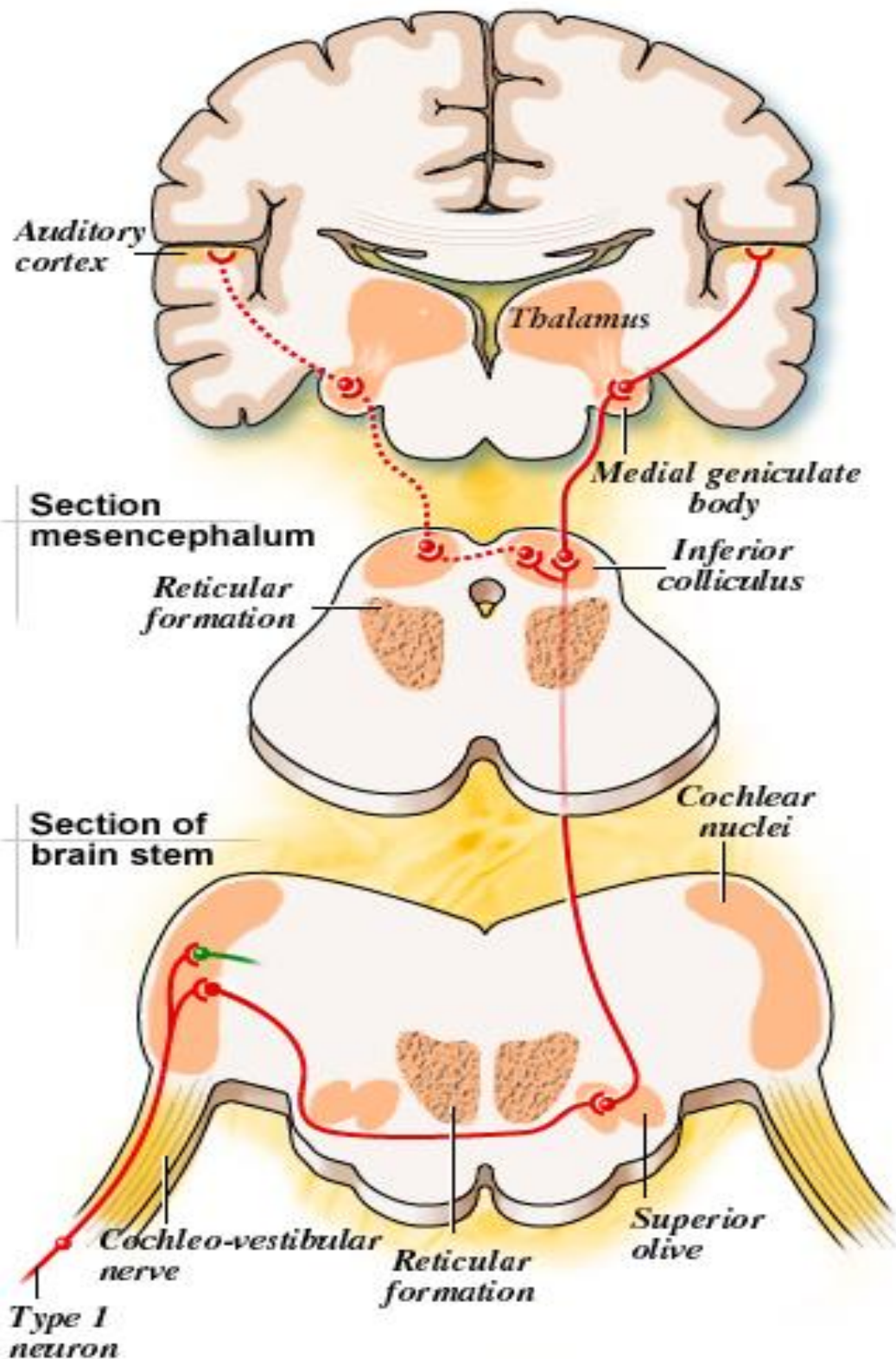


Figura 1 – Propagação do impulso nervoso pela via auditiva primária.

<sup>1</sup>Fonte – S. Blatrix; Promenade 'round the cochlea

<sup>1</sup> Disponível em: [www.neuroreille.com/promenade/english/ptw/zoom1.htm](http://www.neuroreille.com/promenade/english/ptw/zoom1.htm)

O núcleo central do CI é o ponto chave para iniciar a crise audiogênica, pois se sabe que uma lesão bilateral do núcleo central do CI bloqueia esse tipo de crise (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1991). Não somente o CI, mas várias estruturas do mesencéfalo são críticas no desenvolvimento e expressão da crise audiogênica aguda, como por exemplo, o colículo superior (CS) (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1989; GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993).

Doretto e colaboradores (2009) mostraram que o CS tem importância significativa na epilepsia, mediante a remoção bilateral das camadas mais profundas dessa estrutura mesencefálica, seguida de diminuição da crise. Sabe-se também que essas camadas do CS são importantes para gerar a corrida de fuga em GEPR-9 (MILLAN *et al.*, 1988), e em animais normais quando essas estruturas são estimuladas (FAINGOLD; RANDALL, 1999). No WAR, a participação do CS na expressão da crise está fortemente relacionada com a via eferente que liga as estruturas de tronco cerebral e medula, assim, por meio dessa via, os neurônios motores são ativados produzindo o comportamento da crise (DORETTO *et al.*, 2009). As projeções entre CI-CS permitem uma transdução integrada sensorio motora da crise audiogênica formando a placa quadrigêmea (PQ)(GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993).

Além das mudanças comportamentais causadas pelas crises em WAR (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI 1989), há também mudanças fisiológicas e genéticas causadas em GEPRs (DEPAULIS *et al.*, 1990; BROOKS-KAYAL *et al.*, 1998), por exemplo alteração na expressão de genes, como TNF- $\alpha$ , interleucinas, (DEUCHARS *et al.*, 1992; GOUVEIA *et al.*, 2011) e inflamação (SHANDRA *et al.*, 2002; BALOSSO *et al.*, 2005; BALOSSO *et al.*, 2009; VEZZANI *et al.*, 2011).

#### **1.4 Resistência a Múltiplas Drogas (MDR)**

Em 1976, Juliano e Ling descobriram uma proteína transmembrana de efluxo chamada glicoproteína P (P-gp), a qual é membro da família *ATP Binding Cassete* (ABC) que envolve grandes grupos de proteínas de transportadores de membrana, canais de íons e receptores (CALLEN *et al.*, 1987; LEVEILLE-WEBSTER; ARIAS, 1995; ZHANG *et al.*, 2012). Os genes responsáveis pela codificação da proteína P-gp são *MDR1*, *MDR2* (humano) (CALLEN *et al.*, 1987; ZHANG *et al.*, 2012), *mdr1a*, *mdr1b* e *mdr2* (roedores) (SILVERMAN, 1999; ZHANG *et al.*, 2012). Os *MDR1* e

*mdr1* estão relacionados com a resistência a múltiplas drogas e os *MDR2* e *mdr2* têm a função de decodificar o transportador fosfatidilcolina (BORST, 1997; SILVERMAN, 1999). As isoformas *MDR1*, *mdr1a* e *mdr1b* decodificam a P-gp 170 (peso molecular de 170 kDa) (RONINSON *et al.*, 1986; SHEN *et al.*, 1986) e, assim como as outras P-gp, estão envolvidas na resistência a múltiplas drogas (UEDA *et al.*, 1986) porque funcionam naturalmente como bomba de efluxo dependente de energia (ATP), diminuindo o acúmulo de drogas ou toxinas no organismo e protegendo-o contra esses xenobióticos, prevenindo danos em órgãos críticos, como o cérebro e coração (GOTTESMAN; PASTAN, 1988, 1993; GOTTESMAN; PASTAN; AMBUDKAR, 1996; SCHINKEL *et al.*, 1994). Uma característica notável do fenótipo clássico do *MDR* é sua habilidade reduzida para acumular drogas quando comparado a outras linhagens celulares (NOOTER; HERWEIJER, 1991).

Muitas toxinas são hidrofóbicas e se difundem pela bicamada lipídica celular. A presença de proteínas, que tem um papel de levar drogas ou toxinas para fora da célula, contra o gradiente de concentração, é um importante ganho evolutivo. Essas proteínas, que fazem o papel de bombas, estão presentes no genoma desde organismos simples (GOTTESMAN; PASTAN, 1988; BORST *et al.*, 2000).

De acordo com Deuchars e colaboradores (1992) a P-gp 170 está envolvida no transporte de metabólitos exógenos e endógenos de vários tecidos nos seguintes órgãos: intestino, fígado, cérebro, testículo, coração, músculo, adrenal, placenta, ovário, útero e rim. As células endoteliais da barreira hematoencefálica possuem uma concentração de P-gp 170 alta, indicando uma proteção contra entrada de toxinas no cérebro (CORDON-CARDO *et al.*, 1989). Já a superexpressão de P-gp na barreira hematoencefálica em tecido cerebral epileptogênico reduz a penetração das drogas dentro do parênquima e diminui seus efeitos antiepilépticos (SEEGERS; POTSCHKA; LÖSCHER, 2002b). As células endoteliais capilares que formam a barreira hematoencefálica, o córtex piriforme, o hipocampo, o giro denteado e as regiões límbicas apresentam expressão aumentada da proteína P-gp no cérebro de rato Wistar (SEEGERS; POTSCHKA; LÖSCHER, 2002b). Outros trabalhos utilizando ratos Sprague-Dawley observaram aumento da expressão da proteína P-gp nas seguintes regiões: córtex cerebral (Liu *et al.*, 2007), e amígdala (van VLIET *et al.*, 2004). Van Vliet e colaboradores (2004) também avaliaram a expressão gênica de *mdr1a* e *mdr1b* em duas regiões límbicas: giro denteado e córtex

parahipocampal. Eles observaram aumento da expressão de *mdr1b* no giro denteado e no córtex parahipocampal e de *mdr1a* no giro denteado nos animais estimulados eletricamente e sacrificados uma semana após o SE.

Pereira e colaboradores (2008) também fizeram análise da expressão de *mdr1* em músculo esquelético e fígado de WAR, Wistar estimulado e não estimulado e mostraram que houve diferença entre os três grupos.

Jette e colaboradores (1995) mostram que a P-gp exerce funções fisiológicas de excreção ou de proteção dos tecidos contra xenobióticos que são absorvidos naturalmente. O trabalho de Schinkel e colaboradores (1994) corrobora o papel principal da P-gp 170 de proteger o organismo e o subdivide em duas formas: primeiro, limitar a quantidade de acúmulo de droga em certos tecidos e segundo, retirar a toxina o mais rápido possível do tecido à medida que o nível plasmático diminui. Esse transportador limita a concentração no cérebro de muitos agentes farmacológicos e suas eficácias terapêuticas (LIN; YAMAZAKI, 2003).

Devido a essa função da P-gp, o *MDR* tem sido alvo de estudos em cânceres nos últimos 35 anos e muitos trabalhos tem mostrado que esse gene tem um impacto muito grande na resposta à quimioterapia, 90% dos pacientes com câncer metastático não respondem ao tratamento devido à superexpressão de P-gp 170 (LONGLEY; JOHNSTON, 2005; SZAKACS *et al.*, 2006).

Outra relação desse gene com a não resposta ao tratamento, mas de uma forma indireta, é na epilepsia. Um relato de caso da literatura mostra uma criança com crises intratáveis devido à esclerose tuberosa que recebeu várias drogas anticonvulsivantes sem obter melhora dos sintomas. Os níveis plasmáticos de fenitoína eram sempre sub-terapêuticos, apesar das altas doses administradas. A criança foi submetida à cirurgia de epilepsia e no tecido removido foi encontrada superexpressão de P-gp 170 (LAZAROWSKI *et al.*, 1999). Um estudo posterior mostrou a superexpressão de *MDR1* e também de *MPR1* (proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1) em neurônios displásicos, em células normais em forma de balão, em astrócitos, em células da microglia e em alguns vasos sanguíneos do cérebro (LAZAROWSKI *et al.*, 2004).

Tishler e colaboradores (1995) demonstraram que, no cérebro epileptogênico de pacientes com epilepsia fármaco-resistente, o nível de mRNA de *MDR1* está

aumentado dez vezes em relação ao controle. Eles também propuseram que a P-gp pode desempenhar um papel significativo, limitando o acesso das DAE ao parênquima cerebral, de modo que o aumento da expressão de *MDR1* possa contribuir na refratariedade das crises destes pacientes. Já Zhang e colaboradores (1999) observaram imunoreatividade de P-gp em um pequeno número de células gliais sob condições normais, porém um aumento na marcação de P-gp foi observado nos corpos celulares e formação de astrócitos em hipocampo após crise induzida por cainato. Regesta e Tanganelli (1999) determinaram a P-gp no endotélio e parênquima de várias regiões cerebrais por imunohistoquímica. Foram, particularmente, regiões do lobo temporal, o qual está frequentemente envolvido na epilepsia refratária.

Lazarowski e colaboradores (2004 b), por meio de indução de crises repetidas com ácido mercaptopropiônico, demonstraram aumento da expressão de P-gp 170 em células capilares do cérebro, neurônios e células da glia do córtex, estriatum e hipocampo em relação ao controle. Houve também diferença aumentada no grupo que teve crise induzida por sete dias em relação ao grupo que recebeu por apenas quatro dias.

Outros autores mostraram o oposto, que a P-gp não altera durante o tratamento com as drogas ou quando aumentada não influencia na refratariedade. O primeiro trabalho que mostra isso é o de Rizzi e colaboradores (2001) onde uma administração sistêmica de fenitoína em camundongo *mdr1 knockout*, resultou no aumento de 50% nos níveis da droga no hipocampo comparado ao hipocampo de camundongo selvagem em tratamento com fenitoína por quatro dias, mas não mudou a expressão de *mdr1* no hipocampo. Assim como tratamento em camundongos com carbamazepina não alterou a expressão do mRNA de *mdr1*. Em seguida Seegers; Potschka e Löscher, (2002a) mostraram por imunomarcação de várias regiões do cérebro que não houve nenhuma diferença significativa entre os hemisférios. No mesmo trabalho eles mostram a imunolocalização do anticorpo C219 da P-gp, que foi observada principalmente nas células endoteliais e células parenquimais. Dentre as células parenquimais gliais, neurônios e outro tipo celular não houve diferença clara na expressão de P-gp. Tratamento prolongado com fenobarbital ou fenitoína não induziu um aumento considerável da expressão de P-gp no cérebro. Da mesma forma fenitoína não aumentou a intensidade de P-gp

endotelial nem parenquimal em nenhuma aérea do cérebro avaliada (córtex frontal, córtex parietal, córtex piriforme, giro denteado, hilus, CA1, CA3, amígdala, cerebelo e substância negra). Já o fenobarbital induziu um aumento pequeno, mas significativo na expressão de P-gp endotelial nas regiões do córtex piriforme e cerebelo.

O fato de ambas as drogas não alterarem a expressão da P-gp é um indício importante, pois caso contrário seria restrito a entrada no cérebro (SEEGERS; POTSCHKA; LÖSCHER, 2002b). Neste trabalho há dados fortes que indicam que a superexpressão da P-gp em tecido cerebral epileptogênico de pacientes resistentes a drogas não é uma consequência do tratamento crônico com as DAE, como por exemplo, fenobarbital e fenitoína. Entretanto como nos experimentos de Rizzi e colaboradores (2001) e de Seegers e colaboradores (2002b) foram usados animais não epiléticos, não se pode descartar que animais ou humanos epiléticos exibem respostas diferentes ao tratamento das DAE.

No trabalho de Ambroziak e colaboradores (2009) foi mostrado, de uma forma surpreendente, que todas as drogas aumentaram a expressão da P-gp e não houve diferença significativa entre elas. Sendo assim, levanta-se a primeira pergunta será que as DAE influenciam na resistência e/ou na refratariedade?

Kwan e colaboradores (2002) investigaram a expressão regional do gene *mdr1*, que codifica a P-gp 170, em tecido encefálico e mesencefálico de GEPRs após uma única crise audiogênica. Os resultados sugerem que pode ocorrer uma superexpressão do gene *mdr1* após a crise. Nesses animais o padrão da expressão segue a via anatômica de crise audiogênica, com início no mesencéfalo e propagação para o córtex.

Kumar e colaboradores (2014) compararam a expressão de P-gp entre pacientes com síndrome de Lennox-Gastaut, pacientes com outras epilepsias e controles saudáveis. O resultado foi significativamente maior em pacientes com síndrome Lennox-Gastaut do que nos controles. Neste trabalho também foi mostrado uma alta expressão de P-gp em células mononucleadas do sangue em pacientes com essa síndrome em relação aos pacientes com outras epilepsias.

A expressão aumentada de P-gp na síndrome Lennox-Gastaut é improvável ser regulada pela duração da exposição às DAE porque um experimento in vitro

mostrou aumento da atividade da P-gp em pacientes com essa síndrome após o bloqueio de P-gp por verapamil nas células mononucleadas do sangue (KUMAR *et al.*, 2014).

Diante desses estudos é ainda necessário mais pesquisas para definir melhor as regiões nas quais ocorrem alterações e se este aumento é resultado de crises incontroláveis, de mecanismos da epileptogênese, da administração crônica das drogas, por crises induzidas ou até mesmo pela soma de alguns desses fatores.

### **1.5 Epilepsia e inflamação**

A inflamação crônica no cérebro é um processo desenvolvido após o início de injúrias e pode persistir no tecido epileptogênico na presença de altos níveis de mediadores inflamatórios (histamina, bradicinina e prostaglandina) envolvidos na propagação da atividade epiléptica (ASHHAB; OMRAN, 2013). A evidência de que as crises desencadeiam reações inflamatórias duradouras no cérebro pode colocar em questão se o estado pró-inflamatório prolongado no SNC pode aumentar a predisposição do tecido cerebral a desenvolver crises (BALOSSO *et al.*, 2005).

