

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE REGULADOS EM
MODELO ANIMAL DE CRISES EPILÉPTICAS AUDIOGÊNICAS**

ORIENTADA: Samara Damasceno

ORIENTADORA: Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

COORIENTADOR: Dr. Almir de Sousa Martins

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Validação de genes diferencialmente regulados em modelo animal de crises
epilépticas audiogênicas**

Samara Damasceno

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos e oportunidades colocadas em minha vida.

À minha orientadora, Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, pela oportunidade de me fazer crescer no mundo da ciência. Agradeço pelos ensinamentos, confiança, paciência e todo incentivo mediante ao meu anseio.

Ao meu coorientador, Dr. Almir de Sousa Martins que juntamente com suas alunas, Ma. Sarah Martins e Ma. Deborah Ribeiro, me acolheram carinhosamente e me deram todo suporte na experimentação animal.

Aos colaboradores da UNICAMP, Dra. Íscia Lopes-Cendes e seu aluno Me. Alexandre Hilário Berenguer de Matos, pelo acolhimento e instrução.

Ao Me. Daniel Almeida da Silva e Silva pela amizade e todos os ensinamentos de bancada e análise de dados.

À minha amiga, Luana Martins de Carvalho, pelo apoio emocional e cumplicidade no ambiente de trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH), Daniel, Luana, Taciani, Carol, Yan, Renato, Ágatha e Isabella, por todas as risadas e momentos de descontração.

Aos demais professores e alunos que contribuíram para minha formação.

Aos familiares e amigos por todas as palavras de conforto e amparo constante.

À todos que de alguma forma estiveram torcendo por mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
INTRODUÇÃO	14
1. Epilepsia	14
2. Modelo Experimental	16
3. Processo Epileptogênico	21
4. Justificativa e Relevância	26
OBJETIVOS	27
METODOLOGIA	28
1. Animais	28
2. Avaliação comportamental	28
3. Coleta	28
4. Extração de RNA	29
5. Síntese de cDNA	29
6. Desenho dos iniciadores	30
7. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	30

8. Análise estatística	31
9. Identificação de vias biológicas	32
RESULTADOS	33
1. Validação de genes alvo	33
2. Vias biológicas	37
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	61

Lista de figuras

Figura 1. Representação das estruturas ativadas durante as crises audiogênicas agudas em cérebro de rato.	19
Figura 2. Representação do recrutamento de novos substratos neurais durante o abasamento audiogênico em cérebro de rato.	20
Figura 3. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA dos genes alvo na placa quadrigêmea de animais WAR comparadas aos controles Wistar.	35
Figura 4. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA no hipocampo de animais WAR comparadas aos controles Wistar.	36
Figura 5. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA do gene <i>Peli2</i> na placa quadrigêmea e do gene <i>Bdnf</i> no hipocampo de animais WAR comparadas aos controles Wistar.	37
Figura 6. Neurotransmissão glutamatérgica, ilustração retirada do banco de dados KEGG.	39
Figura 7. Neurotransmissão GABAérgica, ilustração retirada do banco de dados KEGG.	40
Figura 8. Via de sinalização de cálcio, ilustração retirada do banco de dados KEGG.	41

Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Index of severity</i> (IS).	18
Tabela 2. Genes diferencialmente transcritos na placa quadrigêmea (33) e no hipocampo (29) de animais WAR comparados com os controles Wistar, e seus respectivos <i>fold changes</i>	24
Tabela 3. Nomeclatura completa dos genes selecionados para os experimentos de quantificação relativa por PCR quantitativa em tempo real.	25
Tabela 4. Sequências dos iniciadores desenhados para a validação por PCR quantitativa em tempo real.	33

Lista de abreviaturas

Abcb1a – *ATP-binding cassette sub-family B member 1*

Actb – *β -actina*

Ank2 – *Ankyrin 2*

AMPA – *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*

Apbb3 – *Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3*

Aqp4 – *Aquaporina 4*

Atp6ap1l – *ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1-like*

AVE – *Acidente vascular encefálico*

Bdnf – *Brain-derived neurotrophic factor*

Bhlhe40 – *Basic helix-loop-helix family, member e40*

Chrna4 – *Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4*

CI – *Colículo inferior*

Cldn11 – *Claudin 11*

Crebl2 – *cAMP responsive element binding protein-like 2*

Creg2 – *Cellular repressor of E1A-stimulated genes 2*

CS – *Colículo superior*

Ct – *Threshold cycle*

DAVID – *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*

Dbn1 – *Dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1*

EAAT1 – *Excitatory Amino Acid Transporter 1*

EAJ – *Epilepsia de ausência juvenil*

EDTA – *Ácido etilenodiamino tetra-acético*

Egfr – *Epidermal growth factor receptor*

ELT – *Epilepsia de lobo temporal*

EMJ – *Epilepsia mioclônica juvenil*

Ewsr1 – *EWS RNA-binding protein 1*

Fam107a – *Family with sequence similarity 107, member A*

FR – *Formação reticular*

GABA – Ácido gama-aminobutírico

Gabbr1 – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1*

Gabbr2 – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2*

Gabra1 – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1*

Gabra2 – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2*

Gdi2 – *GDP dissociation inhibitor 2*

GEPR- *Genetic epilepsy prone rats*

GLAST – *Glutamate aspartate transporter*

Gria2/GLUR2 – *Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2*

Gria3 – *Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3*

Grin1 – *Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1*

IFN-γ – *Interferon gama*

Il18 – *Interleucina 18*

ILAE – *International League Against Epilepsy*

IP3R – *Inositol 1,4,5-triphosphate receptor*

IS – *Index of severity*

Kcnc2 – *Potassium voltage-gated channel subfamily C member 2*

Kcnd2 – *Potassium channel, voltage gated Shal related subfamily D, member 2*

Kcnq – *Potassium voltage-gated channel*

Kctd6 – *Potassium channel tetramerization domain containing 6*

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Mll1 - *Lysine (K)-specific methyltransferase 2A*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

Nedd8 – *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*

Neurod1 – *Neuronal differentiation 1*

NMDA – *N-metil-D-aspartato*

NPY – *Neuropeptideo Y*

Peli1 – *Pellino 1*

Peli2 – *Pellino 2*

Plekhh1 – *Pleckstrin homology domain containing, family H member 1*

PTZ – Pentilenotetrazol

Pxmp4 – *Peroxisomal membrane protein 4*

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

Rab8b – *Ras-related protein Rab-8B*

RNAi – RNA de interferência

Rps26 – *Ribossomal protein S26*

RT1- A2/ A3/ EC2 – *RT1 class Ia, locus A2 /// RT1 class I, locus A3 /// RT1 class Ib, locus EC2*

RT1-S3 – *RT1 class Ib, locus S3*

RT1-T24-3 – *RT1 class I, locus T24, gene 3*

RT1-T24-4 – *RT1 class I, locus T24, gene 4*

RYR – *Ryanodine receptor*

SCN – Sistema nervoso central

Scn1a – *Sodium channel, voltage gated, type I alpha subunit*

Scn2a1 – *Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit 1*

SCP – Substancia cinzenta pariaquedutal

SE – *Status epilepticus*

Slc1a3 – *Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3*

Smoc2 – *SPARC related modular calcium binding 2*

SN – Substancia nigra

SPL – *Sound Pressure Level*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TLR – Receptor *Toll-like*

TM – Temperatura de *melting*

Trak1 – *Trafficking protein, kinesin binding 1*

TRK – *Tropomyosin receptor kinase*

Ubi7 – *Ubiquitin-like 7*

Vdac1 – *Voltage-dependent anion channel 1*

Vdac2 – *Voltage-dependent anion channel 2*

WAR – *Wistar audiogenic rat*

Zeb2 – *Zinc finger E-box binding homeobox 2*

Resumo

O *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) é um modelo animal de crises epiléticas audiogênicas desenvolvido a partir da seleção de ratos Wistar sensíveis a estímulos sonoros. Devido as similaridades com eventos epiléticos em seres humanos, esse modelo é de alta relevância, podendo contribuir para a compreensão de crises generalizadas tônico-clônicas, crises parciais complexas e crises reflexas. Ainda assim, pouco se conhece a respeito dos aspectos genéticos moleculares relacionados com a susceptibilidade desses animais a crises epiléticas. O objetivo desse trabalho foi confirmar a regulação diferencial de alguns genes em dois substratos neurais de animais WAR, estudar esses genes e identificar vias biológicas relevantes neste modelo a fim de contribuir para o entendimento do processo epileptogênico. Para isso utilizou-se as estruturas: placa quadrigêmea e hipocampo de animais WAR e controles Wistar submetidos a estimulação sonora. As validações foram feitas através da PCR quantitativa em tempo real e identificação de vias através dos programas DAVID/KEGG. Foram confirmados como diferencialmente transcritos os genes *Gabbr1*, *Gria2*, *Grin1*, *Scn2a1* e *Il18* na placa quadrigêmea e os genes *Gabra2*, *Gabbr1*, *Gria2* e *Slc1a3* no hipocampo de animais WAR quando comparados com os controles Wistar. Dois dos genes selecionados não apresentaram regulação com diferença significativa, mas mostram uma tendência. Parte desses genes estão envolvidos nas vias de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, ambas bem discutidas nos modelos de epilepsia e aqui identificadas como relevantes na placa quadrigêmea e no hipocampo dos ratos audiogênicos. A hiporregulação dos genes de receptores de GABA se destacou em hipocampo de WARs sugerindo que o sistema GABAérgico seja crítico nessa estrutura. A via de sinalização de cálcio também foi identificada como relevante no processo epileptogênico, mas com significância apenas na placa quadrigêmea. Por diferentes mecanismos, essa via pode mediar a hiperexcitabilidade neuronal e assim favorecer o surgimento de crises epiléticas. Nossos resultados mostram que os genes relacionados a canais iônicos são modulados na placa quadrigêmea e no hipocampo de WARs submetidos a estimulação acústica e sugere a via de sinalização de cálcio como outro campo de estudo para a compreensão do processo epileptogênico no modelo *Wistar Audiogenic Rat*.

Palavras chave: Epilepsia, audiogênico, crises epiléticas, WAR.

Abstract

The Wistar Audiogenic Rat (WAR) is an animal model of audiogenic seizures developed from the selection of sensitive Wistar to sound stimulus. Because of the similarities with epileptic events in humans, this model is highly relevant, and it may contribute to the knowledge of generalized tonic-clonic seizures, complex partial seizures and reflex seizures. Nevertheless, little is known about the molecular genetic aspects related to the susceptibility of this strain to seizures. The aim of this research was to confirm differentially regulated genes in two neural substrates in WAR animals, study these genes and identify relevant biological pathways in the model in order to contribute to the understanding of the epileptic condition. For this, the following structures were used: quadrigeminal plate and hippocampus of WAR and Wistar submitted to sound stimulation. Validations were done using real time quantitative PCR and identification of pathways by programs DAVID/KEGG. Genes *Gabbr1*, *Gria2*, *Grin1*, *Scn2a1* and *Il18* in quadrigeminal plate and genes *Gabra2*, *Gabbr1*, *Gria2* and *Slc1a3* in the hippocampus of WAR animals were confirmed as differentially transcribed when compared to controls Wistar. Two of the selected genes did not show regulation with a significant difference but showed a trend. Some of these genes are involved in glutamatergic and GABAergic neurotransmission pathways, both discussed in models of epilepsy e here identified as relevant in quadrigeminal plate and in the hippocampus of audiogenic rats. The downregulation of the GABA receptor genes stood out in the hippocampus of WARs suggesting that the GABAergic system is critical to that structure. Calcium signaling pathway was also identified as relevant in the epileptic condition but significant only for quadrigeminal plate. By different mechanisms, this pathway can mediate neuronal hyperexcitability and thus promote the emergence of seizures. Our results show that genes related to ion channels are modulated in quadrigeminal plate and in the hippocampus of WARs submitted to acoustic stimulation and suggests the calcium signaling pathway as another field of study for understanding the epileptic condition in Wistar Audiogenic Rat model.

Keywords: Epilepsy, audiogenic, seizures, WAR.

INTRODUÇÃO

1. Epilepsia

A epilepsia é uma condição neurológica crônica basicamente caracterizada pela predisposição ao surgimento de crises epiléticas recorrentes devido a alterações nas atividades cerebrais. É uma das condições mais antigas da humanidade e a mais comum, afetando indivíduos de todas as idades (ENGEL, 2001; BANERJEE et al., 2009). Estima-se que 65 milhões de pessoas tenham epilepsia resultando na prevalência de aproximadamente 1% da população geral (MORIMOTO et al., 2004, THURMAM et al., 2011).

A incompreensão e o estigma social cercaram a epilepsia durante séculos e até hoje afeta a qualidade de vida de muitos portadores. Pessoas que apresentam crises epiléticas tendem a ter mais problemas físicos (fraturas e hematomas), assim como maiores taxas de outras doenças, problemas psicossociais e condições como ansiedade e depressão. Além disso, o risco de morte prematura em pessoas com epilepsia é duas a três vezes maior do que para a população geral (WHO, 2012). O tratamento das epilepsias é feito inicialmente através do uso de drogas antiepiléticas de forma isolada ou em combinação (Fenobarbital, Carbamazepina, Benzodiazepínicos e etc), e a cirurgia é sugerida nos casos em que as crises não podem ser controladas com medicação. Os tratamentos muitas vezes não são eficazes, pois cerca de um terço dos pacientes com epilepsia não atingem o controle das crises com os medicamentos disponíveis, e aproximadamente 25% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia. Isso, possivelmente, devido à dificuldade de diagnóstico preciso a respeito da condição e crises apresentadas, o que torna a epilepsia uma preocupação considerável para a saúde pública (MORIMOTO et al., 2004; FATTORE e PERUCCA, 2011).

A epilepsia apresenta diversos tipos em virtude da grande variedade de manifestações clínicas e etiologias, sendo a ILAE (*International League Against Epilepsy*) a entidade responsável pela classificação das epilepsias. Baseado na etiologia, elas são assim classificadas: metabólica/estrutural, genética e causa desconhecida. As epilepsias metabólicas/estruturais são resultantes de defeitos no metabolismo ou lesões estruturais que incluem acidente vascular encefálico (AVE), traumas cranioencefálicos e infecção adquirida. As epilepsias genéticas são aquelas cuja condição é resultado de um defeito genético que conduz uma alteração na regulação neuronal, os casos de canalopatias são

um bom exemplo de epilepsia genética. Deve-se considerar que designar a doença como genética não exclui a possibilidade dos fatores ambientais contribuírem para desenvolvimento da mesma. Por fim, são ditas epilepsias de causa desconhecida aquelas cujo episódio de crise não pode ser explicado pelos fatores já identificados (BERG et al, 2010; BERG e SCHEFFER, 2011).

Apesar da diversidade, todas as epilepsias têm em comum a ocorrência de crises epiléticas, as quais são causadas por descargas neuronais anormais excessivas que ocorrem de forma passageira e sincrônica, resultantes da movimentação iônica através da membrana neuronal. Essa hiperatividade neuronal pode afetar a consciência, cognição, memória, funções sensoriais e motoras, levando a manifestações clínicas dependentes da região do sistema nervoso central (SNC) afetada (FISHER et al., 2005). A ILAE classifica as crises epiléticas em focais, quando originadas em algum ponto dentro de redes neurais limitadas a um hemisfério, e generalizadas, quando iniciadas em algum ponto, mas com capacidade de envolver redes neurais distribuídas bilateralmente (Anexo 1) (BERG et al, 2010; BERG e SCHEFFER, 2011).

Crises focais ou parciais, simples (sem perda da consciência) e complexas (com perda da consciência), representam cerca de 60% dos casos de humanos adultos com epilepsia, sendo a epilepsia de lobo temporal (ELT) o tipo mais comum de epilepsia focal e também a mais difícil de ser controlada com as medicações disponíveis devido à grande resistência a drogas (TÉLLEZ-ZENTENO e HERNÁNDEZ-RONQUILLO, 2012). As crises generalizadas se manifestam na forma de convulsões tônico-clônicas generalizadas, crises mioclônicas e crises de ausência. Estão entre os eventos mais dramáticos do sistema nervoso e apresentam grande incidência, com manifestações em vários tipos de epilepsias e síndromes epiléticas, tais como epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), síndrome de Dravet, epilepsia de ausência juvenil (EAJ), epilepsia apenas com crises tônico-clônicas entre outras (BANERJEE e HAUSER, 2007; BERG e SCHEFFER, 2011).

As crises epiléticas podem ocorrer sem causa aparente, sendo consideradas “crises não provocadas”, ou podem ser desencadeadas por fatores internos como o estresse, cansaço, sono, febre e ciclo menstrual, sendo designadas “crises provocadas”. Essas podem ainda ser decorrentes de fatores externos como o calor, consumo excessivo de álcool, atividade verbal, estímulos visuais e estímulos sonoros, definindo assim as “crises reflexas” (LEBRUN e LELEUX, 1991; WEISER, 1998; ZIFKIN E INOUE, 2004; PITTAU et al., 2008; STRIANO et al., 2012; TRENITÉ, 2012).

