

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THALITA EWELLYN BATISTA SALES MARQUES

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE
EXPRESSÃO GÊNICA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA DO
LOBO TEMPORAL MESIAL**

Maceió
2013

THALITA EWELLYN BATISTA SALES MARQUES

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE
EXPRESSÃO GÊNICA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA DO
LOBO TEMPORAL MESIAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai

Maceió
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M357i Marques, Thalita Ewellyn Batista Sales.
Identificação de genes de referência para estudos de expressão gênica em modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal mesial / Thalita Ewellyn Batista Sales Marques. – 2013.
85 f. : il.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 71-81.
Anexos: f. 82-85.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Genes de referência. 3. Técnica RT-qPCR.
I. Título.



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Thalita Ewellyn Batista Sales Marques, intitulada: “Identificação de genes de referência para estudos de expressão gênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal”, orientada pelo Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 28 de agosto de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

Aprovada

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Terezinha da Rocha Ataíde - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Marília Gabriella Alves Goulart Pereira – (USP)

DEDICATÓRIA

A Deus.

Ao meu anjo da guarda.

*Aos meus pais amados, Arnon e
Emília e aos meus tios Davy e
Cacilda por serem exemplos de
dedicação e respeito ao que fazem.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais a meu lado, que fizeram do laboratório uma extensão da minha casa!

Ao Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí pela orientação sempre presente. Obrigada por contribuir diariamente para a minha formação acadêmica. Seu amor e respeito pela ciência me inspiram.

Ao prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade pela contribuição para minha formação e pelas discussões estimulantes.

Ao prof. Dr. Renato dos Santos Rodarte pelos conselhos e incentivo.

À Leila Rodrigues por ter dado início a este projeto, sua contribuição foi primordial para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICBS (UFAL), especialmente Evelin, Mykaela, João Pedro, Jordana e Carmem, por toda disposição e pelos dias e noites dedicados ao meu trabalho e ao cuidado com os animais. Obrigada a todos por transformarem todos os dias difíceis em café, artigos e sorrisos.

Aos amigos João Born e Delma pelo apoio, incentivo e diversão!

Às fofas, Bruna, Maísa, Isabelle, Thayana e Heloisa, por serem mais que companheiras de laboratório, são irmãs que a ciência me deu.

Aos amigos Aline e Diego, meus companheiros de vida acadêmica, iniciação científica e mestrado. Agradeço também à Laís e aos demais amigos do LABMEG.

Aos professores e alunos do Laboratório de Biologia Celular (LBC), em especial a mestrande Laís Agra.

Ao professor Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva do Laboratório de DNA Forense da UFAL.

Aos professores Dra. Maria Luisa Paçó-Larson (Laboratório de Estrutura, Regulação e Função Gênica em Eucariotos – FMRP/USP) e Dr. Norberto García-Cairasco (Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental – FMRP/USP) pela contribuição científica e por colaborarem para a realização de parte dos experimentos em seus laboratórios.

Aos funcionários do ICBS – UFAL, da direção à limpeza, minha gratidão.

Às instituições FAPESP, FAPEAL, e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, avós, tios e primos, obrigada por serem minha maior inspiração, por fazerem de cada conquista minha um grande evento. A vocês meu eterno amor e gratidão.

Às minhas irmãs, Camila e Dalila, por todo amor, palavras de incentivo e por sempre se orgulharem de mim. Eu amo vocês.

Ao meu namorado, Igor, pela paciência e companhia nas várias horas de estudo. Obrigada por me fazer enxergar o lado divertido da vida. Te amo!

À minha prima Kélvia por me acolher de coração e braços abertos em sua vida e casa.

Aos meus amigos (minhas joias) por torcerem pelo meu sucesso e por entenderem os meus “Não posso”. Obrigada pelo apoio e amizade incondicional.

*Quem me dera
um mapa do tesouro
que me leve a um velho baú
cheios de mapas do tesouro*

Paulo Leminski

RESUMO

Sabe-se que em experimentos de expressão diferencial, utilizando a técnica de RT-qPCR, os genes de referência devem ser adequadamente validados para assegurar que a expressão do gene não seja afetada pela condição experimental. Foram investigados oito potenciais genes de referência em dois diferentes modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM): pilocarpina intraperitoneal e intra-hipocampal. Foi realizada a análise de expressão de estabilidade usando os softwares *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*. Em seguida, como uma estratégia de validação, foi realizada a análise da expressão relativa do gene *Gfap*. No modelo de pilocarpina intraperitoneal os resultados indicam que os genes *Actb*, *Gapdh*, *Rplp1*, *Tubb2a* e *Polr1a* possuem níveis de expressão estáveis no hipocampo de ratos de todos os grupos experimentais e controle, enquanto *Gusb* mostrou-se o gene mais instável. De fato, foi observado que, quando se utiliza *Gusb* como gene normalizador, os níveis relativos de RNAm do gene *Gfap* diferem daqueles obtidos quando se normaliza com os genes estáveis. Por outro lado, no modelo de pilocarpina intra-hipocampal, todos os softwares indicaram *Gusb* como um gene estável, enquanto que *B2m* foi indicado como o gene mais instável. Os resultados obtidos para os outros genes de referência foram compatíveis aos observados no modelo de pilocarpina intraperitoneal. Quanto à validação destes dados, através da análise da expressão relativa de *Gfap*, foi detectado o aumento da expressão deste gene no hipocampo de ratos eutanasiados 24 horas após o *status epilepticus* (SE); esta alteração não foi detectada apenas quando *B2m* foi utilizado como normalizador. Estes achados sugerem que um gene que é estável em um modelo de patologia pode não ser estável em diferentes condições experimentais relacionadas com a mesma patologia e, portanto, a escolha dos genes de referência deve depender da metodologia do estudo e a escolha aleatória de genes de referência sem essas avaliações prévias devem ser evitadas. Neste trabalho, também foi investigado se o gene *B2m* sofre uma modulação em sua expressão durante a epileptogênese (24h). Para isto, foi avaliado o perfil de expressão de *B2m*, utilizando *Actb* como gene de referência. Observamos que o gene *B2m* sofre uma modulação em sua expressão na fase aguda da epileptogênese (24h). Até onde sabemos, esta foi a primeira vez que se relata uma modulação na expressão de *B2m* no processo epileptogênico. Outro aspecto do trabalho, diz respeito à realização de revisão sistemática da literatura com o objetivo de identificar genes que vêm sendo estudados através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT. Este levantamento é importante para avaliar a consistência dos dados de expressão gênica que estão sendo gerados nos estudos com modelos de epilepsia do lobo temporal (ELT).

Palavras-chave: Epilepsia do lobo temporal. Genes de referência. RT-qPCR

ABSTRACT

It is well recognized that the reference gene in a RT-qPCR should be properly validated to ensure that gene expression is unaffected by the experimental condition. We investigated eight potential reference genes in two different pilocarpine PILO-models of mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) performing a stability expression analysis using geNorm, NormFinder and BestKeeper softwares. Then, as a validation strategy, we conducted a relative expression analysis of the *Gfap* gene. Our results indicate that in the systemic PILO-model *Actb*, *Gapdh*, *Rplp1*, *Tubb2a* and *Polr1a* mRNAs were highly stable in hippocampus of rats from all experimental and control groups, whereas *Gusb* revealed to be the most variable one. In fact, we observed that using *Gusb* for normalization, the relative mRNA levels of the *Gfap* gene differed from those obtained with stable genes. On the contrary, in the intrahippocampal PILO-model, all softwares included *Gusb* as a stable gene, whereas *B2m* was indicated as the worst candidate gene. The results obtained for the other reference genes were comparable to those observed for the systemic PILO-model. The validation of these data by the analysis of the relative expression of *Gfap* showed that the upregulation of the *Gfap* gene in the hippocampus of rats sacrificed 24 hours after status epilepticus (*SE*) was undetected only when *B2m* was used as the normalizer. Moreover we observed the *B2m* undergoes a modulation in their expression in acute epileptogenesis (24h). To our knowledge, this was the first time that reports a modulation in the expression of *B2m* in the epileptogenic process. These findings emphasize that a gene that is stable in one pathology model may not be stable in a different experimental condition related to the same pathology and therefore, the choice of reference genes depends on study design. We also did a systematic review of genes that have been investigated for differential gene expression in experimental models of temporal lobe epilepsy. This survey is important for assessing the consistency of gene expression data being generated in studies with models of temporal lobe epilepsy (TLE).

Keywords: Temporal lobe epilepsy. Reference genes. RT-qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo dos circuitos do hipocampo.....	20
Figura 2 -	Delineamento experimental utilizado nesse estudo para a identificação e validação de genes de referência para análises de expressão gênica em modelo de ELT.....	29
Figura 3 -	Perfis eletroforéticos de amostras de RNA total representativas das demais, em gel de agarose 1% desnaturante.....	36
Figura 4 -	Genes utilizados como referência na literatura dos últimos 7 anos..	37
Figura 5 -	Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems).....	42
Figura 6 -	Níveis de expressão dos genes de referência selecionados para o estudo. Os valores das médias de Ct (<i>threshold cycle</i>) obtidos do RT-qPCR.....	47
Figura 7 -	Seleção dos genes de referência mais adequados para a normalização em modelo de PILO-sistêmica, usando o software geNorm.....	48
Figura 8 -	Classificação dos putativos genes de referência com base em valores de estabilidade calculadas através dos programas <i>NormFinder</i> (A) e <i>BestKeeper</i> (B) em modelo de PIL-sistêmica.....	50
Figura 9 -	Quantificação da expressão relativa de <i>Gfap</i> no hipocampo de ratos injetados PILO-sistêmica.....	51
Figura 10 -	Seleção dos genes de referência mais adequados para a normalização em modelo de PILO intra-hipocampal, usando o software <i>geNorm</i>	53
Figura 11 -	Classificação dos putativos genes de referência com base em valores de estabilidade calculadas através dos programas <i>NormFinder</i> (A) e <i>BestKeeper</i> (B) em modelo de PILO intra-hipocampal.....	54-55
Figura 12 -	Quantificação da expressão relativa de <i>Gfap</i> no hipocampo de ratos injetados PILO intra-hipocampal.....	56
Figura 13 -	Quantificação da expressão relativa de <i>B2m</i> no hipocampo de ratos injetados PILO-intraperitoneal.....	57
Figura 14 -	Genes que foram estudados nos últimos 7 anos através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).....	32
Quadro 2 - Informações e perfil geral de expressão dos genes estudados em três ou mais artigos.....	59-63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental 0h.....	34
Tabela 2 -	Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental 24h.....	34
Tabela 3 -	Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental crônico.....	35
Tabela 4 -	Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo controle-naive.....	35
Tabela 5 -	Genes, número de acesso no NCBI, sequência dos <i>primers</i> desenhados e tamanho dos fragmentos amplificados pelos <i>primers</i> utilizados no estudo.....	38
Tabela 6 -	Concentração dos <i>primers</i> utilizadas nas reações de qRT-PCR.....	40
Tabela 7 -	Eficiência de amplificação das reações de qRT-PCR referentes aos genes analisados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb: beta-actina

B2m: beta-2-microglobulina

Bdnf: fator neurotrófico derivado do cérebro

BDNF: *Brain-derived Neurotrophic Factor*

e.p.m.: erro padrão da média

EH: esclerose hipocampal

ELT: epilepsia do lobo temporal

ELTM: epilepsia do lobo temporal mesial

ELTN: epilepsia do lobo temporal neocortical

FADD: *Fas-associated via death domain*

GAL: *Galenin*

Gapdh: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Gfap: proteína glial fibrilar ácida

Gusb: beta-glucuronidase

Hprt1: hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase

Il1b: interleucina 1-beta

Kcnma1: canal de potássio cálcio-ativado, subfamília M, membro alfa 1

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico

Nos2: óxido nítrico sintase-2

NPY: *Neuropeptide Y*

Polr1a: RNA polimerase I murino

Ppia: peptidil-prolil-isomerase A (Ciclofilina A)

Ptgs2: prostaglandina-endoperóxido sintase 2

PTZ: pentilenotetrazol

Rn18s: RNA ribossomal 18S

Rplp1: proteína ribossomal, grande, P1

RT-PCR: *Reverse-Transcription* PCR

RT-qPCR: *Quantitative Reverse-Transcription* PCR

SE: *status epilepticus*

SS: *Somatostatin*

Syp: sinaptofisina

Tnf: fator de necrose tumoral alfa

TRH: *thyroid receptor hormone*

Tubb2a: beta-tubulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Epilepsia do Lobo Temporal	18
2.1.1	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.....	18
2.2	Modelo experimental	20
2.2.1	Modelo de ELT induzida por pilocarpina	20
2.3	Expressão gênica e ELTM-EH	23
2.4	Genes de referência e Epilepsia do Lobo Temporal	26
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Delineamento experimental	29
4.2	Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle	30
4.2.1	Animais.....	30
4.2.2	Grupos experimentais	30
4.2.2.1	Grupo PILO intraperitoneal	30
4.2.2.2	Grupo PILO intra-hipocampal.....	31
4.2.3	Indução e avaliação comportamental do <i>status epilepticus</i> induzido através de injeção intraperitoneal de pilocarpina	31
4.2.4	Avaliação das crises espontâneas e recorrentes.....	32
4.2.5	Dissecção das estruturas do Sistema Nervoso Central	32
4.2.6	Extração de RNA total de hipocampo de rato	33
4.2.7	Quantificação das amostras de RNA total	33
4.2.8	Gel desnaturante de agarose 1%	35
4.3	Seleção dos genes de referência	36

4.4	Desenho dos <i>primers</i> para os genes selecionados.....	37
4.5	Experimentos de RT-qPCR	39
4.5.1	Síntese de DNA complementar (cDNA)	39
4.5.2	Reação de amplificação	39
4.5.3	Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação	40
4.6	Análise da estabilidade de expressão dos genes utilizando os programas	
	<i>NormFinder</i>, <i>geNorm</i> e <i>BestKeeper</i>	43
4.6.1	<i>geNorm</i>	43
4.6.2	<i>NormFinder</i>	43
4.6.3	<i>BestKeeper</i>	44
4.7	Análises da expressão relativa de <i>Gfap</i> e <i>B2m</i>	44
4.8	Análises estatísticas	44
4.9	Revisão sistemática dos genes estudados na literatura através de expressão	
	diferencial durante o processo epileptogênico	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Identificação de genes de referência para análise de expressão gênica em modelo	
	de pilocarpina intraperitoneal	46
5.1.1	Níveis relativos de expressão dos potenciais genes de referência durante a	
	epileptogênese.	46
5.2	Estabilidade de expressão	47
5.2.1	<i>GeNorm</i>	47
5.2.2	<i>NormFinder</i>	49
5.2.3	<i>Bestkeeper</i>	49
5.3	Validação dos genes de referência	51
5.4	Identificação de genes de referência para análise de expressão gênica em modelo	
	animal de pilocarpina intra-hipocampal	52

5.4.1	<i>GeNorm</i>	52
5.4.2	<i>NormFinder</i>	53
5.4.3	<i>BestKeeper</i>	54
5.5	Validação dos genes de referência para o modelo experimental de pilocarpina via intra-hipocampal	55
5.6	Avaliação da expressão relativa de <i>B2m</i> na epileptogênese	56
5.7	Levantamento de genes que vem sendo estudados através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT	57
6	DISCUSSÃO	64
6.1	Seleção de genes de referência para estudos de expressão diferencial em modelos de Epilepsia do Lobo Temporal	64
6.1.1	Seleção de genes de referência no modelo PILO intraperitoneal	64
6.1.2	Seleção de genes de referência no modelo PILO intra-hipocampal.....	66
6.1.3	Perfil de expressão de <i>B2m</i>	66
6.2	Revisão sistemática de genes que apresentam a expressão modulada no processo epileptogênico	67
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A	81
	ANEXO A	82
	ANEXO B	85

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por crises espontâneas e recorrentes. Essas crises refletem atividade elétrica anormal e paroxística acometendo uma ou várias áreas do sistema nervoso central e que pode ser causada por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (CHANG e LOWENSTEIN, 2003). Em decorrência de fatores como gravidade, alta prevalência, morbidade e impacto econômico-social, estudos em epilepsia têm adquirido caráter prioritário nas políticas de saúde pública, sobretudo nos países da África e América Latina (LI, L. M. e SANDER, 2003; SZOEKE et al., 2006). Uma frente de estudo no campo da epileptologia que obteve grandes avanços nos últimos anos busca investigar vias moleculares associadas ao processo epileptogênico, através de análises de expressão gênica diferencial (GITAI et al., 2008; ROMCY-PEREIRA et al., 2008). Neste caso, uma metodologia bastante utilizada para quantificação de transcritos é o *Quantitative Reverse-Transcription* PCR (RT-qPCR). Entretanto, dada a alta sensibilidade do RT-qPCR, é necessária a utilização de genes de referência, que normalizem pequenas variações referentes à quantidade e qualidade do RNA inicial e à eficiência da síntese de cDNA (VALENTE et al., 2009). Tais genes, portanto, devem apresentar um perfil de expressão estável em todas as condições experimentais analisadas.