Trabalhos recentes têm enfatizado que a crise ou a epilepsia é uma condição inflamatória prolongada e que a atividade da crise aumenta rapidamente a síntese e a liberação de várias interleucinas envolvidas no início da crise em áreas do cérebro de roedores (DELI, *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2012). As citocinas atuam nas células endoteliais e na mudança da permeabilidade da barreira hematoencefálica, a qual tem efeitos significativos na viabilidade e excitabilidade neuronal (DELI *et al.*, 2005).

As crises epilépticas produzem aumento de citocinas *in loco*, tais como interleucinas (IL1-6) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (SHANDRA *et al.*, 2002). O TNF- $\alpha$  atua em papéis chave, como na inflamação aguda e crônica, respostas antitumorais e infecções (PALLADINO *et al.*, 2003) e, em níveis altos, auxilia na susceptibilidade da crise (SHANDRA *et al.*, 2002). Mediante crises e várias condições neuropatológicas essa citocina pleiotrópica tem um aumento no SNC, por exemplo pacientes com inflamação crônica tem maior incidência de crises (MINAMI; KURAISHI; SATOH, 1991; FEUERSTEIN; WANG; BARONE, 1997; PLATA-SALAMAN; LLYIN, TURRIN, 2000; VEZZANI; MONETA; RICHICHI, 2002), entretanto TNF- $\alpha$  não é o gatilho das crises (BALOSSO *et al.*, 2005). Porém uma

longa exposição ao TNF- $\alpha$  pode levar ao rompimento da barreira hematoencefálica e intensificar os disparos em ratos (DELI *et al.*, 1995; MALE, 1995). Shandra e colaboradores (2002) mostraram também que níveis altos de TNF- $\alpha$  causam mudanças profundas no EEG de ratos abrasados. Resultados de Balosso e colaboradores (2005) corroboram isso, pois o mTNF- $\alpha$  reduz significativamente a atividade ictal, mas não altera o início da crise nem a duração interictal. Assim, os autores sugerem que TNF- $\alpha$  não está envolvido no mecanismo de desencadear a crise, porém a transição entre ictal e interictal é alterada.

O TNF- $\alpha$  é produzido por células endoteliais em resposta aos vários estímulos extrínseco e intrínseco, sendo este último relacionado à lesão cerebral aguda, que aumenta a expressão de TNF- $\alpha$  (ALMEIDA, 2013). Reações inflamatórias agudas são iniciadas por uma variedade de estímulos patológicos, como infecção, dano no tecido, trauma e estresse celular (HARTMANN; CHEUNG; PIQUETTE-MILLER, 2002; SLAVIERO; CLARKE; RIVORY, 2003). A resposta imunológica resulta na secreção de citocinas pró-inflamatórias (SLAVIERO; CLARKE; RIVORY, 2003).

O TNF- $\alpha$  regula a plasticidade sináptica (TURRIGIANO, 2010) e se o nível dessa citocina está aumentado no cérebro devido a alguma patofisiologia, regulará o aumento da plasticidade. O efeito da plasticidade ocorre através do TNF- $\alpha$  agindo na produção de ATP mitocondrial (CLARK; ALLEVA; VISSEL, 2010).

## **1.6 Receptor de Pro-renina na epilepsia**

A pro-renina é uma proteína altamente conservada entre as espécies devido à sequência de nucleotídeos ser de 95% de similaridade e o nível de aminoácido estar acima de 80% (BUCKLÉ; BADER, 2006; NGUYEN; MULLER, 2010). Ela é uma pro-enzima inativa proveniente da renina, amadurece por clivagem proteolítica de pro-segmento nas células mioepitelióides da artéria aferente glomerular (NGUYEN *et al.*, 2002; NGUYEN, 2008). Uma vez amadurecida se liga ao (P)RR permitindo um aumento das suas atividades intrínsecas (SHAN *et al.*, 2008).

O trabalho feito por Shan e colaboradores (2008), mostrou que o tratamento das células neuronais com renina reduziu em 46% a taxa de frequência do potencial de ação e durante o tratamento com renina na presença do pulso hiperpolarizante, houve uma redução de  $37\pm 4\%$  na mudança do potencial de repouso da membrana.

O gene do (P)RR é denominado *ATP6ap2* e está no locus p11.4 do cromossomo X de humano, rato e camundongo. Esse gene é importante para a formação embrionária e a ablação dele leva a morte antes de completar a embriogênese (AMSTERDAM *et al.*, 2004). Dados indicam que a sobrevivência celular e a proliferação possam estar relacionadas à função de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (BURCKLÉ; BADER, 2006).

Estudo feito por Ramser e colaboradores (2005), mostra a importância do receptor da pro-renina na função cognitiva e quando ocorre deleção do exon 4 do, *ATP6ap2*, provoca um aumento de crises epilépticas. A ablação está também ligada ao retardo mental associado ao cromossomo X.

### **1.7 $\beta$ -actina como avaliadora da plasticidade tecidual**

A  $\beta$ -actina é uma das proteínas ligada ao citoesqueleto, e tem um papel importante no tráfico intracelular e na morfologia celular, pois está associada à motilidade, endocitose, citocinese e na adesão celular (BRAKEBUSCH *et al.*, 2002; ENGQVIST-GOLDSTEIN; DRUBIN, 2003; ASCOUGH, 2004). Possui também importância em processos celulares como migração e divisão celular, e regulação da expressão gênica. Funções estas atribuídas à sua capacidade de formar filamentos que se montam ou se desmontam dependendo das necessidades celulares (BUNNELL *et al.* 2011).

O mRNA da  $\beta$ -actina e a proteína são bastante utilizados como normalizadores em análises moleculares como PCRtr e western. (VIEIRA; TEIXEIRA; NOGUEIRA, 2008; CARMO; ANDRADE; LIBERMAN, 2014). Entretanto a  $\beta$ -actina pode sofrer alterações demonstrando mudança na plasticidade tecidual (CARMO; ANDRADE; LIBERMAN, 2014).

Imagens de fatias do cérebro revelaram indução precoce imediata de transcrição de  $\beta$ -actina após a despolarização. O estudo do mRNA endógeno em tecidos vivos do camundongo demonstra a sua regulação dinâmica no microambiente celular e tecidual (PARK, *et al.* 2014; BUXBAUM; WU; SINGER, 2014).

## 1.8 Interferência por RNA

A interferência por RNA é uma técnica que promove o silenciamento gênico e é específico através da introdução de RNA dupla-fita (dsRNA) (FIRE *et al.*, 1998). Essa característica é funcionalmente semelhante a animais *knockout* (sem a atividade de um gene específico) (KIM *et al.*, 2002; DZITOEVA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2003; KOSTROUCHOVA *et al.*, 2003). Esse protocolo apresenta praticidade, baixo custo e eficiência já a estratégia de produção de animais *knockout*, tem um custo muito alto, demorada, complexa, geralmente é silenciado um alelo, e é necessário cruzamentos para obter *knockout* dos dois alelos. Este silenciamento gênico pós-transcricional ocorre porque os dsRNAs, duplexes de 21 pares de base (pb) denominados siRNA, são reconhecidos como moléculas estranhas ao transcriptoma celular, sendo então processados pela enzima DICER (BERNSTEIN *et al.*, 2001). A dupla fita de siRNA é separada e cada fita simples se agrega a endoribonuclease chamada RISC, a qual cliva apenas RNAs complementares ao oligonucleotídeo que ela carrega (HUTVAGNER *et al.*, 2002).

O siRNA transformou-se em uma das ferramentas mais utilizadas em biologia molecular, sua praticidade possibilitou aplicá-lo na genômica funcional como por exemplo em *C. elegans*, (FRASER *et al.*, 2000; GONCZY *et al.*, 2000; KAMATH *et al.*, 2003), em *Drosophila* (LUM *et al.*, 2003), em galinha (PEKARIK *et al.*, 2003), em parasitas (PEREIRA *et al.*, 2008) e em mamíferos (MARIN *et al.*, 2008)

## 2 JUSTIFICATIVA

Uma linhagem de ratos Wistar selecionados geneticamente, *Wistar Audiogenic Rat* (WAR), com susceptibilidade epiléptica audiogênica tem sido mantida e estudada no laboratório no Núcleo de Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (NNC-ICB/UFMG). Nestes animais, um estímulo sonoro de alta intensidade (120dB) induz crise convulsiva do tipo tônico clônica generalizada seguida por espasmos.

A repetição dos estímulos sonoros de acordo com protocolos específicos modifica a expressão motora e eletroencefalográfica das crises para um padrão de crises límbicas, também denominadas crises de lobo temporal. Considerando que a caracterização fenomenológica das crises, assim como dos aspectos neurofisiológicos, neuropatológicos e comportamentais do modelo WAR tem sido já adequadamente caracterizada na literatura, fica evidente uma melhor caracterização genética e molecular desse modelo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão do mRNA de *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e  $\beta$ -actina em rato Wistar audiogênico.

#### 3.2 Objetivos Específicos

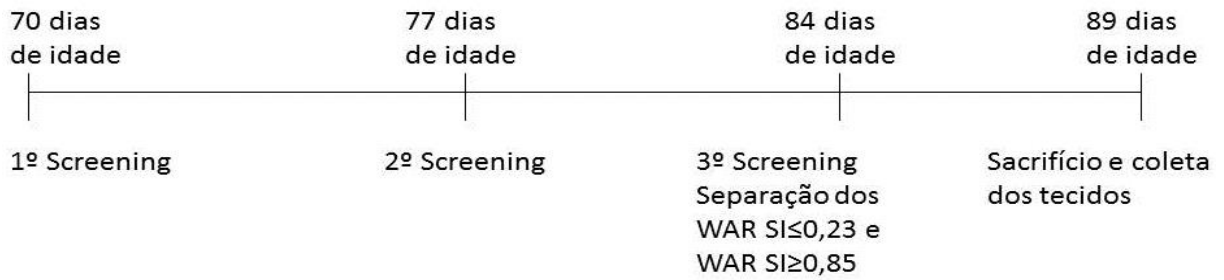
- A) Avaliar a distribuição da expressão dos mRNAs dos genes *mdr1* e *TNF- $\alpha$*  nos tecidos córtex cerebral, hipocampo e PQ.
- B) Avaliar a expressão de *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e  $\beta$ -actina em WAR sensíveis e resistentes à crise epileptogênica comparados com Wistar controle.
- C) Comparar a expressão de *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e  $\beta$ -actina nos WAR e Wistar controles com os animais tratados com siRNA para *mdr1*.
- D) Avaliar as relações entre os intervalos de estímulos, a latência das respostas e a expressão gênica na PQ.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

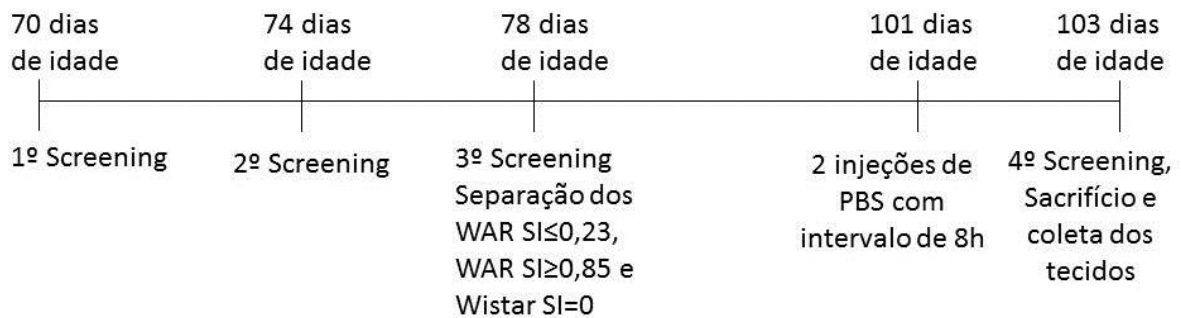
### 4.1 Desenho experimental

O desenho experimental foi baseado nos seguintes protocolos: *screenings*, silenciamento do *mdr1*, coleta dos tecidos, extração de RNA total e RT-PCRtr. A PCRtr só foi realizada quando todos os tecidos foram coletados de cada grupo. A figura 2 exemplifica os protocolos realizados.

## Grupo 1)



## Grupo 2A)



## Grupo 2B)

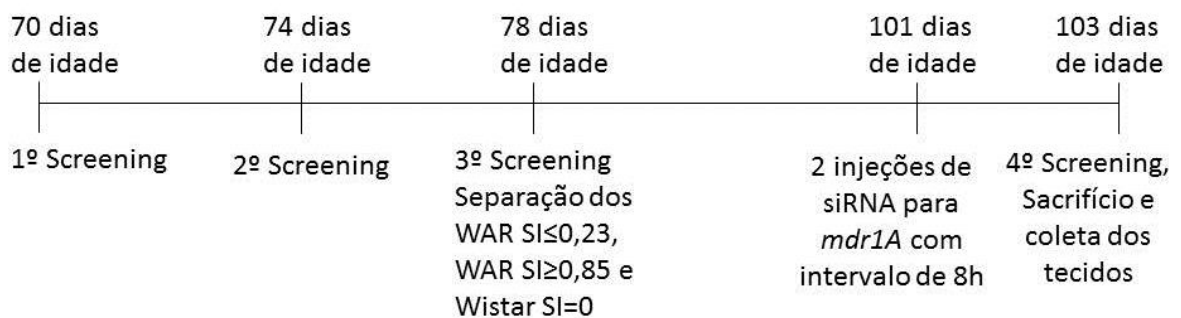


Figura 2 – Desenho experimental dos protocolos realizados nos dois grupos. Grupo 1) animais estimulados uma vez por semana e sacrificados cinco dias após o terceiro *screening* (n=9); Grupo 2A) animais controle estimulados com intervalos de 4 dias e sacrificados 25 dias após o terceiro *screening* (n=11); Grupo 2B) animais tratados com siRNA para *mdr1* estimulados com intervalos de 4 dias e sacrificados 25 dias após o terceiro *screening* (n=11).

## 4.2 Animais

Foram utilizados animais machos das colônias WAR (n=25) e Wistar (n=6) com idades de 89 e 103 dias e peso variando entre 250g a 300g. Os ratos da colônia Wistar foram adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do ICB – CEBIO e os ratos das colônias WAR foram criados e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram submetidos a ciclo de claro-escuro de 12/12 horas. Vários cuidados foram tomados para evitar desconforto e estresse aos animais. Todos os esforços foram feitos para evitar sofrimentos desnecessários aos animais, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA). O presente trabalho foi aprovado pelo CETEA sob o parecer nº 252/2012.

### 4.2.1 Grupos experimentais

#### Grupo 1:

Animais WAR foram separados em dois subgrupos de acordo com o SI ( $\leq 0,23$  ou  $\geq 0,85$ ) obtido do resultado de três estímulos sonoro (120dB) feitos uma vez por semana a partir dos 70 dias de idade do animal. Foram obtidos n=4 para  $SI \leq 0,23$  e n=5 para  $SI \geq 0,85$ . Esse grupo foi sacrificado cinco dias após o terceiro estímulo.

#### Grupo 2:

Foi separado em dois subgrupos: animais controles e animais tratados com siRNA. Os animais foram também separados de acordo com o  $SI \leq 0,23$  (n=8);  $SI \geq 0,85$  (n=8) e Wistar  $SI=0$  (n=6) Após os três estímulos, quatro animais  $SI \leq 0,23$ ; quatro animais  $SI \geq 0,85$  e três animais  $SI=0$  receberam injeções com o complexo (RVG + siRNA + PBS com 5% de glicose) para silenciar o mRNA de *mdr1*. O restante dos animais recebeu apenas o PBS com 5% de glicose (PASCOAL, 2010). As três avaliações de verificação de susceptibilidade epiléptica audiogênica (*screening*) foram feitas aos 70, 74 e 78 dias de idade. Esse grupo foi sacrificado 25 dias após o terceiro estímulo.

#### 4.2.2 Estímulo sonoro e análise comportamental

Segundo a metodologia previamente descrita por Garcia-Cairasco e Sabbatini em 1983 e posteriormente aprimorada por Garcia-Cairasco e colaboradores, em 1996, os animais foram submetidos ao estímulo sonoro de 120dB. O som permanecia por no máximo um minuto ou até que o animal apresentasse uma crise tônica. Os *screening* foram feitos três vezes em cada animal. Animais classificados como resistentes ao estímulo apresentaram  $SI \leq 0,23$  e os sensíveis  $SI \geq 0,85$  em todos os três testes do *screening*. Os valores de SI observados estão representados na Tabela 1. Esta metodologia é utilizada rotineiramente no laboratório NNC-UFMG..

Tabela 1: Comportamentos observados nos animais submetidos à estimulação e respectivos índices de gravidade de acordo com Garcia-Cairasco e Sabbatini (1983) e Garcia-Cairasco e colaboradores (1996)

ÍNDICE (SI)	COMPORTAMENTO
<b>0,0</b>	Ausência de qualquer comportamento convulsivo
<b>0,11</b>	Um episódio de corrida
<b>0,23</b>	Um episódio de corrida + pulos e quedas atônicas
<b>0,38</b>	Dois episódios de corrida + pulos e quedas atônicas
<b>0,61</b>	Todos os comportamentos anteriores + convulsão tônica com arqueamento dorsal da cabeça
<b>0,73</b>	Todos os comportamentos anteriores + convulsões clônicas parciais e generalizadas
<b>0,85</b>	Todos os comportamentos anteriores + espasmos clônicos
<b>0,90</b>	Todos os comportamentos anteriores + flexão ventral da cabeça
<b>0,95</b>	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros anteriores
<b>1,0</b>	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros posteriores

### 4.2.3 Coleta de materiais

Para as análises necessárias, foram coletados tecidos cerebrais dos animais, relacionados às crises epileptogênicas. Contudo, somente no primeiro grupo foi feita uma avaliação da distribuição tecidual da expressão dos genes. Os tecidos analisados foram: córtex direito e esquerdo, hipocampo e PQ. No segundo grupo, só foi avaliado a PQ.