Os episódios convulsivos ocasionados por estímulos externos e sensoriais caracterizam a Epilepsia Reflexa, cujos subtipos são denominados segundo as

peculiaridades de cada fator desencadeador de crise. Algumas crises reflexas são induzidas por estímulos simples, na qual se caracterizam a epilepsia fotossensível (crises ocasionadas por flashes de luzes e padrões de coloração) e a epilepsia somatossensorial (fricção de pele, escovar dentes, estimulação de costas, cabeça ou ouvido externo). Outras são ocasionadas por estímulos complexos como o ato de comer, imersão em água ou contato com água quente. Há ainda, as crises reflexas decorrentes de funções cerebrais superiores, é o caso da epilepsia induzida por linguagem (leitura, escrita e fala), epilepsia Arithmetices (induzida por tomada de decisões, práxis e pensamentos) e a epilepsia musicogênica (vozes, melodias, e etc) (STRIANO et al., 2012; TRENITÉ, 2012). A epilepsia musicogênica é uma condição rara em que as convulsões são desencadeadas por sons, especificamente música (CRITCHLEY, 1937). Essas crises ocasionadas por estímulos sonoros são ditas audiogênicas. Em muitos casos, pacientes relatam crises de acordo com um estilo musical específico (jazz, clássica, popular), instrumento (piano, flauta, saxofone), conteúdo emocional (triste, alegre), além de outros estímulos específicos como sinos de igreja ou mesmo certos timbres de voz (MAGUIRE, 2012).

2. Modelo experimental

Mediante a complexidade das epilepsias, estudar todos os processos implicados nessa condição é um grande desafio, no qual os modelos experimentais são indispensáveis. Diversos modelos têm sido desenvolvidos buscando mimetizar características de tipos de epilepsia humana a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na epileptogênese (geração da condição epiléptica) e ictogênese (geração de crises epilépticas), selecionar novos agentes antiepilépticos, desvendar os processos implicados na resistência de fármacos e assim fornecer base para propor tratamentos mais eficientes. Dentre os modelos animais já estabelecidos encontra-se: o modelo de convulsão induzida por penicilina; modelo por injeção de pilocarpina; por doses de pentilenotetrazol (PTZ); por eletrochoque transauricular; os modelos audiogênicos; etc (FISHER, 1989; AVOLI e GLOOR, 1982; TURSKI et al., 1987; VELISEK et al., 1992; LÖSCHER et al., 1991; DAILEY et al., 1989; GARCIA-CAIRASCO et al., 1990).

Os modelos desenvolvidos por seleção genética têm se destacado, e para a ocorrência de crises epilépticas, geralmente, são necessários pelo menos dois fatores: a predisposição genética determinada, que pode estar relacionada a uma alteração na regulação neuronal, e um fator desencadeador, podendo ser estímulos endógenos ou exógenos (JOBE et al., 1981). A linhagem de ratos WAR, sigla do inglês *Wistar Audiogenic*

Rat, descrita por Garcia-Cairasco e colaboradores é um modelo genético de crises convulsivas audiogênicas estabelecido a partir de colônias de ratos Wistar que apresentavam animais sensíveis a estímulos sonoros (GARCIA-CAIRASCO et al., 1990).

Os primeiros estudos sobre crises audiogênicas foram relatados na década de 20 (~1924) por pesquisadores soviéticos em São Petesburgo (Rússia), onde desenvolveram, a partir de ratos Wistar, o modelo audiogênico Krushinsky-Molodkina (KRUSHINSKY, et al, 1970). Desde então, outras linhagens audiogênicas foram descritas, principalmente em ratos. A linhagem audiogênica GEPRs (*Genetic Epilepsy Prone Rats*), derivada de ratos Sprague-Dawley, foi desenvolvida inicialmente na Universidade do Arizona (EUA) e atualmente é mantida na Universidade de Illinois (EUA). No seu processo de seleção genética foram separados dois fenótipos originando duas subcolônias: os GEPRs-3 apresentando crises moderadas e os GEPRs-9 apresentando crises graves (DAILEY et al., 1989). Em Estrasburgo (França) um outro modelo foi estabelecido a partir da seleção de progenitores Wistar (MARESCAUX et al., 1987). E mais recente, a linhagem WAR (*Wistar Audiogenic Rat*), desenvolvida a partir da seleção genética de ratos Wistar sensíveis, no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) (Brasil) (GARCIA-CAIRASCO et al., 1990). Atualmente o modelo WAR se encontra na USP de Ribeirão Preto (SP) e em Belo Horizonte (MG) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As colônias de WAR são mantidas através de cruzamentos endogâmicos e apresentam um consistente padrão genético com conseqüente homogeneidade do fenótipo. Como procedimento padrão das colônias, os animais, ao completarem 70 dias de vida, passam por uma triagem (*screening*) que consiste em três estímulos sonoros com intervalo de 96 horas entre os estímulos. Embora os WARs respondam ao estímulo acústico em todas as idades, observações sugerem uma resposta mais estável em animais adultos, por volta dos 70 dias (DORETTO et al., 2003). O estímulo consiste no som de uma campainha, com intensidade sonora de 110 a 120 dB SPL (*Sound Pressure Level*) apresentado durante 60 segundos ou até que se inicie a crise. Os ratos são então avaliados, de acordo com a metodologia descrita por Garcia-Cairasco e colaboradores (1996b), e classificados quanto ao índice de gravidade (IS, sigla do inglês *Index of Severity*) apresentado na Tabela 1. (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996b; DORETTO et al., 2003).

Tabela 1. Índice de gravidade (IS).

IS	Comportamento
0,00	Ausência de qualquer comportamento convulsivo
0,11	Um episódio de corrida
0,23	Um episódio de corrida + pulos e quedas atônicas
0,38	Dois episódios de corrida + pulos e quedas atônicas
0,61	Todos os comportamentos anteriores + convulsão tônica com arqueamento dorsal da cabeça
0,73	Todos os comportamentos anteriores + convulsões clônicas parciais e generalizadas
0,85	Todos os comportamentos anteriores + espasmos clônicos
0,90	Todos os comportamentos anteriores + flexão ventral da cabeça
0,95	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros anteriores
1,00	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros posteriores

Fonte: Garcia-Cairasco e cols., 1996b.

Com base nessa triagem, os animais que apresentarem crises generalizadas tônico-clônicas ($IS \geq 0,61$) são ditos sensíveis (S), e aqueles que não respondem ao som com qualquer comportamento referente a crise epiléptica são ditos resistentes (R). Dentre os sensíveis são selecionados os progenitores para a manutenção da colônia, aqueles com os maiores índices a partir do IS: 0,85.

Em geral, os ratos audiogênicos WAR quando submetidos ao estímulo sonoro de alta intensidade (~120 dB SPL) apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas caracterizadas por episódios de corrida, pulos e quedas atônicas, convulsões tônicas e convulsões clônicas parciais e generalizadas seguidas por espasmos clônicos, tais eventos se manifestam em crises audiogênicas agudas (GARCIA-CAIRASCO et al., 1993; DORETTO et al., 2003). As crises audiogênicas agudas requerem a ativação de vias auditivas do tronco encefálico, envolvendo estruturas como o colículo inferior (CI), colículo superior (CS), que juntos formam a placa ou lâmina quadrigêmea, substância nigra (SN), formação reticular (FR) e substância cinzenta pariaquedutal (SCP) (Figura 1) (GARCIA-CAIRASCO et al., 1993; ROSS e COLEMAN, 2000; ROSSETTI et al., 2006).

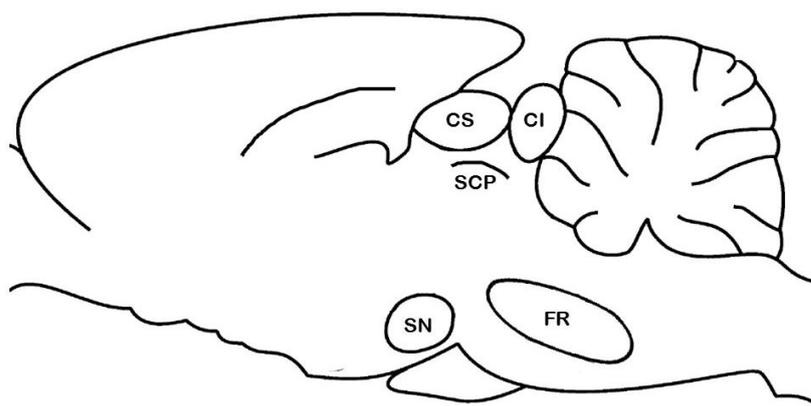


Figura 1. Representação das estruturas ativadas durante as crises audiogênicas agudas em cérebro de rato. CI: colículo inferior; CS: colículo superior; SN: substância nigra; FR: formação reticular; SCP: substância cinzenta pariaquedutal. Ilustração modificada de Ross e Coleman, 2000.

O colículo inferior é considerado a estrutura fundamental na susceptibilidade às crises audiogênicas, sendo o ponto chave para o início das mesmas. Experimentos demonstraram que lesões bilaterais no CI bloquearam completamente as crises convulsivas audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO e SABBATINI, 1991). Outro estudo ainda verificou que a administração de N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista de um receptor de glutamato, no subnúcleo do CI em animais resistentes permitiu que esses animais apresentassem crises com características audiogênicas após estímulos acústicos, enquanto que a administração de antagonista do mesmo receptor em animais sensíveis bloquearam a ocorrência de crises. O CI de ratos audiogênicos parecem ter anormalidades funcionais no processamento da informação sonora na qual vias excitatórias estão envolvidas (TERRA e GARCIA-CAIRASCO, 1994). O colículo superior também foi alvo de avaliação em experimentos com WARs sensíveis. Os animais que sofreram transecções unilaterais no CS apresentaram redução ou bloqueio das crises tônico-clônicas e aqueles que sofreram transecções bilaterais, além da redução e bloqueio das crises, apresentaram redução dos episódios de corrida com diminuição significativa do IS (DORETTO et al., 2009). Assim, o CS é importante na integração das áreas sensoriais e motoras e juntamente com as demais estruturas, SN, FR e SCP, são sugeridos como moduladores ou componentes da via eferente (GARCIA-CAIRASCO et al., 1993; ROSS e COLEMAN, 2000; ROSSETTI et al., 2006).

Além das crises audiogênicas agudas com envolvimento de estruturas do tronco encefálico, os WARs podem apresentar crises crônicas através de protocolos específicos de estimulação repetitiva. Após várias repetições de estímulos sonoros ocorre uma alteração

fenotípica, na qual a expressão motora e eletroencefalográfica das crises tônico-clônicas generalizadas se modifica gradativamente para um padrão de crises límbicas, designadas mais precisamente como crises parciais complexas, podendo apresentar automatismos orofaciais, clonias, postura ereta e quedas. A modificação fenotípica ocorre de forma simultânea ao recrutamento de novos substratos neurais, como amígdala, hipocampo e neocórtex e esse recrutamento mediante a estimulação acústica repetitiva é denominado abrasamento audiogênico (*audiogenic kindling*) (VERGNES et al., 1987; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996a; MORAES et al., 2000).

O termo “abrasamento” ou “*kindling*”, em sua concepção original, refere-se aos fenômenos observados por Goddard e colaboradores (1969). Estes, em seus trabalhos demonstraram a indução de crises límbicas em animais normais mediante estimulações elétricas sub-limíares através de eletrodos implantados em substratos neurais de baixo limiar epiléptico, como a amígdala e o hipocampo, e descreveu o termo “*kindling*”. Vergnes e colaboradores (1987), ao estudarem animais Wistar sensíveis a estímulos sonoros, observaram que a estimulação repetitiva provocava uma alteração do fenótipo da crise, sugerindo o recrutamento de estruturas límbicas e o agravamento da mesma, como o observado no abrasamento elétrico, e assim, nomeou esse fato de abrasamento audiogênico (Figura 2) (GODDARD et al, 1969; VERGNES et al, 1987).

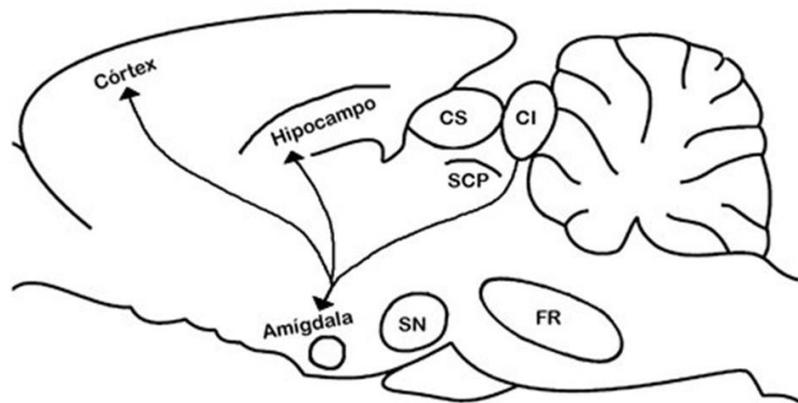


Figura 2. Representação do recrutamento de novos substratos neurais durante o abrasamento audiogênico em cérebro de rato. CI: colículo inferior; CS: colículo superior; SN: substância nigra; FR: formação reticular; SCP: substância cinzenta pariaquedutal. Ilustração modificada de Ross e Coleman, 2000; Deransart et al., 2001.

O abrasamento audiogênico relatado em animais Wistar sensíveis já foi demonstrado na linhagem derivada de ratos Sprague-Dawley, os GEPRs. Reforçando que estruturas prosencefálicas são recrutadas em algum momento durante a repetitiva estimulação sonora

(MARESCAUX et al., 1987; NARITOKU et al., 1992; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996a). Uma vez realizado, o recrutamento límbico parece ser mantido. Animais com abrasamento audiogênico que foram reapresentados a estímulo acústico depois do intervalo de dois meses sem estimulação, mantiveram o padrão de crises límbicas, sugerindo que a manutenção de tal fenótipo é dependente desses rearranjos estruturais (MORAES et al., 2000).

Devido as similaridades com eventos epilépticos em seres humanos, a linhagem WAR é um modelo de grande relevância para o estudo das epilepsias. Além de contribuir para o entendimento das epilepsias reflexas, o WAR é um modelo bem estabelecido para outros dois tipos de epilepsia humana: a epilepsia generalizada com crises tônico-clônicas representada pelo modelo de crises audiogênicas agudas, e a epilepsia de lobo temporal com crises parciais complexas, representada pelo modelo de crises crônicas (abrasamento audiogênico).

3. Processo epileptogênico

O termo “processo epileptogênico” aqui citado refere-se a geração e estabelecimento da condição epiléptica, dita epileptogênese, e a geração de crises epilépticas, dita ictogênese. Ao tentar desvendar os mecanismos envolvidos no processo epileptogênico de cada tipo de epilepsia é preciso compreender alguns aspectos fundamentais da susceptibilidade às crises: os substratos neurais envolvidos, as vias de sinalização intracelulares e a expressão de genes que modulam o fenótipo. O surgimento das crises epilépticas está relacionado ao desequilíbrio entre a excitação e inibição neuronal, onde os neurotransmissores (excitatórios e inibitórios) e neuromoduladores exercem um importante papel, sendo considerados na gênese, na manutenção ou na inibição da descarga epiléptica. Os neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) são os mais discutidos nesse âmbito, considera-se um aumento na ativação da via que utiliza o glutamato como neurotransmissor e/ou uma diminuição na via que utiliza o GABA como neurotransmissor mediando assim a hiperexcitação neuronal (URE e PERASSOLO, 2000; MORIMOTO et al., 2004).

O glutamato é um dos neurotransmissores excitatórios mais importantes do sistema nervoso central (SNC) e seus receptores mais bem conhecidos são o NMDA e AMPA. Ambos são ionotrópicos associados a canais permeáveis a cátions como íons de sódio (Na^+) e de potássio (K^+), promovendo a despolarização da membrana e transmissão sináptica

excitatória rápida. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, seu receptor ionotrópico GABA_A está associado a canais permeáveis a ânions, em especial íons cloreto (Cl⁻), cuja entrada para dentro da célula tende a diminuir a excitabilidade neuronal (PURVES et al., 2004; AIRES et al., 2008).

Desde o reconhecimento das vias GABAérgicas como essenciais para os processos inibitórios do SNC, investiga-se a sua participação na gênese das epilepsias. Apesar de não poder afirmar que as alterações dessa via sejam diretamente responsáveis pela epileptogênese, diversos trabalhos em modelos animais têm sugerido o seu envolvimento. Já foi demonstrado que convulsões induzidas podem ser bloqueadas pelo aumento da atividade do sistema GABAérgico em substância nigra (GARANT et al., 1980; IADOROLA e GALE, 1982; GARCIA e SABATINI, 1991) e colículo inferior, neste cujas microinjeções de baclofeno (agonista de receptor de GABA) ou gabaculina (inibidor de GABA-transaminase/recaptação de GABA) exerceram efeito protetor sobre animais GEPRs-9 contra crises convulsivas audiogênicas (FAINGOLD et al., 1994). A respeito do sistema glutamatérgico, já foi demonstrado que microinjeções bilaterais de agonista de receptor de glutamato no colículo inferior de ratos Sprague-Dawley normais e Wistar resistentes permitiram o desenvolvimento de crises com características audiogênicas após a estimulação acústica, e ao antagonizar a via glutamatérgica no colículo inferior de animais Wistar sensíveis observou-se o bloqueio das crises convulsivas (MILLAN et al., 1986; FAINGOLD et al., 1989; TERRA e GARCIA-CAIRASCO, 1994).