O impacto do uso de um gene de referência com expressão instável pode levar a resultados imprecisos e conclusões errôneas. Apesar disso, os estudos de expressão gênica diferencial em geral, e particularmente nas epilepsias têm utilizado genes de referência sem uma validação prévia do seu perfil de expressão nas condições experimentais. Sendo assim, neste trabalho foram identificados e validados genes de referência para análise de expressão gênica diferencial nos modelos de ELT baseados na administração intraperitoneal (i.p) e intra-hipocampal (i.h) de pilocarpina. Para isso, avaliamos a expressão de oito potenciais genes de referência comumente utilizados em estudos de expressão diferencial (*Actb*, *Rplp1*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *Ppia*, *B2m* e *Polr1a*). Através de RT-qPCR, obteve-se o perfil dos seus transcritos no hipocampo de animais eutanasiados imediatamente após o *status epilepticus* (SE), 24 horas após o SE e fase crônica, e do grupo controle. Em seguida, foi avaliada a estabilidade de expressão desses genes através dos programas *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*.

Como estratégia de validação, foi avaliado o impacto do uso de diferentes genes de referência na expressão relativa do gene *Gfap* (*Glial fibrillary acidic protein*) cujo perfil de expressão na epileptogênese é bem conhecido. Através desses estudos identificamos um

painel de genes que são adequados para a normalização de dados de expressão. Além do mais, nossos achados mostraram que há uma modulação na expressão do gene *B2m* durante a fase aguda da epileptogênese dos dois modelos de ELT estudados. Outro aspecto do trabalho diz respeito à realização de revisão sistemática da literatura com o objetivo de identificar genes que vêm sendo estudados através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT. Este levantamento é importante para avaliar a consistência dos dados de expressão gênica que estão sendo gerados nos estudos com modelos de ELT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia do Lobo Temporal

Epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia focal em adolescentes e adultos (ENGEL, 2001; GASTAUT et al., 1975). Segundo a ILAE (*International League Against Epilepsy*), ELT é classificada como uma condição epiléptica caracterizada pela presença de crises parciais simples ou complexas, podendo estar associadas a generalizações secundárias. Durante crises parciais simples, há preservação da consciência e os pacientes costumam apresentar manifestações psíquica, gustativa, olfativa e sintomas autonômicos. Em crises parciais complexas, a consciência é prejudicada e, normalmente, os indivíduos apresentam olhar imóvel, acompanhado de automatismos de forma estereotipada, repetitiva e movimentos involuntários (WIEBE et al., 2001). A ELT foi subdividida quanto à semiologia e origem das crises em epilepsia mesial e lateral (ou neocortical). A maioria das crises do lobo temporal originam-se nas estruturas mesiais e em menor escala em regiões neocorticais. Manifestações ictais comuns em epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) são significativamente menos frequentes em epilepsia do lobo temporal neocortical (ELTN) (BERCOVICI et al., 2012). De acordo com a ILAE (1989), ELTN é caracterizada por crises simples, alucinações auditivas, ilusões visuais e transtorno de linguagem, podendo evoluir para crises parciais complexas se houver a propagação para estruturas temporais mesiais ou extratemporais.

2.1.1 Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

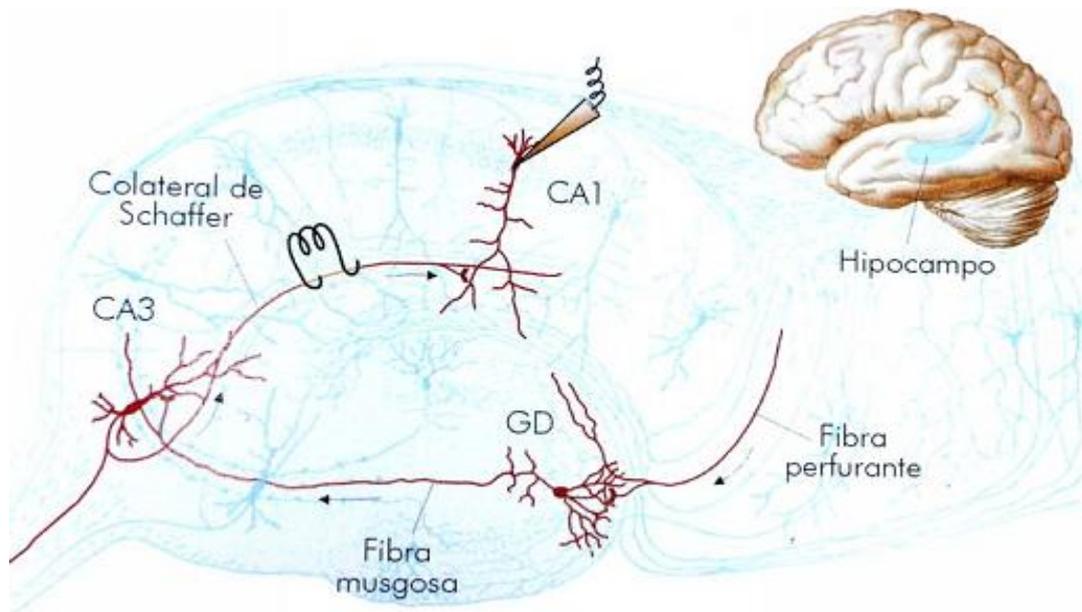
Aproximadamente 60% dos casos de ELT correspondem à ELTM, sendo a forma mais comum associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH) (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; FRENCH et al., 1993). Entretanto, outros tipos de lesões estruturais, tais como tumores, displasias corticais, hamartomas e malformações vasculares, também são encontrados em pacientes com ELTM (AL SUFIANI e ANG, 2012). De acordo com o Relatório da ILAE, a esclerose hipocampal é caracterizada histologicamente pela perda neuronal e gliose, principalmente nas células do setor Sommer (CA1 e *prosubiculum*) e dos neurônios da região hilar do hipocampo. A perda neuronal é menos proeminente nas áreas de CA2, *subiculum* e GD (BABB et al., 1984). Outros processos biológicos e neuroplásticos também foram descritos no hipocampo de pacientes com ELTM-EH, tais como: a) reorganização axonal, caracterizada

pelo brotamento de fibras musgosas na região da camada molecular interna, b) dispersão de células granulares no giro denteado e neurogênese (WIESER e HANE, 2004). Embora a epilepsia seja considerada historicamente uma patologia que acomete a matéria cinzenta cerebral, estudos demonstraram que estruturas da matéria branca, principalmente fibras mielinizadas, são afetadas em pacientes com epilepsia, mesmo em locais distantes da zona epileptogênica primária (GROSS et al., 2006; NILSSON et al., 2008; SCHOENE-BAKE et al., 2009). O hipocampo, assim, é uma estrutura crítica no processo epileptogênico. Essa região do sistema límbico é composta por duas áreas principais: o corno de Ammon, subdividido em 3 campos numerados de 1 a 3 e abreviados de CA1, CA2 e CA3 (as regiões CA1 e CA3 estão mostradas na figura 1) e o giro denteado (GD) (Fig. 1).

A esclerose hipocampal está presente em 50-70% dos pacientes fármaco-resistentes (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006), para este grupo, a cirurgia de ressecção é uma opção terapêutica. O foco epileptogênico no lobo temporal pode ser identificado através de uma cuidadosa avaliação pré-operatória, com base nas características clínicas e eletrofisiológicas e exames de neuroimagem. Em 60-80% dos casos, as crises cessam após lobectomia temporal (OLBRICH et al., 2002). Nos achados patológicos destes espécimes ressecados podem ser observados esclerose hipocampal (EH), lesões causadas por malformação, tumores, lesões isquêmicas, traumas e lesões inflamatórias (HAUSER e MOHR, 2011).

Um dos grandes desafios da epileptologia é esclarecer quais mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos no processo de epileptogênese. Neste sentido, avanços no conhecimento têm sido feitos utilizando animais como modelos experimentais, gerando uma grande quantidade de informações que possibilitam uma melhor compreensão sobre o processo epileptogênico.

Figura 1 - Esquema representativo dos circuitos do hipocampo.



Fonte: Lent, 2004

2.2 Modelo experimental

A capacidade de reproduzir doenças humanas em modelos animais é uma vantagem da medicina experimental (CURIA et al., 2008). Nesse aspecto, várias abordagens vêm sendo desenvolvidas para estudos de epilepsia (PITKANEN, 2006; PURPURA e SHOFER, 1972; SCHWARTZKROIN et al., 1983). Os modelos experimentais de roedores podem ser agrupados em três categorias: a) abrasamento, através de estímulos elétricos, químicos ou sensoriais de estruturas límbicas (e.g hipocampo e amígdala), b) crises agudas, pela estimulação elétrica ou sensorial direta, injeção local ou sistêmica de convulsivantes químicos (e.g. PTZ) e lesões eletrolíticas e c) crises crônicas ou epilepsia, que são baseadas na indução de SE, principalmente através da injeção de convulsivantes químicos (e.g. ácido caínico e pilocarpina) (ELLIOTT e LOWENSTEIN, 2004).

2.2.1 Modelo de ELT induzida por pilocarpina

Este modelo é baseado na administração local ou sistêmica de um potente agonista muscarínico, a pilocarpina (LEITE, J. P. et al., 1990; TURSKI et al., 1983). Segundo Hamilton et al. (1997), a capacidade da pilocarpina para induzir SE provavelmente depende da ativação do subtipo de receptor muscarínico M1, pois em camundongos *knockout* do receptor *M1*, não desenvolvem convulsões em resposta à pilocarpina. Experimentos em cultura de neurônios do hipocampo demonstram que a pilocarpina, agindo através de receptores muscarínicos, provoca um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, resultando na geração de SE (PRIEL e ALBUQUERQUE, 2002). Evidências sugerem que, após o início das crises pela ativação dos receptores M1, as crises são mantidas pela ativação do receptor de NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) (NAGAO et al., 1996; SMOLDERS et al., 1997).

A indução de crises por pilocarpina caracteriza-se pela ocorrência de um evento convulsivo inicial levando ao SE, que apresenta crises do tipo tônico-clônicas, seguido de um período sem crises, conhecido como período de latência e, por fim, há emergência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes, que indicam a fase crônica (CAVALHEIRO et al., 1991).

Assim, neste modelo, o processo epileptogênico correlaciona-se estreitamente com as principais características da ELT, são elas: a) a localização do foco das crises no sistema límbico, especialmente no hipocampo, córtex entorrinal e amígdala (BARTOLOMEI et al., 2005), b) a presença de uma “injúria precipitante”, o SE, que precede o aparecimento da ELT (MATHERN et al., 2002), c) um intervalo de tempo sem crises caracterizado histologicamente pela alta incidência de esclerose hipocampal, perda neuronal, gliose e rearranjos axonais (MATHERN et al., 1997) e, d) as crises recorrentes e espontâneas.

- *Status Epilepticus*

O dano cerebral induzido pelo SE nos animais pode ser considerado equivalente à injúria precipitante no paciente (MATHERN et al., 1996). Do ponto de vista comportamental, em estudo realizado por Turski et al. (1983), cinco a dez minutos após a injeção de pilocarpina os animais se mantiveram imóveis e este comportamento foi seguido de salivação, movimentos oro-mandibulares e das vibrissas, piscar de olhos e bocejo, permanecendo nessa atividade por 45min. Crises epiléticas descontínuas começaram após 30 minutos da administração de pilocarpina e duraram de 90 à 150 minutos, agravando-se para convulsões límbicas motoras, com salivação intensa, clonia das patas superiores, seguida de queda. Após a injeção de pilocarpina, cerca de 60% dos ratos desenvolveram SE (CAVALHEIRO et al.,

1991). A taxa de mortalidade após a injeção de pilocarpina varia de 30-40% em ratos *Wistar* machos tratados com 300-400 mg / kg de pilocarpina (CAVALHEIRO et al., 1991; TURSKI et al., 1983). No âmbito histológico, alguns minutos depois do SE, ocorre um dano inicial caracterizado por um processo apoptótico ou necrótico, que é mais intenso nas camadas superficiais de algumas áreas neocorticais, na região hilar do hipocampo, núcleo endopiriforme, córtex piriforme e claustro (CAVALHEIRO, 1995; LEITE, J. P. et al., 1990; TURSKI et al., 1983).

- Período de latência

O período de latência varia de acordo com o tempo que o animal permaneceu em SE e precede a fase crônica (LEITE, J. et al., 2002). Através de vídeo monitoramento, ratos *Wistar* machos adultos (300-320 mg/kg PILO i.p) apresentaram um período de latência médio de 14 dias (ARIDA et al., 1999; CAVALHEIRO et al., 1991; CAVALHEIRO et al., 1996; LEMOS e CAVALHEIRO, 1996). Na fase aguda do período de latência, até 24 horas após o insulto, há liberação de neurotransmissores, particularmente glutamato, seguida de ativação de canais iônicos, influxo de cálcio e aumento de modificações pós-traducionais, como fosforilação proteica. Em muitos casos, ocorre ainda injúria excitotóxica acompanhada de morte celular (JACOBS et al., 2009). Os danos cerebrais não se restringem às primeiras horas e dias após SE e tende a se expandir progressivamente a outras áreas do cérebro nos meses seguintes. (SCORZA e ARIDA, 2009). Durante o período de latência, ocorre aumento de transcrição gênica, desencadeando respostas inflamatórias, gliais e vasculares, super-expressão de fatores de crescimento e morte de células neuronais (JACOBS et al., 2009). Na fase tardia deste período também ocorrem eventos de remodelamento, como redirecionamento axonal, sinaptogênese, neurogênese, gliose, angiogênese, reorganização nos circuitos cerebrais e aumento da predisposição à atividade sincrônica (JACOBS et al., 2009).