Todos os materiais foram coletados e processados nos laboratórios: Núcleo de Fisiologia e Genômica Funcional (NUFIGEN) e Núcleo de Neurociências (NNC), do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram submetidos à decapitação e imediatamente os tecidos alvos foram removidos em condições estéreis, e em seguida, colocados em RNA *later* ou nitrogênio líquido para armazenamento em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o procedimento de extração de RNA total. O primeiro grupo foi sacrificado cinco dias após o último *screening*. Já o segundo grupo com 25 dias após o último *screening*. Sendo que este grupo recebeu injeções de siRNA (n=8) e PBS (n=8) 48h antes.

## 4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

### 4.3.1 Extração de RNA total e tratamento com DNase

As amostras foram homogeneizadas separadamente em TRizol<sup>®</sup> e em seguida centrifugadas, formando um composto trifásico. A primeira fase era composta de RNA, a segunda de DNA e a terceira por proteína. O RNA foi separado e processado de acordo com o protocolo do fabricante do TRizol<sup>®</sup> (TRizol<sup>®</sup> Reagent, Life Technologie, Carlsbad, California). As outras duas fases foram guardadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras análises. O RNA total foi ressuscitado em 50 $\mu\text{L}$  de água DEPC e quantificado em 260/280 nm (NanoVue Plus Spectrophotometer GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se uma alíquota de 2 $\mu\text{L}$ . Alíquotas de amostras de RNA total foram, em seguida, tratadas com *DNase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico, extraídas com fenol, precipitadas com isopropanol e o *pellet* de RNA tratado foi lavado com etanol e ressuscitado em 50 $\mu\text{L}$  de água DEPC. Após este tratamento as alíquotas foram novamente quantificadas em 260/280 nm para a realização da transcrição reversa (RT).

#### 4.3.2 Oligonucleotídeos iniciadores para transcrição reversa (RT) e PCR em Tempo Real (PCRtr)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a RT e PCRtr foram estudados, desenhados e selecionados a partir de análises das sequências descritas no *GeneBank*, utilizando-se o programa Blast do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Belo Horizonte, Brasil) (<http://www.idtdna.com>). Os *primers* foram recebidos liofilizados, ressuspendidos em água estéril filtrada (SF), aliquotados e armazenados a -20°C em solução estoque de 100pmol/μL. Soluções de *primers* para uso foram diluídas a 10pmol/μL. O controle endógeno normalizador utilizado foi o gene S26 (VINCENT, MARTY; FORT, 1993), sendo os *primers* específicos previamente padronizados no NUFIGEN/ICB-UFMG.

Os *primers* desenhados para os genes alvos deste estudo de expressão por PCRtr, são apresentados abaixo na Tabela 2. As sequências foram pesquisadas no Blast, para obtenção de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso de aproximadamente 21-25 nt contendo aproximadamente 50% de AT e 50% de GC, visando sempre *amplicons* alvos de no mínimo 70 pb e no máximo 100 pb. As curvas de calibração e de dissociação foram construídas, mostrando linearidade e 100% de eficiência para todos os alvos e especificidade dos *primers* e *amplicons* (Anexos – Figuras suplementares 1, 2, 3, 4, 5,).

Tabela 2 – Iniciadores de Oligonucleotídeos selecionados para PCRtr.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento Amplificado
<b>mdr1For</b>	5'- CCA TTG TGA TAG CTC ACC GCT TGT -3'	24 nt	
<b>mdr1Rev</b>	5'- CTT GCT CCA CAA TGA CAC CAC CAT -3'	24 nt	84 pb
<b>TNF-<math>\alpha</math>For</b>	5'- TCT TCT GTC TAC TGA ACT TCG GGG -3'	24 nt	
<b>TNF-<math>\alpha</math>Rev</b>	5'- ATG GAA CTG ATG AGA GGG AGC-3'	21 nt	82pb
<b>RNPrenFor</b>	5'- CTT GAG ACG AAA CAA GAG AAC ACC -3	24 nt	
<b>RNPrenRev</b>	5'- GCC AGT CAT AAT CCA CAG TAC CA -3	23 nt	105pb
<b>RN<math>\beta</math>- actinaFor</b>	5'- CAT TGA ACA CGG CAT TGT CAC -3'	21 nt	
<b>RN<math>\beta</math>- actinaRev</b>	5'- CCA CAC GCA GCT CAT TGT AGA -3'	21 nt	80pb
<b>S26For</b>	5'- CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT-3'	21 nt	
<b>S26Rev</b>	5'- CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA TG -3'	23 nt	71pb
<b>mdr1 siRNA For</b>	5'- AAG GAG ATA GGC TGG TTT GAC CCT GTC TC -3	29 nt	
<b>mdr1 siRNA Rev</b>	5'- AAG TCA AAC CAG CCT ATC TCC CCT GTC TC -3'	29 nt	95pb

#### 4.3.3 Transcrição reversa (RT)

A RT para síntese de sscDNA (DNA complementar de fita simples) foi realizada aproximadamente 0,7  $\mu$ g de RNA total em volume final de reação de 21  $\mu$ L por amostra. Resumidamente, 0,7  $\mu$ g de RNA foram pré-incubados a 70°C por 10 minutos com 10 pmol de cada *primer* reverso, específico para os genes alvos em estudo, juntamente com 10 pmol de *primer* oligo dT<sub>18</sub> (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 11  $\mu$ L do mix de enzima transcriptase reversa (40U) em tampão RT (KCl 50 mM,

Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 $\mu$ L de dNTP mix (10 mM de cada) foram incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e *primers*. A reação foi finalizada a 4°C e imediatamente utilizada no PCRtr. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

#### 4.3.4 PCR em tempo real (PCRtr)

As amostras de sscDNA resultantes da RT foram utilizadas no PCRtr. O PCRtr foi realizada no equipamento Vii7 real time PCR System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras em triplicata foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de reação de 10 $\mu$ L cada. Alíquotas de 0,8 $\mu$ L de sscDNA das amostra foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se posteriormente, 9,2 $\mu$ L de sybr Mix (5 $\mu$ L do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,06 $\mu$ L de cada primer (senso e anti-senso; 10pmol/ $\mu$ L e 4,08 $\mu$ L água SF). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15 s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60°C para análise da especificidade dos *amplicons*.

#### 4.4 Bloqueio da tradução dos transcritos (siRNA)

Para o bloqueio da tradução dos transcritos do *mdr1 siRNA* foi utilizado o protocolo escrito por Pascoal (2010) com modificações descritas a seguir.

Utilizou-se o **Silencer® siRNA Construction Kit** (Ambion® by life technologies™) e a preparação para hibridização e purificação do siRNA foi feita de acordo com as especificações do kit.

Os animais WAR SI $\leq$ 0,23 (n=4), WAR SI $\geq$ 0,85 (n=4) e Wistar SI=0 (n=3) receberam duas injeções intravenosas (veia caudal) com oito horas de intervalo de siRNA (25 $\mu$ g/injeção) conjugadas com o peptídeo RVG (*Rabies Virus Glycoprotein - 9R*, YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASN GGGRRRRRRRRR - Biosynthesis,

Lewisville, Texas; USA). O peptídeo teve por finalidade atravessar o siRNA pela barreira hematoencefálica possibilitando a transfecção das células no SNC (Figura 3). O siRNA foi complexado 15 minutos antes com o peptídeo em uma razão molar de 1:10 (siRNA:RVG) e mantido no gelo. Essa complexação foi diluída em PBS com 5% de glicose em um volume final de 500 $\mu$ L/injeção. Após 48h os animais passaram por um estímulo audiogênico para verificar se houve alteração no SI antes de coletar os tecidos para avaliação da expressão dos genes alvos.

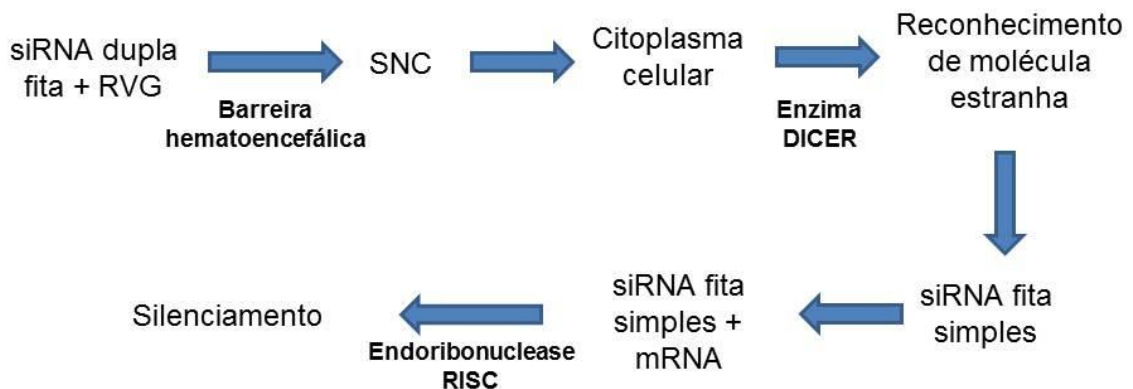


Figura 3 – Transfecção da dupla fita de siRNA complexado com RVG que permite a entrada do siRNA na célula do SNC, ativando a enzima DICER que reconhece o siRNA como molécula estranha tornando-a em fita simples, permitindo assim que esta fita se ligue ao mRNA celular complementar clivado pela endoribonuclease RISC, resultando no silenciamento.

#### 4.5 Análise estatística

Para a quantificação relativa foi realizada uma análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes alvos versus o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo, onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos (média do CT gene alvo – média do CT controle endógeno) gerando o  $\Delta$ CT. Utilizando-se o  $\Delta$ CT foi calculado o  $\Delta\Delta$ CT ( $\Delta$ CT amostra –  $\Delta$ CT do calibrador (amostra de referência)). Ao final foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para determinação dos níveis relativos de expressão de cada gene alvo. Os resultados dos níveis de expressão foram lançados no programa *GraphPad Prism 5*, para a análise estatística dos níveis de expressão, utilizou-se os dados com média $\pm$ E.P.M, Teste t de student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Expressão de mRNAs dos genes que codificam *mdr1*, *TNF- $\alpha$* e *ATP6ap2* em animais WAR com cinco dias após o terceiro estímulo

Os resultados das análises das expressões dos genes *mdr1*, *TNF- $\alpha$*  e *ATP6ap2* com cinco dias após o terceiro estímulo na comparação tecidual dos animais WAR  $SI \leq 0,23$  e WAR  $SI \geq 0,85$  são apresentados na figura 4. Os dados do RT-PCRtr demonstraram uma expressão significativa ( $p < 0,05$ ) para mRNA de *mdr1* e *TNF- $\alpha$*  aumentado na PQ de WAR  $SI \geq 0,85$ , quando comparado com animais da mesma linhagem com  $SI \leq 0,23$ . Já a expressão de *ATP6ap2* em WAR  $SI \geq 0,85$  está diminuída em relação ao WAR  $SI \geq 0,23$  e essa diferença foi significativa ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos outros tecidos analisados mostrou diferença significativa para esses genes e entre os SI.

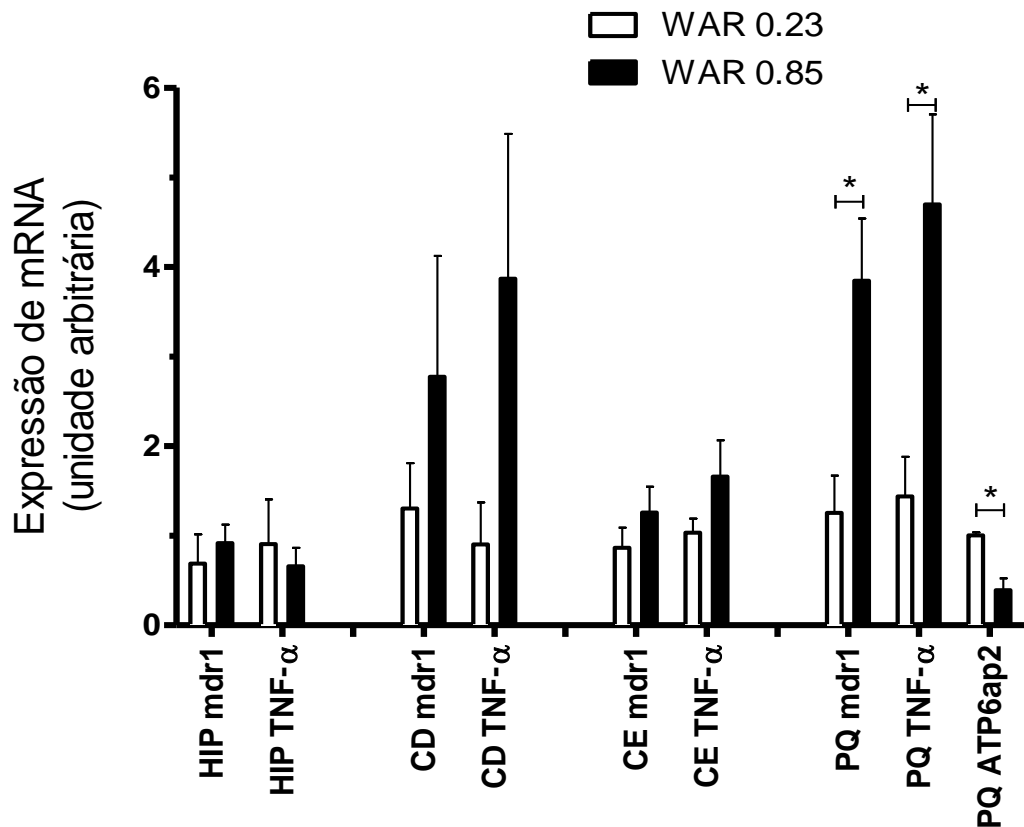


Figura 4 – Quantificação da expressão de mRNA de mdr1, de TNF- $\alpha$  e de ATP6ap2 e comparação tecidual do animais WAR  $SI \leq 0,23$  (n=4) e  $SI \geq 0,85$  (n=5) com cinco dias após o terceiro estímulo. A expressão de mRNA de mdr1 e de TNF- $\alpha$  não foi significativa para CD, CE e HIP. As expressões de mdr1 na PQ de WAR  $SI \leq 0,23$  ( $1,255 \pm 0,414$ ) e  $SI \geq 0,85$  ( $3,846 \pm 0,692$ ), de TNF- $\alpha$  na PQ de WAR  $SI \leq 0,23$  ( $1,438 \pm 0,443$ ) e  $SI \geq 0,85$  ( $4,698 \pm 1,003$ ) e de ATP6ap2 na PQ de WAR  $SI \leq 0,23$  ( $1,003 \pm 0,035$ ) e  $SI \geq 0,85$  ( $0,393 \pm 0,129$ ) foram significativas. Teste t não pareado com \* $p < 0,05$  para mdr1 e TNF- $\alpha$ ; e \*\* $p < 0,01$  para ATP6ap2.

## 5.2 Verificação da síntese do siRNA para mdr1

A síntese do siRNA foi feita de acordo com o kit e os animais do grupo 2 foram transfectados com siRNA (n=8) e PBS (n=8) de acordo com protocolo descrito por Pascoal (2010). Para verificar a eficiência da reação da síntese de oligos siRNA e hibridização dos pares, o resultado da síntese foi verificado com aplicação de 2 $\mu$ L em gel de agarose 2% corado com Syber (Figura 6). Os pares de siRNA foram quantificados no NanoVue ( $0,708 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,308 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), verificando assim sua pureza.

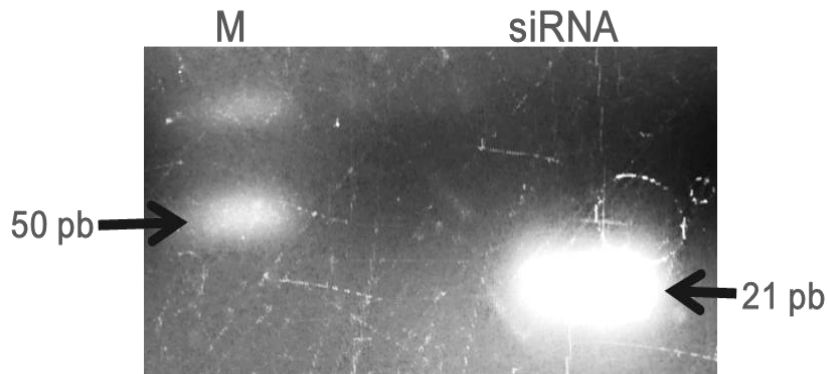


Figura 5 - gel de agarose 2% com controle positivo da síntese de siRNA após a digestão. M=marcador do peso molecular 50pb.

### 5.3 Avaliação da expressão de mRNAs dos genes que codificam *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e *$\beta$ -actina* na PQ nos animais Wistar controle comparado com Wistar tratado; WAR 0,23 controle e tratado; WAR 0,85 controle e tratado com 25 dias após o terceiro estímulo

Os resultados das análises das expressões dos genes que codificam *mdr1* (figura 6), *TNF- $\alpha$*  (figura 7), *ATP6ap2* (figura 8) e  *$\beta$ -actina* (figura 9) 25 dias após o terceiro estímulo na PQ dos animais Wistar e WAR foram comparados com Wistar controle e não houve diferença significativa entre os animais com SI diferentes e nem nas expressões de mRNAs desses genes. Os dados do RT-PCRtr demonstraram que os animais tratados com siRNA para *mdr1* tiveram uma diminuição entorno de 15-25% na expressão do mRNA de *mdr* quando se compara o controle com o tratado da mesma linhagem e SI,,, contudo não foi estatisticamente significativo. Para obter o silenciamento do gene, o valor deve ser acima de 50%. Os demais gráficos mostraram que o silenciamento não interferiu na expressão dos demais genes. Os animais tratados receberam infusão i.v de siRNA para *mdr1*.