Ademais, estudos eletrofisiológicos em cultura primária de neurônios hipocâmpais de WARs mostraram uma redução inata na magnitude das correntes GABAérgicas em relação aos controles, enquanto as correntes glutamatérgicas se mantiveram normais. Observou-se também que o potencial de membrana em repouso dos neurônios de WARs (-50mV) são mais despolarizados do que dos controles (-63mV), indicando serem células mais excitáveis (MESQUITA et al., 2005). Estes trabalhos e outros tantos só reforçam o quão fundamentais são as vias GABAérgicas e glutamatérgicas para o desenvolvimento de crises epiléticas. Entretanto, acredita-se que essas não sejam as únicas vias envolvidas no processo epileptogênico. Os estudos genético-moleculares podem ajudar na identificação de genes relacionados a epilepsia e assim auxiliar no conhecimento de novas vias envolvidas nesse processo.

Sabe-se que fatores genéticos estão implicados nas epilepsias, porém a identificação de genes causais ou predisponentes à condição é dificultada pelo fato das epilepsias serem doenças complexas. Contudo, muitos genes já foram relacionados a condição epilética e em geral são genes codificadores de subunidades de canais iônicos ou de proteínas que

interagem com os mesmos, como já era esperado, uma vez que esses canais são a base para os processos de excitabilidade neuronal. Determinadas alterações genéticas já foram associadas à alguns tipos de epilepsia: mutações do gene codificador de subunidade de um receptor acetilcolínico (*Chrna4*) foram relacionadas a epilepsia de lobo frontal noturna autossômica dominante; mutação nos genes codificadores de subunidades de canal iônico de potássio voltagem dependente (*Kcnq2* e *Kcnq3*) foram as primeiras mutações descritas para epilepsia generalizada; mutação no gene codificador de subunidade do canal de sódio voltagem-dependente (*Scn1a*) associada com a síndrome de Dravet (epilepsia mioclônica severa da infância); mutações no gene codificador de subunidade do receptor GABA_A (*Gabra1*) relacionada a epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), etc. (STEINLEIN et al., 1995; CHARLIER et al., 1998; SINGH et al., 1998; CLAES et al., 2001; COSSETE et al., 2002; GITAÍ et al., 2008; LOPES-CENDES e RIBEIRO, 2013).

A identificação de genes envolvidos no processo epileptogênico não só contribuirá para o reconhecimento e entendimento das vias moleculares relacionadas, como poderá auxiliar no diagnóstico e desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. O estudo genético dos modelos experimentais é indispensável para a construção dessa ciência, apesar disso, a linhagem audiogênica WAR foi pouco explorada nesse aspecto. Um dos primeiros trabalhos moleculares com essa linhagem foi realizado por Gitaí e colaboradores, no qual se observou que os níveis de transcritos de uma variante da subunidade 2 do receptor de glutamato AMPA (*GluR2*, gene *Gria2*) estavam aumentados no hipocampo de animais WARs submetidos a crises agudas e crônicas quando comparados com WARs não estimulados (Naive) e Wistar resistentes. Em sua publicação os autores já haviam relatado a escassez de conhecimento a respeito dos fatores genético moleculares relacionados com a susceptibilidade desses animais (GITAÍ et al., 2010).

Desde então, outros grupos de pesquisa têm se dedicado a preencher essa lacuna. Um dos projetos para o estudo genético molecular do modelo WAR foi proposto através da parceria FAPESP-FAPEMIG que uni UFMG e UNICAMP no trabalho intitulado: "Estudo da expressão gênica em larga escala e análise funcional utilizando a tecnologia da interferência por RNA (RNAi) em um modelo de epilepsia audiogênica em ratos". Esse projeto vem sendo desenvolvido por pesquisadores da UNICAMP no Laboratório de Genética Molecular (Depto. de Genética Médica) e pesquisadores da UFMG no Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) (Depto. de Biologia Geral) e no Núcleo de Fisiologia Genômica (Depto de Fisiologia e Biofísica). Na primeira etapa desse grande projeto foi feita a caracterização do perfil de transcriptoma de dois substratos neurais importantes no modelo audiogênico WAR, utilizando RNA total extraído do hipocampo e da placa quadrigêmea (composta por CI e CS) de animais WAR e controles Wistar. Foram identificados como diferencialmente transcritos,

em ambas estruturas neurais, genes envolvidos com o desenvolvimento neuronal, regulação da transmissão sináptica, projeção neuronal e sinalização celular. Os genes identificados com maior e menor expressão nos animais WAR são apresentados abaixo (Tabela 2) (MATOS et al., 2012; MATOS, 2013).

Tabela 2. Genes diferencialmente transcritos na placa quadrigêmea (33) e no hipocampo (29) de animais WAR comparados com os controles Wistar, e seus respectivos *fold changes*. Modificado de Matos, 2013.

Placa quadrigêmea					
Gene	<i>Fold change</i>	Gene	<i>Fold change</i>	Gene	<i>Fold change</i>
<i>RT1-T24-3</i>	4,907753125	<i>Apbb3</i>	1,367711955	<i>Trak1</i>	-1,097186574
<i>Creg2</i>	3,509129854	<i>Ubl7</i>	1,337324665	<i>Gabbr2</i>	-1,124122959
<i>Plekhh1</i>	3,174510335	<i>Gabbr1</i>	1,32573713	<i>Peli1</i>	-1,340977464
<i>Rab8b</i>	3,01466906	<i>Scn2a1</i>	1,31187967	<i>Aqp4</i>	-1,690424344
<i>RT1-S3</i>	2,603710297	<i>Grin1</i>	1,29199291	<i>Il18</i>	-1,601114616
<i>Dbn1</i>	2,513476275	<i>Nedd8</i>	1,25110323	<i>Peli2</i>	-2,124119865
<i>Cldn11</i>	2,391971628	<i>Gabra1</i>	1,212309733	<i>Atp6ap1l</i>	-5,634671314
<i>RT1-S3</i>	2,339964171	<i>Vdac2</i>	1,21229025	<i>Pxmp4</i>	-5,815543095
<i>Abcb1a</i>	2,337315948	<i>Slc1a3</i>	1,20900484	<i>Egfr</i>	-6,948610861
<i>Vdac1</i>	1,826207203	<i>Gria2</i>	1,14578985	<i>RT1- A2/ A3/ EC2</i>	-11,73433333
<i>Kcnc2</i>	1,607381648	<i>Ank2</i>	-1,095978141	<i>RT1-T24-4</i>	-30,18086744
Hipocampo					
Gene	<i>Fold change</i>	Gene	<i>Fold change</i>	Gene	<i>Fold change</i>
<i>Rab8b</i>	4,621109218	<i>Slc1a3</i>	1,297978319	<i>Gabbr1</i>	-4,274398064
<i>RT1-T24-3</i>	4,529879307	<i>Vdac1</i>	1,187930218	<i>Ewsr1</i>	-4,715320373
<i>Plekhh1</i>	3,236285148	<i>Scn2a1</i>	1,138814136	<i>Fam107a</i>	-4,747007798
<i>Smoc2</i>	3,150074606	<i>Gria3</i>	1,118772979	<i>Pxmp4</i>	-4,963960261
<i>Zeb2</i>	2,806937848	<i>Gria2</i>	1,111697241	<i>RT1- A2/ A3/ EC2</i>	-5,592639412
<i>Creg2</i>	2,45469122	<i>Nedd8</i>	1,098009123	<i>Bhlhe40</i>	-5,819597305
<i>Abcb1a</i>	2,255712416	<i>Neurod1</i>	-1,144681711	<i>Crebl2</i>	-6,144245867
<i>RT1-S3</i>	1,94561694	<i>Gabra2</i>	-1,231295566	<i>Mll1</i>	-7,670103786
<i>Kctd6</i>	1,456980965	<i>Aqp4</i>	-1,243554243	<i>RT1-T24-4</i>	-26,58418379
<i>Kcnd2</i>	1,298334005	<i>Bdnf</i>	-1,29312111	-	-

Os resultados foram obtidos através da técnica de microarranjo, uma metodologia que permite a análise de milhares de genes ao mesmo tempo e é amplamente utilizada para a identificação de múltiplos transcritos relacionados a processos biológicos distintos. Porém, as análises de microarranjo mostram variações generalizadas mesmo sob condições experimentais controladas, tornando indispensável que os seus resultados sejam validados por outros métodos independentes (JAYAPAL e MELENDEZ, 2006). Entre outras tecnologias, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido a mais utilizada para essa finalidade, técnica já bem estabelecida para a análise individual de genes alvo e que fornece dados quantitativos acurados.

Entre os genes identificados como diferencialmente transcritos em animais WAR (Tabela 2), alguns foram previamente selecionados para análise individual. Seis genes da placa quadrigêmea (*Gria2*; *Grin1*; *Gabbr1*; *Scn2a1*; *Il18*; *Peli2*) e cinco genes do hipocampo (*Gria2*; *Gabra2*; *Gabbr1*; *Slc1a3*; *Bdnf*), apresentados com sua nomenclatura completa na Tabela 3. Neste trabalho, assumi-se a tarefa de confirmar a transcrição diferencial desses genes alvo, por meio da qPCR, a fim de definir genes e vias candidatas associadas ao processo epileptogênico como base para os futuros estudos funcionais.

Tabela 3. Nomeclatura completa dos genes selecionados para os experimentos de quantificação relativa por PCR quantitativa em tempo real.

Gene	Nome Completo
<i>Bdnf</i>	<i>Brain-derived neurotropic factor</i>
<i>Gabbr1</i>	<i>GABA_B receptor 1</i>
<i>Gabra2</i>	<i>GABA_A receptor, alpha 2</i>
<i>Gria2</i>	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2</i>
<i>Grin1</i>	<i>Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1</i>
<i>Il18</i>	<i>Interleukin 18</i>
<i>Peli2</i>	<i>Pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2</i>
<i>Slc1a3</i>	<i>Solute carrier family 1, member 3</i>
<i>Scn2a1</i>	<i>Sodium channel, voltage-gated type II, alpha 1</i>

4. Justificativa e relevância

Os ratos da linhagem WAR (*Wistar Audiogenic Rat*) ao serem estimulados apresentam semelhanças comportamentais e eletrofisiológicas com crises epilépticas humanas. Essas similaridades devem ser exploradas para um melhor entendimento do processo epileptogênico que afeta mais de 65 milhões de pessoas no mundo. Esse modelo genético é de suma importância para os estudos de epilepsia e leva consigo uma versatilidade, podendo representar e dessa forma contribuir para o entendimento de diferentes tipos de crises ocorridas em humanos, como crises reflexas, crises generalizadas tônico-clônicas e crises parciais através de protocolos específicos de estimulação. Embora seja bem caracterizada do ponto de vista comportamental e eletrofisiológico, pouco se sabe dos aspectos genéticos moleculares relacionados com a susceptibilidade dessa linhagem. Com esse estudo será possível relatar genes e vias candidatas, auxiliando no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na predisposição às crises audiogênicas e assim fornecer base para estudos funcionais e futuramente propor tratamentos mais eficientes.

O trabalho aqui desenvolvido compõe os objetivos do projeto proposto pela UNICAMP e UFMG através da parceria FAPESP-FAPEMIG, aprovado no Programa FAPESP-FAPEMIG: 2009/53444-8.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Validar alguns genes identificados pelo microarranjo como diferencialmente transcritos em WARs e apontar vias relevantes no modelo, a fim de auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na predisposição às crises audiogênicas e fornecer base para futuros estudos funcionais.

Objetivos Específicos

- Avaliar os genes *Gria2*, *Grin1*, *Gabbr1*, *Scn2a1*, *Il18* e *Peli2* na placa quadrigêmea de animais WAR em relação aos controles Wistar;
- Avaliar os genes *Gria2*, *Gabra2*, *Gabbr1*, *Slc1a3* e *Bdnf* no hipocampo de animais WAR em relação aos controles Wistar;
- Estudar os genes validados, assim como os demais identificados no microarranjo, quanto ao seu envolvimento no processo epileptogênico identificando vias relevantes no modelo.

METODOLOGIA

1. Animais

Os ratos da linhagem WAR e os Wistar resistentes são mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG em condições controladas de iluminação com ciclos de 12hrs luz/escuro e acesso livre a comida e água. Os experimentos desenvolvidos nesse trabalho tiveram a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Anexo 2).

2. Avaliação comportamental

Os animais da linhagem WAR e os controles Wistar foram submetidos a estímulos sonoros de alta intensidade (120 dB) durante um minuto ou até que se inicie a crise. Para receber a estimulação, cada rato foi colocado dentro de um cilindro de acrílico transparente (32x36x32cm), que por sua vez, foi posto dentro de uma caixa de madeira acusticamente isolada (41x41x46cm) com parede frontal de acrílico transparente para permitir a observação do animal. A estimulação acústica e avaliação comportamental (*screening*) foi realizada três vezes, sempre no mesmo horário, aos 70, 74 e 78 dias de vida. A gravidade das crises foi avaliada pelo *index of severity* (IS) de acordo com a metodologia descrita por Garcia-Cairasco e colaboradores (Garcia-Cairasco et al.,1996b) (Tabela 1). Foram selecionados como controles os ratos Wistar que não respondiam ao som com qualquer comportamento referente a crise epiléptica ($IS \leq 0,23$) e selecionados os ratos audiogênicos que apresentaram $IS \geq 0,85$ nos três *screenings*.

3. Coleta

Quatro dias após o último *screening*, aos 82 dias de idade, os controles Wistar (n=10) e os animais WAR (n=10) foram eutanasiados em guilhotina e tiveram o cérebro dissecado. Coletou-se a placa quadrigêmea (conjunto de colículos inferiores e superiores) e o hipocampo direito e esquerdo. As amostras foram colocadas em microtubos de 2 mL, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C. Esses procedimentos foram realizados na sala de cirurgia do Núcleo de Neurociências (NNC) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4. Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo de TRIzol® (Invitrogen). Às amostras ainda congeladas foi adicionado o TRIzol® em uma proporção de 1 mL/100 mg de tecido seguido de maceração com o homogeneizador Tissue Master 125 (OMNI International). Em seguida, a solução ficou em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos, depois foi adicionado 200 µL de clorofórmio PA, agitado em vórtex por 10 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 G por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Nova centrifugação foi feita a 12000 G por 10 minutos a 4°C (nessa fase forma-se o *pellet*). Em seguida, desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado, agitado em vórtex até que o pellet se desprendesse e centrifugado a 7500 G durante 10 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado ficou em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos deixando evaporar todo etanol. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 20µL de água Ultrapure® (Qiagen).

O RNA total foi quantificado utilizando os equipamentos NanoDrop® ND-1000v3 1.0 (Thermo Fisher Scientific) e Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Todas as amostras utilizadas apresentaram razões 260/230 nm e 260/280 nm maiores ou iguais a 1,8. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com 15 µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1X (Ácido acético glacial 20 mM, Tris 40 mM, EDTA 1 mM) onde foi possível observar a presença das bandas ribossomais 28S e 18S. As condições da corrida foram 300 mA, 90V por aproximadamente 30 minutos.

5. Síntese de cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram usados 800 ng de RNA total em um volume final de 20 µL. Inicialmente, em um microtubo de reação foram adicionados: a água Ultrapure® (Qiagen), os 800 ng de RNA e 2 µL de oligodT, o volume de água é dependente da concentração da amostra. Ao final desse procedimento, o microtubo contendo o volume de 12,5 µL foi aquecido a 65°C por 5 minutos e depois colocados em gelo para a dissociação das moléculas e sua permanência em fita simples. Em seguida foram adicionados ao microtubo de reação: 2 µL de dNTP mix, 4 µL de Reaction Buffer 5X

(Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL de Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) e 1 µL da enzima RevertAID® Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), totalizando o volume de 20 µL. As amostras foram então colocadas em termociclador Peltier Thermal Cycler (Biocycler) com programação de 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos, conforme instruções do fabricante. O cDNA obtido foi estocado a -20°C.

6. Desenho dos iniciadores

Os genes a serem validados foram escolhidos através de pesquisa no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) selecionando aqueles com possível envolvimento na epilepsia. A sequência de exons dos genes alvo foi retirada do NCBI e comparadas com as depositadas no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). A sequência foi inserida no programa Primer3 v.0.4.0 (UNTERGASSER et al., 2012) disponível *on-line* no endereço: <http://frodo.wi.mit.edu/>, restringindo o tamanho do produto (70-150 bases), tamanho do iniciador (mínimo 19 bases, ótimo 21 bases e máximo 23 bases), temperatura de *melting* (TM) (mínimo 59°C, ótimo 60°C e máximo 61°C), %GC (mínimo 20%, ótimo 50% e máximo 80%), os demais parâmetros não foram alterados.

Em seguida, os iniciadores foram avaliados através do programa NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) para evitar pares com grandes defeitos estruturais. A especificidade dos pares foi testada através da análise por alinhamento local utilizando o programa Primer-BLAST, disponível no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Os *primers* desenhados foram também testados por PCR convencional e os produtos visualizados em gel de agarose 1% corado com o agente intercalante GelRed™ (Biotium Inc.), onde não foi observada qualquer inespecificidade.

7. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para essas, foi utilizado o agente intercalante SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o aparelho CFX 96™ Real Time system (BioRad). Inicialmente, foi feita uma curva de diluição seriada de 5 concentrações de cDNA (40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng e 2,5 ng) para testar os primers dos

genes em questão (genes alvo e genes normalizadores). As eficiências das reações de amplificação são calculadas pelo programa Bio-Rad CFX Manager® (Biorad) e não podem apresentar diferença maior que 10% entre genes alvo e seus controles endógenos, dessa forma dizemos que o sistema está validado e as quantificações relativas podem ser realizadas. Com base na melhor eficiência relativa, a concentração de 10 ng de cDNA foi escolhida para as próximas reações. Para a normalização dos dados foram utilizados 3 genes constitutivos, ditos genes endógenos ou de referência, o *Gdi2* (*GDP dissociation inhibitor 2*), *Rps26* (*Ribossomal protein S26*) e *Actb* (β -actina), escolhidos com base na sua estabilidade de expressão.