Por outro lado, é interessante notar que alguns autores questionam a existência do tempo de latência. Em um estudo baseado em gravações de vídeo-EEG contínuo, o período de latência médio foi de cerca de 7 dias após o SE com 2h de duração (GOFFIN et al., 2007). As variações no período de latência encontradas por alguns autores podem ser explicadas através da abordagem farmacológica para abortar o SE. Em estudos realizados por Lemos e Cavalheiro (1995), Goffin et al. (2007) e Biagini et al. (2006), os animais que desenvolveram

crises epilépticas e recorrentes mais rapidamente foram tratados apenas com diazepam (20 mg / kg, i.p.).

- Período crônico

Essa fase é caracterizada pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes. Do ponto de vista comportamental, crises recorrentes e espontâneas em ratos tratados com pilocarpina após o período latente, foram recentemente reclassificadas por (VELISKOVA e MOSHE, 2006), de acordo com os seguintes critérios: 1. Olhar fixo e clônia de boca; 2. Automatismos; 3. Clônias monolaterais de membros posteriores; 4. Clônias de bilaterais de membros posteriores; 5. Clônias bilaterais de membros superiores com elevação e queda e 6. Crise tônico-clônicas. Ratos *Wistar* machos adultos (300-320 mg/kg PILO i.p), apresentaram uma frequência de 2,8 crises por semana (ARIDA et al., 1999; CAVALHEIRO et al., 1991; CAVALHEIRO et al., 1996; LEMOS e CAVALHEIRO, 1996). As crises espontâneas podem começar com crises parciais, agravando-se para crises generalizadas nos dias seguintes (GOFFIN et al., 2007). Em um estudo realizado por Arida et al. (1999), os animais foram mantidos num ciclo de 12h claro/escuro e a frequência das crises foi maior durante o período diurno (07h00 – 19h00).

A epileptogênese, portanto, envolve uma combinação de alterações nas propriedades neuronais, aumento da transmissão excitatória ou redução da transmissão inibitória e aumento na conectividade interneural (JACOBS et al., 2009). Tais alterações levam a uma predisposição anormal do cérebro à atividade hipersincrônica e, assim, ao desencadeamento de crises epilépticas espontâneas. Com o objetivo de investigar as vias moleculares associadas à epileptogênese, muito grupos de pesquisa vêm realizando estudos de expressão gênica diferencial ao longo do processo epileptogênico.

2.3 Expressão gênica e ELTM-EH

Dentre os importantes estudos das últimas décadas no campo da epileptologia, destaca-se a identificação de genes associados à epilepsia do lobo temporal associada à esclerose hipocampal. Através desses estudos, foi possível saber que o processo epileptogênico está associado a diferentes vias moleculares subjacentes a muitos processos

biológicos, tais como transmissão sináptica, inflamação, plasticidade neuronal, morte celular e reorganização da expressão gênica.

Transmissão sináptica: foram observadas alterações na expressão de genes envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, principais mediadores excitatórios e inibitórios do sistema nervoso central, respectivamente (AKIYAMA et al., 1992; KRAUS e MCNAMARA, 1998; MATHERN et al., 1998; MIKUNI et al., 2000). Em um estudo realizado por Eid et al. (2013), enzimas que participam do metabolismo de glutamato, glutamina sintetase e glutaminase ativada pelo fosfato, apresentam níveis aumentados de mRNA em algumas regiões do hipocampo de indivíduos com ELT e ELTM-EH. Outra classe de genes estudados são os neuropeptídios, dentre eles está o neuropeptídio pró-convulsivantes CRH, que apresenta níveis aumentados de transcritos em regiões límbicas, como no hipocampo e amígdala (BARAM e HATALSKI, 1998; WANG, W. et al., 2001). Alguns neuropeptídios anticonvulsivantes já estudados são, GAL (*Galenin*), TRH (*thyroid receptor hormone*), NPY (*Neuropeptide Y*), SS (*Somatostatin*). A análise conjunta desses dados revela que genes com atividade facilitadora de vias excitatórias apresentam níveis de transcritos aumentados no hipocampo epiléptico, e este resultado é compatível com uma situação pró-convulsivante. Por outro lado, em relação aos genes envolvidos nas vias inibitórias, é interessante notar que, a exemplo de GABA, também pode apresentar uma expressão aumentada, o que pode estar relacionado a mecanismos compensatórios da hiperexcitabilidade neuronal (ESCLAPEZ e HOUSER, 1999).

Plasticidade neuronal: Quanto à neurotrofinas, pesquisadores notaram que estas proteínas que favorecem a sobrevivência dos neurônios e estão envolvidas nos processos de sinaptogênese e potenciação de sinapses centrais sofre modulação durante o processo epileptogênico. Dentre elas destacam-se a NGF, BDNF, NT-4, NT-3 e seus respectivos receptores TrkA, TrkB e TrkC (BENZON et al., 1993; GALL, C. et al., 1991; GALL, C. M. e ISACKSON, 1989; ISACKSON et al., 1991). Segundo Bengzon et al. (1993) os receptores TrkB e TrkC do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) apresentaram níveis aumentados de mRNA em regiões do hipocampo. Os resultados indicam que a ativação do gene do BDNF, pelo menos em células de grânulos dentados, está relacionada à duração, mas não da gravidade ou nível das crises.

Morte neuronal: muitos estudos têm sido voltados para expressão diferencial de genes envolvidos com os mecanismos de morte celular (ROMCY-PEREIRA et al., 2008). Sabe-se que genes que participam diretamente do processo apoptótico apresentam a expressão alterada no hipocampo epiléptico, tais como caspase 2 e 8, e FADD (HENSHALL et al., 2001), caspases

efetoras (caspase 3 e 6), família das proteínas bcl-2 pró-apoptóticas (bax, bcl-x, bim, bid) e anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-xI, bcl-w) (HENSHALL e SIMON, 2005). No hipocampo epiléptico, os genes pró-apoptóticos geralmente são mais expressos nas regiões CA1 e CA3, enquanto os genes anti-apoptóticos são mais expressos nas células granulares do giro denteado (BECKER et al., 2002). Esses dados estão em conformidade com o padrão histológico de morte celular que ocorre no hipocampo de pacientes e animais com epilepsia.

Astroglíose: em resposta aos danos causados ao sistema nervoso central, os astrócitos entram em um processo de estado reativo conhecido como gliose, que é caracterizada por alterações morfológicas (hipertrofia), alterações funcionais, e por um aumento acentuado da expressão de *Gfap* (SIMPSON et al., 2010). Em um estudo realizado por Becker et al. (2002) foi observada uma super-expressão de *Gfap* em astrócitos reativo. Segundo Morimoto et al. (2004), associado ao processo de astroglíose que acompanha insultos epileptogênicos, foi observado um aumento de *Gfap*, no hilo do giro denteado, uma semana e um mês após o abrasamento elétrico.

Sistema imune e inflamação: um grupo de genes associados com as funções imunitárias e inflamatórias apresentou expressão aumentada. Dentre eles estão algumas quimiocinas e seus receptores (CCL2, CCL3, CCL4, CXCR4) e citocinas e seus receptores (FGF1, FGF2, FGF13, TNFSF7) (LEE et al., 2007). Basicamente, a expressão de FGF é aumentada no hipocampo algumas horas após o início das crises, alcançando níveis até seis vezes maior no grupo epiléptico comparado com o controle, no giro denteado e em outras áreas do hipocampo e córtex, esse aumento ocorre entre 6 -24 h (BUGRA et al., 1994; FOLLESA et al., 1994; GOMEZ-PINILLA et al., 1995; HUMPEL et al., 1993A; HUMPEL et al., 1993B). O aumento do nível desses mediadores inflamatórios pode influenciar na excitabilidade neuronal e na resposta do cérebro às crises (DE SIMONI e IMERI, 1998). Quanto às citocinas anti-inflamatórias, em um estudo realizado por Kan et al. (2012) foi detectado um aumento na expressão de IL-10 e IL-25 em pacientes com ELTM associada à esclerose hipocampal em comparação com ELTM sem esclerose hipocampal e controles.

Reorganização da expressão gênica: em alguns estudos foram avaliados os perfis de expressão hipocampal de fatores de transcrição, como do proto-oncogene c-fos, que possui expressão aumentada durante uma hora após a indução das crises. Outro fator de transcrição com expressão hipocampal alterada nas epilepsias é a proteína CREB, que é caracterizada por se ligar a sítios CRE localizados na região promotora de muitos genes (KASHIHARA et al., 2000; MORGAN et al., 1987). Esses achados mostram que durante o processo epileptogênico podem ocorrer alterações moleculares envolvidas na regulação da expressão de uma variedade

de genes, conhecidos com genes-alvo. Além do mais, estudos recentes em modelo animal mostram que os miRNAs podem contribuir para a epileptogênese (ARONICA et al., 2010; HU et al., 2011; SONG et al., 2011). Através de estudos de expressão diferencial em larga-escala seguido de uma validação individual, Hu et al. (2011) identificaram quatro miRNAs (microRNA-34a, microRNA-22, microRNA-125a, microRNA-21) que apresentavam a expressão alterada no hipocampo de animais submetidos a SE, em modelo de lítio-pilocarpina.

Assim, pode-se observar que estudos de expressão gênica diferencial têm contribuído para o entendimento dos mecanismos moleculares associados ao estabelecimento e consequências das crises epiléticas.

2.4 Genes de referência e Epilepsia do Lobo Temporal

Análise da expressão gênica é uma abordagem comum para a investigação das vias moleculares associadas a processos biológicos em condições normais e de doença (MAURER-MORELLI, C. et al., 2012). Métodos para a quantificação da expressão gênica tem tido um papel cada vez mais crescente nesses estudos. Tais métodos podem ser baseados em análise individual da expressão de determinados genes ou na análise de expressão de vários genes simultaneamente. Existem análises de expressão gênica em larga escala, como hibridação em microarranjos (*microarray*) e análise serial de expressão gênica (*Serial Analysis of Gene Expression* - SAGE), ou os métodos podem se basear em análises individuais, como *Nothern Blotting* e RT-qPCR.

A metodologia RT-qPCR se tornou amplamente utilizada em estudos de expressão gênica diferencial (BUSTIN et al., 2005). Entretanto, dada a alta sensibilidade desse método, faz-se necessário um processo de normalização preciso. Dentre as abordagens disponíveis para normalização, uma das mais aplicadas baseia-se no uso de genes de referência. Para isto, é importante uma seleção cuidadosa e estridente de genes cujo nível de expressão possa ser utilizado para corrigir pequenas variações referentes à quantidade e qualidade do RNA inicial e à eficiência da síntese de cDNA (VALENTE et al., 2009). Tais genes (denominados de genes de referência ou *housekeeping genes*) devem ser expressos de forma estável, nos mesmos níveis, nas diferentes condições experimentais, tecidos ou patologias investigadas (WIERSCHKE et al., 2010).

Genes relacionados com processos básicos e estruturais da célula (Beta-actina, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, subunidades ribossomais, beta-tubulina, e outros) têm

sido utilizados diretamente como normalizadores em ensaios quantitativos. No entanto, evidências na literatura sugerem que a expressão destes tipos de genes pode variar de acordo com os tipos de células e as condições experimentais (CORDOBA et al., 2011; SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000; THELLIN et al., 1999). O uso de um controle interno não adequado no processo de normalização pode levar a resultados não confiáveis. Portanto, é importante validar os genes de referência para uma interpretação correta de dados de expressão gênica. Assim, é surpreendente que a maioria dos estudos de expressão gênica diferencial na área da epileptologia utiliza genes de referência sem uma prévia validação dos protocolos.

Só recentemente, alguns estudos têm apresentado a importância da caracterização e identificação de genes endógenos adequados para análises de RT-qPCR em estudos de epilepsia (CHEN, J. et al., 2001; MAURER-MORELLI, C. V. et al., 2012; PERNOT et al., 2010; WIERSCHKE et al., 2010). O presente estudo destina-se a investigar o perfil de expressão de alguns genes de referência na epileptogênese, utilizando o modelo animal de ELT induzido por pilocarpina via sistêmica e intra-hipocampal.

3 OBJETIVOS

Geral

Contribuir para os estudos de expressão gênica diferencial em modelos de epilepsia do lobo temporal.

Específicos

Obter e avaliar o perfil de expressão dos genes de referência selecionados, através de RT-qPCR, em modelos de ELT induzido por pilocarpina;

Avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência utilizando os programas geNorm, NormFinder e BestKeeper;

Avaliar a expressão relativa de *Gfap* em diferentes fases da epileptogênese, utilizando os genes investigados neste trabalho como normalizadores endógenos;

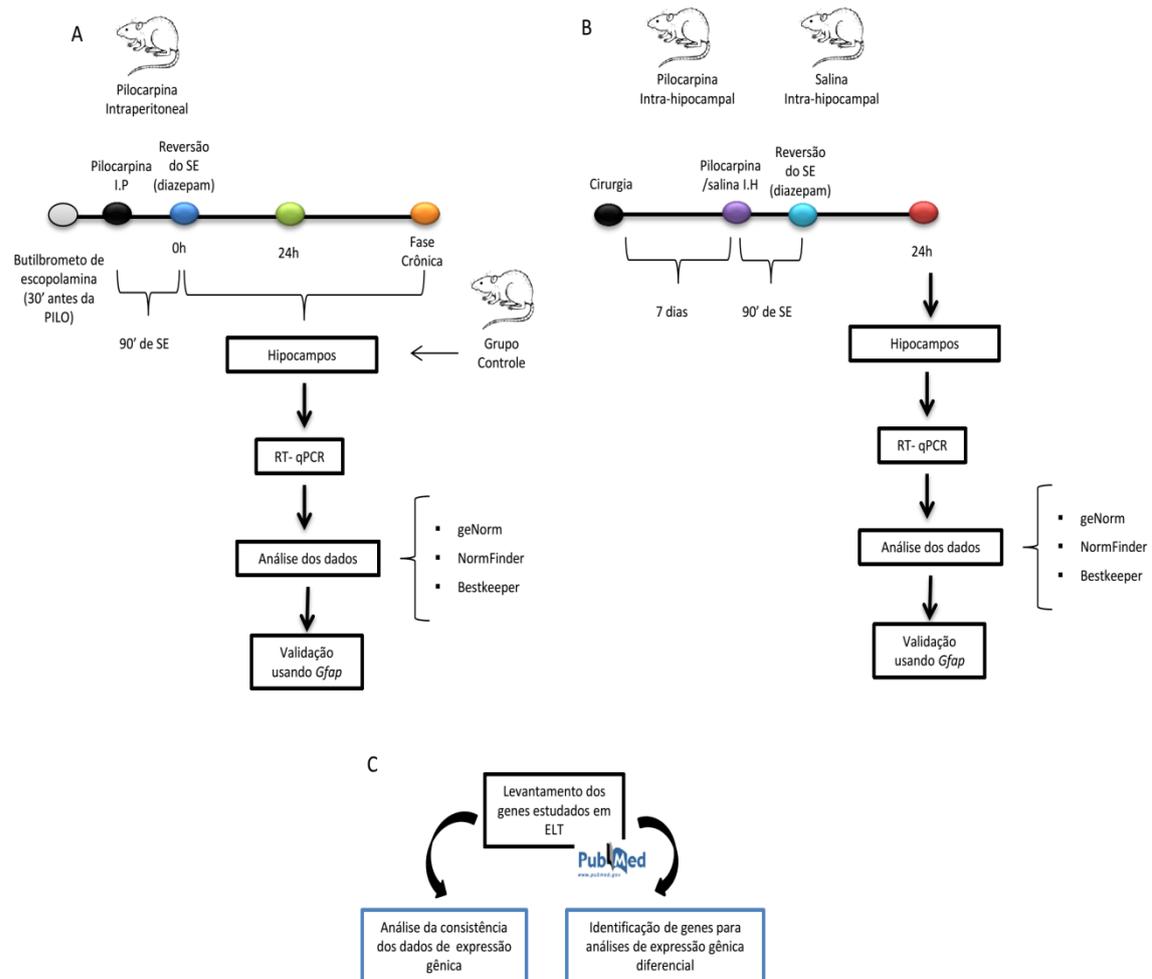
Avaliar a expressão relativa de *B2m* durante a epileptogênese;

Identificar, a partir de revisão sistemática da literatura, genes que vem sendo estudados através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Figura 2 - Delineamento experimental utilizado nesse estudo.