Os valores obtidos do  $\Delta$ CT gerou análises bem heterogêneas para os animais Wistar controle e Wistar tratado, logo não é um grupo homogêneo e sendo necessário aumentar o n desses animais para obter valores mais homogêneos.

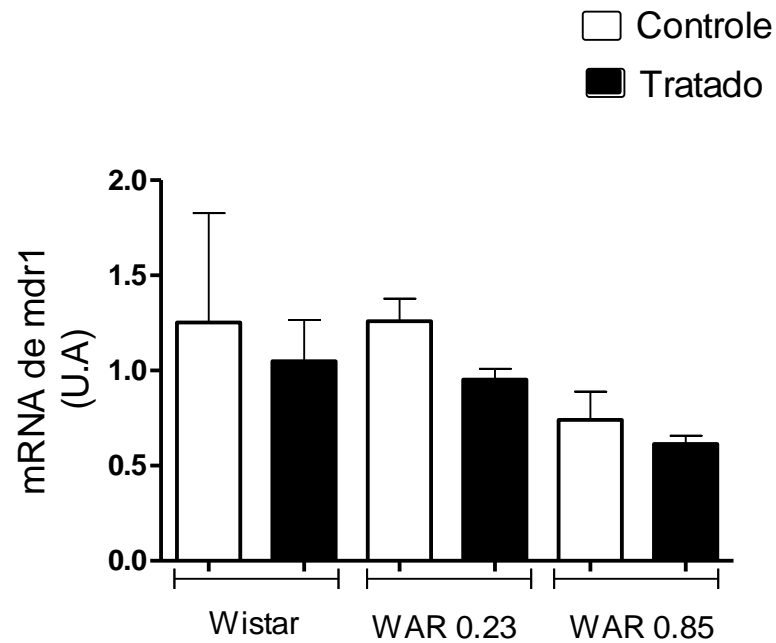


Figura 6 - Quantificação da expressão de mRNA de mdr1 na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=6) e WAR 0,85 (n=7) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de mdr1 não foi significativa.

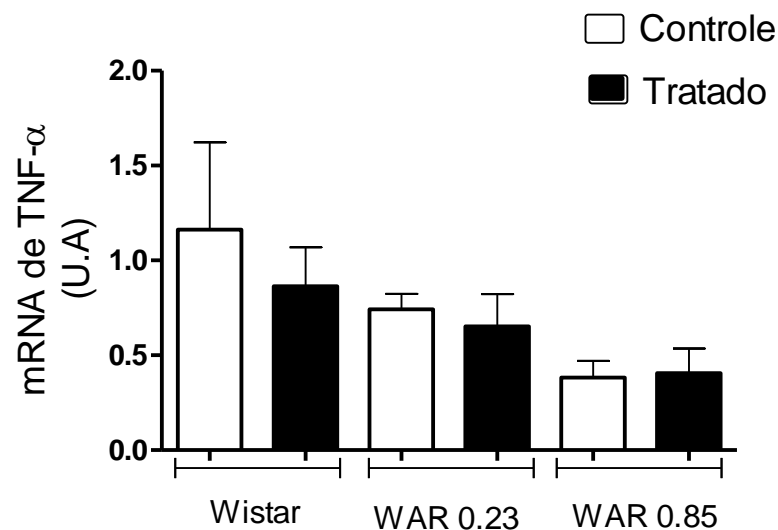


Figura 7 - Quantificação da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=7) e WAR 0,85 (n=6) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  não foi significativa.

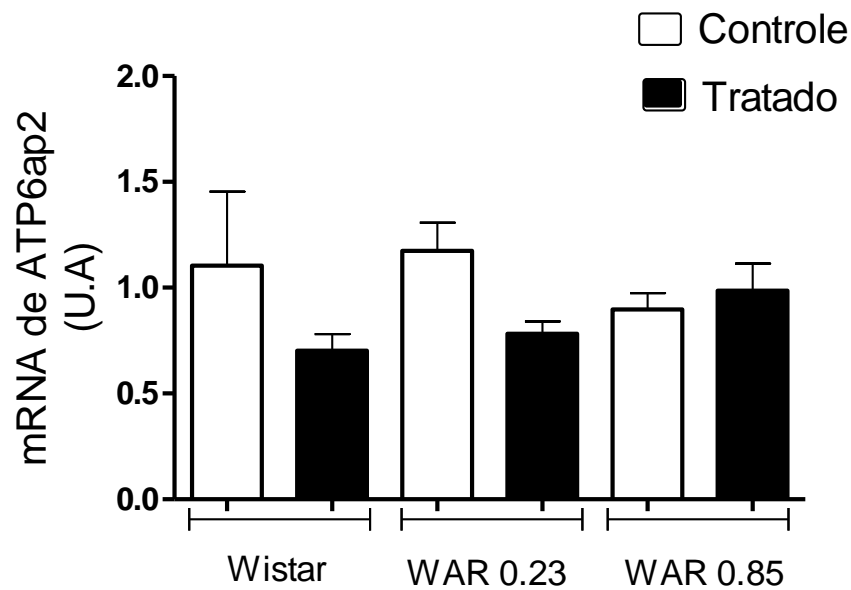


Figura 8 - Quantificação da expressão de mRNA de ATP6ap2 na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=7) e WAR 0,85 (n=8) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de ATP6ap2 não foi significativa.

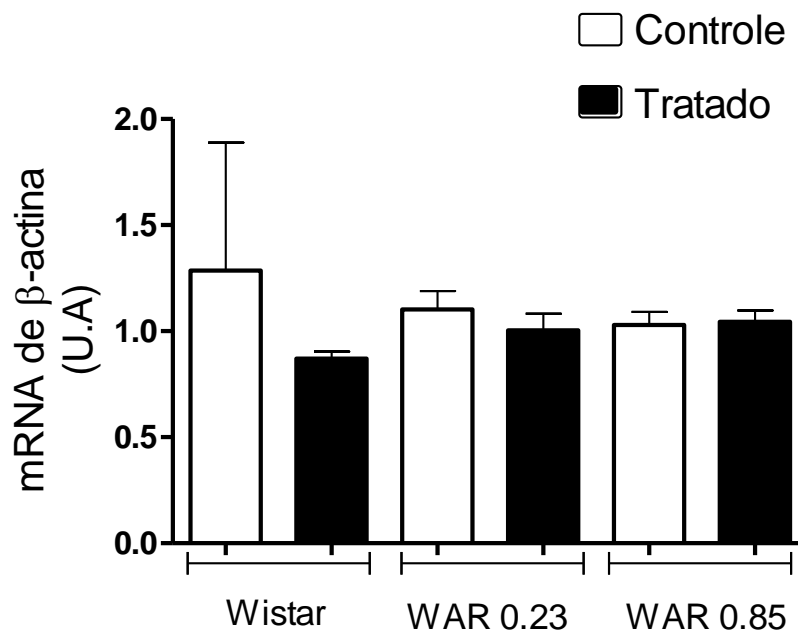


Figura 9 - Quantificação da expressão de mRNA de  $\beta$ -actina na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando Wistar controle (n=3) com Wistar tratado (n=3), WAR 0,23 (n=8) e WAR 0,85 (n=8) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de  $\beta$ -actina não foi significativa.

#### 5.4 Avaliação da expressão de mRNAs dos genes que codificam *mdr1*, *TNF- $\alpha$* , *ATP6ap2* e *$\beta$ -actina* na PQ nos animais WAR 0,23 controle e tratado; WAR 0,85 controle e tratado com 25 dias após o terceiro estímulo

Os resultados das análises das expressões dos genes que codificam *mdr1* (figura 10), *TNF- $\alpha$*  (figura 11), *ATP6ap2* (figura 12) e  *$\beta$ -actina* (figura 13) na PQ dos animais WAR e Wistar com 25 dias após o terceiro estímulo foram significativos para o *mdr1* para WAR 0,23 controle comparado ao WAR 0,85 controle ( $p < 0,05$ ) e comparado ao WAR 0,85 tratado ( $p < 0,01$ ). Em ambos o *mdr1* está diminuído em relação ao WAR  $SI \leq 0,23$  controle. Já a expressão de mRNA de *TNF- $\alpha$*  e de *ATP6ap2* está diminuída apenas no WAR  $SI \geq 0,85$  controle comparado com o WAR  $SI \leq 0,23$  controle.

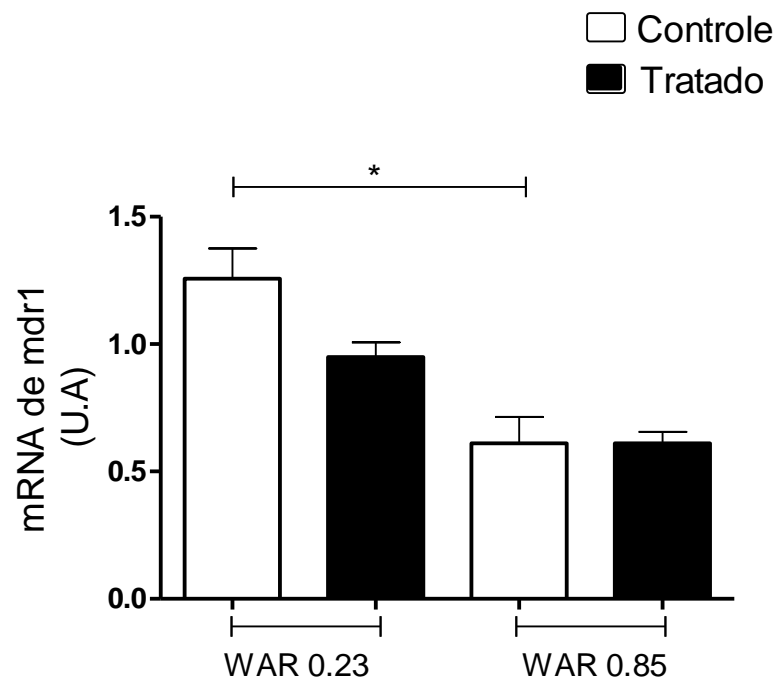


Figura 10 - Quantificação da expressão de mRNA de *mdr1* na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=3) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=3) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de *mdr1* foi significativa para WAR 0,85 controle ( $0,61 \pm 0,104$ ). Teste t não pareado com  $*p < 0,05$ .

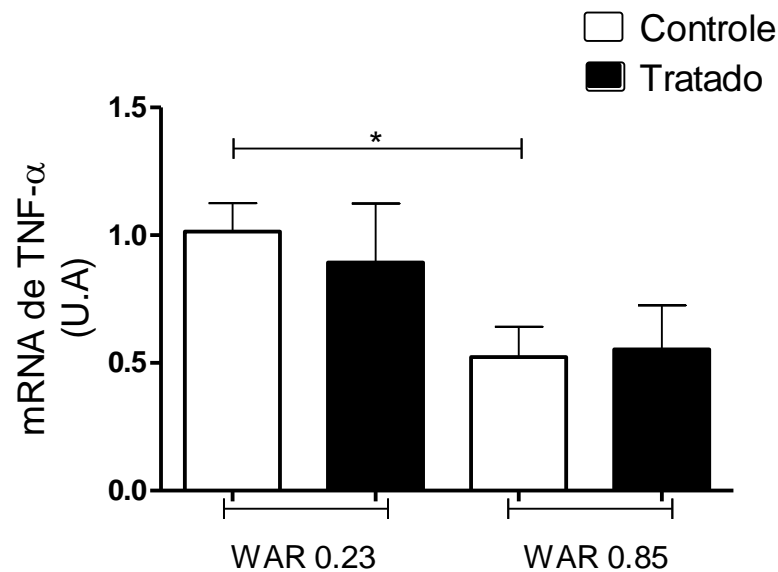


Figura 11 - Quantificação da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=3) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  foi significativa para WAR 0,85 controle (0,523 $\pm$ 0,118) comparado com o WAR 0,23 controle (1,015 $\pm$ 0,110). Teste t não pareado com \*p<0,05.

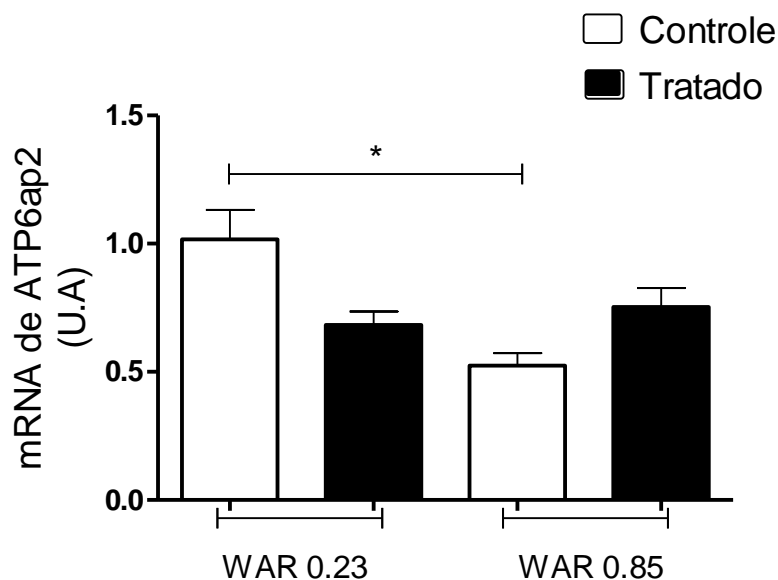


Figura 12 - Quantificação da expressão de mRNA de ATP6ap2 na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=3), WAR 0,85 controle (n=4) e WAR 0,85 tratado (n=3) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de ATP6ap2 foi significativa para WAR 0,85 controle (0,525 $\pm$ 0,048) comparado com o WAR 0,23 controle (1,018 $\pm$ 0,114). Teste t não pareado com \*p<0,05.

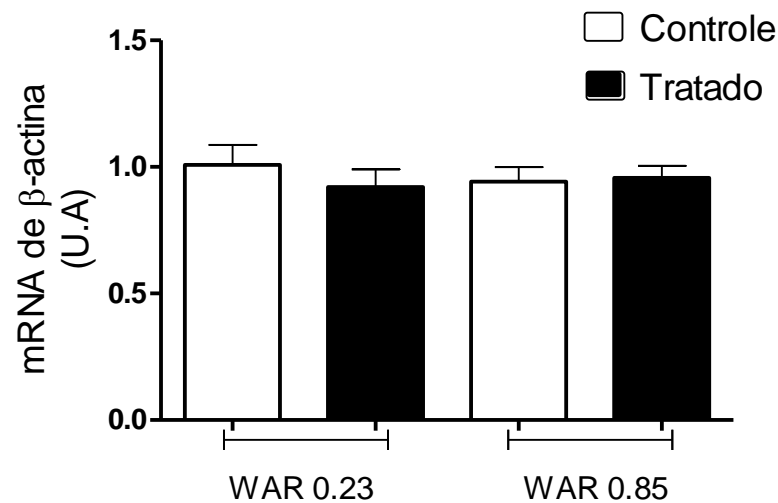


Figura 13 - Quantificação da expressão de mRNA de  $\beta$ -actina na PQ com 25 dias após o terceiro estímulo comparando WAR 0,23 controle (n=4) com WAR 0,23 tratado (n=4), WAR 0,85 controle (n=4) e WAR 0,85 tratado (n=4) normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de  $\beta$ -actina não foi significativa.

### 5.5 Comparação dos resultados obtidos para o mRNA de *mdr1* na PQ entre animais com 5 dias e 25 dias após o terceiro *screening*

O resultado da comparação do mRNA de *mdr1* entre os animais sacrificados 5 dias e 25 dias após o terceiro *screening* foi mostrado na figura 14. Esse resultado mostra que o estímulo está diretamente relacionado com a expressão do mRNA, assim como o tempo esperado após o estímulo permitiu a queda dos valores da expressão de mRNA. Também se observa que os animais WAR  $SI \leq 0,23$  apresentam uma variação muito pequena na expressão, possivelmente, por serem animais resistentes ao estímulo, possuem um mecanismo de equilíbrio dos níveis de expressão do mRNA de *mdr1* mais rapidamente.

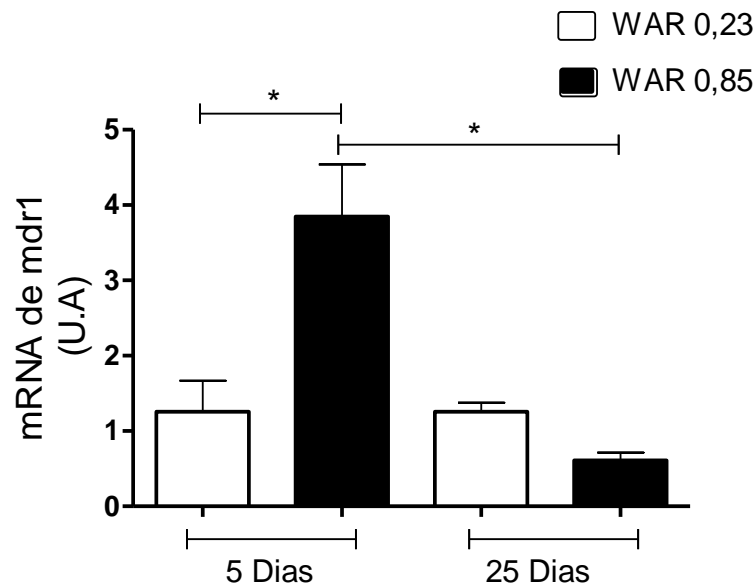


Figura 14 – Comparação da quantificação do gene *mdr1* expresso na PQ dos animais controles com 5 (n=9) e 25 (n=6) dias após o terceiro estímulo normalizado pelo S26. A expressão de mRNA de *mdr1* foi significativa para WAR 0,23 com 5 após o terceiro *screening* ( $1,25 \pm 0,414$ ) comparado com o WAR 0,85 com 5 após o terceiro *screening* ( $3,846 \pm 0,692$ ) e significativa para WAR 0,85 com 5 após o terceiro *screening* ( $3,846 \pm 0,692$ ) comparado com WAR 0,85 com 25 após o terceiro *screening* ( $0,61 \pm 0,104$ ). Teste t não pareado com  $*p < 0,05$ .