Para a quantificação relativa dos genes de interesse, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 10 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix, 1 μ L de cDNA (10 ng), 0,4 μ L da solução primers (10 μ M), 8,2 μ L de água, tendo um branco da reação no qual se adicionou 1,0 μ L de água ao invés do cDNA, mantendo o volume final de 20 μ L. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto com adicional da curva de dissociação (curva de *melting*). As curvas de dissociação analisadas não apresentaram quaisquer problemas de especificidade dos iniciadores desenhados, nem dímeros de *primer*. Os dados de quantificação, valores de *threshold cycle* (Ct), foram exportados para uma planilha no Excel e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada segundo a metodologia de Vandesompele e colaboradores (VANDESOMPELE et al., 2002). Nesse cálculo, a média aritmética das réplicas é definida como a quantidade relativa da amostra considerando a eficiência para cada gene. A amostra com o menor Ct é considerada o valor máximo (igual a 1) e usada como referência para o cálculo das quantidades relativas das outras amostras. Essas quantidades relativas são normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos três genes de referência. Por fim, os valores de quantificação seguirão para a análise estatística.

8. Análise estatística

Os dados obtidos foram testados quanto a distribuição de normalidade e as diferenças de quantidade entre os transcritos foram avaliadas através do teste t não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância mantido em $p < 0,05$.

9. Identificação de vias biológicas

A identificação de vias foi realizada através dos bancos de dados para anotação: *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID, Bioinformatics Resources 6.7) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). Para essa identificação e enriquecimento de vias foram utilizados os dados normalizados do microarranjo que foram disponibilizados por nosso colaborador (Tabela 2) e considerando o nível de significância em $p < 0,05$. Os genes também foram pesquisados isoladamente nos bancos de dados analisando as vias em que participam e selecionando aquelas com possível envolvimento na epilepsia.

RESULTADOS

1. Validação de genes alvo

Os iniciadores para os genes alvo e genes endógenos foram desenhados com o auxílio de programas disponíveis *on-line*. Os iniciadores desenhados (Tabela 4) foram testados por PCR convencional seguida por eletroforese em gel de agarose, e avaliados através das curvas de dissociação. Não foi observado qualquer produto indesejado em ambas análises garantindo a especificidade dos iniciadores. Ainda, foi verificada as eficiências de amplificação de cada gene alvo em relação aos controles endógenos, mostrando que suas eficiências estavam próximas a 100% e que suas diferenças não excediam 10%.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores desenhados para a validação por PCR quantitativa em tempo real. Os genes endógenos/referência escolhidos para normalizar os dados estão identificados com a abreviação "(ref)". Sequências representadas no sentido 5'→ 3'.

Gene	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<i>Actb</i> (ref)	CATTGAACACGGCATTGTAC	CCACACGCAGCTCATTGTAGA
<i>Bdnf</i>	GACCAGGAGCGTGACAACAAT	GGAAGTTCAGGGTCCACACAAA
<i>Gabbr1</i>	TTAACAGCCGCAGAGACATCC	GAACTACAGCCAGGCATGAGAA
<i>Gabra2</i>	CTGAACAGAGAATCGGTGCCA	GGAAGGGAATTTTCGAGCACTG
<i>Gdi2</i> (ref)	CCCGCCATGAATGAGGAAT	TCACTGACATTATCCCCGACA
<i>Gria2</i>	AGAATACCCTGGAGCACACACA	TCAGTCATCACTTGGACAGCATC
<i>Grin1</i>	TGGGACTGACTACCCGAATGT	GCATCATCTCAAACCAGACGC
<i>Il18</i>	CAAAAGAAACCCGCCTGTGT	TCTGGTCTGGGATTTCGTTGG
<i>Peli2</i>	CGTACACTTTGTACGGAACCA	GACTTTCTGTTGACCTGCCCA
<i>Rps26</i> (ref)	CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT	CGATTCCTGACAACCTTGCTATG
<i>Slc1a3</i>	TCGGAATGCCTTTGTGCTAC	TCATTTTATACGGTTCGGAGGG
<i>Scn2a1</i>	CATTCTCCAGAGATGGTGTCA	GCGAGATTGCTTTCCCCTTA

Os experimentos de quantificação relativa dos genes de interesse foram realizados utilizando amostras da placa quadrigêmea e hipocampo de animais audiogênicos e controles Wistar. A metodologia para os cálculos de quantidade relativa (VANDESOMPELE et al., 2002) utiliza os valores das eficiências de amplificação dos genes alvo e endógenos e

faz uso de um calibrador interno, com valor de referência fixado em um (unidade arbitrária), que é base para os cálculos das demais amostras. Os resultados dos cálculos são avaliados por teste t não pareado ao nível de 5%.

No principal substrato neural envolvido nas crises audiogênicas, a placa quadrigêmea, foram validados cinco genes como diferencialmente transcritos no modelo WAR em relação aos controles Wistar. A análise da quantidade de mRNA dos genes *Gria2*, *Grin1*, *Gabbr1* e *Scn2a1* mostrou um aumento nos níveis de transcritos dos animais audiogênicos em relação aos controles, confirmando assim, que esses genes são hiper-regulados no modelo WAR. O gene *Il18* apresentou um decréscimo nas quantidades de transcritos dos ratos WAR em relação aos controles, corroborando com os dados do microarranjo que mostrou esse gene como hiporregulado nesse modelo audiogênico (Figura 3).

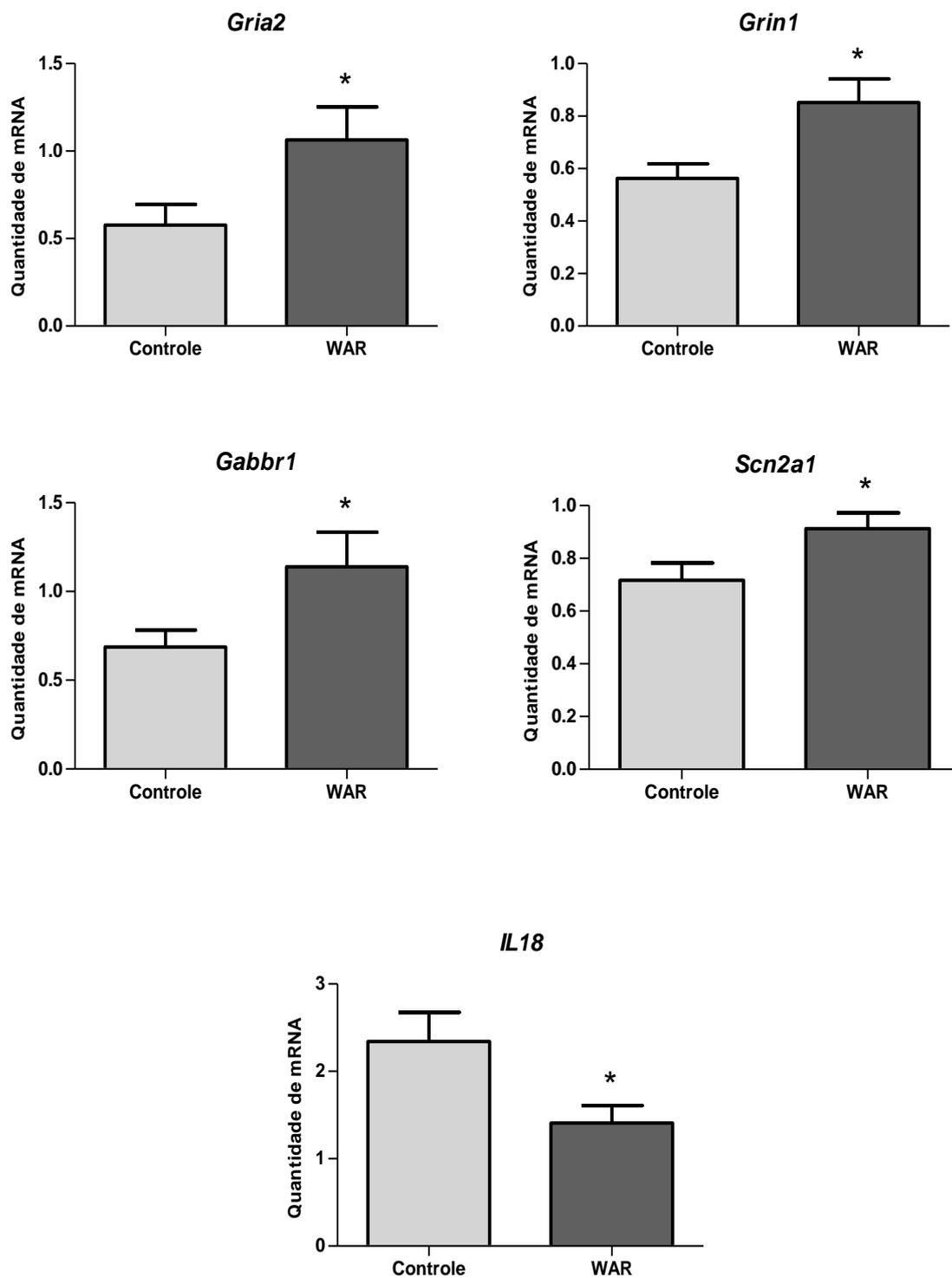


Figura 3. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA dos genes alvo na placa quadrigêmea de animais WAR comparadas aos controles Wistar. Gene *Gria2*: Controle (n=7) e WAR (n=7). Demais genes: Controle (n=9) e WAR (n=8). Ordenada: Quantidade de mRNA em unidades arbitrárias; Abscissa: Grupos experimentais. Barras verticais indicam o erro padrão. * p<0,05.

No hipocampo foram validados quatro genes como diferencialmente transcritos no modelo WAR comparados aos controles Wistar. Dois genes, *Gabra2* e *Gabbr1*, apresentaram decréscimo nas quantidades de transcritos de ratos audiogênicos em relação aos controles. Enquanto que os genes, *Gria2* e *Slc1a3*, são considerados hiper-regulados no modelo por apresentarem maiores quantidades de mRNA quando comparados com os controles Wistar (Figura 4).

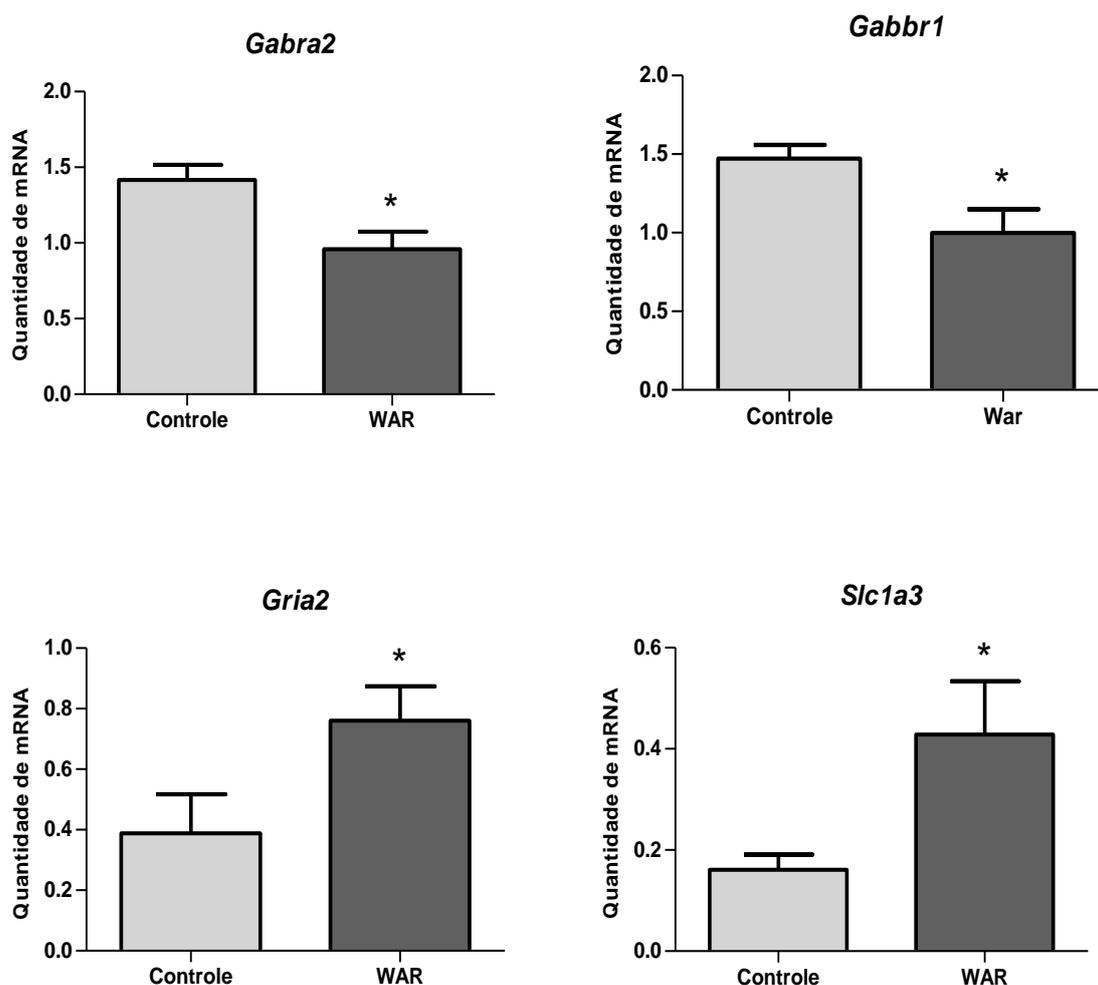


Figura 4. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA no hipocampo de animais WAR comparadas aos controles Wistar. Gene *Gabra2*: Controle (n=9) e WAR (n=9). Gene *Gabbr1*: Controle (n=9) e WAR (n=8). Genes *Gria2* e *Slc1a3*: Controle (n=8) e WAR (n=8). Ordenada: Quantidade de mRNA em unidades arbitrárias; Abscissa: Grupos experimentais. Barras verticais indicam o erro padrão. * p<0,05.

Os genes *Peli2* e *Bdnf* avaliados na placa quadrigêmea e no hipocampo, respectivamente, não mostraram diferenças significativas quanto a sua transcrição em animais WAR comparados a controles Wistar. No entanto, ambos apresentaram uma tendência de hiporregulação em ratos audiogênicos apresentando *p-value* 0,0858 para o gene *Peli2* e 0,1309 para o gene *Bdnf*.

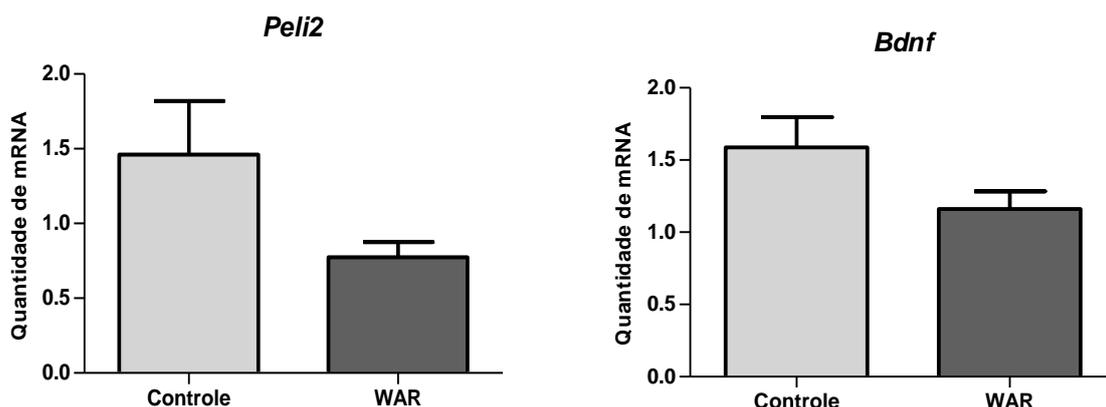


Figura 5. Gráficos apresentando a quantidade relativa de mRNA do gene *Peli2* na placa quadrigêmea e do gene *Bdnf* no hipocampo de animais WAR comparadas aos controles Wistar. Gene *Peli2*: Controle (n=8) e WAR (n=8). Gene *Bdnf*: Controle (n=8) e WAR (n=6). Ordenada: Quantidade de mRNA em unidades arbitrárias; Abscissa: Grupos experimentais. Barras verticais indicam o erro padrão. * $p < 0,05$.