Identificação e validação de genes de referência para análises de expressão gênica em modelo de ELT (A/B) e (C) para o levantamento de genes que vem sendo estudados na literatura através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT.

Fonte: Autora, 2013.

4.2 Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle

4.2.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando 48 ratos *Wistar*, sendo que o estabelecimento dos grupos foi realizado da seguinte maneira: 37 animais (grupo PILO intraperitoneal, n=31 e controles, n=6) foram utilizados para experimentos realizados na Universidade Federal de Alagoas e 11 animais para os experimentos na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais machos de 90-100 dias, pesando entre 200 e 250g, foram mantidos a 22°C, em grupos de quatro animais por gaiola, submetidos a ciclo claro-escuro 12h/12h (as luzes eram acesas às 8h), com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, processo: 011462/2010-83 (Apêndice A) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações normativas para experimentação animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais utilizados nos experimentos.

4.2.2 Grupos experimentais

Neste estudo, foram utilizados grupos experimentais baseados no modelo de SE induzidos por pilocarpina intra-hipocampal e intraperitoneal.

4.2.2.1 Grupo PILO intraperitoneal

Foram utilizados 23 animais provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas. Foram estabelecidos 3 grupos experimentais e 1 grupo controle: a) o grupo PILO-i.p é composto por animais eutanasiados imediatamente após o SE (G-0hora, n = 6); b) animais submetidos ao SE e eutanasiados 24 horas após o SE (G-24horas, n = 6); c) animais submetidos ao SE e eutanasiados após a detecção de crises espontâneas (G-CR, n = 5) e d) Grupo naive: animais não-manipulados (G-Naive, n = 6). Os grupos foram estabelecidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas.

4.2.2.2 Grupo PILO intra-hipocampal

Foram utilizados 11 animais provenientes do biotério da FMRP-USP. Foram estabelecidos os seguintes grupos: A) Grupo experimental: constituído de animais submetidos à injeção intra-hipocampal de pilocarpina (G-24h i.h, n=5) e B) grupo controle (G-controle, n=6) constituído de animais que foram injetados com salina (0.9%; 1µl) em substituição a pilocarpina. Esses grupos foram estabelecidos no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental, da FMRP-USP. A metodologia utilizada está descrita no anexo A.

4.2.3 Indução e avaliação comportamental do *status epilepticus* induzido através de injeção intraperitoneal de pilocarpina

Para indução do SE, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de Pilocarpina (320mg/kg) 30 minutos após a administração de butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p).

Logo após a administração de pilocarpina, os animais foram monitorados durante 60 minutos, utilizando-se uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). Para a caracterização do início do SE, o critério utilizado foi a ocorrência de crises contínuas que se sustentassem durante o tempo mínimo de cinco minutos após a injeção de Pilocarpina (LOWENSTEIN e ALLDREDGE, 1998; SHORVON, 1994). Esse período foi dividido em 12 períodos de cinco minutos para a avaliação das alterações comportamentais. As crises epiléticas de cada animal foram classificadas de acordo com a escala de crises límbicas estabelecida por Racine (1972) e representada no quadro 1.

Quadro 1- Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).

0 – Imobilidade
1 - Automatismos faciais
2 - Mioclonias de cabeça
3 - Clonias uni ou bilaterais das patas anteriores
4 - Clonias das patas anteriores com elevação sobre as patas posteriores
5 - Elevação das patas anteriores e queda atônica com crises clônicas generalizadas

Fonte: Racine, 1972.

Para a reversão do SE, os animais foram tratados com diazepam (15-30mg/kg) via intraperitoneal após um período de 90 minutos, para alguns animais foram necessárias doses adicionais de diazepam, com intervalos de 1h, para que o quadro de crises epiléticas fosse cessado. Até três dias após o SE, quando necessário, foi realizada a reposição hidroeletrólítica e nutritiva através da injeção intraperitoneal de soro fisiológico a 0,9% e soro glicosado a 5%.

4.2.4 Avaliação das crises espontâneas e recorrentes

A partir do terceiro dia após o SE, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico e o seu comportamento foi monitorado e gravado, em média 6 horas por dia, utilizando uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). A fase crônica foi caracterizada pela presença de pelo menos duas crises epiléticas espontâneas com gravidade maior ou igual a 3, de acordo com a escala de Racine (1972).

4.2.5 Dissecção das estruturas do Sistema Nervoso Central

Os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico (mantidos na câmara até queda e perda motora total) e decapitados para remoção do cérebro. Os hipocampus foram imediatamente dissecados sobre superfície fria e rapidamente congelados em nitrogênio líquido (-180°C). Os tecidos foram mantidos a -80°C até a etapa de processamento.

4.2.6 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações.

Os hipocampos esquerdos dos ratos foram transferidos do *freezer* a -80°C para nitrogênio líquido. A cada tubo contendo um hipocampo, foram adicionados 350 μL de Trizol, à temperatura ambiente, e os conteúdos foram homogeneizados com pistilos para tubos. Em seguida, foram adicionados 140 μL de clorofórmio (proporção de 200 μL de clorofórmio para 1mL de Trizol) e os conteúdos foram homogeneizados por inversão e mantidos à temperatura ambiente por cerca de 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas (Heal Force® - High speed refrigerated bench) a 12000g durante 15 minutos a 4°C . A fase aquosa dos tubos (fase contendo RNA) foi transferida para tubos novos. O restante do conteúdo, interfase e fase orgânica, foi armazenado em freezer a -80°C . Aos tubos contendo as fases aquosas, foram adicionados 175 μL de isopropanol (proporção de 500 μL de isopropanol para cada 1mL de Trizol). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 12000g por 30 minutos a 4°C . Após essa etapa, o *pellet* de RNA foi visualizado. O isopropanol foi então removido cuidadosamente por inversão dos tubos e foi adicionado 1mL de etanol 75% para lavagem dos *pellets*, que foram deslocados com auxílio do vórtex. Os conteúdos foram novamente centrifugados a 12000g por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então desprezado, preservando o *pellet*. Os *pellets* foram, em seguida, novamente lavados com 1mL de etanol 75% e centrifugados a 12000g por 5 minutos a 4°C . Após esse processo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram mantidos invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* foram ressuspensos em 30 μL de água milliQ tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e durante 40 minutos em gelo para completa dissolução dos *pellets*. Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em *freezer* a -80°C . Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC.

4.2.7 Quantificação das amostras de RNA total

A concentração e a pureza dos RNAs foram avaliadas através de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza desses RNAs

foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e a 280nm.

As tabelas 1, 2, 3, e 4 apresentam a quantidade total de RNA obtido e a razão OD_{260}/OD_{280} das amostras purificadas. Pode-se observar que a concentração dos RNAs purificados variou entre $1,227\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $3,616\mu\text{g}/\mu\text{l}$, com média de $2,07\pm 0,44\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (média \pm D.P.). Observa-se também que a média dos valores obtidos pela razão OD_{260}/OD_{280} foi de $1,74\pm 0,05$, com valores mínimo e máximo de 1,66 e 1,88, respectivamente. Esses dados demonstram que essas amostras se apresentam adequadas para utilização nas análises por RT-qPCR.

Tabela 1 - Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental 0h.

Amostras	Razão OD_{260} / OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	1,72	2,312	69,36
2	1,66	2,42	72,6
3	1,71	2,384	71,52
4	1,74	2,152	64,56
5	1,82	1,844	55,32

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 2 - Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental 24h.

Amostra	Razão OD_{260} / OD_{280}	Quantificação de RNA OD_{260} ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	Quantidade total de RNA na amostra (μg)
1	1,88	2,399	71,97
2	1,80	1,429	42,87
3	1,81	2,042	61,26
4	1,83	2,004	60,12
5	1,78	1,227	36,81

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 3 - Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo experimental crônico.

Amostra	Razão OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	Quantificação de RNA OD ₂₆₀ (µg / µL)	Quantidade total de RNA na amostra (µg)
1	1,78	1,416	42,48
2	1,78	3,616	108,48
3	1,7	2,928	87,84
4	1,66	2,304	69,12
5	1,66	2,944	88,32

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 4 - Concentração e quantidade total de RNA extraído de hipocampos esquerdos dos animais do grupo controle-naive.

Amostras	Razão OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	Quantificação de RNA OD ₂₆₀ (µg / µL)	Quantidade total de RNA na amostra (µg)
1	1,71	1,744	52,32
2	1,74	1,888	56,64
3	1,72	2,216	66,48
4	1,72	2,336	70,08
5	1,67	1,392	41,76
6	1,69	1,6	48

Fonte: Autora, 2013.

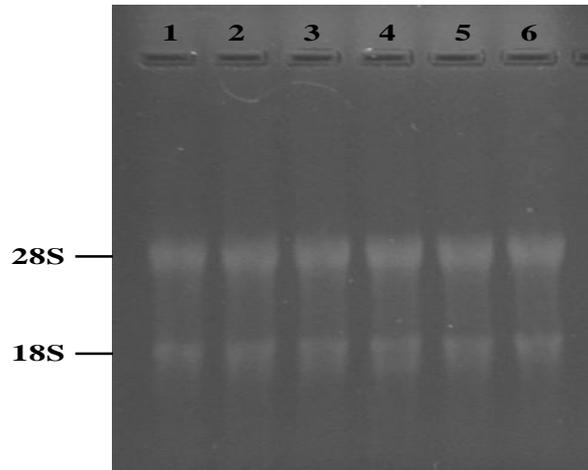
4.2.8 Gel desnaturante de agarose 1%

A integridade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1%, contendo 17,6 mL de formaldeído (6,5%) e 10 mL (1x) de MOPS 10X (0.2M MOPS, 50mM acetato de sódio, 5mM EDTA). Para tampão de corrida, foram preparados 500 mL do tampão MOPS 1x (50mL de MOPS e 450mL de água tratada com DEPC). A solução de aplicação foi preparada utilizando tampão MOPS 1x, formaldeído a 6,5%, formamida deionizada a 50%, 1µg de brometo de etídio, azul de bromofenol 1x e 3 µL de amostra de RNA (entre 3-7µg de RNA). Após a corrida, o gel era visualizado em transiluminador de luz UV (360nm) e fotografado através sistema digital de captura de imagem Vilber Lourmat (ECX•20.M, Vilber Lourmat, France).

A integridade do RNA foi avaliada a partir de uma análise qualitativa das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. A figura 3 mostra os perfis eletroforéticos de amostras de RNA total, representativas das demais. Pode-se observar que foram obtidos

RNAs que não apresentam degradação evidente e que se encontram, portanto, adequados para utilização nas análises por qRT-PCR.

Figura 2 - Perfis eletroforéticos de amostras de RNA total representativas das demais, em gel de agarose 1% desnaturante.



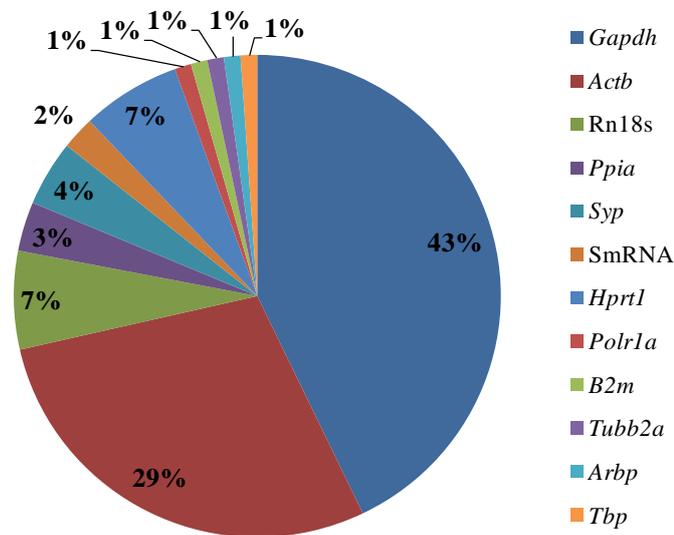
Raias 1-6 – amostras referentes ao grupo controle 0h; 28S – subunidade 28S do RNA ribossomal; 18S – subunidade 18S do RNA ribossomal.
Fonte: Autora, 2013.

4.3. Seleção dos genes de referência

Foi feito um levantamento dos genes de referência que têm sido utilizados em estudos de expressão gênica diferencial em modelos experimentais de ELT. Esse levantamento foi feito a partir da literatura armazenada no banco de dados PubMed, disponível na plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Para essa análise, foram estabelecidos os seguintes critérios: a) publicações disponibilizadas entre janeiro de 2005 e dezembro de 2011, b) dados gerados através de RT-qPCR ou RT-PCR semiquantitativa, e c) dados obtidos a partir dos modelos induzidos por pilocarpina ou por cainato.

Nesta revisão sistemática, foram consultados 81 artigos, nos quais identificamos 12 genes diferentes que foram utilizados como normalizador endógeno (Figura 4). Desses genes, os mais utilizados foram, respectivamente, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*Gapdh*; 43%), Beta-actina (*Actb*; 29%) e RNA ribossomal 18S (*Rn18s*; 7%).

Figura 4 – Genes utilizados como referência na literatura dos últimos 7 anos.



Gapdh – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *Actb* – beta-actina; *Rn18s* – RNA ribossomal 18S; *Ppia* – Peptidil-prolil-isomerase A (Ciclofilina A); *Syp* – sinaptofisina; *SmRNA* – RNA mensageiro sintético; *Hprt1* – hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase; *Polr1a* – RNA polimerase I murino; *B2m* – Beta-2-microglobulina; *Tubb2a* – beta-tubulina; *Arpb* – fosfoproteína ribossomal ácida P0; *Tbp* – proteína ligadora de TATA box.

Fonte: Autora, 2013

Com base nesses dados, foram selecionados os seguintes genes para este estudo: *Hprt1*, *Polr1a*, *Rn18s*, *Syp*, *Gapdh*, *Actb*, *Ppia*, *Tubb2a* e *B2m*. Além desses, foram incluídos nas análises, os genes da beta-glucuronidase (*Gusb*) e da proteína ribossomal, grande, P1 (*Rplp1*), que são tradicionalmente utilizados como genes de referência em experimentos de RT-qPCR.

4.4 Desenho dos *primers* para os genes selecionados

O desenho de *primers* foi realizado com o auxílio do programa *Oligo Explorer 1.4* (Gene Link, NY, USA), a partir das sequências de RNAm disponibilizadas no banco de dados (NCBI). Os *primers* foram desenhados em éxons diferentes para possibilitar a discriminação de produtos de amplificação de DNA genômico. A tabela 5 apresenta as sequências dos *primers* desenhados, os números de acesso no NCBI e os tamanhos dos amplicons para os genes de referência selecionados e para o gene *Gfap*, utilizado no processo de validação dos dados.

Tabela 5 - Genes, número de acesso no NCBI, sequência dos *primers* desenhados e tamanho dos fragmentos amplificados pelos *primers* utilizados no estudo.