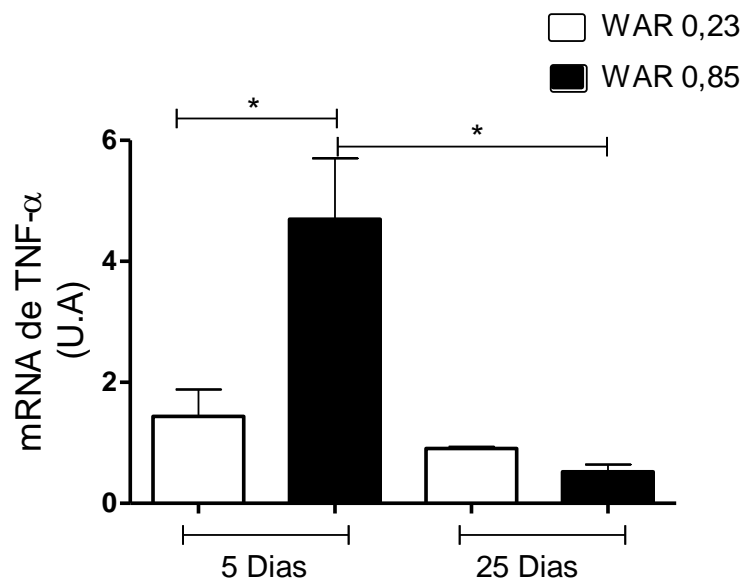


Figura 15 - Comparação da quantificação do gene *TNF-α* expresso na PQ dos animais controles com 5 (n=9) e 25 (n=6) dias após o terceiro estímulo normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de *TNF-α* foi significativa para WAR 0,23 com 5 após o terceiro *screening* ( $1,438 \pm 0,443$ ) comparado com o WAR 0,85 com 5 após o terceiro *screening* ( $4,698 \pm 1,003$ ) e significativa para WAR 0,85 com 5 após o terceiro *screening* ( $4,698 \pm 1,003$ ) comparado com WAR 0,85 com 25 após o terceiro *screening* ( $0,523 \pm 0,118$ ). Teste t não pareado com  $*p < 0,05$ .

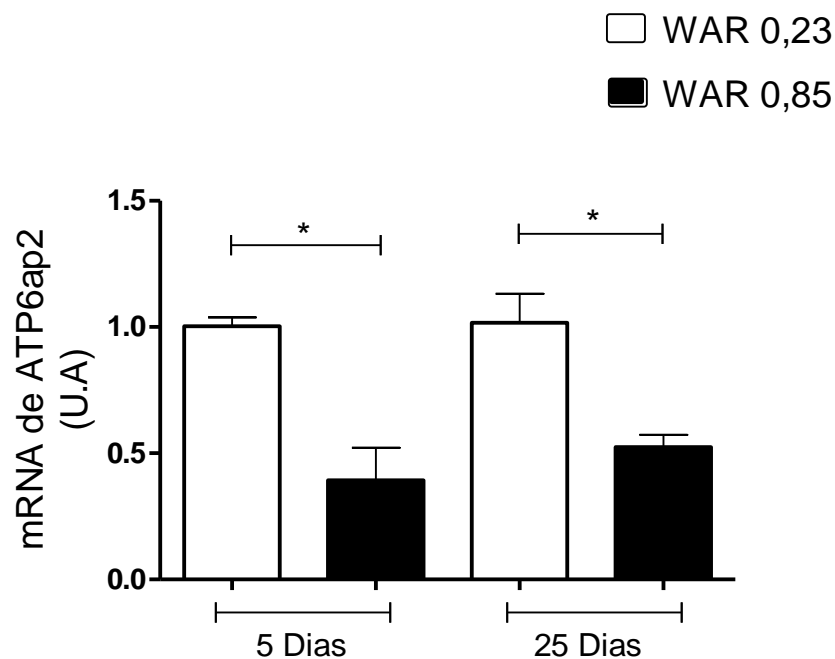


Figura 16 - Comparação da quantificação do gene *ATP6ap2* expresso na PQ em mRNA dos animais controles com 5 (n=7) e 25 (n=8) dias após o terceiro estímulo normalizados pelo mRNA de S26. A expressão de mRNA de *ATP6ap2* foi significativa para WAR 0,23 com 5 após o terceiro *screening* ( $1,003 \pm 0,035$ ) comparado com o WAR 0,85 com 5 após o terceiro *screening* ( $0,393 \pm 0,129$ ) e significativa para WAR 0,23 com 25 após o terceiro *screening* ( $1,018 \pm 0,114$ ) comparado com WAR 0,85 com 25 após o terceiro *screening* ( $0,492 \pm 0,124$ ). Test t não pareado com \*  $p < 0,01$ .

### 5.6 Período de latência entre estímulo audiogênico e resposta epileptogênica

Foi comparado o tempo que os animais levaram para responder ao primeiro, segundo e terceiro estímulo audiogênico realizados antes do sacrifício dos animais (n=13). A partir desse gráfico observa-se que houve diferença significativa no tempo de resposta ao estímulo que levou a crise epileptogênica. O terceiro *screening* do grupo 1 com 5 dias após o terceiro *screening* mostrou uma resposta muito mais rápida e significativa em relação às outras respostas ocorridas no grupo 1 e no grupo 2 com 25 dias após o terceiro *screening* (Figura 17). Já o grupo 2 apresentou períodos de latências mais homogêneos em relação ao grupo 1. O quarto *screening* realizado apenas nos animais do grupo 2 com 25 dias após o terceiro estímulo foi feito para verificar se os animais tiveram uma mudança comportamental após a injeção de PBS ou de siRNA. Entretanto não houve mudanças nos SI desses animais (dado não mostrado).

### Período de latência entre estímulo audiogênico e resposta epileptogênica

- WAR  $SI \geq 0,85$  grupo 1 com 5 dias após o terceiro estímulo
- WAR  $SI \geq 0,85$  grupo 2 com 25 dias após o terceiro estímulo

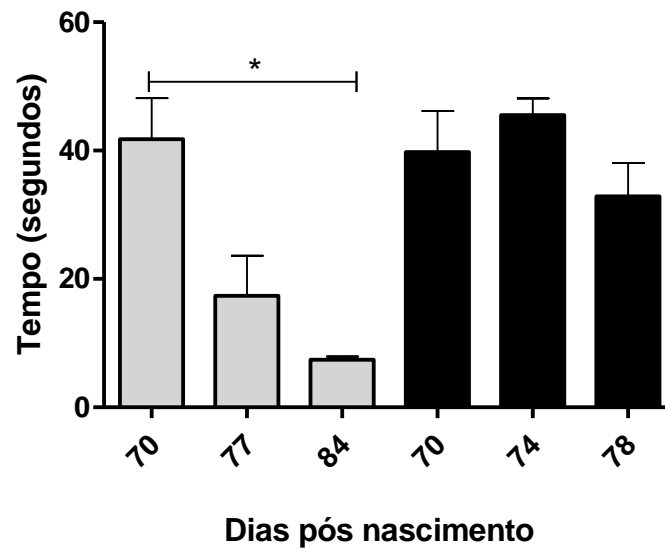


Figura 17 - Período de latência entre estímulo audiogênico e resposta epileptogênica. O período de latência dos animais do grupo 1 diminuiu no terceiro *screening* ( $7,4 \pm 0,509$ ) com parado com o primeiro estímulo ( $41,8 \pm 6,375$ ). Test t não pareado com  $*p < 0,001$ .

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível observar que a PQ é o tecido que permite diferenciar geneticamente os animais sensíveis e resistentes ao estímulo audiogênico. A avaliação tecidual permitiu determinar o tecido alvo em que ocorre essa diferença na expressão gênica de *mdr1* e *TNF- $\alpha$*  entre WARs da mesma colônia. A PQ é a região alvo dessa diferença existente entre os dois SI da colônia WAR. Nessa colônia, a PQ deve ser o local mais importante do cérebro envolvido na genética de sensibilidade audiogênica, portanto, o alvo principal para a análise genômica deste modelo animal.

O presente estudo mostrou que com cinco dias a expressão de *mdr1* está aumentada significativamente nos WAR  $SI \geq 0,85$  em relação aos WAR  $SI \leq 0,23$  na PQ. Embora o resultado dos córtices não fossem estatisticamente significativos observou-se uma tendência nestas estruturas. É interessante notar que nos experimentos do segundo grupo houve uma diminuição significativa da expressão de *mdr1* na PQ. Esses animais com 25 dias após o terceiro estímulo apresentaram uma readaptação em sua genômica funcional, porém não é possível afirmar se essa adaptação é devida a um fenômeno tardio pós-estímulo ou a idade. Essa pergunta ainda precisa ser esclarecida mesmo sabendo que a  $\beta$ -actina mostrou-se inalterada, ou seja, a estrutura celular se manteve íntegra. Outro dado observado foi que os valores de WAR  $SI \leq 0,23$  se mantem constantes, possivelmente estes animais conseguem reverter o processo do estímulo, mais rápido que cinco dias. Mais uma vez, observa-se que há diferença na expressão genética entre esses animais com SI diferentes. Segundo Kwan e colaboradores (2002) uma única estimulação audiogênica no GEPR provocou o aumento da expressão de mRNA de *mdr1* nos tecidos cerebrais, como no mesencéfalo, após 24h e no córtex cerebral após 24h e sete dias. Eles também revelaram que a crise audiogênica não teve efeito na ponte/medula e nem no hipocampo, corroborando os nossos dados. Isso é possível entender devido ao trajeto da via da crise audiogênica, onde não se inclui o hipocampo nem ponte/medula. Outros pesquisadores mostraram que as crises provocadas e não provocadas podem alterar vários genes, mesmo que os animais sejam sacrificados com uma hora após o estímulo (WILLIAMS; JOPE, 1994). Kwan e colaboradores (2002) previram que um grande número de genes acabaria por

revela-se suscetível à modulação induzida por convulsão, com padrões específicos de modelo de expressão em termos de relações temporais e substratos neuroanatômicos.

Ambroziak e colaboradores (2009) mostraram o aumento da expressão de *mdr1* quando as células foram expostas às drogas. Já Rizzi e colaboradores (2002) utilizaram C57BL/6 e induziram a crise com ácido caínico, resultando no aumento da expressão de *mdr1* que foi estatisticamente significativa para o hipocampo, mostrando que esse tipo de crise ativa outra circuitaria envolvendo o hipocampo.

Os trabalhos de Seegers et. al. (2002a) e Rizzi et. al. (2001) revelaram que o uso de drogas não altera a expressão da proteína P-gp. Já no estudo feito por Seegers e colaboradores (2002b) foi mostrado que o estímulo aumenta a expressão da proteína P-gp, corroborando o fato de que o estímulo altera a expressão. Isso mostra que a refratariedade possivelmente está relacionada com a quantidade de estímulo e não com a dosagem de drogas, ou seja, quanto mais crises, maior a expressão de *mdr1*, logo menos drogas absorvidas pelas células.

A crise epiléptica também influenciou na expressão de TNF- $\alpha$  nos animais sacrificados com cinco dias após o estímulo. Neste grupo o TNF- $\alpha$  estava aumentado nos animais WAR SI $\geq$ 0,85. Outros autores confirmam esse resultado do aumento deste mRNA como mostrado por Kim e colaboradores (2012) pela injeção de pilocarpina, por Shandra e colaboradores (2002) através de estímulos audiogênicos e também por Ashhab e Omran (2013 através da indução de crise por lítio/pilocarpina na fase aguda (2h), latente (3 semanas) e crônica (8 semanas). Kim et. al. (2012) analisou os animais Sprague-Dawley 24h após a injeção de pilocarpina, Shandra et. al. (2002) utilizou Wistar com 12h, um dia, três dias e uma semana após a estimulação elétrica de amígdala; e Ashhab & Omran (2013) utilizaram Sprague-Dawley imaturos (25 dias de idade). Já no segundo grupo analisado, a expressão de TNF- $\alpha$  ficou reduzida nos WAR SI $\geq$ 0,85, pois já haviam passado 25 dias que os animais haviam sido estimulados. Possivelmente a lógica se mantém para esse gene nos animais WAR SI $\leq$ 0,23 como ocorreu para o *mdr1*. Essa latência de 25 dias possibilitou aos animais se recuperarem do estímulo e terem a expressão dos genes nos seus possíveis estados iniciais. A presença de insultos,

como o estímulo audiogênico, leva o animal a ter crises, causando aumento do TNF- $\alpha$  (BALOSSO *et al.*, 2005; ASHHAB; OMRAN, 2013).

O estímulo seguido de crise nos animais WAR  $SI \geq 0,85$  levou a uma diminuição da expressão de mRNA de ATP6ap2 no primeiro grupo. Por outro lado, apesar do segundo grupo de animais controles terem a expressão de mRNA de ATP6ap2 em WAR  $SI \geq 0,85$  diminuída, ela aumentou em relação ao primeiro grupo, mesmo não sendo significativa. Shan e colaboradores (2008) trataram as células neuronais com renina o que resultou na inibição da frequência do potencial de ação durante cinco minutos, mas sem influenciar no potencial de repouso da membrana. Ramser e colaboradores (2005) mostraram que a deleção do gene *ATP6ap2* leva uma perda cognitiva e aumento de crises epiléticas. Diante destes resultados observa-se que a presença de renina ligada ao seu receptor ajuda a controlar os gatilhos para a crise e a ausência dele permite aumentar as crises. A própria crise ajuda a diminuir a expressão do ATP6ap2.

O estímulo, entretanto, não alterou o gene  *$\beta$ -actina* para os animais com os dois SI diferentes, indicando que se manteve íntegro. Assim, para esse estudo, ele também pode ser usado como gene normalizador (CARMO; ANDRADE; LIBERMAN, 2014). Por outro lado, pode ser que para avaliar sua expressão seja necessário um tempo mais curto, já que foi possível detectá-lo a partir de 10 minutos após a estimulação no experimento feito por Park e colaboradores (2014).

O aumento da expressão de mRNA de *TNF- $\alpha$*  e de *mdr1* na PQ mostrou que estes genes são putativos e suscetíveis para estudos genéticos. No entanto, se as proteínas TNF- $\alpha$  e P170, como produtos dos genes na região da PQ estão correlacionados com os processos de epilepsia em animais  $SI \geq 0.85$ , ainda não se sabe. Em relação ao gene do receptor de pro-renina, vale a pena investigar, o quanto influencia nas crises e na latência dessas crises, pois os animais WAR  $SI \geq 0.85$  tiveram sua expressão diminuída comparados com os WAR  $SI \leq 0,23$ . A  *$\beta$ -actina* mostrou-se inalterada em todas as situações analisadas o que infere que esse é um gene que pode ser considerado um normalizador de reação nesse modelo de estudos, assim como mostra que as células não sofreram alterações estruturais após três *screening*.

Em relação à infusão do siRNA em animais com 25 dias após o terceiro estímulo não mostrou o efeito esperado, pois inibir algo já subexpresso, no caso dos WAR  $SI \geq 0,85$ , não surtiu muito efeito. Assim, acredita-se que o silenciamento deve ser realizado ainda sob o efeito do estímulo. Dessa forma espera-se que seja possível visualizar uma resposta maior do siRNA sobre o *mdr1*. Outras razões para o siRNA não ter funcionado adequadamente foi o alvo escolhido e a quantidade de alvos. Ou seja, provavelmente este alvo não era o ideal para dar o efeito esperado ou é necessário mais alvos para obter um resultado semelhante a um animal *knockout*.

O tempo ocorrido nos dois grupos após o estímulo mostrou ser bastante relevante nas análises, pois possibilitou um entendimento do comportamento da latência assim como do efeito dos estímulos sobre os animais. O *screening* do segundo grupo feito entre 70, 74 e 78 dias de idade dos animais não teve diferença na latência corroborando o trabalho de Doretto e colaboradores (2003). Estes autores mostraram que não há diferença significativa entre os SI dos três dias estimulados e a latência.

Os resultados apresentados para os animais Wistar não revelaram dados conclusivos devido ao n pequeno, ter análises muito variáveis e por ser um grupo mais heterogêneo em relação ao WAR.

Muitas vias ainda precisam ser estudadas para entender melhor todo o processo envolvido nas crises epileptogênicas uma vez que este é um processo complexo. Mas pode-se afirmar que os resultados mostraram que há diferença entre o WAR sensível e resistente ao estímulo.