2. Vias biológicas

O processo de identificação de vias foi realizado através de análise nos bancos de dados *online* DAVID e KEGG, que são completos e muito utilizados por fornecerem informações de genômica e vias biológicas. Ao estudar os genes assinalados pelo microarranjo e validados por qPCR verificou-se que as vias de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica estão muito presentes no modelo audiogênico, e a análise de enriquecimento apontou a via de sinalização de cálcio como relevante nos WARs (*p-value* = 0,0060; *Fold Enrichment* = 9,4505; FDR = 5,3354). Cada uma dessas vias, representadas nas ilustrações a seguir, tem como constituintes pelo menos quatro dos genes identificados no microarranjo como diferencialmente transcritos em WAR. A via de neurotransmissão glutamatérgica (Figura 6), por exemplo, tem como componentes cinco dos genes

identificados (*Gria2*, *Gria3*, *Grin1*, *Slc1a3* e *Ank2*) dos quais três foram validados neste trabalho. Os genes validados *Gria2*, *Grin1* e *Slc1a3*, codificam subunidades de receptores ionotrópicos e transportador de aminoácidos excitatórios tipo 1 (EAAT1), respectivamente. Esses produtos gênicos estão grifados em vermelho na ilustração. A via de neurotransmissão GABAérgica (Figura 7) tem como componentes quatro genes entre os identificados no microarranjo (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabbr1* e *Gabbr2*). Similarmente, a via de sinalização de cálcio tem como constituintes quatro dos genes identificados (*Egfr*, *Grin1*, *Vdac1* e *Vdac2*), e o gene *Grin1*, também participante da via glutamatérgica, foi o único validado dessa via.

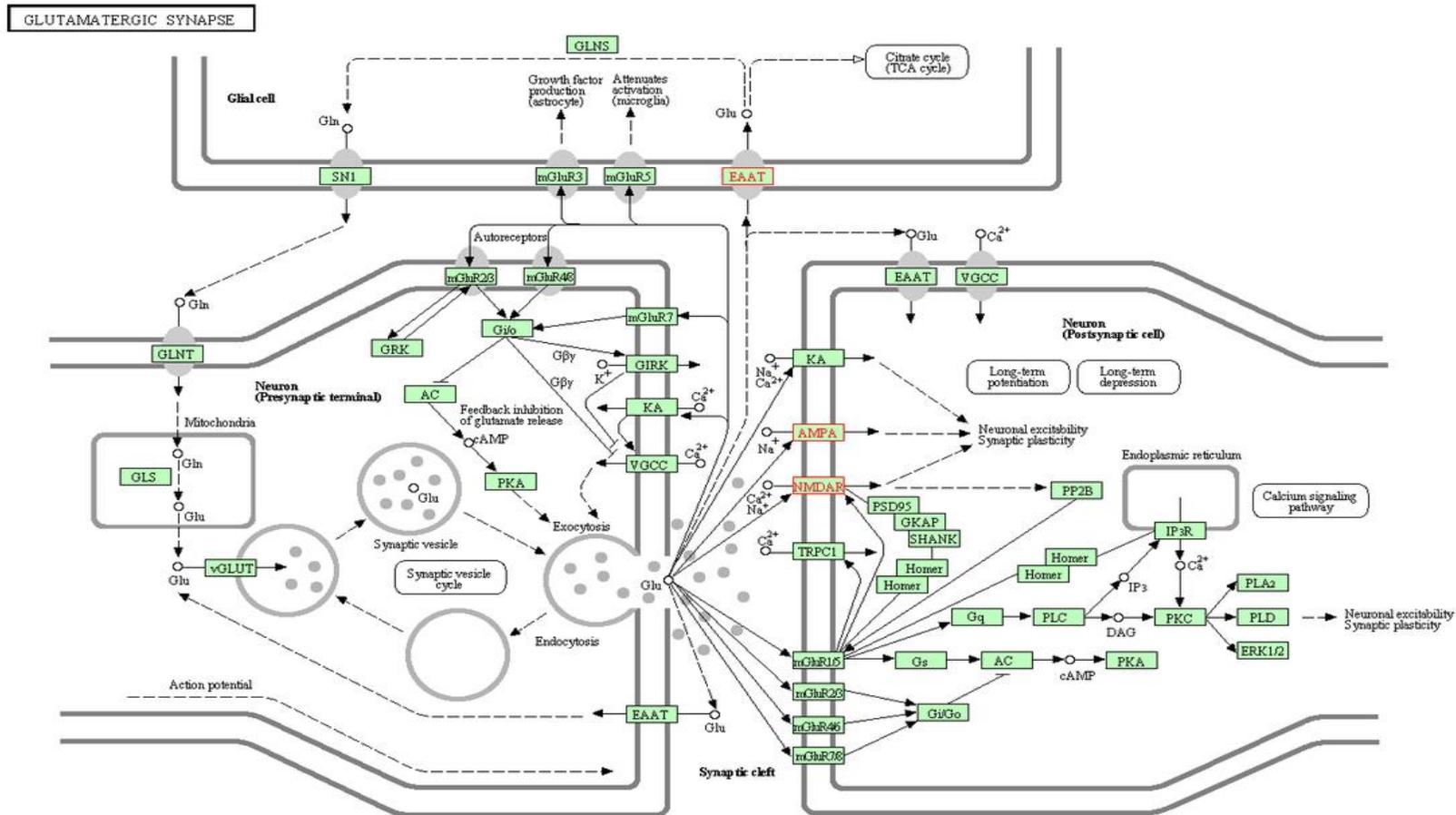


Figura 6. Neurotransmissão glutamatérgica, ilustração retirada do banco de dados KEGG. A figura mostra as interações entre os genes (setas contínuas indicam interações mais fortes do que as representadas por setas pontilhadas). As caixas retangulares representam produtos gênicos; os pequenos círculos representam um composto; as caixas ovais indicam a ligação a outra via biológica. + p: fosforilação; -p: desfosforilação. Os grifos em vermelho indicam algum produto gênico referente aos genes que foram validados no presente trabalho.

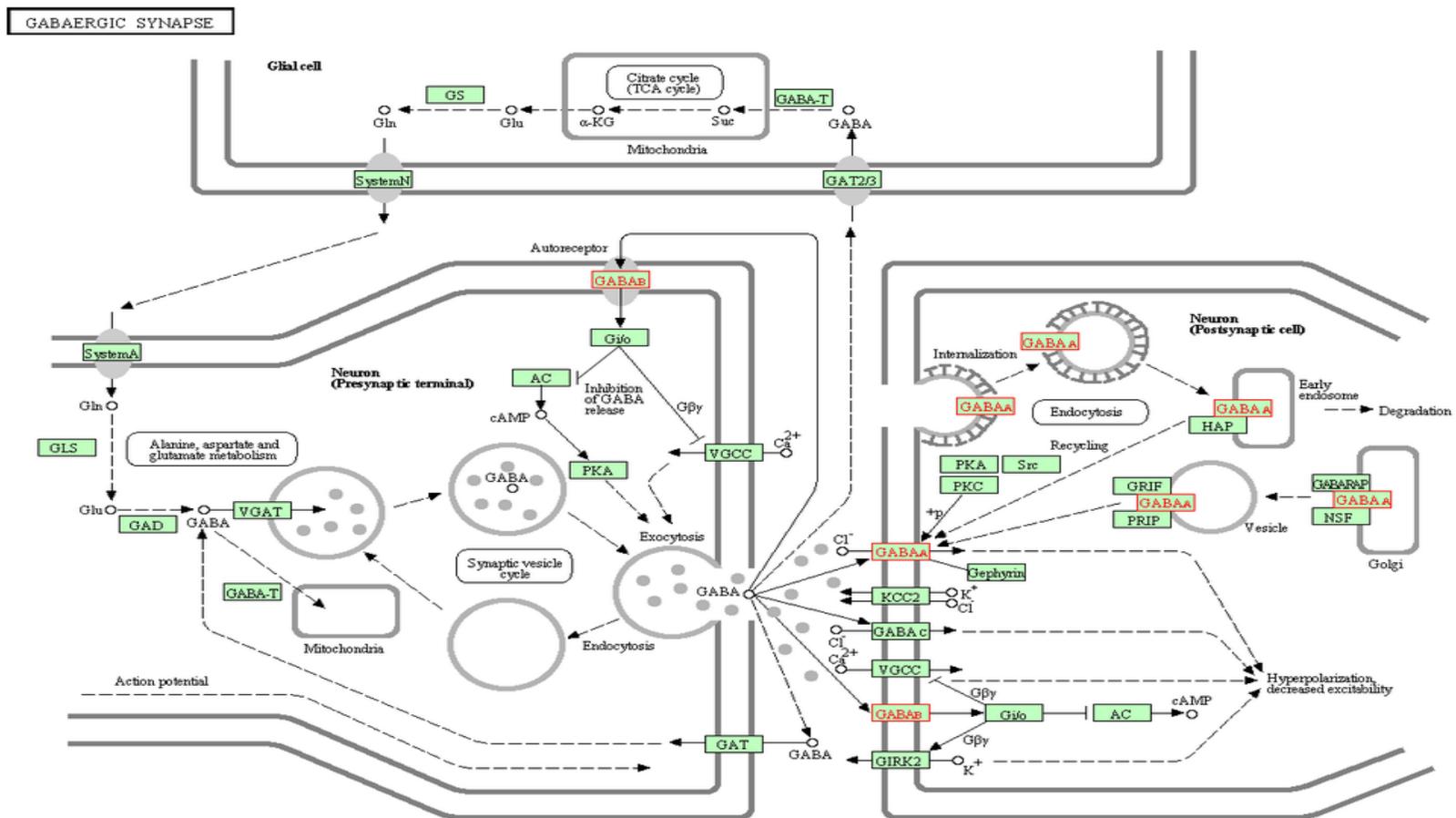


Figura 7. Neurotransmissão GABAérgica, ilustração retirada do banco de dados KEGG. A figura mostra as interações entre os genes (setas contínuas indicam interações mais fortes do que as representadas por setas pontilhadas). As caixas retangulares representam produtos gênicos; os pequenos círculos representam um composto; as caixas ovais indicam a ligação a outra via biológica. + p: fosforilação; -p: desfosforilação. Os grifos em vermelho indicam algum produto gênico referente aos genes que foram validados no presente trabalho.

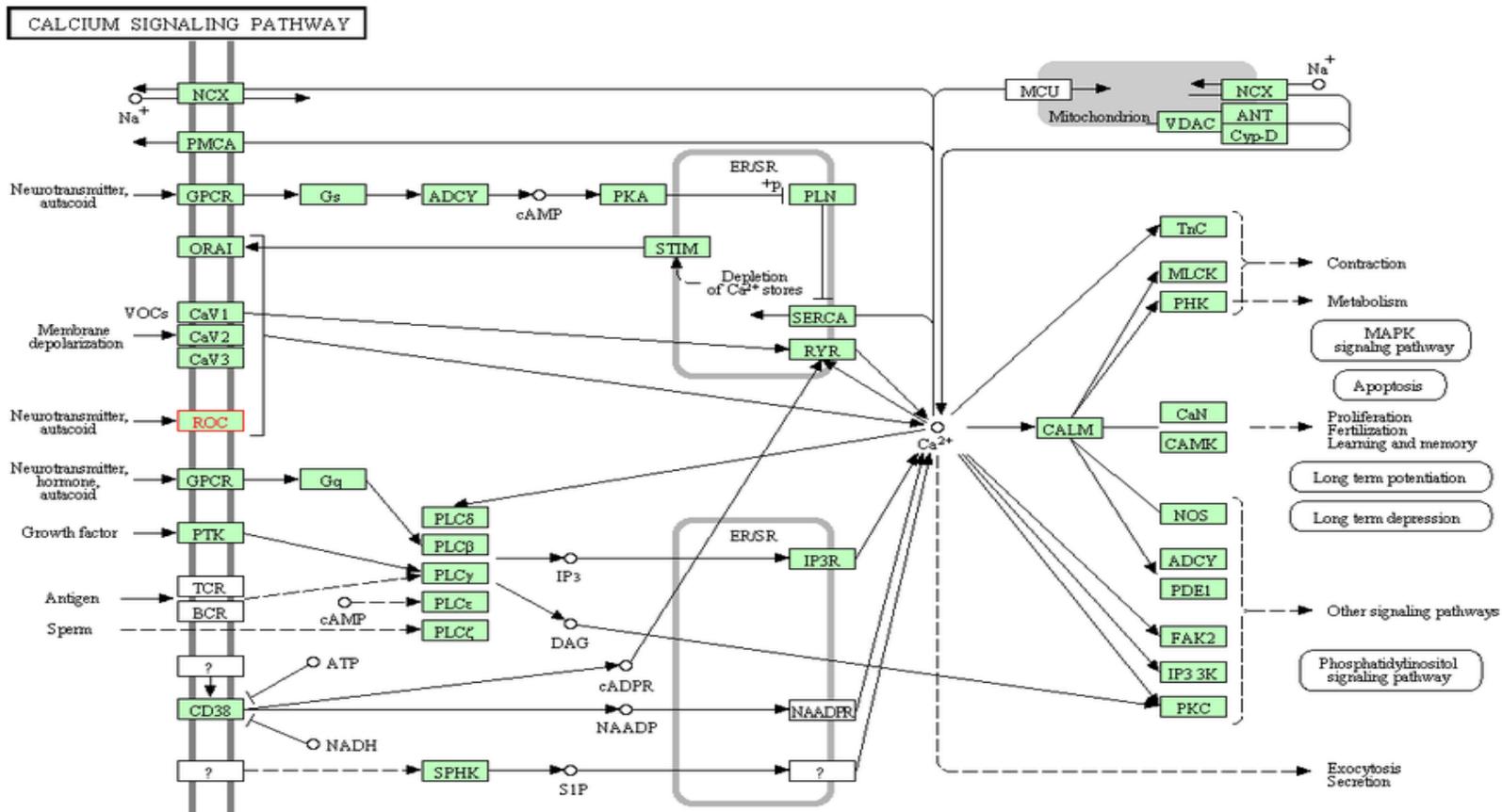


Figura 8. Via de sinalização de cálcio, ilustração retirada do banco de dados KEGG. A figura mostra as interações entre os genes (setas contínuas indicam interações mais fortes do que as representadas por setas pontilhadas). As caixas retangulares representam produtos gênicos; os pequenos círculos representam um composto; as caixas ovais indicam a ligação a outra via biológica. + p: fosforilação; -p: desfosforilação; ER/RS: retículo endoplasmático/sarcoplasmático. O grifo em vermelho indica algum produto gênico referente aos genes que foram validados no presente trabalho.

DISCUSSÃO

O presente trabalho é resultado da parceria entre UFMG e UNICAMP em um grande projeto com o modelo *Wistar Audiogenic Rat*. Na fase inicial do projeto nossos colaboradores promoveram a identificação de genes diferencialmente transcritos por meio da técnica de microarranjo e nós assumimos de validar essas diferenças. Dentre a lista apresentada na Tabela 2, foram selecionados seis genes para confirmação na placa quadrigêmea e cinco para confirmação na estrutura hipocampal. Os genes *Gabbr1*, *Gria2*, *Grin1*, *Scn2a1* e *Il18* foram confirmados como diferencialmente regulados na placa quadrigêmea de WARs quando comparados com os controles Wistar, da mesma forma, os genes *Gabra2*, *Gabbr1*, *Gria2* e *Slc1a3* foram confirmados como diferencialmente regulados no hipocampo de animais WAR. Dois dos genes selecionados, *Peli2* e *Bdnf*, não apresentaram regulação com diferença significativa, mas mostraram uma tendência sugestiva.

O gene *Grin1*, que codifica a subunidade NR1 do receptor ionotrópico NMDA, mostrou-se suprarregulado na placa quadrigêmea de animais WAR, resultado antes nunca registrado para esse modelo. Já foi demonstrado que durante o desenvolvimento pós-natal de ratos o receptor NMDA é excessivamente expresso por um período transitório, havendo uma hiper-regulação da subunidade NR1 entre o 5^o e 10^o dia pós-natal em células ciliares externas e internas da cóclea, tornando a região altamente sensível ao neurotransmissor glutamato que pode desempenhar um papel importante na modulação desse receptor durante essa fase (KNIPPER et al., 1997; ROSS e COLEMAN, 2000). Em humanos já foi observado o aumento da expressão de NR1 em amígdala de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial (MOURA et al., 2012), e trabalhos sugerem que a atividade anticonvulsiva de alguns elementos (neuropeptídeo y, agmatina) se passa pela sub-regulação de subunidades de receptores NMDA, incluindo NR1 (DONG et al., 2013; XU et al., 2014).

O gene que codifica a subunidade GluR2 do receptor ionotrópico AMPA, *Gria2*, também se apresentou suprarregulado na placa quadrigêmea e no hipocampo de WARs. O receptor AMPA é um complexo tetramérico (GluR1-4) cuja subunidade GluR2 é a principal responsável pela condutância de íons (AIRES et al., 2008). Gitaí e colaboradores observaram altos níveis de transcritos da variante 1 da subunidade GluR2 (GluR2-flip) no hipocampo de ratos WAR submetidos a crises agudas e crônicas, o que não foi observado para a variante 2 (GluR2-flop). Ao analisarem animais sem estimulação acústica (WAR

naive e Wistar) foi observado que a variante GluR2-flip é naturalmente mais expressa na placa quadrigêmea do que no hipocampo, mas essas diferenças não foram detectadas após a ocorrência de crises audiogênicas, também não foi demonstrado diferenças significativas na quantidade de transcritos das isoformas de GluR2 nos colículos superiores e inferiores, sugerindo que essa subunidade não seja regulada nessa estrutura durante o processo (GITAÍ et al., 2010). Neste trabalho não fizemos restrição entre as variantes da subunidade GluR2 e verificamos uma diferença significativa dos níveis de transcritos tanto no hipocampo quanto na placa quadrigêmea de animais WAR comparados aos controles Wistar. Essa divergência de dados pode ser devido a alguns pontos importantes da metodologia. Em seus experimentos Gitaí e colaboradores utilizaram animais fêmeas, com um grupo submetido a um único estímulo acústico e eutanásia 2h após a indução da crise audiogênica (verificar metodologia). Possivelmente, uma única estimulação sonora não tenha sido suficiente para causar uma modulação significativa nos colículos que compõem a placa quadrigêmea, dissemelhante do hipocampo que apresentou uma relevante modulação nas mesmas condições. Ambos receptores ionotrópicos, NMDA e AMPA, já foram relatados com densidades aumentadas em tecido epileptogênico (GEDDES et al., 1990; MCDONALD et al., 1991) e inferimos que os mesmos sejam modulados positivamente em WARs após indução de crises epiléticas audiogênicas.