Gene	Símbolo*	Número de acesso (NCBI)	Sequência dos <i>primers</i> 5'-3'	Amplicon (pb)
Beta-tubulina	<i>Tubb2a</i>	NM_001109119.1	F - TTGTGTTTCGGTCAGAGTGGT R - GACTCCTTCCTCACCACATC	103
Beta-2-Microglobulina	<i>B2m</i>	NM_012512.1	F- ATCTTTCTGGTGCTTGTCTCT R - TGAGGTGGGTGGAAGTGA	140
Beta-actina	<i>Actb</i>	NM_031144.2	F - AGCCTTCCTTCCTGGGTATG R - GAGGTCTTTACGGATGTCAAC	92
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Gapdh</i>	NM_017008.3	F - TCCCATTCTTCCACCTTTGATGCT R - ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTCAT	104
Beta-glucuronidase	<i>Gusb</i>	NM_017015.2	F - CCGTGGAACAGGGAATGAG R - CTCAGGTGTTGTCATCGTCA	121
Peptidil-prolil-isomerase A (Ciclofilina A)	<i>Ppia</i>	NM_017101.1	F- AGCACTGGGGAGAAAGGATT R- GATGCCAGGACCTGTATGCT	174
RNA polimerase I murinho	<i>Polr1a</i>	NM_031772.1	F - CAGGAGAAGTGCCTGAGACC R - TCCTCCTCTCTCCGATTCCT	188
Proteína ribossomal, grande, P1	<i>Rplp1</i>	NM_001007604.1	F - GCATCTACTCCGCCCTCA R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT	58
Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase	<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	F – AGGCCAGACTTTGTTGGATT R – GCTTTTCCACTTTCGCTGAT	119
Sinaptofisina	<i>Syp</i>	NM_012664.2	F – CCACGGACCCAGAGAACATT R – TCAGGAAGCCAAACACCACT	123
RNA ribossomal 18S	Rn18s	NR_046237.1	F – GATCCATTGGAGGGCAAGTCT R – CCAAGATCCAACACTACGAGCTTTTTT	103
Proteína glial fibrilar ácida	<i>Gfap</i>	NM_017009.2	F - AACCGCATCACCATTCTGT R - CATCTCCACCGTCTTTACCAC	123

Fonte: Autora, 2013.

4.5 Experimentos de RT-qPCR

4.5.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase. Aos volumes das amostras correspondentes a 3µg de RNA total, foram adicionados tampão de DNase 1x (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de *RNaseOUT*TM (Invitrogen). As reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Foi, então, adicionado EDTA 5 mM e as reações foram incubadas a 75°C por 10 minutos. Após o tratamento, todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *High Capacity*[®] *kit* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados na reação 2µL RT Buffer (10x), 0,8µL de dNTP mix 25x (100Mm), 2µL de RT Random *Primers* (10x) e 1µL de MultiScribeTM Reverse Transcriptase (50U/µL). A quantidade inicial de RNA utilizada foi de 1µg. As reações foram incubadas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Após a síntese, foram adicionados 180µL de água milliQ tratada com DEPC. Todas as amostras foram divididas em quatro alíquotas e armazenadas a -80°C.

4.5.2 Reação de amplificação

A obtenção dos perfis de expressão foi realizada através da metodologia RT-qPCR. As reações foram realizadas utilizando o equipamento *StepOnePlus*TM *Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicatas e consistiram em 2,5 µL de cada amostra de cDNA, 6 µL de *SYBR*[®] *Green PCR Master Mix* (Invitrogen), 3 µL de cada *primer* a uma concentração final específica (tabela 6) e 0,5 µL de água, em volume final de 12 µL. As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada uma etapa de dissociação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, para geração da curva de dissociação. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação – ciclo *threshold* (C_T) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlus*TM (Applied Biosystems).

Tabela 6 - Concentração dos primers utilizadas nas reações de RT-qPCR.

Gene	Concentração final na reação (µM)
<i>Actb</i>	0,2
<i>Ppia</i>	0,6
<i>Polr1a</i>	0,4
<i>Tubb2a</i>	0,4
<i>Gapdh</i>	0,4
<i>Gusb</i>	0,4
<i>B2m</i>	0,4
<i>Rplp1</i>	0,2
<i>Hprt1</i>	0,4
<i>Syp</i>	0,4
<i>Gfap</i>	0,2

Fonte: Autora, 2013.

4.5.3 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação

Para determinação da eficiência de amplificação, foram geradas as curvas-padrão baseadas em cinco pontos de diluições (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320). Para isso, utilizou-se o valor de C_T obtido em cada diluição *versus* o log das respectivas diluições. A partir da correlação entre esses dois fatores, as eficiências de amplificação (E) foram determinadas através da fórmula:

$$E = [10^{(-1/slope)} - 1] \times 100,$$

em que *slope* é a inclinação da reta obtida.

A validação da eficiência de amplificação em experimentos de RT-qPCR é essencial, pois os cálculos realizados para obtenção dos níveis de expressão relativa através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) partem do pressuposto de que as reações apresentam eficiência de amplificação dentro do intervalo de 90-110%. A tabela 7 apresenta as eficiências de amplificação para cada gene. Pode-se observar que as reações referentes aos genes *Polr1a*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *β2m*, *Actb*, *Ppia*, *Rplp1* e *Gfap* apresentaram eficiência dentro do intervalo de 90-110%. Para Sinaptofisina e *Hprt1*, a eficiência de amplificação foi menor que 90% e, portanto, esses genes foram excluídos das análises de RT-qPCR.

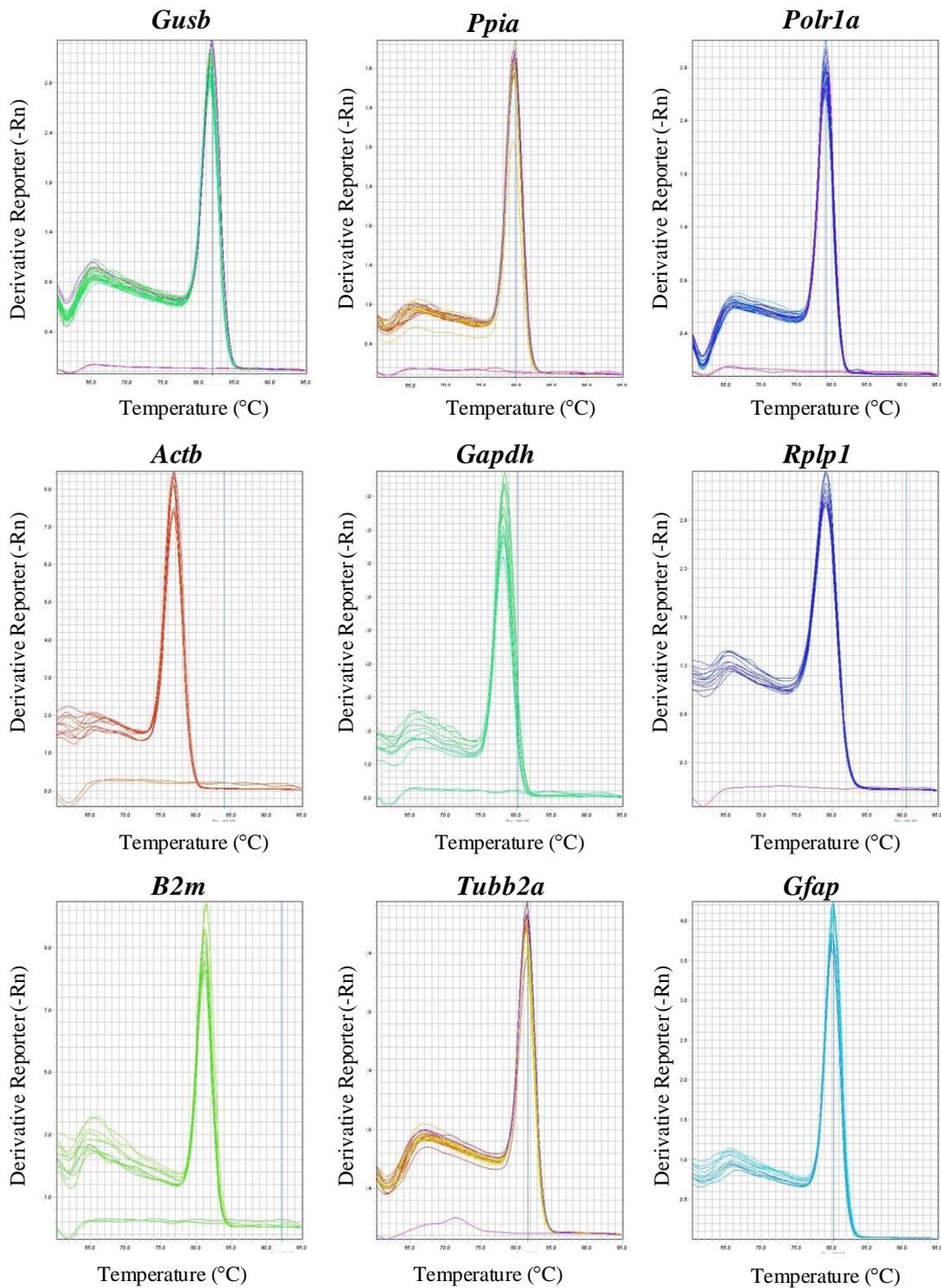
Para verificar a especificidade de amplificação das reações e formação de dímeros, foi realizada a curva de dissociação. A figura 5 apresenta as curvas de dissociação dos genes que apresentaram eficiência de amplificação entre 90-110%. Podemos observar a presença de apenas um pico nas curvas, o que revela ausência de amplificações inespecíficas ou de formação de dímeros de *primers*.

Tabela 7 - Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR referentes aos genes analisados.

Gene	Eficiência (%)
<i>Actb</i>	96,61
<i>Ppia</i>	100,07
<i>Polr1a</i>	92,47
<i>Hprt1</i>	86,32
<i>Tubb2a</i>	95,46
<i>Gapdh</i>	96,57
<i>Gusb</i>	99,70
<i>B2m</i>	98,81
<i>Syp</i>	78,08
<i>Rplp1</i>	95,79
<i>Gfap</i>	91,18

Fonte: Autora, 2013.

Figura 5 - Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa *StepOnePlus™* (Applied Biosystems).



Fonte: Autora, 2013.

4.6 Análise da estabilidade de expressão dos genes utilizando os programas *NormFinder*, *geNorm* e *BestKeeper*

As análises dos perfis de expressão foram realizadas com o auxílio dos programas *geNorm* (<http://medgen.ugent.br/~jvdesomp/genorm/>), *NormFinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) e *BestKeeper* (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>).

4.6.1 *geNorm*

O software *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) tem como funções ranquear os genes quanto a estabilidade de expressão e indicar o número mínimo de genes necessários para serem usados na normalização dos dados de expressão gênica. Para isso, os valores de C_T obtidos devem ser convertidos em quantidades relativas de expressão. E isto foi feito utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Essas quantidades relativas são exportadas para o programa *geNorm* que calcula a medida de estabilidade de um gene através da comparação da expressão relativa de cada um dos genes com a expressão relativa de todos os outros genes, por meio de uma análise aos pares. Essa análise gera um valor de variação de expressão para cada um dos genes em comparação com a expressão dos demais genes (análise aos pares). Em seguida, é calculada a média aritmética desses valores de variação, denominada de índice M. Assim, quanto menor o valor de M, menor variabilidade de expressão e, portanto, mais estável é o gene. O programa *geNorm* recomenda que o valor de M seja menor que 1,5 para poder ser incluído nas análises (VANDESOMPELE et al., 2002).

4.6.2 *NormFinder*

Assim como no programa *geNorm*, a análise do programa *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004) também requer que os valores de C_T sejam convertidos em quantidades relativas de expressão. A análise desse programa leva em consideração a variação de expressão do gene nas condições experimentais analisadas, calculando a variação intragrupo e inter-grupo apresentada por cada gene. A partir desse dado, o programa calcula o valor de estabilidade de cada gene. Assim, quanto menor a variação da expressão do gene dentre as amostras, menor é o seu índice de estabilidade e, portanto, maior a estabilidade de expressão do gene.

4.6.3 *BestKeeper*

O programa *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004) não requer a conversão para quantidades relativas como nos programas anteriores, este software utiliza os valores de C_T obtidos para os genes candidatos em todas as condições testadas. Esse programa estima a estabilidade global de expressão dos genes estudados através da análise do desvio padrão da média dos valores C_T (D.P. $[\pm C_T]$). Todos os genes que apresentam desvio-padrão menor do que 1 possuem uma expressão mais estável e, por isso, são utilizados no cálculo do *BestKeeper Index*. Tal índice consiste na média geométrica dos valores de C_T de cada gene para as respectivas amostras. Em seguida, é realizada uma análise de correlação aos pares e uma análise de regressão versus o valor do cálculo do *BestKeeper Index*. Essa análise gera um coeficiente de correlação (r), que pode ser utilizado para avaliar a estabilidade de expressão. Sendo assim quanto mais próximo de 1 for o valor de (r), maior a correlação entre o gene analisado e o *índice BestKeeper* e, portanto, mais estável é a expressão do gene.

4.7 Análises da expressão relativa de *Gfap* e *B2m*

Para testar os dados gerados pelos programas *NormFinder*, *geNorm* e *BestKeeper*, o perfil de expressão do gene *Gfap* foi avaliado utilizando os genes de referência investigados nesse estudo. A escolha do uso de *Gfap* como marcador não foi aleatória, alguns estudos demonstraram que há um aumento da expressão desse gene nos modelos de pilocarpina e de cainato (LAURÉN et al., 2010; TANG, Y. et al., 2002; XU et al., 2011). Além do mais, também foi observado o aumento da expressão de *Gfap* no hipocampo de pacientes com ELT (OZBASGERÇEKER et al., 2006). Adicionalmente, também foi feita uma análise de expressão diferencial do gene *B2m*. Essas análises foram realizadas através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

4.8 Análises estatísticas

Os resultados das análises dos grupos experimentais (PILO-i.p e PILO-i.h) e controle foram avaliados estatisticamente através de análise utilizando ANOVA e Kruskal-Wallis ou Bonferroni test e Test t (GraphPad Prism, versão 5.00).

4.9 Revisão sistemática dos genes estudados na literatura através de expressão diferencial durante o processo epileptogênico

A partir dos artigos que atenderam aos critérios listados no tópico 4, foi realizada uma revisão sistemática dos genes que vêm sendo avaliados quanto à expressão diferencial durante o processo epileptogênico. Para isso, foram coletadas as seguintes informações: a) genes estudados, b) funções e processos biológicos em que esses genes estão envolvidos, a partir do banco de dados *Gene Ontology* (NCBI), c) estrutura do sistema nervoso central avaliada, d) tempo do processo epileptogênico em que foram realizadas as análises, e e) a metodologia empregada.