## 7 CONCLUSÃO

O aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  e de mdr1 e a diminuição de ATP6ap2 na PQ mostram que estes genes estão envolvidos no mecanismo funcional do modelo WAR na epilepsia e que o estímulo influencia na expressão desses mRNAs. A comparação tecidual mostrou que a PQ é a região alvo da diferença genética entre os WARs, pois está relacionada com a via audiogênica. Várias vias e subprodutos na região da PQ relacionados com a epilepsia em ratos SI $\geq$ 0,85 ainda são desconhecidas e precisam ser elucidadas.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADINA R. BUXBAUM, A. R.; WU, B.; SINGER, R. H. Single  $\beta$ -Actin mRNA Detection in Neurons Reveals a Mechanism for Regulating Its Translatability. **Science** v. 343, n. 6169, p. 419-422, 2014.
- ALMEIDA, A. Genetic determinants of neuronal vulnerability to apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences** v.70, n. 1, p.71-88, 2013.
- AMBROZIAK, K.; KUTEYKIN-TEPLYAKOV, K.; LUNA-TÓRTOS, C.; AL-FALAH, M.; FEDROWITZ, M.; LÖSCHER, W. Exposure to antiepileptic drugs does not alter the functionality of P-glycoprotein in brain capillary endothelial and kidney cell lines. **European Journal of Pharmacology** v. 628, p. 57-66, 2009.
- AMSTERDAM, A.; NISSEN, R. M.; SUN, Z.; SWINDELL, E. C.; FARRINGTON, S.; HOPKINS, N. Identification of 315 genes essential for early zebra fish development. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 101, p. 12792- 12797, 2004.
- ANNEGERS, J. F. The epidemiology of epilepsy. In: Wyllie E. **The treatment of epilepsy: principles and practice**. Third edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 131-138.
- ASCOUGH, K. R. Endocytosis: Actin in the Driving Seat. **Current Biology** v. 14, p.124–126, 2004.
- ASHHAB, M. U.; OMRAN, A.; KONG, H.; GAN, N.; HE, F.; PENG, J.; YIN, F. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. **Journal of Molecular Neuroscience** v. 51, n. 3, p.950-958, 2013.
- BALOSSO, S.; RAVIZZA, T.; PEREGO, C.; PESCHON, J.; CAMPBELL, I. L.; DE SIMONI, M. G.; VEZZANI, A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Annals of Neurology** v. 57, p. 804-812, 2005.
- BALOSSO, S.; RAVIZZA, T.; PIERUCCI, M. CALCAGNO, E.; INVERNIZZI, R.; DI GIOVANNI, E.; VEZZANI, A. Molecular and functional interactions between tumor necrosis factor alpha receptors and the glutamatergic system in the mouse hippocampus: implications for seizure susceptibility. **Neuroscience** v. 161, p. 293-300, 2009.
- BANCAUD, J.; HENRIKSEN, O.; RUBIO-DONNADIEU, F.; SEINO, M.; DREIFUSS, F. E.; PENRY, J. K. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia** v. 22, p. 489-501, 1981.

- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature** v. 409, p. 363-366, 2001.
- BLATRIX, S. Promenade 'round the cochlea. Disponível em [www.neuroreille.com/promenade/english/ptw/zoom1.htm](http://www.neuroreille.com/promenade/english/ptw/zoom1.htm). Acessado em 18/11/2014.
- BORST, P. Multidrug resistant proteins. **Seminars in Cancer Biology** v. 8, p. 131-134, 1997.
- BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M. WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute** v. 92, n. 16, p. 1295-1302, 2000.
- BRAKEBUSCH, C.; BOUVARD, D.; FABIO STANCHI, F.; TAKAO SAKAI, T.; FÄSSLER, R. Integrins in invasive growth. **Journal Clinical Investigation** v. 109, p. 999–1006, 2002.
- BRODIE, M. J.; BARRY, S. J. E.; BAMAGOUS, G. A.; NORRIE, J. D.; KWAN, P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology** v. 78, n. 20, p. 1548-1554, 2012.
- BROOKS-KAYAL, A. R.; SHUMATE, M. D.; JIN, H.; RIKHTER, T. Y.; COULTER, D. A. Selective changes in single cell GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. **Nature** v. 4, n. 10, p. 1166-1172, 1998.
- BUNNELL, T. M.; BURBACH, B. J.; SHIMIZU, Y.; ERVASTI, J. M.  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. **Molecular Biology of Cell** v. 22, p. 4047-4058, 2011.
- BURCKLÉ, C.; BADER, M. Prorenin and its ancient receptor. **Hypertension** v. 48, p. 549-551, 2006.
- BUXBAUM, A. R.; WU B.; SINGER, Single  $\beta$ -Actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* v. 343, n. 6169, p. 419-422, 2014.
- CALLEN, D. F.; BAKER, E.; SIMMERS, R. N.; SESHADRI, R.; RONINSON I. B.; Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. **Human Genetics** v. 77, p. 142-144, 1987.
- CARMO, L. S.; ANDRADE, M. C. C.; LIBERMAN, M. Beta-actina não é uma proteína normalizadora adequada em células musculares lisas vasculares de camundongos obesos com resistência à insulina e deficientes em leptina (obob) estimuladas com endotelina-1. Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo p. 1437, 2014.

- CHANG, B. S.; LOWENSTEIN, D. H. Epilepsy. **The New England Journal of Medicine** v. 349, p. 1257-1266, 2003.
- CLARK, I. A.; ALLEVA, L. M.; VISSEL, B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. **Pharmacology & Therapeutics** v. 128, n. 3, p. 519-48, 2010.
- Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia** v. 30, p. 389-399, 1989.
- Commission on Epidemiology and Prognosis, ILAE. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. **Epilepsia** v. 34, n. 4, p. 592-596, 1993.
- CORDON-CARDO, C.; O'BRIEN, J. P.; CASALS, D.; RITTMAN-GRAUER, L.; BIEDLER, J. L. MELAMED, M. R. BERTINO, J. R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood brain barrier sites. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 86, p. 695-698, 1989.
- DAILEY, J. W.; REIGEL, C. E.; MISHRA, P. K.; JOBE, P. C. Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy research** v. 3, n.1, p. 3-17, 1989.
- DELI, M.A., DESCAMPS, I., DEHOU, M.P., CECHELLI, R., JOO, F., ABRAHAM, C.S., TORPIER, G. Exposure of tumor necrosis factor- $\alpha$  to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. **Journal of Neuroscience Research** v. 41, p. 717-726, 1995.
- DELI, M. A.; ABRAHÁM, C. S.; KATAOKA, Y.; NIWA, M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology and pharmacology. **Cellular and Molecular Neurobiology** v. 25, p. 59-127, 2005.
- DEPAULIS, A.; MARESCAUX, C.; LIU, Z.; VERGNES, M. The GABAergic nigro-collicular pathway is not involved in the inhibitory control of audiogenic seizures in the rat. **Neuroscience Letters** v. 111, p. 269-274, 1990.
- DEUCHARS, K. L.; DUTHIE, M.; LING, V. Identification of distinct P-glycoprotein gene sequences in rat. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1130, p. 157-165, 1992.
- DORETTO, M. C.; CORTES-DE-OLIVEIRA, J. A.; ROSSETTI, F. GARCIA-CAIRASCO, N. Role of the superior colliculus in the expression. Of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar Audiogenic Rats. **Epilepsia** v. 50, n. 12, p. 2563-2574, 2009.
- DORETTO, M. C.; FONSECA, LÔBO, R. B.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Quantitative study of the response to genetic

- selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WAR). **Behavior Genetics** v. 33, n. 1, p. 33-42, 2003.
- DZITOYEVA S, DIMITRIJEVIC N, MANEV H. Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 100, n. 9, p. 5485-5490, 2003.
- ENGQVIST-GOLDSTEIN A.E.Y.; DRUBIN D.G. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** v. 19, p. 287-332, 2003.
- FAINGOLD, C. L.; RANDALL, M. E. Neurons in the deep layers of superior colliculus play a critical role in the neuronal network for audiogenic seizures: mechanisms for production of wild running behavior. **Brain Research** v. 815, p. 250-258, 1999.
- FEUERSTEIN, G. Z.; WANG, X.; BARONE, F. C. Inflammatory gene expression. in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. **Annals of The New York Academy of Science** v. 825, p. 179-193, 1997.
- FIRE, A.; SIQUN, X. MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v. 391, p. 806-811, 1998.
- FISHER, R. S.; BOAS, W. V. E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic seizures and epilepsy: definition proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia** v. 46, n. 4, p.470-472, 2005.
- FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J. Jr FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia** v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014.
- FISHER, R. S.; BOAS, W. V. E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic seizures and epilepsy: definition proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia** v. 46, n. 4, p.470-472, 2005.
- FONSECA, A. DE G. A. R. **Vaso pressina plasmática e tecidual em ratos com susceptibilidade epiláptica audiogênica (WARs)**. 2000. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências

Biológicas-Fisiologia e Farmacologia Instituto de Ciências Biológicas –  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

- FORSGREN, L. Epidemiology of intractable epilepsy in adults. In Johannessen SI, Gram, L., Sillanpää, M., Tomson, T. (Eds.), *Intractable Epilepsy*. **Wrightson Biomedical Publishing Ltd** p. 25-40, 1995.
- FRASER, A. G.; KAMATH, R. S.; ZIPPERLEN, P.; MARTINEZ-CAMPOS, M.; SOHRMANN, M.; AHRINGER, J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. **Nature** v. 408, p. 325-330, 2000.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; LOBO, R. B. Genetic selection of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures: a quantitative analysis. **Epilepsia** v. 31, p. 815, 1990.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; PRADO, P.; JORGE, B. P. D.; TERRA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. C. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods, **Behavioural Brain Research** v. 48, p. 49-56, 1992.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; NONAKA, K. O. Audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. **Pharmacology Biochemistry Behavior** v. 53, n. 3, p. 503-510, 1996.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. E. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats. **Behavioural Brain Research** v. 33, p. 65-77, 1989.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. E. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. **Physiology & Behavior** v. 50, p. 521-527, 1991.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.16, p.171-183, 1983.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C.; DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizure rats. **Behavioral Brain Research** v. 58, p. 57-67, 1993.
- GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* v. 214, p. 1020-1021, 1967.
- GONCZY, P.; ECHEVERRI, C.; OEGEMA, K.; COULSON, A.; JONES, S. J.; COPLEY, R. R.; DUPERON, J.; OEGEMA, J.; BREHM, M.; CASSIN, E.; HANNAK, E.; KIRKHAM, M.; PICHLER, S.; FLOHRS, K.; GOESSEN, A.; LEIDEL, S.; ALLEAUME, A. M.; MARTIN, C.; OZLU, N.; BORK, P.; HYMAN,

- A. A. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. **Nature** v. 408, p. 331-336, 2000.
- GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. The multidrug transporter, a double-edge sword. **The Journal of Biological Chemistry** v. 263, n. 25, p. 12163-12166, 1988.
- GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry** v.62, p. 385-427, 1993.
- GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; AMBUDKAR, S. V. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Current opinion in genetics & development** v. 6, n. 5, p. 610-61, 1996.
- GOUVEIA, T. L. F.; SCORZA, F. A.; SILVA, M. J. V.; BANDEIRA, T. DE A.; PEROSA, S. R.; ARGANARAZ, G. A.; SILVA, M. DE P.; ARAUJO, T. R.; FRANGIOTTI, AMADO, D. CAVALHEIRO, E. A.; SILVA, J. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. DA G. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators in the hippocampus and blocks the hyperthermia of rats submitted to long-lasting status epilepticus. **Epilepsy & Behavior** v. 20, p.1-5, 2011.
- GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In: Epilepsia. 3ª Edição. São Paulo. Lemos Editorial p. 1-10, 2000.
- HARTMANN, G.; CHEUNG, A. K. Y.; PIQUETTE-MILLER, M. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporter in endotoxemia. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 303, n. 1, p. 273-281, 2002.
- HUANG, K.; BECK, C. F. Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 100, n. 10, p. 6269-6274, 2003.
- HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science** v. 297, p. 2056-60, 2002.
- JETTE, L.; POULIOT, J.-F.; MURPHY, G. F.; BELIVEAU, R. Isoform 1 (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. Evidence for cross-reactivity of antibody C219 with an unrelated protein. **The Biochemical Journal** v. 305, p. 183-200, 1995.
- JOBE, P. C.; MISHRA, P. K.; LUDVIG, N.; DAILEY, J. W. Scope and contribution of genetic models to an understanding of the epilepsies. **Critical Reviews in Neurobiology** v. 6, p. 183-200, 1991.

- JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants permeability. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 455, p. 152-162, 1976.
- KALE, R. Global campaign against epilepsy: the treatment gap. *Epilepsia* v. 43, n. 6, p. 31-33, 2002.
- KAMATH, R. S.; FRASER, A. G.; DONG, Y.; POULIN, G.; DURBIN, R.; GOTTA, M.; KANAPIN, A.; LE BOT, N.; MORENO, S.; SOHRMANN, M.; WELCHMAN, D. P.; ZIPPERLEN, P.; AHRINGER, J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. **Nature** v. 421, p. 231-237, 2003.
- KIESMANN, M. ; MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; MICHELETTI, G.; DEPAULIS, A.; WARTER, J. M. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological, and electrocephalographic studies. **Journal of Neural Transmission** v. 72, n.3, p. 235-244, 1988.
- KIM, D. H.; FEINBAUM, R.; ALLOING, G.; EMERSON, F. E.; GARSIN, D. A.; INOUE, H.; TANAKA-HINO, M.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; TAN, M. W.; AUSUBEL, F. M. A conserved p38 MAP kinase pathway in **Caenorhabditis elegans** innate immunity. **Science** v. 297, p. 623-626, 2002.
- KIM, J.; RYU, H. J.; CHOI, S. Y.; KANG, T. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated threonine 435 phosphorylation of p65 nuclear factor- $\kappa$ B subunit in endothelial cells induces vasogenic edema and neutrophil infiltration in the rat piriform cortex following status epilepticus. **Journal of Neuroinflammation** v. 9, n. 1, p. 6-18, 2012.
- KOSTROUCHOVA, M.; KOSTROUCH, Z.; SAUDEK, V.; PIATIGORSKY, J.; RALL, J. E. BIR-1, a *Caenorhabditis elegans* homologue of Survivin, regulates transcription and development. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 100, n. 9, p.5240-5245, 2003.
- KRUSHINSKY, L. V.; MOLODKINA, L. N.; FLESSE, D. A. The functional state of the brain during sonic stimulation. In: Physiological effects of noise. Welch, B. L. and Welch, A. L. (Eds), Penum Press, New York, 1979.
- KUMAR, A.; TRIPATHI, D.; PALIWAL, V. K.; NEYAZ, Z.; AGARWAL, V. Role of P-glycoprotein in refractoriness of seizure to antiepileptic drugs in Lennox-Gastaut Syndrome. **Journal of Child Neurology** p. 1-5, 2014.
- KWAN, P.; SILLS, G. J.; BUTLER, E.; GANT, T. W.; MELDRUM, B. S.; BRODIE, M. J. Regional expression of multidrug resistance genes in genetically epilepsy-prone rat brain after a single audiogenic seizure. **Epilepsia** v. 43, n. 11, p. 1318-1323, 2002.

- LAZAROWSKI, A.; JAVIER-RAMOS, A.; RIVELLO, H. G.; BRUSCO, A.; GIRARDI, E. Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. **Cellular and Molecular Neurobiology** v. 24, n. 1, p. 77-85, 2004 b.
- LAZAROWSKI, A.; LUBIENIECKI, F.; CAMARERO, S.; POMATA, H.; BARTULUCHI, M.; SEVLEVER, G.; TARATUTO, A. L. Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy. **Pediatric Neurology** v. 30, n. 2, p. 102-106, 2004.
- LAZAROWSKI, A.; SEVLEVER, G.; TARATURO, A.; MASSARO, M.; RABINOWICZ, A. Tuberous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. **Pediatric Neurology** v. 21, n. 4, p. 731-734, 1999.
- LEITE, J. P.; CAVALHEIRO, E. A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a modelo f apontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Research** v. 20, p. 93-104, 1995.
- LERCHE, H.; SHAH, M.; BECK, H.; NOEBELS, J.; JOHNSTON, D.; VINCENT, A. Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. **Journal Phisiology** n. 591, n. 4, p. 753-764, 2013.
- LEVEILLE-WEBSTER, C. R.; ARIAS, I. M. The biology of the P-glycoproteins. **The Journal Membrane Biology** v. 143, n. 2, p. 89-102, 1995.
- LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Clinical relevance of P-glycoprotein in drug therapy. **Drug Metabolism Review** v. 35, p. 417-454, 2003.
- LIU, X.; YANG, Z.; YANG, J.; YANG, H. Increased P-glycoprotein expression and decreased phenobarbital distribution in the brain of pentylenetetrazole-kindled rats. **Neuropharmacology** v. 53, p. 657-663, 2007.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LONGLEY, D. B; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology** v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.
- LUM, L.; YAO, S.; MOZER, B.; ROVESCALLI, A.; VON KESSLER, D.; NIRENBERG, M.; BEACHY, P. A. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells. **Science** v. 299, p. 2039-2045, 2003.
- LÖSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Progress in Neurobiology** v. 53, p. 239-258, 1997.
- LÖSCHER, W.; LEPPIK, I. E. Critical re-evaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs. **Epilepsy Research** v. 50, p. 17-20, 2002.