O gene *Slc1a3* que codifica o transportador de aminoácidos excitatórios tipo 1 (EAAT1, também conhecido por GLAST, sigla do inglês “*Glutamate Aspartate Transporter*”) foi validado com elevados níveis de transcritos no hipocampo de WARs. O EAAT1 é expresso predominantemente na membrana plasmática de células da glia, especialmente astrócitos, e conduz a remoção de glutamato do espaço extracelular (PURVES, 2004). Em pacientes com epilepsia de lobo temporal foi verificada uma redução focal da expressão de EAAT1 nas áreas com esclerose hipocampal (BJORNSEN et al, 2007; SARAC et al., 2009). Pesquisas mostraram que mutações no gene do EAAT1 levam a uma diminuição da capacidade de captação de glutamato podendo contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal e assim ocasionar ataxia episódica, hemiplegia e crises epiléticas (JEN et al., 2005). Ainda foi relatado que camundongos com deficiência desse transportador (*GLAST-knockout*) são mais suscetíveis ao desenvolvimento de episódios epiléticos (WATANABE et al., 1999). Os transportadores de aminoácidos excitatórios (há cinco tipos) são responsáveis pela recaptação destes no espaço extracelular. Alterações nos seus genes, físicas ou regulatórias, podem comprometer a funcionalidade desses transportadores e acarretar, por exemplo, em um aumento da concentração de glutamato no foco epileptogênico, contribuindo assim para uma hiperexcitação neuronal e consequente crise epilética. O aumento dos níveis de transcritos do gene *Slc1a3* em nossos resultados é

sugerido como um mecanismo de *feedback* negativo, uma resposta fisiológica para reparar o acúmulo de glutamato na fenda sináptica. Recordando que a eutanásia dos animais foi realizada quatro dias após o terceiro *screening*, tempo considerável para a modulação de uma resposta.

Os genes *Grin1*, *Gria2* e *Slc1a3* são componentes da via de neurotransmissão glutamatérgica juntamente com outros dois genes identificados pelo microarranjo mas não avaliados no presente estudo, *Ank2* e *Gria3*. A relevância do glutamato no processo epileptogênico é bem documentado, com envolvimento na iniciação e propagação das crises epiléticas. Estudos sugerem que o sistema glutamatérgico desempenha um papel fundamental na atividade convulsiva audiogênica e acredita-se que esse aminoácido esteja envolvido no processamento anormal da informação acústica no colículo inferior (ROSS e COLEMAN, 2000).

Outros dois genes aqui validados fazem parte da via de neurotransmissão GABAérgica, também muito discutida no âmbito das epilepsias. Os genes *Gabbr1* e *Gabra2* mostraram-se sub-regulados no hipocampo, enquanto *Gabbr1* mostrou-se suprarregulado na placa quadrigêmea de animais WARs. O gene *Gabbr1* codifica o receptor metabotrópico B1 de ácido gama-aminobutírico (GABA_{B1}) que interage com o receptor GABA_{B2} (gene *Gabbr2*) formando um heterodímero associado a proteína G, e juntos exercem sua função inibitória através de segundos mensageiros que resultam na modulação indireta de canais iônicos (PURVES, 2004; AIRES et al., 2008). Em humanos, o gene *Gabbr1* foi mapeado em uma região cromossômica que abriga um lócus de susceptibilidade para epilepsia generaliza idiopática (PETERS et al., 1998), e o polimorfismo G1465A desse gene está associado com o risco de desenvolvimento de epilepsia de lobo temporal (XI et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que camundongos com deficiência do receptor GABA_{B1} exibiram convulsões espontâneas (PROSSER et al, 2001; SCHULER et al., 2001), o que certifica que essa subunidade é fundamental para o mecanismo de inibição mediado pelos receptores metabotrópicos de GABA. O componente GABA_{B1} é essencial para o acoplamento do ligante, enquanto o GABA_{B2} é necessário para a expressão funcional do dímero na superfície celular. Os transcritos desses receptores são expressos ao mesmo tempo, mas algumas diferenças de regulação foram observadas. Em ratos Sprague-Dawley comuns verificaram-se maiores níveis de transcritos de *Gabbr1* na região CA1 do hipocampo e no colículo superior quando comparados com os níveis de transcritos de *Gabbr2* para as mesmas estruturas. O contrário foi visto na região CA2 do hipocampo, onde o *Gabbr2* supera o *Gabbr1* (LI et al., 2003). Devido ao funcionamento conjunto desses elementos, sugere-se que as diferenças de regulação possam interferir na sua ação inibitória. A elevada concentração de mRNAs de GABA_{B1} na placa quadrigêmea por exemplo, se contrapõe com

o previsto para GABA_{B2} (*Gabbr2* mostrou-se hiporregulado na placa quadrigêmea, mas não foi avaliado por qPCR).

O gene *Gabra2* codifica a subunidade $\alpha 2$ do receptor ionotrópico GABA_A que está associado a canais de Cl⁻ e medeiam a inibição sináptica rápida no SNC (PURVES, 2004; AIRES et al., 2008). Alterações nos genes codificantes de algumas subunidades de receptores GABA_A foram descritas em vários tipos de desordens neurológicas incluindo epilepsias (DIBBENS et al., 2009; MACDONALD et al., 2010, SIDDHARTH et al., 2014). No gene *Gabra1* que codifica a subunidade $\alpha 1$ foi descoberta uma mutação (Ala322Asp) em uma família isolada com epilepsia mioclônica juvenil (COSSETE et al., 2002) mas até o momento não há relatos de mutações no gene *Gabra2* associadas a epilepsia. Recentemente, um estudo de quantificações de mRNAs no tecido cerebral demonstrou um aumento significativo da proporção de transcritos *Gabra2/Gabra1* em pacientes com epilepsia refratária (LODDENKEMPER et al., 2014). Os receptores GABA_A são pentâmeros organizados em diferentes arranjos entre suas três subunidades (α , β , γ) (SIGEL e STEINMANN, 2012). Acredita-se que modificações em alguma das subunidades que compõem o GABA_A comprometa o receptor como um todo, podendo reduzir sua sensibilidade ao GABA ou ocasionar uma rápida desativação, por exemplo. Dessa forma, a hiporregulação de componentes de receptores metabotrópicos ou ionotrópicos poderiam reduzir a inibição GABAérgica e deixar o foco mais propenso a hiperexcitação neuronal. Mesquita e colaboradores, ao estudarem neurônios hipocampais *in vitro*, verificaram uma menor capacidade de resposta ao GABA e consequente redução na magnitude das correntes inibitórias. Ainda especularam que esse fato poderia estar relacionado com uma modificação endógena no GABA_A pós sináptico ou uma redução na densidade de subunidades deste receptor (MESQUITA et al., 2005).

Além dos genes *Gabbr1* e *Gabra2* aqui avaliados, outros dois genes identificados no microarranjo também compõem a via de neurotransmissão GABAérgica (*Gabbr2*, *Gabra1*). O papel dessa via nas epilepsias ficou claro quando surgiram os experimentos com agonistas e antagonistas de receptores de GABA. Atualmente várias drogas que aumentam a inibição GABAérgica são usadas clinicamente como anti-convulsivantes. Os episódios epiléticos geralmente são produzidos por um desequilíbrio entre a excitação e inibição neuronal que envolve as vias glutamatérgicas e GABAérgicas. Considerando os dados já publicados, essas duas vias são cruciais para o desenvolvimento de crises audiogênicas. Nos WARs, ambas parecem estar envolvidas no processo de iniciação da crise na placa quadrigêmea, embora não saibamos qual delas é a mais crítica nesse processo. Mesquita e colaboradores (2005) quando verificaram a redução de correntes inibitórias em cultura de neurônios hipocampais, não relataram nenhuma alteração nas correntes excitatórias, que se

mantiveram em níveis normais, o que nos leva a crer que no hipocampo a via GABAérgica seja decisiva para a propagação de crises e possível recrutamento de novas estruturas.

Canais iônicos estão relacionados com vários tipos de epilepsia, inclusive algumas síndromes epilépticas têm sido consideradas como canalopatias. Alterações nos genes responsáveis pela formação desses canais são relatadas por diversos autores (CHARLIER et al., 1998; WALLACE et al., 1998; IMBRICI et al., 2004; HERON et al., 2007). Genes de subunidades de canais de sódio (Na^+) dependentes de voltagem (*Scn1a*, *Scn2a*, *Scn1b*) tiveram mutações identificadas e associadas a: epilepsia generalizada com convulsões febris, epilepsia mioclônica grave na infância (síndrome de Dravet) e convulsões neonatais-infantis familiares benignas (WALLACE et al., 1998; FUJIWARA et al., 2003; HERLENIUS et al., 2007; KILE et al., 2008; LIÃO et al., 2010). Além das desordens citadas, o gene *Scn2a*, que codifica a subunidade α do canal de Na^+ dependentes de voltagem tipo II, teve uma mutação descrita em um paciente com epilepsia de difícil controle e declínio mental grave (KAMIYA et al., 2004). Esses canais de Na^+ geram uma rápida despolarização da membrana e são compostos por uma subunidade α , que possui propriedades essenciais no canal, e subunidades reguladoras menores (β) (PURVES, 2004). Estudos funcionais indicam que a subunidade α é suficiente para formar um canal funcional (HILLE, 1992). Em animais WARs o gene *Scn2a1* apresentou-se suprarregulado na placa quadrigêmea. Assim como os receptores associados a canais iônicos (NMDA e AMPA), a hiperexpressão de canais de Na^+ dependentes de voltagem resultam num aumento da despolarização gerando uma excitação neuronal desequilibrada que pode ocasionar crises epilépticas.

O gene da interleucina 18 (*Il18*), uma citocina pró-inflamatória indutora de interferon- γ (IFN- γ), mostrou-se hiporregulado na placa quadrigêmea de ratos audiogênicos. Ryu e colaboradores inferiu que a *Il18* juntamente com o IFN- γ , pode desempenhar um papel protetor contra os danos neuronais causados por *status epilepticus* (SE) (RYU et al., 2010). Muitos autores apoiam a ideia de que inflamação em determinadas áreas cerebrais contribua no processo epileptogênico, e dados demonstraram que algumas citocinas pró-inflamatórias (*il-1 β* , *il-6* e *TNF- α* , por exemplo) são reguladas positivamente após crises epilépticas (SHENG et al., 1994; MINAMI et al., 1991; SIMONI et al., 2000; VEZZANI et al., 2008; SHIMADA et al., 2014). A divergência desses relatos com o resultado aqui obtido e a ausência de outros mediadores inflamatórios identificados no microarranjo torna necessário um estudo mais acurado a respeito do envolvimento de processos inflamatórios na ictogênese e epileptogênese de animais WARs.

Dos genes selecionados para a validação, dois não apresentaram diferenças de transcritos com significância estatística. O gene *Pellino2* membro da família de proteína

ubiquitina ligase E3 revelou uma tendência de hiporregulação na placa quadrigêmea de WARs. *Peli2* parece ser um componente necessário das vias de sinalização IL-1R (via do receptor de interleucina 1) e TLRs (via dos receptores *Toll-Like*) (YU et al., 2002; KIM et al., 2012). Os membros pellino em geral (*Peli1*, *Peli2*, *Peli3*) são considerados mediadores críticos de algumas vias de sinalização do sistema imunológico, exercendo funções distintas (HUOH e FERGUSON, 2014). No entanto, não há publicações relacionando crises epiléticas com o gene em questão, o que leva a considerar que esse achado na placa quadrigêmea seja algo arbitrário.

O gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) também não apresentou diferenças de expressão significativas, mas verificou-se uma sutil tendência de sub-regulação no hipocampo de ratos audiogênicos. O BDNF, membro da família de neurotrofinas, é expresso em todo o cérebro e regula diversas funções neuronais. Exerce efeito sobre o crescimento e sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento e há tempos vem sendo reconhecido pela sua influência na excitabilidade neuronal. Diferentes trabalhos têm sugerido a contribuição desse fator na epileptogênese. Em modelos animais de epilepsia de lobo temporal (TLE) foi demonstrado que crises convulsivas induzem aumento da expressão desse fator neurotrófico, especialmente no hipocampo, que por sua vez atua no desenvolvimento da hiperexcitabilidade neuronal. Dessa forma, o BDNF poderia contribuir para a epileptogênese ou mesmo ser considerado como pró-convulsivante no sistema límbico (CROLL et al., 1999; REIBEL et al., 2001; MCNAMARA e SCHARFAMAN, 2010; GRABENSTATTER et al., 2012). Antagonicamente, alguns autores relataram efeitos inibitórios do fator neurotrófico derivado do cérebro através de observações em que infusões intra-hipocâmpais crônicas de BDNF retardou o abrasamento em ratos. Esse retardo no desenvolvimento da epilepsia poderia ser atribuído a baixa regulação de receptores específicos de neurotrofinas (TRKs), mas logo verificou-se que as infusões de BDNF ocasionavam um aumento da expressão do neuropeptídeo Y (NPY) que já tem seus efeitos inibitórios bem descritos. O nível de NPY, por exemplo, é elevado em neocórtex de pacientes com TLE e positivamente correlacionados com o BDNF. Assim, o efeito anti-epileptogênico do BDNF tem sido atribuído ao NPY (TAKAHASHI et al., 1999; BINDER et al., 2001; REIBEL et al., 2001; REIBEL et al., 2003; KOUYAMA e IKEGAYA, 2005). Com base no resultado aqui apresentado e devido aos efeitos contrastantes dessa neurotrofina é dificultoso inferir sobre a influência do BDNF no processo epileptogênico de WARs, tornando essencial reavaliar esse gene no modelo audiogênico, tal como seu receptor, a fim de esclarecer essa questão.

A identificação de vias biológicas foi realizada utilizando os elementos do microarraqo apresentados na tabela 2 e o banco de dados DAVID/KEGG. As vias de neurotransmissão

glutamatérgica e GABAérgica foram identificadas juntamente com a via de sinalização de cálcio e apontadas como consideráveis para o modelo audiogênico. O papel das vias que utilizam glutamato e GABA como neurotransmissores é bastante retratado e praticamente inquestionável. No entanto, nenhum trabalho anterior explorou a importância de uma terceira via no processo epileptogênico do modelo *Wistar Audiogenic Rat*. Os genes *Grin1*, *Vdac1*, *Vdac2* e *Egfr*, identificados como diferencialmente transcritos no WAR, estão associados a via de sinalização de cálcio, cujo elemento principal, o íon cálcio (Ca^{2+}), é de importância geral envolvendo-se em diversos processos fisiológicos. Esse íon atua como sinalizador intracelular, participa de funções enzimáticas, proliferação celular, processos de transcrição, apoptose etc. (RESENDE et al., 2012). A sinalização de cálcio citosólico é originária da entrada de Ca^{2+} extracelular através dos canais iônicos na membrana plasmática ou a partir da liberação de Ca^{2+} intracelular pelo retículo endoplasmático (RE). O RE é um compartimento interno que armazena íons cálcio cuja liberação, induzida pelo próprio íon, é feita através de receptores específicos (RYRs e IP3Rs) enquanto a entrada de Ca^{2+} extracelular ocorre por meio de canais de cálcio voltagem-dependentes e outros canais, como o associado ao receptor NMDA, por exemplo. O rápido influxo de Ca^{2+} nos neurônios despolariza a membrana celular, e dessa forma, medeia a excitabilidade neuronal e regula outras vias biológicas sensíveis aos íons cálcio (GARGUS, 2009). Devido a essa amplitude de atuações, é pensado que desregulações nessa via tenham um impacto significativo sobre os processos fisiológicos.

A via de sinalização de cálcio tem sido reconhecida como um componente importante em várias patologias, incluindo epilepsia. A hiperexcitabilidade neuronal pode ser mediada pela sinalização de cálcio através da modulação direta da atividade neuronal ou indiretamente por meio da gliotransmissão dependente de cálcio (STEINLEIN, 2014). Acredita-se que a gliotransmissão contribui para o sincronismo neuronal excessivo que predispõe o cérebro à ocorrência de crises epilépticas. Isso através da liberação de glutamato pelos astrócitos que pode excitar diretamente neurônios vizinhos e favorecer atividades sincronizadas mediadas pela ativação de receptores NMDA extra sinápticos (FELLIN et al., 2004; ALEXEI, 2006; CARMIGNOTO e HAYDON, 2012). Os astrócitos atuam ativamente na transmissão sináptica e estão envolvidos na manutenção do equilíbrio de íons no meio extracelular o que os torna um constituinte importante no foco epileptogênico (STEINLEIN, 2014). Múltiplos trabalhos têm exposto a influência da sinalização de cálcio, principalmente por meio de células astrocíticas, nas epilepsias. Experimentos já mostraram que a atividade epiléptica induzida por pilocarpina pode elevar a sinalização de cálcio nos astrócitos (DING et al., 2007). Em modelo animal de epilepsia de lobo temporal (ELT) observou-se a suprarregulação de um gene de canal de cálcio em estrutura hipocampal, e

camundongos deficientes para o mesmo gene apresentaram um número reduzido de crises epilépticas (BECKER et al., 2008; CAIN e SNUTCH, 2012). Outros estudos relataram que mutações em genes codificantes de canais de cálcio já foram associados a alguns tipos de epilepsia (CHEN et al., 2003; HERON et al., 2004; LIANG et al., 2006; STEINLEIN, 2014). E recentemente, por meio do estudo de perfis de expressão de miRNA de ratos estimulados eletricamente, concluiu-se que o desenvolvimento da epilepsia nesses animais pode estar intimamente associado com vias de sinalização de cálcio (MENG et al., 2015).