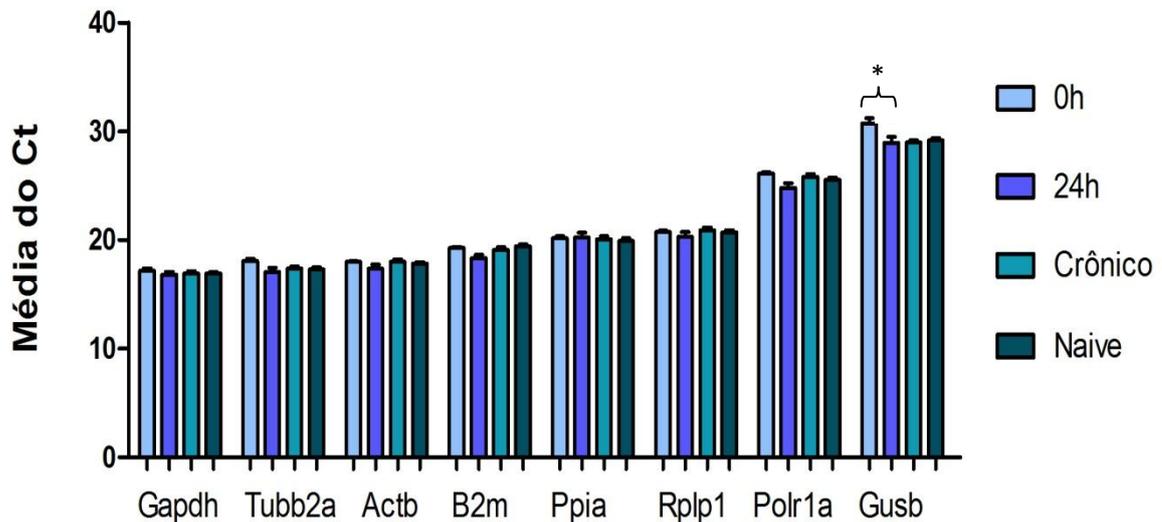
5 RESULTADOS

5.1 Identificação de genes de referência para análise de expressão gênica em modelo de pilocarpina intraperitoneal

5.1.1 Níveis relativos de expressão dos potenciais genes de referência durante a epileptogênese.

Avaliamos através de RT-qPCR, o perfil de expressão dos potenciais genes de referência no hipocampo de animais em diferentes períodos da epileptogênese induzida pela injeção i.p. de pilocarpina. A figura 6 mostra as médias dos valores de Ct obtidos para cada gene (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb*, *Tubb2a*, *Ppia*, *Rplp1*, *Polr1a*), refletindo o nível de expressão nas condições experimentais e controle (animais naive) analisados. Podemos observar que todos os genes apresentaram valores médios de Ct que variam entre 16,96 (*Gapdh*) e 29,45 (*Gusb*), indicando que esses são, respectivamente, os genes mais e menos expressos no tecido analisado, pois o valor do Ct do gene é inversamente proporcional a abundância de seus transcritos no tecido. Observamos também que apenas *Gusb* apresenta uma diferença de expressão significativa entre os grupos experimentais (condições 0h e 24h, $P = 0,0286$), indicando que este gene, particularmente, apresenta uma variação nos níveis de transcritos nesses períodos da epileptogênese.

Figura 6 - Níveis de expressão dos genes de referência selecionados para o estudo. Os valores das médias de Ct (*threshold cycle*) obtidos do RT-qPCR.



* 0h comparado com 24h, $p < 0,05$. Two-way ANOVA.

Fonte: Autora, 2013.

5.2 Estabilidade de expressão

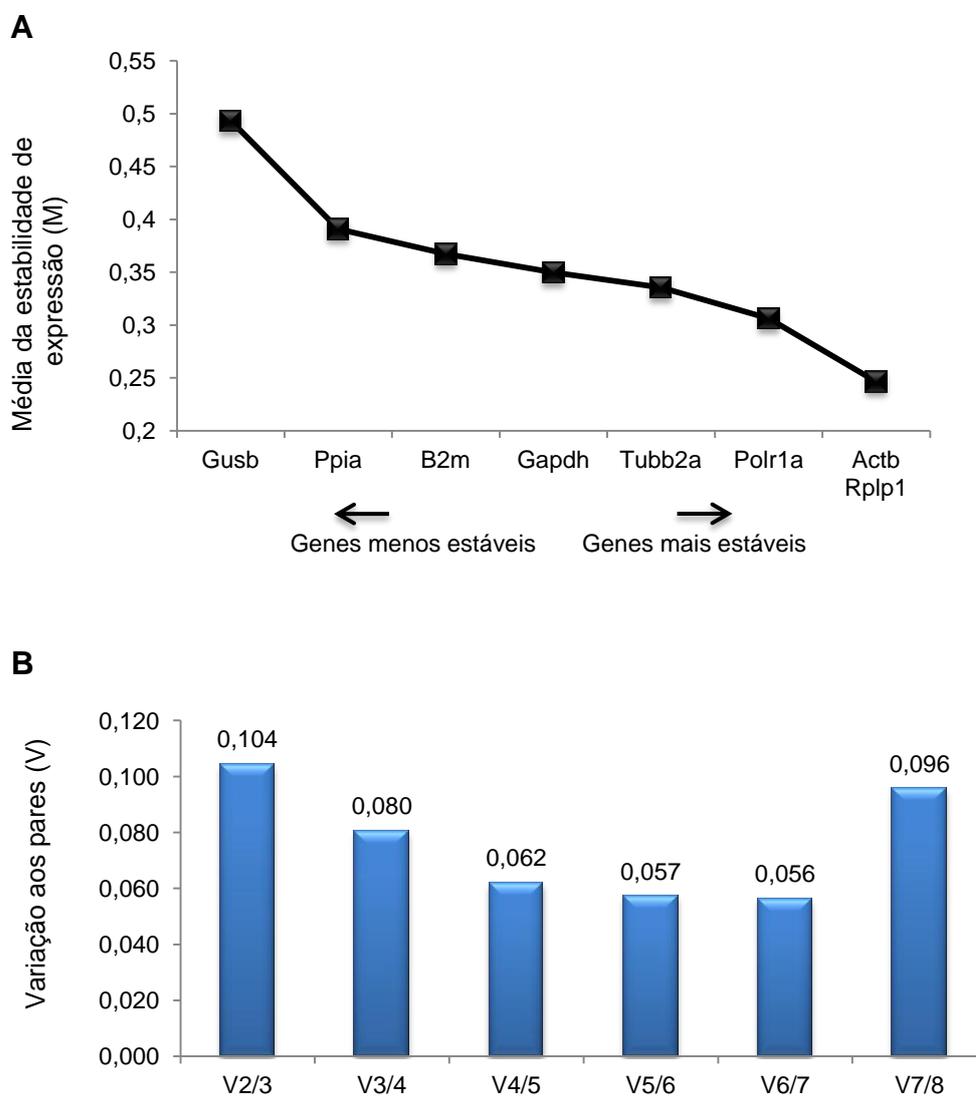
Para determinar a estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência em diferentes fases da epileptogênese, foram utilizados, independentemente, os softwares *geNorm* (Vandesompele et al., 2002), *NormFinder* (Andersen, Jensen e Orntoft, 2004) e *BestKeeper* (Pfaffl et al., 2004).

5.2.1 *GeNorm*

O programa *GeNorm* gera valores médios de estabilidade de expressão de cada gene (índice M) que estão apresentados na figura 7A. Os valores de estabilidade gerados variaram entre ($0,24 < \text{valor de M} < 0,49$), sendo a combinação dos genes *Actb/Rplp1* e o gene *Gusb* apontados, respectivamente, como os que apresentam uma maior e menor estabilidade na expressão. Este programa calcula também a melhor combinação de genes através de eliminação automática dos genes com expressão menos estáveis de acordo com os valores de (M). Assim *Actb* e *Rplp1* foram apontados como a combinação dos genes com expressão mais estável. Este software foi utilizado também para determinar o número mínimo de genes de referência necessários para uma normalização adequada. Este cálculo é feito através de uma

análise de variação aos pares ($V_n / n + 1$), onde V é a variação entre dois pares de genes normalizadores. O programa estabelece um ponto de corte de 0.15, abaixo desse valor a inserção de um gene de referência é desnecessária (VANDESOMPELE et al., 2002). Na figura 7B, observa-se que o valor de $V_2 / 3$ foi de 0.104, abaixo do ponto de corte, indicando, portanto, que dois genes de referência (*Actb* / *Rplp1*) são suficientes para uma normalização adequada da expressão gênica nas condições experimentais investigadas.

Figura 7 - Seleção dos genes de referência mais adequados para a normalização em modelo de PILO-sistêmica, usando o software *geNorm*.



A) Cálculo da média da estabilidade de expressão e exclusão gradual dos genes menos estáveis. Para cada gene, foi calculado o valor de M . O eixo X da esquerda para a direita indica a posição dos genes de acordo com a sua estabilidade de expressão. B) Determinação do melhor número de genes de referência para a normalização.

Fonte: Autora, 2013.

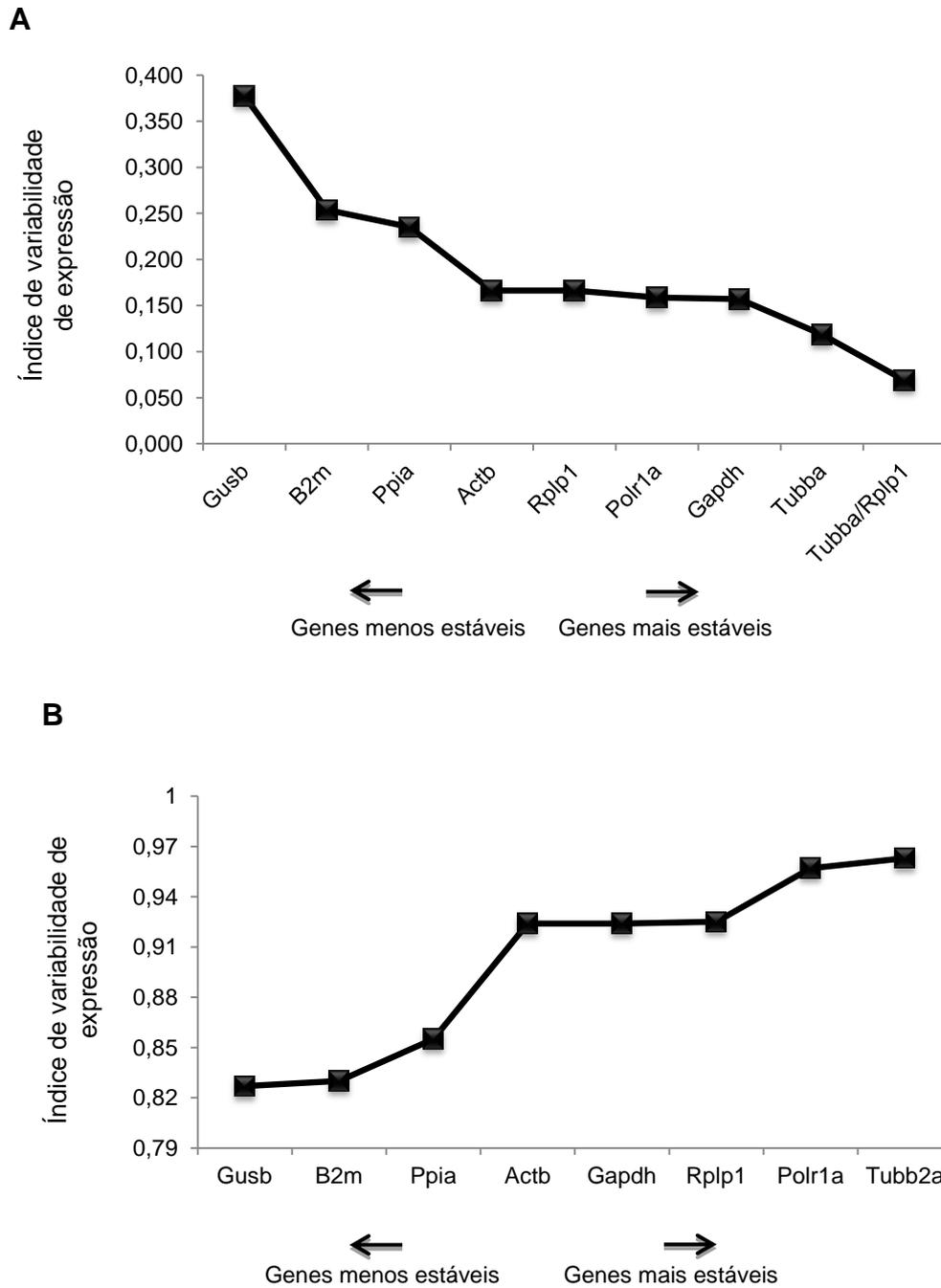
5.2.2 NormFinder

Os valores de estabilidade para cada gene, também foram calculados pelo programa *Normfinder* (Fig 8A). Podemos observar que *Tubb2a*, *Gapdh*, *Polr1a*, *Rplp1*, *Actb*, *Ppia*, *B2m* e *Gusb*, apresentam índice de estabilidade entre 0,119 e 0,378. *Gusb* foi indicado novamente como o gene mais instável (0,378). A melhor combinação de genes de referência indicado foi *Rplp1/Tubb2a*. Esses conjuntos de dados estão em conformidade com os obtidos através do programa *geNorm*.

5.2.3 Bestkeeper

Na figura 8 B, temos os valores dos coeficientes de correlação (r) obtidos através da análise de correlação entre genes de referência e o *BestKeeper Index*. Podemos observar que a melhor correlação foi obtida para *Tubb2a* ($r = 0,963$), seguido por *Polr1a*, *Rplp1*, *Actb* e *Gapdh*. Mais uma vez, o gene *Gusb* apresentou menor coeficiente de correlação (r) para o *Bestkeeper Index*, constituindo o gene com menor estabilidade de expressão e, dessa forma, menos indicado para ser utilizado como gene de referência.

Figura 8 - Classificação dos putativos genes de referência com base em valores de estabilidade calculadas através dos programas *NormFinder* (A) e *BestKeeper* (B) em modelo de PILO sistêmica.

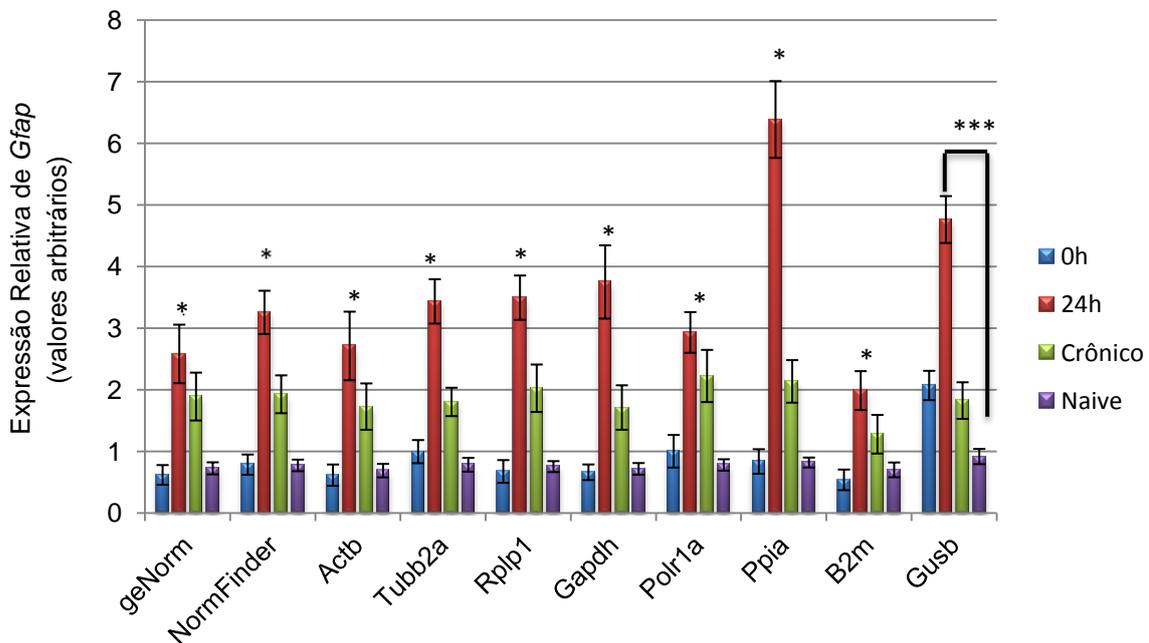


Fonte: Autora, 2013.