- MACHADO, A. Estruturas e funções do córtex cerebral. In: Angelo Machado. **Neuroanatomia Funcional**. Belo Horizonte: Atheneu 2 edição 2004. p. 257-273.
- MALE, D. The blood–brain barrier. No barrier to a determined lymphocyte. In: Greenwood, J.; Begley, D.J.; Segal, M.B. **New Concepts of a Blood–Brain Barrier**. New York: Plenum Press, 1995. p. 311–314.
- MARIN, T. M.; CLEMENTE, C. F.; SANTOS, A. M.; PICARDI, P. K.; PASCOAL, V. D.; LOPES-CENDES, I.; SAAD, M. J.; FRANCHINI, K. G. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. **Circulation Research** v.103, n. 8, p. 813-824, 2008.
- MARTINS, A. S.; GREENE, L. J.; YOHO, L. L.; MILSTED, A. The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. **Gene** v. 161, n. 2, p. 253-257, 1995.
- MELDRUM, B. S.; BESTER, H. How to develop new drugs for prevention of epilepsy or its progression?: The complexity of progression: epilepsy, neurodegeneration and behavior (experimental view). In: LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. **New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies**. *Epilepsy Research* v. 69, p. 183-272, 2006.
- MILLAN, M. H.; MELDRUM, R. S.; BOERSMA, C. A.; FAINGOLD, C. L. Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. II. Efferent seizure propagating pathway. **Experimental Neurology** v. 99, p.687-698, 1988.
- MINAMI, M.; KURASHI, Y.; SATOH, M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communication** v. 176, p. 593-598, 1991.
- NGUYEN, G. Twenty years of the (pro) renin receptor. **Journal of the American Society of Hypertension** v. 2, n. 2, p. 59-63, 2008.
- NGUYEN, G.; MULLER, D. N. The biology of the (pro) renin receptor. **Journal of the American Society of Nephrology** v.21, p. 18-23, 2010.
- NOOTER, K.; HERWEIJER, H. Multidrug resistance (*mdr*) genes in human cancer. **British Journal Cancer** v.63, p. 663-669, 1991.
- PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 2, p. 736-746. 2003.
- PARK, H. Y.; LIM, H.; YOON, Y. J.; FOLLENZI, A.; NWOKAFOR, C.; LOPEZ-JONES, M. MENG, X.; SINGER, R. H. Visualization of Dynamics of Single

- Endogenous mRNA Labeled in Live Mouse. **Science** v.343 n. 6169 p. 422-424, 2014.
- PASCOAL, V. D. B. **O papel da interleucina – 1 beta na fase aguda do modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina**. Campinas, 2010. 137p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- PEKARIK, V.; BOURIKAS, D.; MIGLINO, N.; JOSET, P.; PREISWERK, S.; STOECKLI, E. T. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. **National Biotechnology** v. 21, n. 1, p. 93-96, 2003.
- PEREIRA, T. C.; PASCOAL, V. D.; MARCHESINI, R. B.; MAIA, I. G.; MAGALHÃES, L. A.; Zanotti-Magalhães, E. M.; Lopes-Cendes, I. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Experimental Parasitology** v. 118, n. 4, p. 619-623, 2008.
- PEREIRA, M. C. C.; MARTINS, A. S.; ASSUMPÇÃO, G. A.; VILELA, M. P.; SANTOS, J. A.; SIQUEIRA, J. M.; MILSTED, A; VASCONCELOS, A. C.; RAMIREZ, DORETTO, M. C. Absolute quantification pcr for the rat multidrug resistance (mdr1) gene expression analysis. *The Ohio Journal of Science*. v. 108, p. A-15-a-16, 2008.
- PLATA-SALAMÁN, C. R.; ILYIN, S. E.; TURRIN, N. P.; GAYLE, D.; FLYNN, M. C.; ROMANOVITCH, A. E.; KELLY, M. E.; BUREAU, Y.; ANISMAN, H.; MCINTYRE, D. C. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. **Brain Research. Molecular Brain Research** v. 75, p. 248-258, 2000.
- POTSCHAKA, H.; LÖSCHER, W. In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. **Epilepsia** v. 42, n 10, p. 1231-1240, 2001.
- RAMSER, J.; ABIDI, F. E.; BURCKLÉ, C. A.; LENSKI, C.; TORIELLO, H.; WEN, G.; LUBS, H. A.; ENGERT, S.; STEVENSON, R. E.; MEINDL, A.; SCHWARTZ, C. E.; NGUYEN, G. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. **Human Molecular Genetics** v. 14, n. 8, 1019-1027, 2005.
- REES, M. I. The genetics of epilepsy: the past, the present and future. **Seizure** v. 19, p. 630-683, 2010.
- REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. **Epilepsy Research** v. 24, p. 109-222, 1999.
- RIZZI, M.; CACCIA, S.; GUIISO, G.; RICHICHI, C.; GORTER, J. A.; ARONICA, E.; ALIPRANDI, M.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; D'INCALCI M.; SAMANIN, R.; VEZZANI, A. Limbic seizure induce P-glycoprotein in rodents brain functional

- implications for pharmacoresistance. **The Journal of Neuroscience** v. 22, n. 14, p. 5833-5839, 2002.
- RIZZI, M.; GUIISO, G.; MULÉ, F.; MONETA, D.; SPERK, G.; VEZZANI, A.; CACCIA, S. Induction of *mdr-1* by limbic seizures in mice: relevance for drug resistance in epilepsy. **Abstract Society of Neuroscience** v. 27, p. 553.2, 2001.
- ROGAWSKI, M. A.; TAYLOR, C. P. How to develop better anti-ictal drugs?: Ion channels. In: LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. **New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies**. *Epilepsy Research* v. 69, p. 183-272, 2006.
- RONINSON, I. B.; CHIN, J. E.; CHOI, K.; GROS, P.; HOUSMAN, D. E.; FOJO, A.; SHEN, D.-W.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Isolation of human MDR DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America** v. 83, p. 4538-4542, 1986.
- ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M. C.; OLIVEIRA, J. A.; GARCIA-CAIRASCO, N. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy Research** v. 72, p. 192-208, 2006.
- SCHINKEL, A. H.; SMIT, J. J. M.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJEN, J. H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MEL, C. A. A. M.; VAN DER VALKS, M. A.; ROBANUS-MAANDAG, E. C.; TE RIELE, H. P. J.; BERNS, A. J. M.; BORST, P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. **Cell** v. 77, p. 491-502, 1994.
- SEEGERS, U.; POTSCSKA, H.; LÖSCHER, W. Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions. **European Journal of Pharmacology** v. 451, p. 149 – 155, 2002a.
- SEEGERS, U.; POTSCSKA, H.; LÖSCHER, W. Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainite model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** v. 51, p. 257-268, 2002b.
- SHAN, Z.; CUADRA, A. E.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M. K. Characterization of a functional (pro) renin receptor in rat brain neurons. **Experimental Physiology** n. 93, v. 5, p. 701-708, 2008
- SHANDRA, A. A.; GODLEVSKY, L. S.; VASTYANOV, R. S.; OLEINIK, A. A.; KONOVALENKO, V. L.; RAPOPORT, E. N.; KOROBKA, N. N. The role of

- TNF- $\alpha$  in amygdala kindled rats. **Neuroscience Research** v. 42, p. 147-153, 2002.
- SHEN, D.-W.; FOJO, A.; CHIN, J. E.; RONINSON, I. B.; RICHERT, N.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Human multidrug-resistance cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. **Science** v. 232, p. 643-645, 1986.
- SILLANPÄÄ, M.; SCHMIDT, D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. **Brain** v. 129, p. 617-624, 2006
- SILVERMAN, J. A. Multidrug-resistance transporters. **Pharmaceutical Biotechnology** v. 12, p. 353-386, 1999.
- SLAVIERO, K. A.; CLARKE, S. J.; RIVORY, L. Inflammatory response: an unrecognized source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. **The Lancet Oncology** v. 4, p. 224-232, 2003.
- STAFSTROM, C. E.; Tempel, B. L. Epilepsy genes: the link between molecular dysfunction and pathophysiology. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews** v. 6, p. 281-292, 2000.
- SZAKACS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug** v. 5, p. 219-234, 2006.
- TISHLER, D. M.; WEINBERG, K. T.; HINTON, D. R.; BARBARO, N.; ANNETT, G. M.; RAFFEL, C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically epilepsy. **Epilepsia** v. 36, p. 1-6, 1995.
- TURRIGIANO, G. G. The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. **National Institutes of Health Public Access** v. 135, n. 3, p. 422-435, 2010.
- UEDA, K.; CORNWELL, M. M.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; RONINSON, I. G.; LING, V.; RIORDAN, J. R. The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 141, n. 3, p. 956-962, 1986.
- VAN VLIET, E.; ARONICA, E.; REDEKER, S.; MARCHI, N.; RIZZI, M.; VEZZANI, A.; GORTER, J. Selective and persistent upregulation of mdr1b mRNA and P-glycoprotein in the parahippocampal cortex of chronic epileptic rats. **Epilepsy Research** v. 60, p. 203-213, 2004.
- VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T. Z. The role of inflammation in epilepsy. **Nature reviews neurology** v. 7, p. 31-40, 2011.
- VEZZANI, A.; MONETA, D.; RICHICHI, C.; ALIPRANDI, M.; BURROWS, S. J.; RAVIZZA, T.; PEREGO, C.; DE SIMONI, M. G. Functional role of inflammatory

cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. **Epilepsia** v. 43, n. 5, p. 30-35, 2002.

VIEIRA, J.; TEIXEIRA, A. B.; NOGUEIRA, M. F. G. SPECIFICITY AND SENSITIVITY OF THE PRIMERS FROM GENOMIC SEQUENCE OF  $\beta$ -ACTIN IN THE POLYMERASE CHAIN REACTION TO *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) (Carnivora, Canidae). **VII Congresso de Iniciação Científica Anais** 2008.

VINCENT, S.; MARTY, L.; FORT, P. S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. **Nucleic Acids Research**. v. 21, n. 6, 1993.

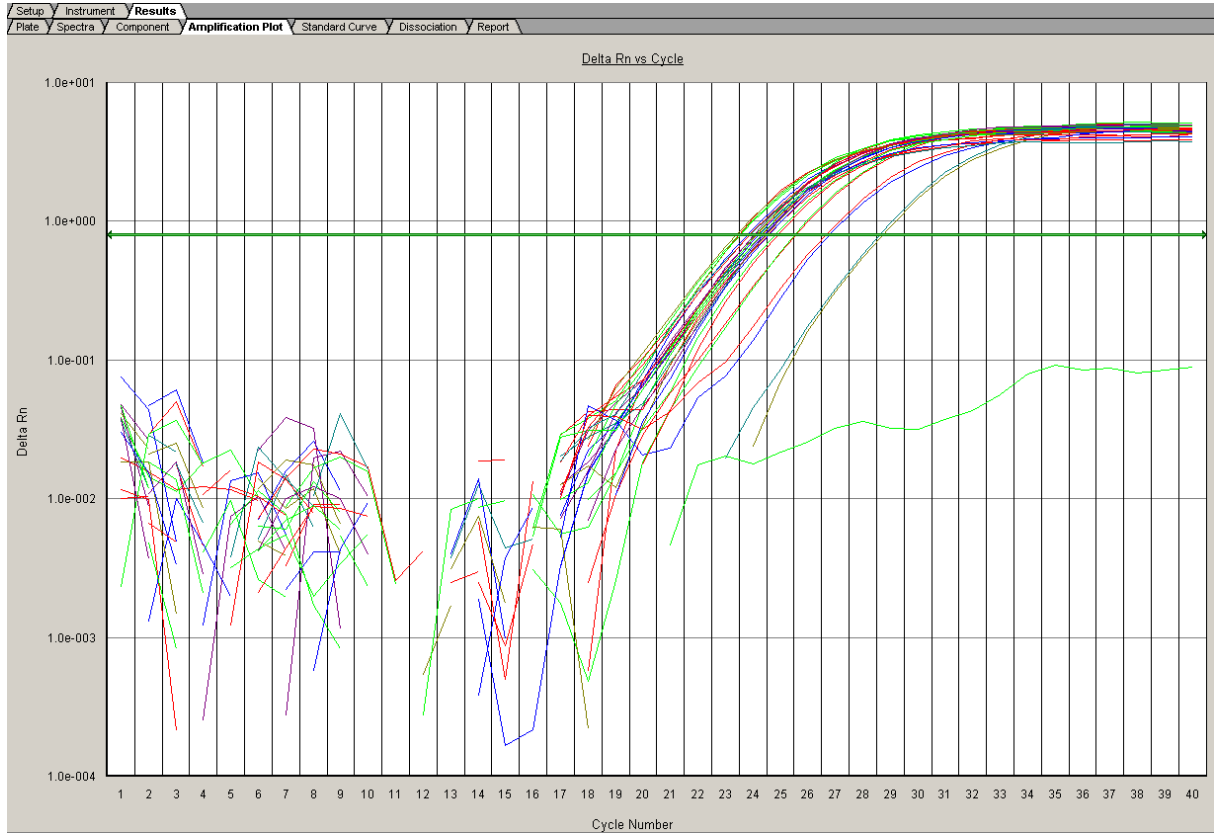
WILLIAMS, M. B.; JOPE, R. S. Distinctive rat brain immediate early gene responses to seizures induced by lithium plus pilocarpine. **Molecular Brain Research** v. 25, n. 80, 1994.

ZHANG, C.; KWAN, P.; ZUO, Z.; BAUM, L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 64, p. 930-942, 2012.

ZHANG, L.; ONG, W. Y.; LEE, T. Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainite injections. **Experimental Brain Research** v. 126, p. 509-516, 1999.

# 9 ANEXOS

## A



## B

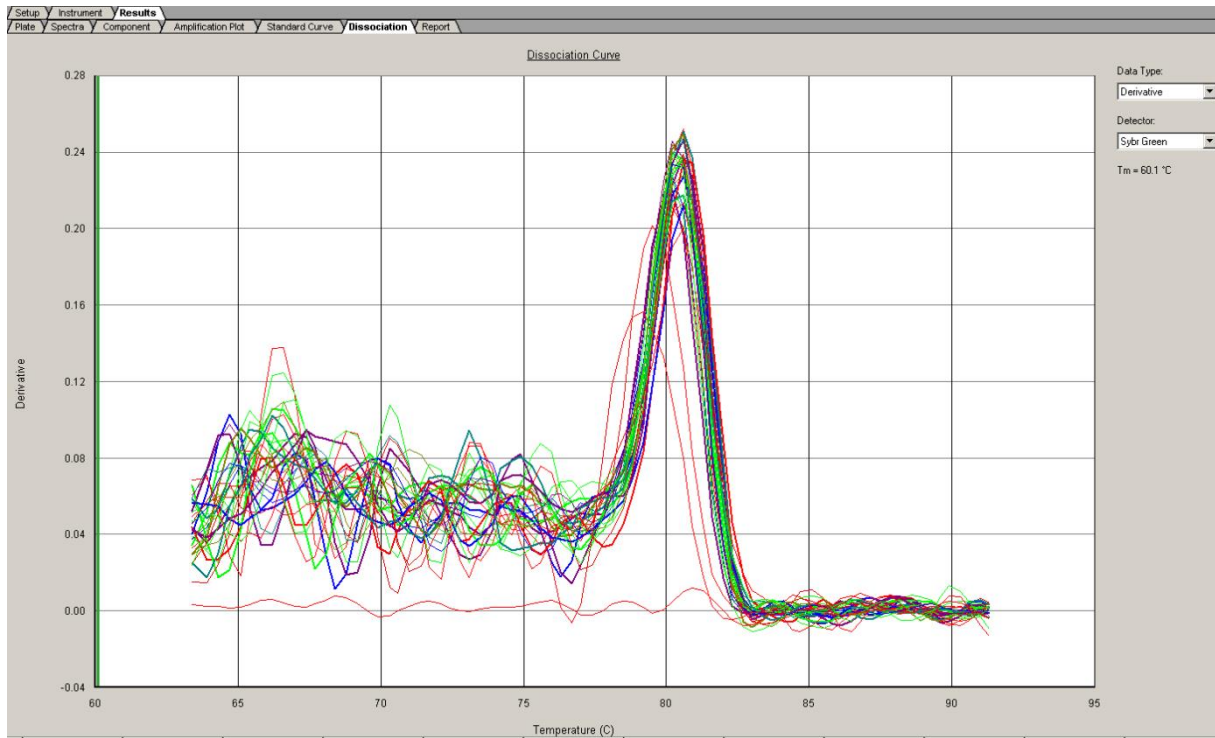


Figura suplementar 1 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos *amplicons* alvos para o normalizador S26.