No modelo *Wistar Audiogenic Rat* muito se discute sobre as vias de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica mas o envolvimento de uma terceira via na sua epileptogênese é pouco explorada. O achado da via de sinalização Ca^{2+} como relevante nesse modelo vem sugerir um outro campo de estudo. Nos últimos anos, a via de sinalização de cálcio tem sido discutida pela sua atuação no desenvolvimento de epilepsias, retratando que essa via merece uma atenção especial no WARs. Acredita-se que o estudo da via sinalização de Ca^{2+} , por meio dos seus receptores e outros constituintes, possa complementar e gerar novas informações científicas a respeito da susceptibilidade dos WARs a crises epilépticas audiogênicas, bem como fornecer novos alvos terapêuticos.

CONCLUSÕES

- Genes relacionados a canais iônicos são regulados na placa quadrigêmea e hipocampo de animais WARs após estimulação sonora;
- Os genes *Gria2*, *Grin1*, *Gabbr1*, *Scn2a1* e *Il18* são modulados na placa quadrigêmea de ratos audiogênicos submetidos a estimulação acústica seguida de crise, destacando-se a regulação positiva dos genes de receptores de glutamato (*Gria2* e *Grin1*);
- Os genes *Gria2*, *Gabra2*, *Gabbr1* e *Slc1a3* são modulados no hipocampo de ratos audiogênicos submetidos a estimulação acústica seguida de crise, destacando-se a hiporregulação dos genes de receptores de GABA (*Gabra2* e *Gabbr1*);
- Além das vias de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, a via de sinalização de cálcio é sugerida como relevante no processo epileptogênico na placa quadrigêmea do modelo WAR

REFERÊNCIAS

- AIRES, M.M., et al. **Fisiologia**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALEXEI, V. Glial calcium signaling in physiology and pathophysiology. **Acta Pharmacologica Sinica**, 27(7): p.773-780, 2006.
- AVOLI, M.; GLOOR, P. Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. **Exp Neurol.**, 76(1): p.196-217, 1982.
- BANERJEE, P.N.; FILIPPI, D.; HAUSER, W.A. **Epilepsy Res.**, 85(1): p.31-45, 2009.
- BANERJEE, P.N.; HAUSER, W.A. **Incidence and prevalence**. Printer: RR Donnelly, cap 5: p.45-56, 2007.
- BECKER, A.J.; PITSCH, J.; SOCHIVKO, D.; OPITZ, T.; STANLEK, M.; CHEN, C.C.; CAMPBELL, K.P. SCHOCH, S.; YAARI, Y.; BECK, H. Transcriptional Upregulation of Cav3.2 Mediates Epileptogenesis in the Pilocarpine Model of Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, 28(49): p.13341-13353, 2008.
- BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; BOAS, W.E.; ENGEL, J.JR.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, 51(4): p.676-685, 2010.
- BERG, A.T., SCHEFFER, I.E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. **Epilepsia**, 52(6): p.1058-1062, 2011.
- BINDER, D.K.; CROLL, S.D.; GALL, C.M.; SCHARFMAN, H.E. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? **Trends Neurosci.**, 24: p.47-53, 2001.
- BJORNSEN, L.P.; EID, T.; HOLMESTH, S.; DANBOLT, N.C.; SPENCER, D.D.; LANEROLLE, N.C. Changes in glial glutamate transporters in human epileptogenic hippocampus: Inadequate explanation for high extracellular glutamate during seizures. **Neurobiology of Disease**, 25: p.319–330, 2007.
- CAIN, S.M.; SNUTCH, T.P. Voltage-Gated Calcium Channels in Epilepsy. In: NOEBELS, J.L. et al. **Jasper's basic mechanisms of the epilepsies**. 4th.ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2012.
- CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P.G. Astrocyte Calcium Signaling and Epilepsy. **GLIA**, 60: p.1227-1233, 2012.
- CHARLIER, C.; SINGH, N.A.; RYAN, S.G.; LEWIS, T.B.; REUS, B.E.; LEACH, R.J.; LEPPERT, M. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. **Nature Genetics**, 18: p.53-55, 1998.
- CHEN, Y.; LU, J.; PAN, H.; ZHANG, Y.; WU, H.; XU, K.; LIU, X.; JIANG, Y.; BAO, X.; YAO, Z.; DING, K.; LO, W.L.; QIANG, B.; CHAN, P.; SHEN, Y.; WU, X. Association between

genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. **Ann. Neurol.**, 54: p.239-243, 2003.

CLAES, L.; DEL-FAVERO, J.; CEULEMANS, B.; LAGAE, L.; BROECKHOVEN, C.V.; JONGHE, P. De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. **Am. J. Hum. Genet.**, 68:p.1327-1332, 2001.

COSSETE, P.; LIU, L.; BRISEBOIS, K.; DONG, H.; LORTIE, A.; VANESSE, M.; SAINT-HILAIRE, J.M.; CARMANT, L.; VERNER, A.; LU, W.Y.; WANG, Y.T.; ROULEAU, G.A. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. **Nature genetics**, 31: p.184-189, 2002.

CRITCHLEY, M. Musicogenic epilepsy. **Brain**, 60: p.13-27, 1937.

CROLL, S.D.; SURI, C.; COMPTON, D.L.; SIMMONS, M.V.; YANCOPOULOS, G.D.; LINDSAY, R.M.; WIEGAND, S.J.; RUDGE, J.S.; SCHARFMAN, H.E. brain-derived neurotrophic factor transgenic mice Exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity And in vitro hyperexcitability in the hippocampus and Entorhinal cortex. **Neuroscience**, 93(4): p.1491-1506, 1999.

DAILEY, J.; REIGEL, C.; MISHRA, P., JOBE, P.C. Neurobiology of seizures predisposition in genetically epilepsy-prone rats. **Epilepsy Res.**, 3: p.3-17, 1989.

DERANSART, C.; LE-PHAM, B.T.; HIRSCH, E.; MARESCAUX, C.H.; DEPAULIS, A. Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizure specificity of the nigral control. **Neuroscience**, 105(1): p.203-211, 2001.

DIBBENS, L.M.; HARKIN, L.A.; RICHARDS, M.; HODGSON, B.L.; CLARKE, A.L.; PETROU, S.; SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F.; MULLEY, J.C. The role of neuronal GABAA receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. **Neuroscience Letters**, 453: p.162-165, 2009.

DING, S.; FELLIN, T.; ZHU, Y.; LEE, S.Y.; AUBERSON, Y.P.; MEANEY, D.F.; COULTER, D.A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P.G. Enhanced Astrocytic Ca² Signals Contribute to Neuronal Excitotoxicity after Status Epilepticus. **The Journal of Neuroscience**, 27(40): p.10674-10684, 2007.

DONG, C.; ZHAO, W.; LV, W.; DONG, X. Anti-epileptic effects of neuropeptide Y gene transfection into the rat brain. **Neural Regen Res.**, 8(14): p.1307-1315, 2013.

DORETTO, M.C.; FONSECA, C.G.; LOBO, R.B.; TERRA, V.C.; OLIVEIRA, J.A.; GARCIA-CAIRASCO, N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WAR). **Behav. Genet.**, 33(1): p.33-42, 2003.

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**, 50: p.2563-2574, 2009.

ENGEL, J.JR. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, 42: p.796-803, 2001.

- FAINGOLD, C.L.; MARCINCZYK, M.J.; CASEBEER, D.J.; RANDALL, M.E., ARNERIC, S.P.; BROWNING, R.A. GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. **Brain Research**, 640: p.40-47, 1994.
- FAINGOLD, C.L.; MILLAN, M.H.; ANDERSON, C.A.B.; MELDRUM, B.S. Induction of audiogenic seizures in normal and genetically epilepsy-prone rats following focal microinjection of an excitant amino acid into reticular formation and auditory nuclei. **Epilepsy Res.**, 3: p.199-205, 1989.
- FATTORE, C.; PERUCCA, E. Novel Medications for Epilepsy. **Drugs**, 71: p.2161-2178, 2011.
- FELLIN, T.; PASCUAL, O.; GOBBO, S.; POZZAN, T.; HAYDON, P.G.; CARMIGNOTO, G. Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. **Neuron**, 43: p.729-743, 2004.
- FISHER, R.S. Animal models of the epilepsies. **Brain Research Reviews**, 14: p.245-278, 1989.
- FISHER, R.S.; BOAS, W.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J.JR. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, 46(4): p.470-472, 2005.
- FUJIWARA, T.; SUGAWARA, T.; MIYAZAKI, E.M.; TAKAHASHI, Y.; FUKUSHIMA, K.; WATANABE, M.; HARA, K.; MORIKAWA, T.; YAGI, K.; YAMAKAWA, K.; INOUE, Y. Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. **Brain**, 126: p.531-546, 2003.
- GARANT, D.S.; IADAROLA, M.J.; GALE, K. Identification of substantia nigra as the midbrain site associated with GABA-mediated anticonvulsant activity. **Fed. Proc.**, 41:p.1064, 1980.
- GARCIACAIRASCO, N.; DORETTO, M.C.; LOBO, R. Genetic selection of a strain of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures. A quantitative analysis. **Epilepsia**, 31: p.815, 1990.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V.C.; DORETTO, M.C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural Brain Research**, 58: p.57-67, 1993.
- 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**, 50: p.421-427, 1991
- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M.C.; RAMALHO, M.I.; RODRIGUES, J.A.; NONAKA, K.O. Audiogenic and audiogenic-like seizures: Locus of induction and seizure severity determine post-ictal prolactin patterns. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 53: p.503-510, 1996a.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J.A.C.; GOMES, E.L.T.; DEL BEL, E.A.; MELLO, L.E.A.M. Neuroethological and morphological (Neo-Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in

- seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Res.**, 26: p.177-192, 1996b.
- GARGUS, J.J. Genetic Calcium Signaling Abnormalities in the Central Nervous System: Seizures, Migraine, and Autism. **The Year in Human and Medical Genetics**, 1151: p.133-156, 2009.
- GEDDES, J.W.; CAHAN, L.D.; COOPER, S.M.; KIM, R.C.; CHOI B.H.; WOTMAN, C.W. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. **Exp. Neurol.**, 108: p.214-20, 1990.
- GITAÍ, D.L.G.; MARTINELLI, H.N.; VALENTE, V.; PEREIRA, M.G.; OLIVEIRA, J.A.; ELIAS, C.F.; BITTENCOURT, J.C.; LEITE, J.P.; COSTANETO, C.M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PAÇÓLARSON, M.L. Increased expression of GluR2flip in the hippocampus of the Wistar audiogenic rat strain after acute and kindled seizures. **Hippocampus**, 20: p.125-133, 2010.
- GITAI, D.L.G.; ROMCY-PEREIRA, R.N.; GITAI, L.L.G.; LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PAÇO-LARSON, M.L. Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. **Rev Assoc. Med. Bras.**, 54(3): p.272-278, 2008.
- GODDARD, G.; MCINTYRE, D.; LEECH, C. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental Neurology**, 25: p. 295-330, 1969.
- GRABENSTATTER, H.L.; RUSSEK, S.J.; BROOKS-KAYAL, A.R. Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. **Epilepsia**, 53: p.71-78, 2012.
- HERLENIUS, E.; HERON. S.E.; GRINTON, B.E.; KEAY, D.; SCHEFFER, I.E.; MULLEY, J.C.; BERKOVIC, S.F. SCN2A Mutations and Benign Familial Neonatal-Infantile Seizures: The Phenotypic Spectrum. **Epilepsia**, 48(6): p.1138-1142, 2007.
- HERON, S.E.; PHILLIPS, H.A.; MULLEY, J.C.; MAZARIB, A.; NEUFELD, M.Y.; BERKOVIC, S.F.; SCHEFFER, I.E. Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. **Ann Neurol.**, 55: p.595-596, 2004.
- HERON, S.E.; SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F.; DIBBENS, L.M.; MULLEY, J.C. Channelopathies in idiopathic epilepsy. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 2007.
- HILLE, B. Ionic channels of excitable membranes. **Sinauer Associates**, 3rd ed, 1992.
- HUOH, Y.S.; FERGUSON, K.M. The pellino E3 ubiquitin ligases recognize specific phosphothreonine motifs and have distinct substrate specificities. **Biochemistry**, 53(30): p.4946-4955, 2014.
- IADAROLA, M.J.; GALE, K. Substantia nigra: site of anti-convulsant activity mediated by F-aminobutyric acid. **Science**, 218: p.1237-1240, 1982.
- IMBRICI, P.; JAFFE, S.L.; EUNSON, L.H.; DAVIES, N.P.; HERD, C.; ROBERTSON, R.; KULLMANN, D.M.; HANNA, M.G. Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. **Brain**, 127: p.2682-2692, 2004.
- JAYAPAL, M.; MELENDEZ, A.J. DNA microarray technology for target identification and validation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 33: p.496-

503, 2006.

- JEN, J.C.; WAN, J.; PALOS, T.P. Mutations in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. **Neurology**, 65: p.529-34, 2005.
- JOBÉ, P.C.; BROWN, R.D.; DAILEY, J.W. Effect of Ro 41284 on audiogenic seizure susceptibility and intensity in epilepsy-prone rats. **Life Sci.**, 28(18): p.2031-2038, 1981.
- KAMIYA, K.; KANEDA, M.; SUGAWARA, T.; MAZAKI, E.; OKAMURA, N.; MONTAL, M.; MAKITA, N.; TANAKA, M.; FUKUSHIMA, K.; FUJIWARA, T.; INOUE, Y.; YAMAKAWA, K. A Nonsense Mutation of the Sodium Channel Gene SCN2A in a Patient with Intractable Epilepsy and Mental Decline. **The Journal of Neuroscience**, 24(11): p.2690-2698, 2004.
- KILE, K.B.; TIAN, N.; DURAND, D.M. Scn2a sodium channel mutation results in hyperexcitability in the hippocampus in vitro. **Epilepsia**, 49(3): p.488-499, 2008.
- KIM, T.W.; YU, M.; ZHOU, H.; CUI, W.; WANG, J.; DICORLETO, P.; FOX, P.; XIAO, H.; LI, X. Pellino 2 Is critical for Toll-like Receptor/Interleukin-1 Receptor (TLR/IL-1R)-mediated Post-transcriptional Control. **The journal of biological chemistry**, 287(30): p.25686-25695, 2012.
- KNIPPER, M.; KOPSCHALL, L.; ROHBOCK, A.K.E.; BONK, I.; ZIMMERMANN, U.; ZENNER, H.P. Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear. **Cell Tissue Res.**, 287: p.23-41, 1997.
- KOUYAMA, R.; IKEGAYA, Y. To BDNF or Not to BDNF: That Is the Epileptic Hippocampus. **Neuroscientist**, 11(4): p.282-287, 2005.
- KRUSHINSKY, I.; MOLODKINA, I.; FLESS, D.; DOBROKHOTOVA, I.; STESHENKO, A.; SEMIOKHINA, A.; ZORINA, Z.; ROMANOVA, I. The functional state of the brain during sonic stimulation. **Physiological effects of noise**, 151, 1970.
- LEBRUN, Y.; LELEUX, C. Reflex epilepsy induced by verbal activities. **J. Neurolinguistics**, 6: p.371-379, 1991.
- LIANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; PAN, H.; WU, H.; XU, K.; LIU, X.; JIANG, Y.; SHEN, Y.; WU, X. New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. **Neurosci Lett.**, 406: p.27-32, 2006.
- LIAO, Y.; ANTONEN, A.K.; LIUKKONEN, E.; GAILY, E.; MALJEVIC, S.; SCHUBERT, S.; BELLAN-KOCH, A.; PETROU, S.; AHONEN, V.E.; LERCHE, H.; LEHESJOKI, A.E. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. **Neurology**, 75(16): p.1454-1458, 2010.
- LI, S.P.; PARK, M.S.; YOON, H.; RHEE, K.H.; BAHK, J.Y.; LEE, J.H.; PARK, J.S.; KIM, M.O. Differential Distribution of GABAB1 and GABAB2 Receptor mRNAs in the Rat Brain. **Mol. Cells**, 16(1): p. 40-47, 2003.
- LODDENKEMPER, T.; TALOS, D.M.; CLEARY, R.T.; JOSEPH, A.; FERNANDEZ, I.S.; ALEXOPOULOS, A.; KOTAGAL, P.; NAJM, I.; JENSEN, F.E. Subunit composition

of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. **Epilepsy Research**, 108: p.605-615, 2014.

LOPES-CENDES, I.; RIBEIRO, P.A.O. Aspectos Genéticos das epilepsias: uma visão atual. **Rev. med. clin. Condes**, 24(6): p.903-908, 2013.