5.3 Validação dos genes de referência

Com o objetivo de validar os resultados obtidos para os genes de referência, foi realizada uma análise de expressão relativa do gene *Gfap* (Figura 9). Para as análises, foram utilizados como normalizadores endógenos os oito genes de referência, separadamente, ou nas melhores combinações indicadas pelos programas *geNorm* e *NormFinder*. Podemos observar que os níveis de *Gfap*, quando normalizados por *Actb* / *Rplp1* (*geNorm*) ou *Rplp1/Tubb2a* (*NormFinder*), são significativamente maiores no grupo G-24horas, em comparação aos grupos G-0hora e Naive ($p < 0,05$). Esse perfil de expressão foi reproduzido quando utilizamos como normalizadores endógenos os genes *Actb*, *Rplp1*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *Ppia*, *B2m* e *Polr1a*, separadamente. Entretanto, quando *Gusb* foi utilizado como normalizador, a diferença de expressão de *Gfap* só foi significativamente diferente entre os grupos G-24horas e G-Naive ($P < 0.005$).

Figura 9 - Quantificação da expressão relativa de *Gfap* no hipocampo de ratos injetados PILO-sistêmica.



Os dados de *Gfap* obtidos por RT-qPCR foram normalizados por oito genes de referência e pela melhor combinação de genes segundo *geNorm* e *NormFinder* (média \pm DP). O diagrama mostra os níveis médios de transcrições de *Gfap* na epileptogênese (G-0hora e G-24horas), período de crônico (G-CR) e animais naive (G-Naive). * G-24horas comparado com o G-0hora ou G-Naive, $p < 0,05$; *** G-24horas em comparação com o G-Naive, $p < 0,05$. One-way ANOVA Kruskal-Wallis.

Fonte: Autora, 2013.

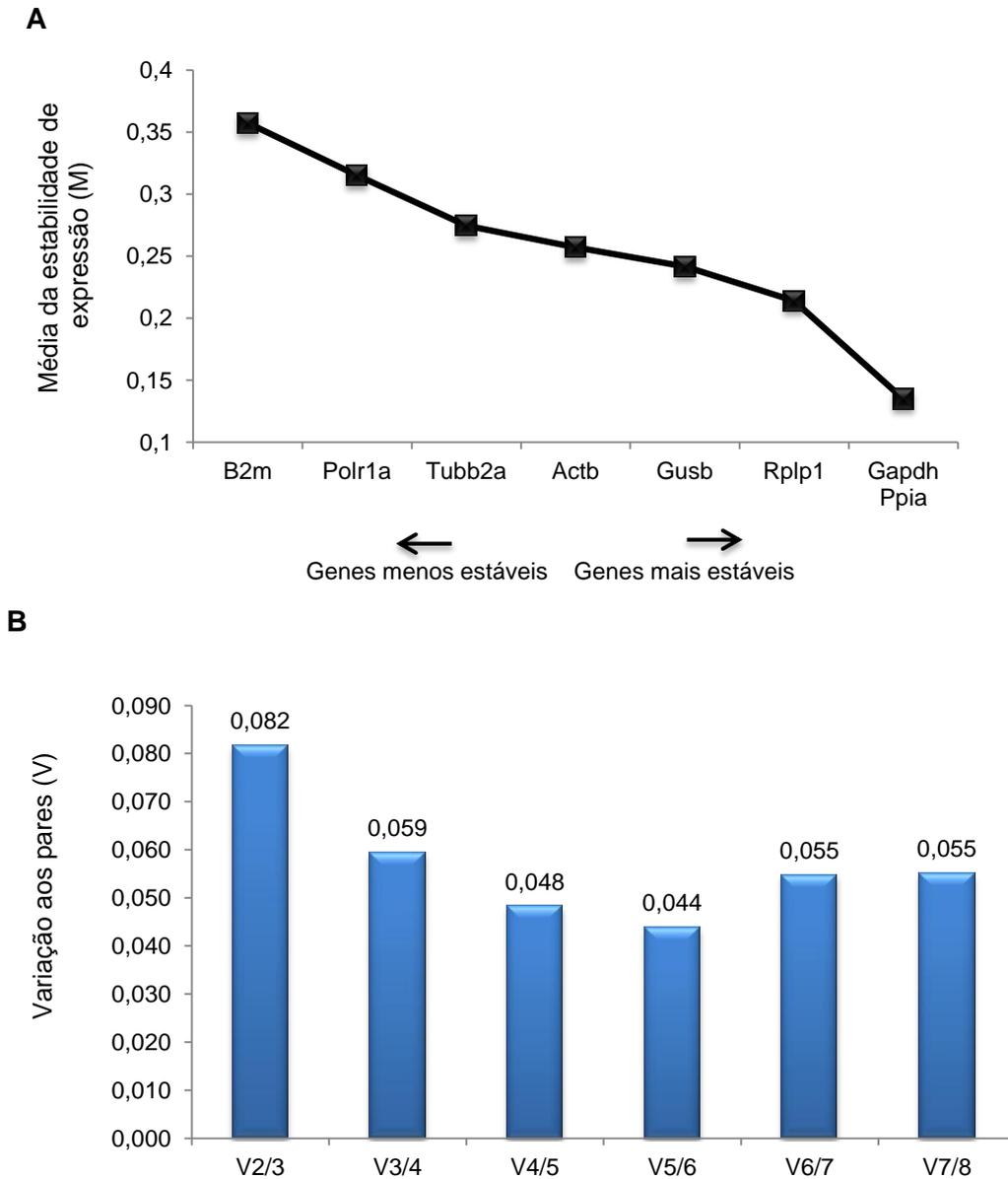
5.4 Identificação de genes de referência para análise de expressão gênica em modelo animal de pilocarpina intra-hipocampal

Com o objetivo de avaliar se os dados obtidos nas análises dos genes de referências no modelo de indução sistêmica são aplicáveis em outras condições experimentais, realizamos as mesmas análises no modelo da injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Para isto, foi realizado, através de RT-qPCR, a análise dos níveis de expressão dos genes *Actb*, *Rplp1*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *Ppia*, *B2m* e *Polr1a* no hipocampo dos animais eutanasiados 24h após o SE e de animais controle. A avaliação da estabilidade da expressão dos genes de referência foi realizada com o auxílio dos softwares *geNorm*, *NormFinder* e *Bestkeeper*.

5.4.1 *GeNorm*

A figura 10A apresenta os valores do índice M gerados por esse software para cada gene. Podemos observar que *Gapdh* e *Ppia* foram apontados como os genes com expressão mais estável ($M = 0,135$), e o gene *B2m* como o gene com expressão menos estável ($M = 0,357$). O *geNorm* também foi usado para determinar o número mínimo de genes de referência necessários para uma normalização adequada. Na figura 10B, observa-se que, o valor de $V2 / 3$ foi de 0,082, abaixo do valor de corte (0,15), indicando, portanto, que dois genes de referência (*Gapdh* / *Ppia*) são suficientes para normalização da expressão gênica nas condições experimentais investigadas.

Figura 10 - Seleção dos genes de referência mais adequados para a normalização em modelo de PILO-intra-hipocampal, usando o software *geNorm*.



Fonte: Autora, 2013.

5.4.2 NormFinder

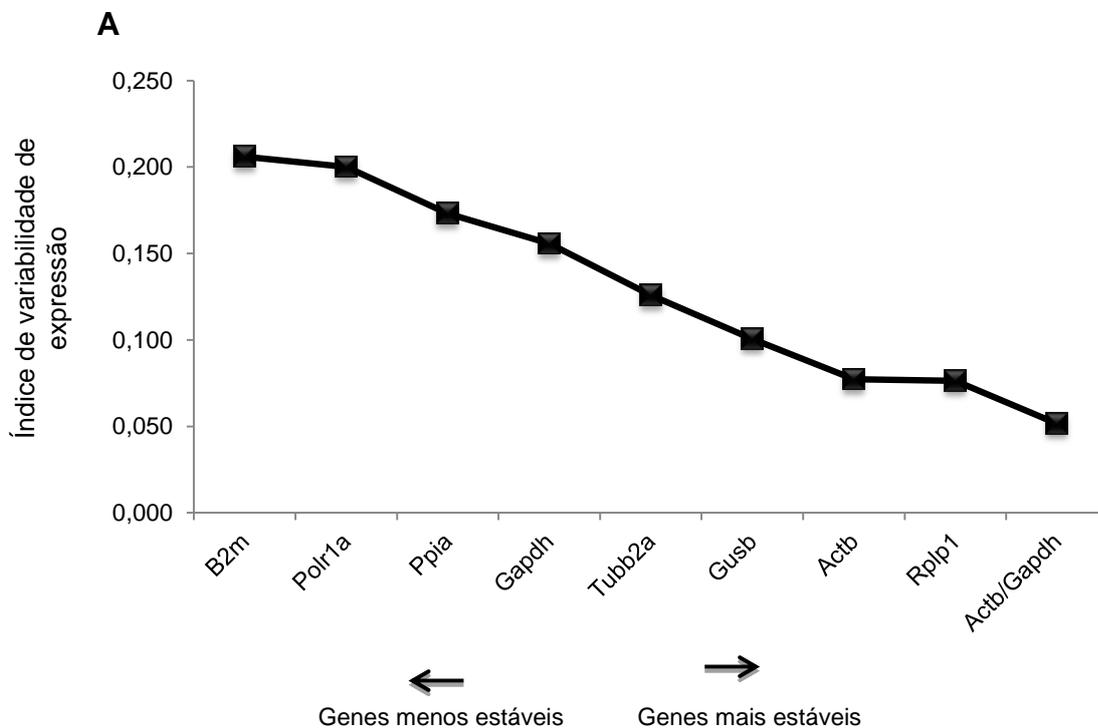
Na figura 11 A, temos os valores de estabilidade calculados por esse programa para cada gene. Com base nos resultados, pode-se observar que o gene *Rplp1* foi apontado como o gene com expressão mais estável (valor de estabilidade = 0,076). Já o gene *B2m* (valor de estabilidade = 0,206) foi indicado, novamente, como o gene menos estável. Além disso, o

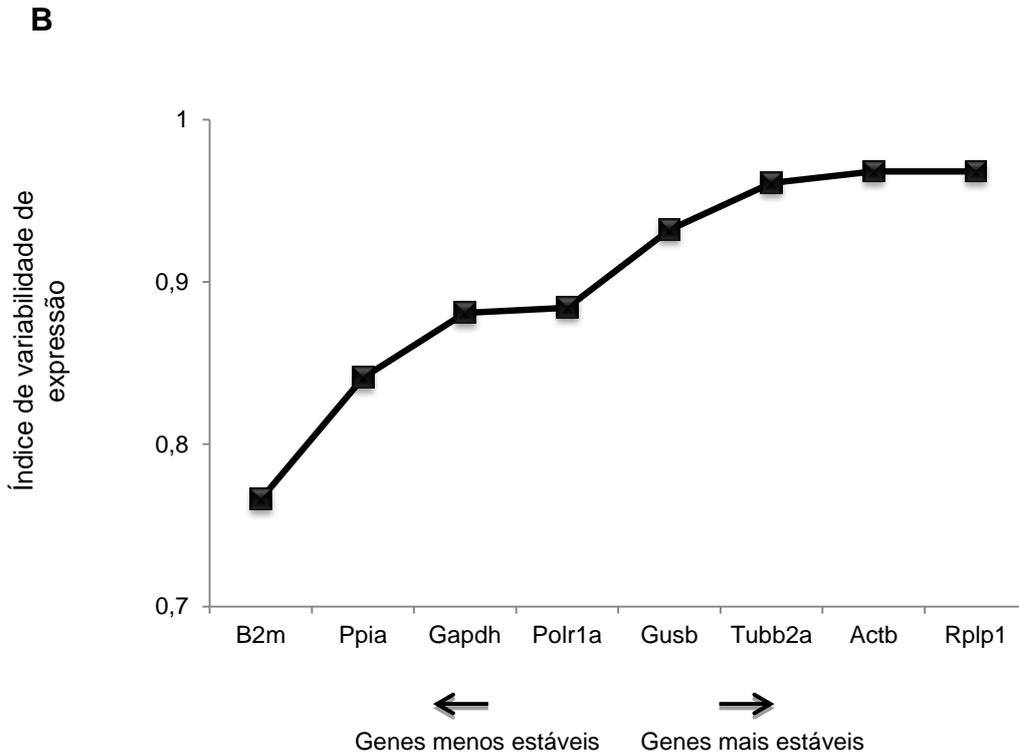
programa determinou que a melhor combinação de dois genes para normalização de dados de RT-qPCR é *Actb* e *Gapdh*, com valor de estabilidade de 0,052.

5.4.3 *BestKeeper*

Através do programa *BestKeeper* foi possível obter os valores dos coeficientes r obtidos através da análise de correlação dos genes com o *BestKeeper Index*. Podemos observar que os genes *Rplp1* e *Actb* apresentaram igualmente a melhor correlação obtida ($r = 0,968$) e, por isso, foram considerados os genes com expressão mais estáveis. Já o gene *B2m* apresentou o menor valor de r ($r = 0,766$), constituindo o gene com menor estabilidade de expressão e, dessa forma, menos indicado para ser utilizado como gene de referência (fig. 11 B)

Figura 11 - Classificação dos putativos genes de referência com base em valores de estabilidade calculadas através dos programas *NormFinder* (A) e *BestKeeper* (B) em modelo de PILO intra-hipocampal.



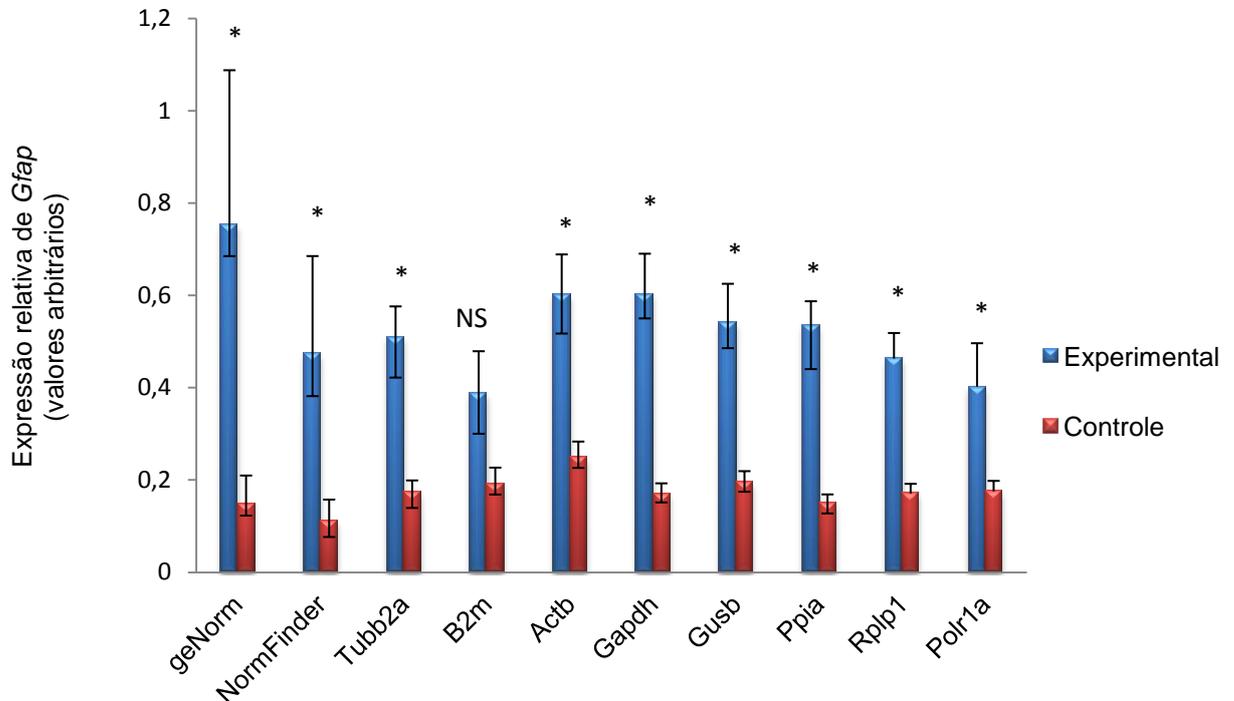


Fonte: Autora, 2013.