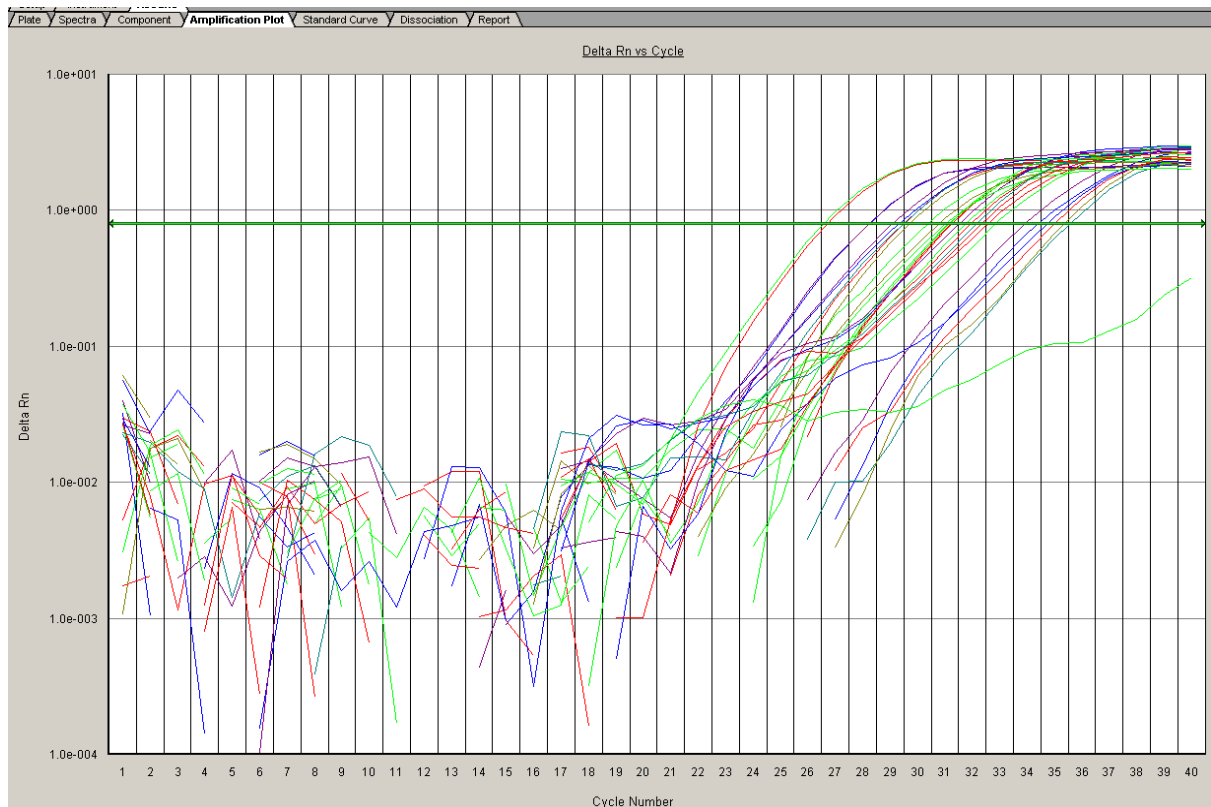
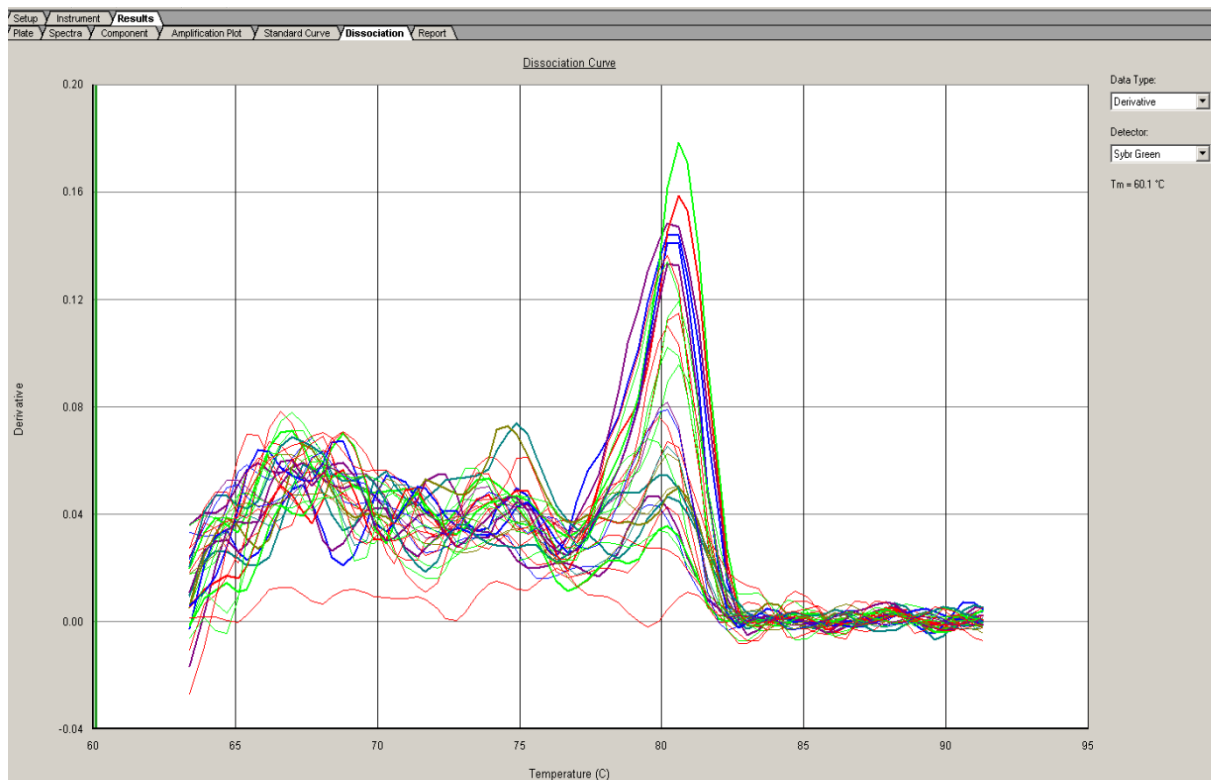
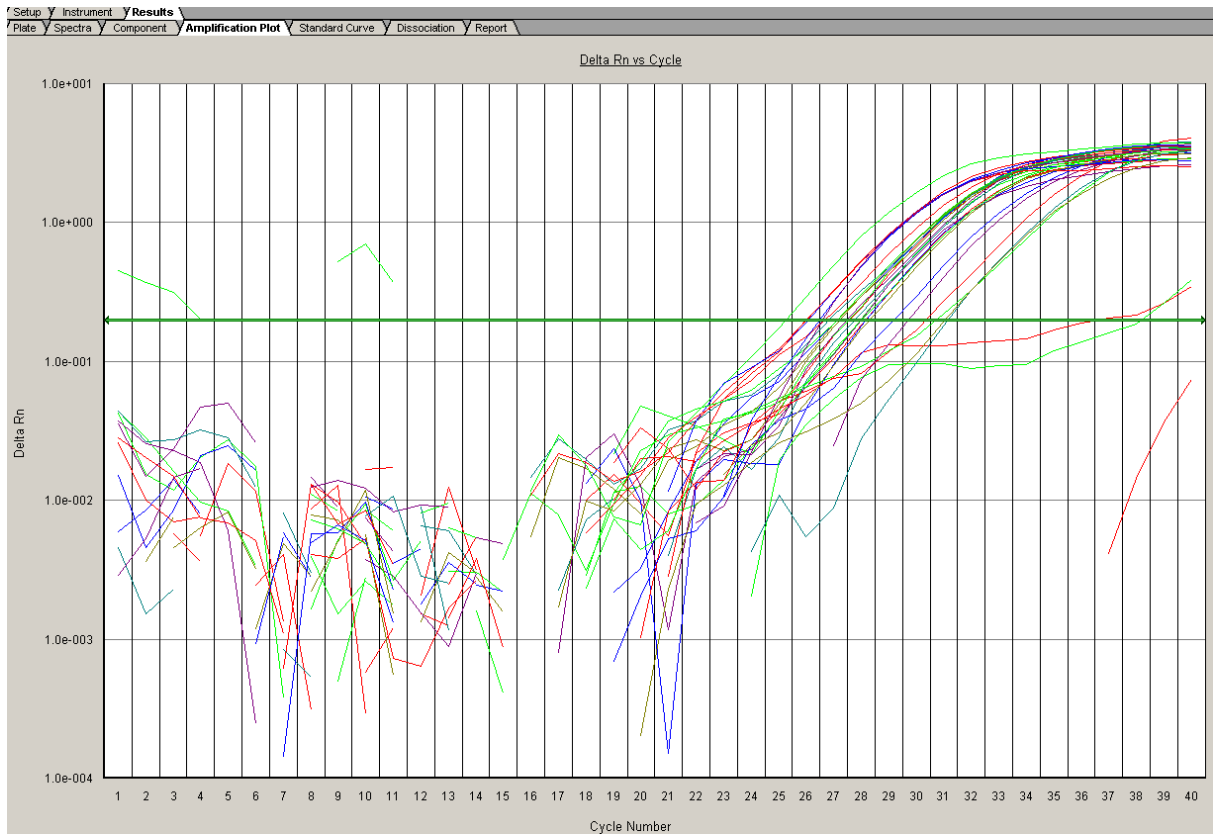
**A****B**

Figura suplementar 2 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos amplicons alvos para o gene *mdr1*.

A



B

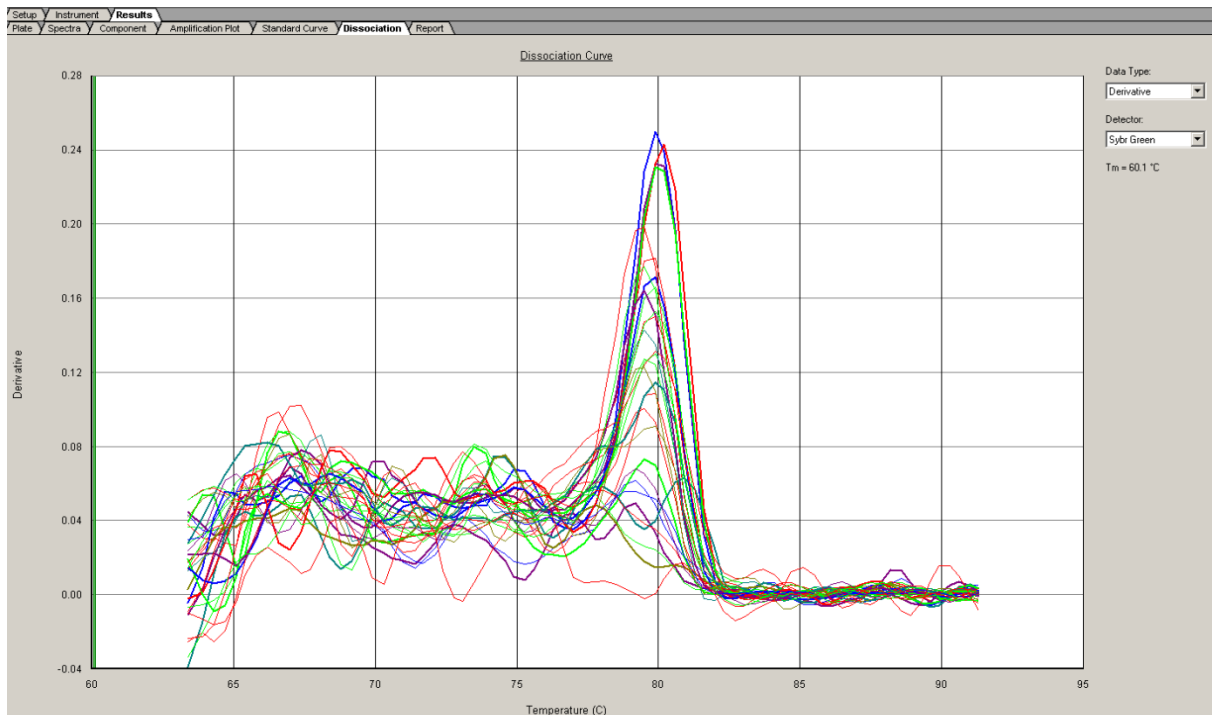


Figura suplementar 3 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos amplicons alvos para o gene *TNF-α*.

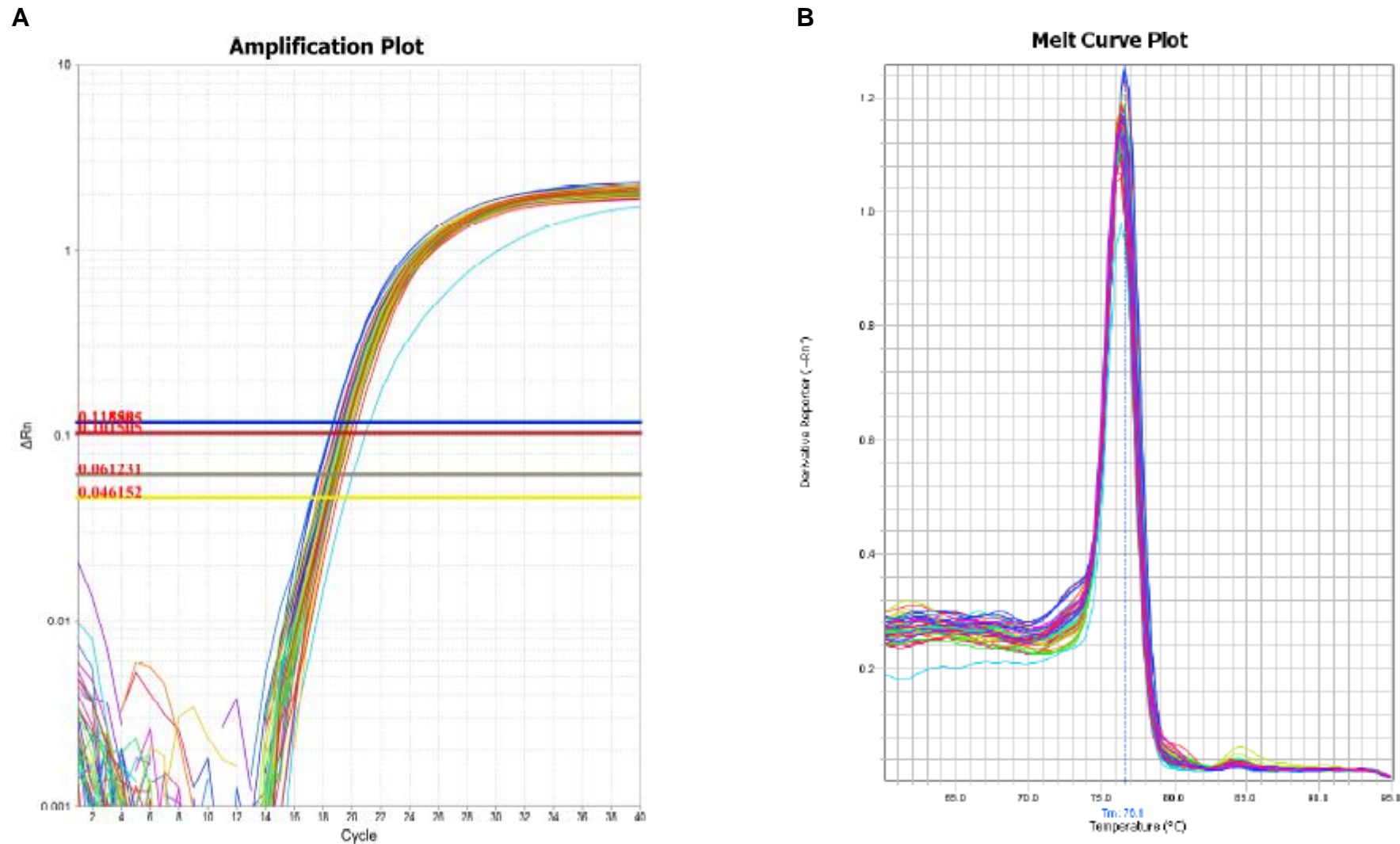


Figura suplementar 4 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos *amplicons* alvos para o gene *ATP6ap2*.

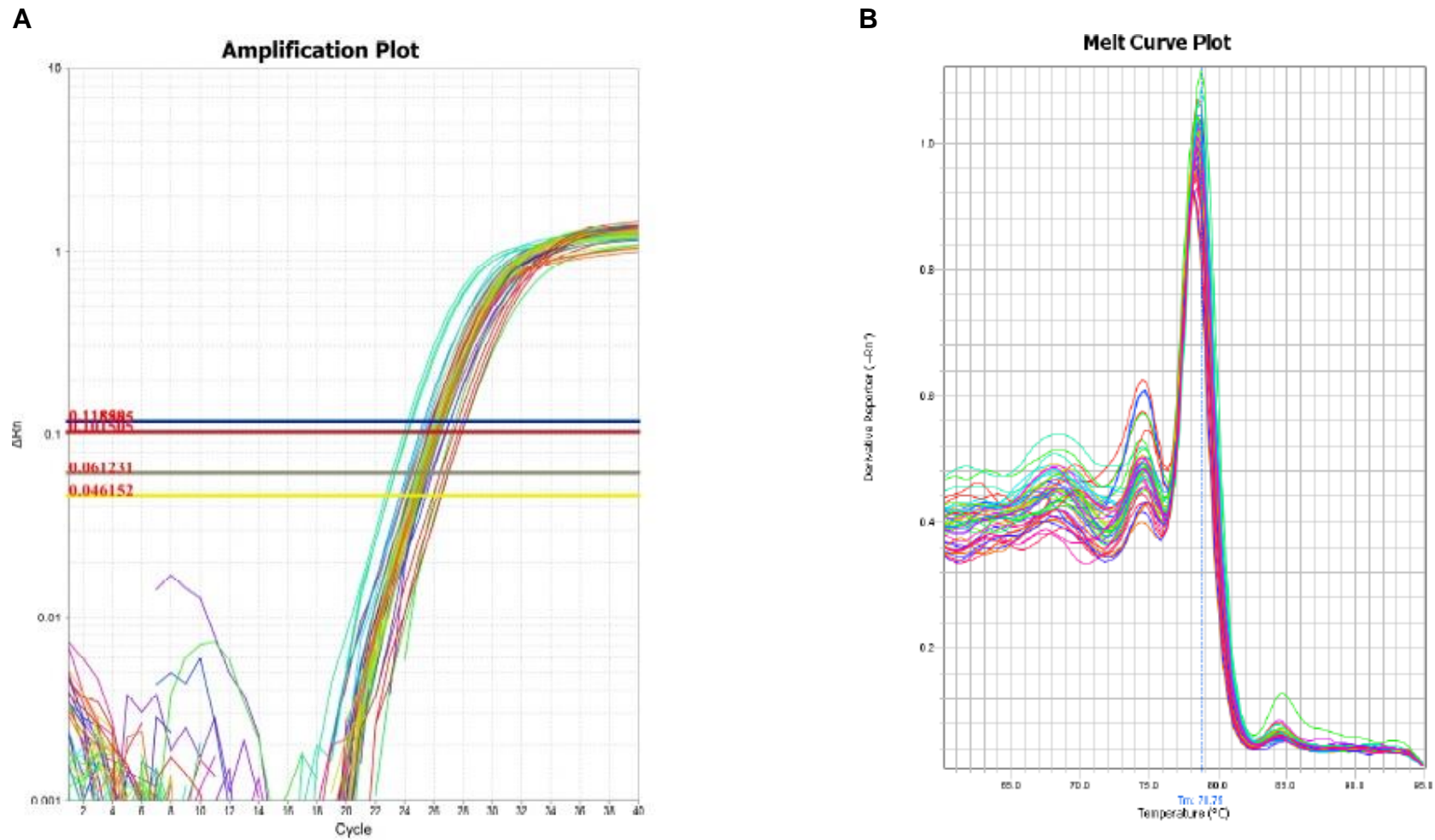


Figura suplementar 5 – Curva de amplificação em A e de dissociação em B dos amplicons alvos para o gene  $\beta$ -actina.