LÖSCHER, W.; FASSBENDER, C.P.; NOLTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. **Epilepsy Res**, 8: p.79-94, 1991.

MACDONALD, R.L.; KANG, J.Q.; GALLAGHER, M.J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. **J. Physiol.**, 588: p.1861–1869, 2010.

MAGUIRE, M.J. Music and epilepsy: A critical review. **Epilepsia**, 53(6): p.947-961, 2012.

MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; KIESMANN, M.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G., WARTER, J.M. Kindling of Audiogenic Seizures in Wistar Rats: An EEG Study. **Experimental Neurology**, 97: p.160-168, 1987.

MATOS, A.H.B.; PASCOAL, V.D.B.; NASCIMENTO, D.R.; MARTINS, S.; ROCHA, C.S.; VASCONCELLOS, J.F.; CHAMMA, M.T.; MAURER-MORELLI, C.V.; MARTINS, A.S.; VALLE, A.C.; GODARD, A.L.B.; LOPES-CENDES, I. A Caracterização do Perfil de Expressão Gênica em Larga Escala em Modelos Genéticos de Epilepsia Fornece Elementos para Entender os Mecanismos Envolvidos na Epileptogênese em Roedores. **J. Epilepsy Clin Neurophysio.**, 18(2): p.50-52, 2012.

MATOS, A.H.B. **Expressão gênica em larga escala em modelos genéticos de epilepsia**, 2012. Dissertação de mestrado - Programa de pós-graduação em Fisiopatologia Médica, UNICAMP, Campinas, 2013.

MCDONALD, J.W.; GAROFALO, E.A.; HOOD, T.; SACKELLARES, J.C.; GILMAN, S.; MCKEEVER, P.E.; TRONCOSO, J.C.; JOHNSTON, M.V. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol.**, 29: p.529-41, 1991.

MCNAMARA, J.O.; SCHARFAMAN, H.E. Temporal lobe epilepsy and the BDNF receptor, TrkB. **Epilepsia**, 51: p.46, 2010.

MENG, F.; YOU, Y.; LIU, Z.; LIU, J.; DING, H.; XU, R. Neuronal calcium signaling pathways are associated with the development of epilepsy. **Molecular medicine reports**, 11: p.196-202, 2015.

MESQUITA, F.; AGUIAR, J.F.; OLIVEIRA, J.A.; GARCIA-CAIRASCO, N.; VARANDA, W.A. Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. **Brain Research Bulletin**, 65:p.177-183, 2005.

MILLAN, M.H., MELDRUM, B.S.; FAINGOLD, C.L. Induction of Audiogenic Seizure Susceptibility by Focal Infusion of Excitant Amino Acid or Bicuculline into the Inferior Colliculus of Normal Rats. **Experimental neurology**, 91:p.634-639, 1986.

MINAMI, M.; KURASHI, Y.; SATOH, M. Effects of kainic acid on messenger rna levels of il-1/3, il-6, tnfa and lif in the rat brain. **Biochemical and biophysical research communications**, 176(2): p.593-598, 1991.

- MORAES, M.F.; GALVIS-ALONSO, O.Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, 39: p.251-259, 2000.
- MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. Kindling and *status epilepticus* models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, 73: p.1-60, 2004.
- MOURA, J.C.; TIRAPELLI, D.P.C.; NEDER, L.; SAGGIORO, F.P.; SAKAMOTO, A.C.; VELASCO, T.R.; PANEPUCCI, R.A.; LEITE, J.P.; ASSIRATI JR, J.A.;COLLI, B.O.; CARLOTTI JR, C.G. Amygdala Gene Expression of NMDA and GABAA Receptors in Patients With Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Hippocampus**, 22: p.92-97, 2012.
- NORITOKU, D.K.; MECOZZI, L.B.; AIELLO, M.T.; FAINGOLD, C.L. Repetition of Audiogenic Seizures in Genetically Epilepsy-Prone Rats Induces Cortical Epileptiform Activity and Additional Seizure Behaviors. **Experimental neurology**, 115: p.317-324, 1992.
- PETERS, H.C.; KAMMER, G.; VOLZ, A.; KAUPMANN, K.; ZIEGLER, A.; BETTLER, B.; EPLEN, J.T.; SANDER, T.; RIESS, O. Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. **Neurogenetics**, 2: p.47-54, 1998.
- PITTAU, F.; TINUPER, P.; BISULLI, F.; NALDI, I.; CORTELLI, P.; BISULLI, A.; STIPA, C., CEVOLANI, D.; AGATI, R.; LEONARDI, M.; BARUZZI, A. Videopolygraphic and functional MRI study of musicogenic epilepsy. A case report and literature review. **Epilepsy Behav.**, 13: p.685-692, 2008.
- PROSSER, H.M.; GILL, C.H.; HIRST, W.D.; GRAU, E.; ROBBINS, M.; CALVER, A.; SODDIN, E.M.; FARMER, C.E.; LANNEAU, C.; GRAY, J.; SCHENCK, E.; WARMERDAM, B.S.; CLAPHAN, C.; REAVILL, C.; ROGERS, D.C.; STEAN, T.; UPTON, N.; HUMPHREYS, K.; RANDAL, A.; GEPPERT, M.; DAVIES, C.H.; PANGALOS, M.N. Epileptogenesis and Enhanced Prepulse Inhibition in GABAB1-Deficient Mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 17: p.1059-1070, 2001.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. **Neuroscience**, 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2004.
- REIBEL, S.; BENMAAMAR, R.; LE, B.T.; LARMET, Y.; KALRA, S.P.; MARESCAUX, C.; DEPAULLIS, A. Neuropeptide Y delays hippocampal kindling in the rat. **Hippocampus**, 13: p.557-560, 2003.
- REIBEL, S.; DEPAULLS, A.; LARMET, Y. BDNF and epilepsy – the bad could turn out to be good. **TRENDS in Neurosciences**, 24(6), 2001.
- REIBEL, S.; LARMET, Y.; LE, B.T.; CARNAHAN, J.; MARESCAUX, C.; DEPAULIS, A. Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. **Neuroscience**, 100: p.777-788, 2000.
- RESENDE, R.R.; GUATIMOSIM, S.; LEITE, M.F.; **Sinalização de cálcio: bioquímica e fisiologia celulares**. 1ªed., 2012.
- ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M.C.; OLIVEIRA, J.A.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. EEG wavelet analyses of the striatum substantia nigra pars reticulata superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar

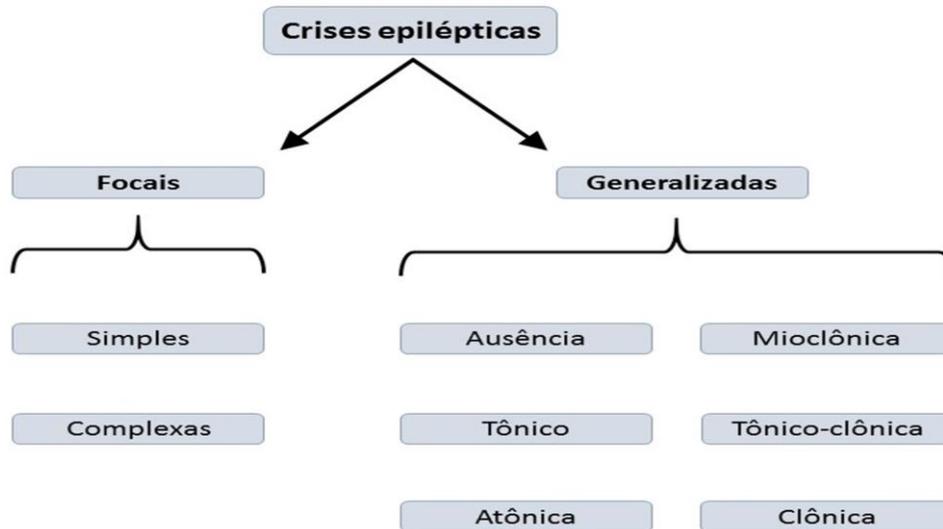
- audiogenic rats (War strain). **Epilepsy Res.** 72:192-208, 2006.
- ROSS, K.C.; COLEMAN, J.R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 24: p. 639-653, 2000.
- RYU, H.J.; KIM, J.E.; KIM, M.J.; KWON, H.J.; SUH, S.W.; SONG, H.K.; KANG, T.C. the protective effects of interleukin-18 and interferon- γ on neuronal damages in the rat hippocampus following status epilepticus. **Neuroscience**, 170: p.711-721, 2010.
- SARAC, S.; AFZAL, S.; BROHOLM, H.; MADSEN, F.F.; PLOUG, T.; LAURSEN, H. Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. **APMIS**, 117(4): p.291-301, 2009.
- SCHULER, V.; LUSCHER, C.; BLANCHET, C.; KLIX, N.; SANSIG, G.; KLEBS, K.; SCHMUTZ, M.; HEID, J.; GENTRY, C.; URBAN, L.; FOX, A.; SPOOREN, W.; JATON, A.L.; VIGOURET, J.M.; POZZA, M.; KELLY, P.H.; MOSBACHER, J.; FROEST, W.; KASLIN, E.; KORN, R.; BISCHOFF, S.; KAUPMANN, K.; PUTTEN, H.; BETTLER, B. Epilepsy, Hyperalgesia, Impaired Memory, and Loss of Pre- and Postsynaptic GABAB Responses in Mice Lacking GABAB(1). **Neuron.**, 31: p.47-58, 2001.
- SHENG, J.G.; BOOP, F.A.; MRAK, R.E.; GRIFFIN, W.S.T. Increased neuronal b-amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: association with interleukin-1a immunoreactivity. **J. Neurochem.**, 63: p.1872-1879, 1994.
- SIDDHARTH, S.; COHEN, J.; PEVSNER, J.; ARADHYA, S.; MCKNIGHT, D.; BUTLER, E.; JOHNSTON, M.; FATEMI, A. A Novel Variant in GABRB2 Associated with Intellectual Disability and Epilepsy. **American journal of medical genetics**, 2014.
- SHIMADA, T.; TAKEMIYA, T.; SUGIURA, H.; YAMAGATA, K. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. **Mediators of Inflammation**, 2014.
- SIGEL, E.; STEINMANN, M.E. Structure, Function, and Modulation of GABA A Receptors. **J. Biol. Chem.**, 287: p.40224-40231, 2012.
- SIMONI, M.G.; PEREGO, C.; RAVIZZA, T.; MONETA, D.; CONTI, M.; MARCHESI, F.; LUIGI, A.; GARATTINI, S.; VEZZANI, A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **European Journal of Neuroscience**, 12: p.2623-2633, 2000.
- SINGH, N.A.; CHARLIER, C.; STAUFFER, D.; DUPONT, B.R.; LEACH, R.J.; MELIS, R.; RONEN, G.M.; BJERRE, I.; QUATTLEBAUM, T.; MURPHY, J.V.; MCHARG, M.L.; GAGNON, D.; ROSALES, T.O.; PEIFFER, A.; ANDERSON, V.E.; LEPPERT, M. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. **Nature genetics**, 18: p.25-29, 1998.
- STEINLEIN, O.K. Calcium signaling and epilepsy. **Cell Tissue Res.**, 357: p.385-393, 2014.
- STEINLEIN, O.K.; MULLEY, J.C.; PROPPING, P.; WALLACE, R.H.; PHILLIPS, H.A.; SUTHERLAND, G.R.; SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F. a missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. **Nature Genetics**, 11: p.201-203, 1995.

- STRIANO, S.; COPPOLA, A.; DEL GAUDIO, L.; STRIANO, P. Reflex seizures and reflex epilepsies: old models for understanding mechanisms of epileptogenesis **Epilepsy Res.**, 100: p.1-11, 2012.
- TAKAHASHI, M.; HAYASHI, S.; KAKITA, A.; WAKABAYASHI, K.; FUKUDA, M.; KAMEYAMA, S.; TANAKA, R.; TAKAHASHI, H.; NAWA, H. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. **Brain Res.**, 818(2): p.579-582, 1999.
- TÉLLEZ-ZENTENO e HERNÁNDEZ-ROQUILLO. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsy Research and Treatment**, 2012.
- TERRA, V.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially inferior colliculus subnuclei. **Behavioural Brain Research**, 62: p.29-39, 1994.
- THURMAM, D.J.; BEGHI, E.; BEGLEY, C.E.; BERG, A.T.; BUCHHALTER, J.R.; DING, D.; HESDORFFER, D.C.; HAUSER, W.A.; KAZIS, L.; KOBAYASHI, R.; KRONER, B.; LABINER, D.; LIOW, K.; LOGROSCINO, G.; MEDINA, M.T.; NEWTON, C.R.; PARKO, K.; PASCHAL, A.; PREUX, P.M.; SANDER, J.W.; SELASSIE, A.; THEODORE, W.; TOMSON, T.; WIEBE, S. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, 52: p.2-26, 2011.
- TRENITÉ, D.G.A.K. Provoked and reflex seizures: Surprising or common? **Epilepsia**, 53: p.105-113, 2012.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; COIMBRA, C.; PENHA, B.M.; IKONOMIDOU-TURSKI, C.; TURSKI, L. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res.**, 434: p.281-305, 1987.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M. ROZEN, S.G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, 40(15), 2012.
- URE, J.A.; PERASSOLO, M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. **Journal of the Neurological Sciences**, 177: p.1-17, 2000.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3(7), 2002.
- VELISEK, L.; KUBOVA, H.; POHL, M.; STANKOVA, L.; MARES, P.; SCHICKEROVA, R. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 346: p.588-591, 1992.
- VERGNES, M.; KIESMANN, M.; MARESCAUX, C.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G.; WARTER. Kindling of audiogenic seizures in the rat. **Int. J. Neurosci.**, 36(3 4): p.16776, 1987.
- VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain, Behavior, and Immunity**, 22: p.797-803, 2008.

- WALLACE, R.H.; WANG, D.W.; SINGH, R.; SCHEFFER, I.E.; GEORGE, A.L.J.; PHILLIPS, H.A.; SAAR, K.; REIS, A.; JOHNSON, E.W.; SUTHERLAND, G.R.; BERKOVIC, S.F.; MULLEY, J.C. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. **Nat. Genet.**, 19: p.366-370, 1998.
- WATANABE, T.; MORIMOTO, K.; HIRAO, T.; SUWAKI, H.; WATASE, K.; TANAKA, K. Amygdala-kindled and pentylentetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. **Brain Res.**, 845, p.92-96, 1999.
- WEISER, H.G. Seizure induction in reflex seizures and reflex epilepsy. **Adv. Neurol.**, 75: p.69-85, 1998.
- WHO. **Epilepsy**. Fact sheet N°999, 2012 Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>. Acesso em: 20 de nov., 2014
- XI, BO.; CHEN, J.; YANG, L.; WANG, W.; FU, M.; WANG, C. GABBR1 gene polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, 96, p.58-63, 2011.
- XU, H.; OU, F.; WANG, P.; NAREN, M.; TU, D.; ZHENG, R. High dosage of agmatine alleviates pentylentetrazole-induced chronic seizures in rats possibly by exerting an anticonvulsive effect. **Experimental and therapeutic medicine**, 8: p.73-78, 2014.
- YU, K.Y.; KWON, H.J.; NORMAN, D.A.M.; VIG, E.; GOEBL, M.G.; HARRINGTON, M.A. Cutting Edge: Mouse Pellino-2 Modulates IL-1 and Lipopolysaccharide Signaling. **J. Immunol.**, 169: p.4075-4078, 2002.
- ZIFKIN, B.G.; INOUE, Y. Visual reflex seizures induced by complex stimuli. **Epilepsia**, 45: p.27-29, 2004.

ANEXOS

1.



Crises focais ou parciais:

- Simplex: Episódio epiléptico sem perda da consciência.
- Complexa: Episódio epiléptico com perda da consciência.

Obs: A distinção de crises focais em simples e complexa está entrando em desuso devido a imprecisa definição baseada na consciência ou perda da consciência.

Crises generalizadas:

- Ausência: Breve episódio de lapso da consciência.
- Mioclônica: Breves e súbitas contrações musculares, semelhantes a choques.
- Clônica: Contrações musculares seguidas de relaxamentos de forma repetitiva e rítmica (mioclonia rítmica).
- Tônica: Contração súbita dos músculos mantida por segundos ou mais tempo.
- Tônico-clônica: Combinação de episódios das convulsões tônicas e convulsões clônicas. Contração tônica simétrica e bilateral seguida de contração clônica dos quatro membros.
- Atônica: Perda ou diminuição do tonus muscular (perda do controle muscular).

Engel, 2001; Blume et al., 2001; Berg e Scheffer, 2011.

2.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 251/2012**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo da expressão gênica em larga escala e análise funcional utilizando a tecnologia da interferência por RNA (RNAi) em um modelo de epilepsia*", que tem como responsável(is) **Ana Lúcia Brunialti Godard**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **26/09/2012**.

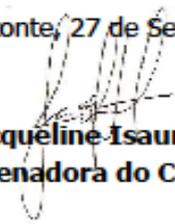
Este certificado expira-se em **26/09/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 251/2012**, related to the project entitled "*Study of large-scale gene expression and functional analysis using the technology of RNA interference (RNAi) in a model of epilepsy in rats*", under the supervisors of **Ana Lúcia Brunialti Godard**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **September 26, 2012**.

This certificate expires in **September 26, 2017**.

Belo Horizonte, 27 de Setembro de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)