5.5 Validação dos genes de referência para o modelo experimental de pilocarpina via intra-hipocampal

O perfil de expressão de *Gfap* nos grupos experimental e controle foram obtidos através de normalização com os diferentes genes de referência (Figura 12). Quando utilizamos os genes *Actb*, *Rplp1*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *Ppia* e *Polr1a* como normalizadores endógenos, observa-se que os níveis de *Gfap* foram significativamente maiores no grupo experimental quando comparado com o grupo controle. Somente quando *B2m* foi utilizado como gene normalizador, o aumento significativo dos níveis de mRNA de *Gfap* não foi revelado no hipocampo dos ratos eutanasiados 24 horas após a SE. De fato, essa observação confirma os dados gerados pelos programas *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*, em que *B2m* foi o gene que apresentou expressão menos estável.

Figura 12 - Quantificação da expressão relativa de *Gfap* no hipocampo de ratos injetados PILO intra-hipocampal.



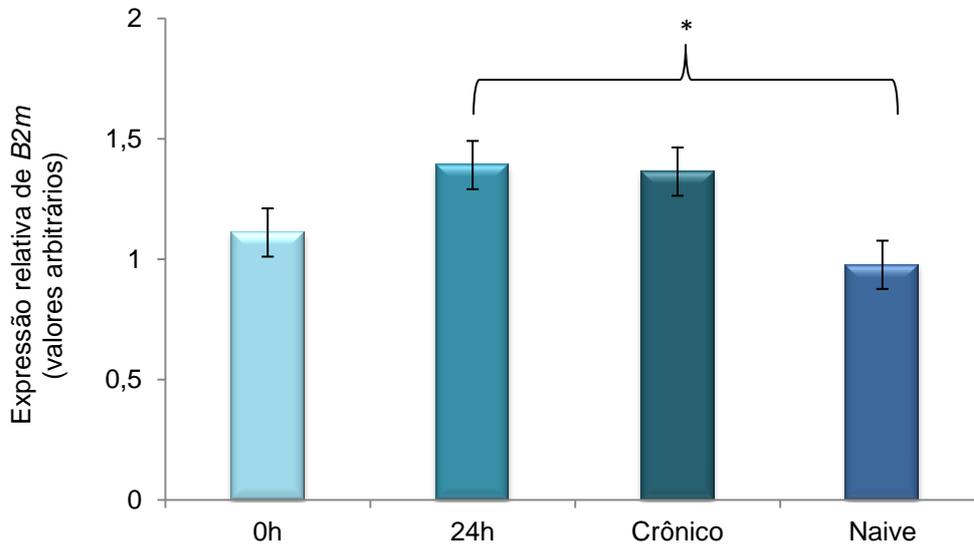
Os dados de *Gfap* obtidos por RT-qPCR foram normalizados por oito genes de referência (média ± DP). O diagrama mostra os níveis médios de transcrições de *Gfap* na fase aguda da epileptogênese (G-24horas) e grupo controle. * $p < 0,05$; NS – não significativo.

Fonte: Autora, 2013.

5.6 Avaliação da expressão relativa de *B2m* na epileptogênese

Os dados obtidos nas análises anteriores no modelo de SE induzida pela injeção intra-hipocampal de pilocarpina sugerem que o gene *B2m* sofre uma modulação em sua expressão na fase aguda da epileptogênese (24h). Para investigar esta questão, avaliamos o perfil de expressão de *B2m* durante a epileptogênese em modelo de SE induzido pela injeção i.p. de pilocarpina. Nestas análises, utilizamos *Actb* como gene de referência. As análises foram realizadas através de RT-qPCR (figura 13). Podemos observar que os transcritos *B2m* apresentaram níveis significativamente maiores no tempo 24horas quando comparados com o grupo naive.

Figura 13 - Quantificação da expressão relativa de *B2m* no hipocampo de ratos injetados PILO intraperitoneal.



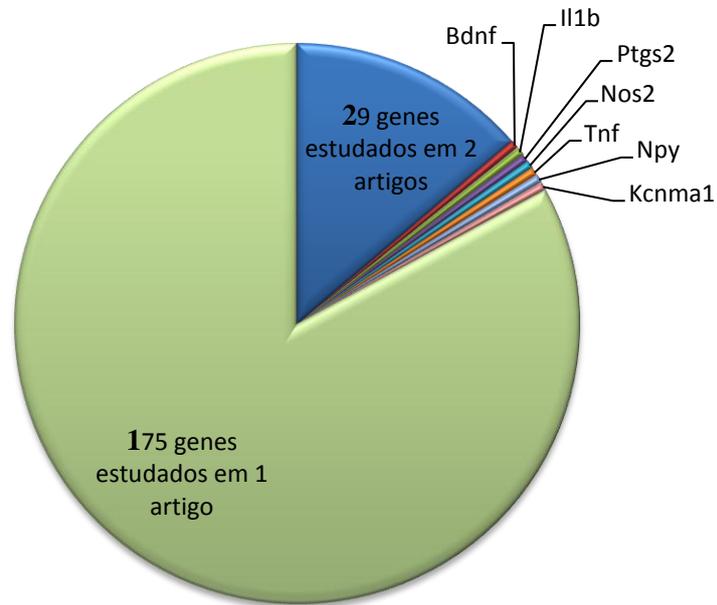
Os dados de *B2m* obtidos por RT-qPCR foi normalizado por *Actb*. O diagrama mostra os níveis médios de transcrições de *B2m* na epileptogênese (G-0hora e G-24horas), período de crônico (G-CR) e animais naive (G-Naive). * G-24horas comparado com o G-Naive, $p < 0,05$.

Fonte: Autora, 2013.

5.7 Levantamento de genes que vem sendo estudados através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT

Foi feito um levantamento dos genes que vem sendo investigados quanto à expressão gênica diferencial em modelos experimentais de ELT. Esse levantamento foi realizado a partir da literatura disponível no banco de dados PubMed, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Ver metodologia). Foram analisados 81 artigos, através dos quais foram identificados 211 genes que tiveram suas expressões analisadas; destes, 36 foram estudados em dois ou mais trabalhos independentes. Dentre os 36 genes mais estudados, sete genes tiveram sua expressão analisada em três ou mais estudos (Fig. 14) (Quadro 2).

Figura 14 - Genes que foram estudados nos últimos 7 anos através de análise de expressão gênica diferencial em modelos de ELT.



Bdnf – fator neurotrófico derivado do cérebro; *Il1b* – interleucina 1-beta; *Ptgs2* - prostaglandina-endoperóxido sintase 2; *Nos2* – óxido nítrico sintase-2; *Tnf* – fator de necrose tumoral alfa; *Kcnma1* – canal de potássio cálcio-ativado, subfamília M, membro alfa 1.

Fonte: Autora, 2013.

Quadro 1 - Informações e perfil geral de expressão dos genes estudados em três ou mais artigos.

GENE ESTUDADO	GENE ID	AUTOR, REVISTA e ANO DE PUBLICAÇÃO	MODELO EXPERIMENTAL	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	ÁREA / TIPO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL		TEMPO DO PROCESSO EPILEPTICO
<i>Bdnf</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)	24225	Gleeson <i>et al.</i> , Brain Behav Immun 2010.	K. R. SC.	RT PCR (TaqMan)	HIP. ↑		- 24 horas pós-injeção de cainato
		Jessberger <i>et al.</i> , J Neurosci 2007.	K. R. IP.	RT PCR Semiquantitativa	HIP.(DG) ↑		- 3 horas e 24 horas pós-indução de SE
		Aid <i>et al.</i> , J Neurosci Res. 2007.	K. R. SC.	RT PCR Semiquantitativa	Éxons IIA e IIB	HIP. —	- 1 hora, 12 horas e 24 horas pós-injeção de cainato
						HIP. ↑	-3 horas pós-injeção de cainato.
						HIP. ↓	- 6 horas pós-injeção de cainato
Éxons I, IIC, V, VII, VIII, IXA	HIP. ↑	- 3 horas e 6 horas pós-injeção de cainato					
	HIP. —	- 1 hora, 12 horas e 24 horas pós-injeção de cainato					
Éxons III e VI	HIP. —	- 1, 3, 6, 12 e 24 horas pós-injeção de cainato					
Éxon IV	HIP. —	- 1 hora pós-injeção de cainato					
	HIP. ↑	- 3, 6, 12 e 24 horas pós-injeção de cainato					

P – Pilocarpina; K – cainato; IP – via intraperitoneal; - SC – via subcutânea; ICV – via intracerebroventricular; IH – via intra-hipocampal; ns. – via não-especificada; M – camundongo; R – rato; HIP – hipocampo; IPS. – ipsilateral; CON. – contralateral; CA1 – *cornu ammonis* 1; CA3 – *cornu ammonis* 3; DG – giro denteado; P15 – 15 dias pós-natal; ↑ super-expresso; ↓ sub-expresso; — sem alteração na expressão.

Fonte: Autora, 2013.

Quadro 2 (continuação)

GENE ESTUDADO	GENE ID	AUTOR, REVISTA e ANO DE PUBLICAÇÃO	MODELO EXPERIMENTAL	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	ÁREA / TIPO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL	TEMPO PROCESSO EPILÉPTICO
<i>Bdnf</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)	24225	Ruiz <i>et al.</i> , Brain Res. 2011.	P. R. IP	qRT-PCR (TaqMan)	HIP. —	- 24 horas, 10 dias, 1 mês e 2 meses pós-SE
		Chen <i>et al.</i> , J Neurosci. 2007	P. R. IP.	RT PCR Semiquantitativa	HIP. ↑	- 3 horas pós-indução do SE
		Lubin <i>et al.</i> , J Neurochem 2007	K. R. IP.	RT PCR Semiquantitativa	Éxons I, II, IV, VI e IX HIP.(CA1) ↑	- 2,5–3 horas pós-injeção de cainato
		Sumanont <i>et al.</i> , Biol Pharm Bull. 2007.	K. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. ↑	- 6 horas pós-injeção de cainato
		Lau <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci U S A. 2010.	P. R. ns.	qRT-PCR (SYBr Green)	pan- <i>Bdnf</i> HIP. ↑ HIP — long 3' UTR <i>Bdnf</i> HIP. – HIP. ↑	- 30 min. e 90 min. pós-SE - 24h pós-SE - 30 min. e 24 horas pós-SE - 90 min. pós-SE
<i>Il1b</i> (interleucina 1 beta)	24494	Gleeson <i>et al.</i> , Brain Behav Immun 2010.	K. R. SC.	RT PCR (TaqMan)	HIP. ↑	- 24 horas pós-injeção de cainato
		Kuteykin-Teplyakov <i>et al.</i> , Epilepsia 2009.	LP. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. ↑	- 7,5 horas, 10 horas e 16 horas pós-início do SE
		Lee <i>et al.</i> , Neurosci Lett. 2008	K. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. (CA1 e CA3) ↑	- 3 dias pós-injeção de cainato
		Yang <i>et al.</i> , Epilepsia 2010.	K. R. IP.	RT PCR (SYBR Green)	HIP. ↑	- 12 horas pós-SE (induzido em P15)

Quadro 2 (continuação)

GENE ESTUDADO	GENE ID	AUTOR, REVISTA e ANO DE PUBLICAÇÃO	MODELO EXPERIMENTAL	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	ÁREA / TIPO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL	TEMPO DO PROCESSO EPILEPTICO
<i>Illb</i> (interleucina 1 beta)	16176	Cardoso <i>et al.</i> , J Control Release 2010	K. M. ICV.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. (direito) ↑	- 24 horas pós-injeção de cainato
		Pernot <i>et al.</i> , Epilepsia 2011.	K. M. IH.	qRT-PCR (SYBR Green)	HIP. IPS. ↑ HIP. IPS. — HIP. CON. ↑ HIP. CON. —	- 5 horas e 7 dias pós-SE - 24 horas, 2 dias e 21 dias pós-SE. - 7 dias pós-SE - 5 horas, 24 horas, 2 dias e 21 dias pós-SE.
<i>Ptgs2</i> (prostaglandina-endoperóxido sintase 2)	29527	Joseph <i>et al.</i> , Neuroscience, 2006.	K. R. IP.	qRT PCR (TaqMan)	HIP. (direito) ↑ HIP. (direito) —	- 2 horas pós-início de crise de nível 5 (escala de Racine) - 6 horas e 24 horas após o início do SE
		Kuteykin-Teplyakov <i>et al.</i> , Epilepsia 2009.	LP. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. ↑	- 7,5 horas, 10 horas, 13 horas, 16 horas, 19 horas e 24 horas pós-início do SE
		Sumanont <i>et al.</i> , Biol Pharm Bull. 2007.	K. R. IP.	qRT PCR (SYBR® Green)	HIP. ↑	- 6 horas pós-injeção de cainato
	19225	Schulte <i>et al.</i> , Neurochem Int. 2009.	K. M. IP.	RT PCR Semiquantitativa	HIP. —	- 6 horas e 24 horas pós-injeção de cainato
		Pernot <i>et al.</i> , Epilepsia 2011.	K. M. IH.	qRT-PCR (SYBR Green)	HIP. IPS. e CON. ↑ HIP. IPS. ↑ HIP. IPS. — HIP. CON. —	- 5 horas pós-SE - 24 horas pós-SE - 2 dias, 7 dias e 21 dias. - 24 horas, 2 dias, 7 dias e 21 dias.

Quadro 2 (continuação)

GENE ESTUDADO	GENE ID	AUTOR, REVISTA e ANO DE PUBLICAÇÃO	MODELO EXPERIMENTAL	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	ÁREA / TIPO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL		TEMPO DO PROCESSO EPILÉPTICO
<i>Kcnma1</i> (canal de potássio cálcio-ativado, subfamília M, membro alfa 1)	83731	Ermolinsky <i>et al.</i> , Neuroreport. 2008	P. R. IP.	qRT PCR (TaqMan)	HIP.(DG) ↓ C.CER. (par.) —		- 24 horas, 10 dias, 1 mês e >2 meses pós-indução do SE - 24 horas, 10 dias, 1 mês e >2 meses pós-indução do SE
		Otalora <i>et al.</i> , Brain Res 2008.	P. R. IP.	RT PCR Semiquantitativa	HIP. (DG) ↓		- 2-4 semanas pós-indução do SE (após a 2ª crise espontânea)
		Ermolinsky <i>et al.</i> , Neuros. Res. 2011.	P. R. IP	qRT-PCR (TaqMan)	Principal transcrito	HIP. (DG) ↓	- 24 horas, 10 dias, 1 mês e 2 meses pós-SE.
					Variante ZERO	HIP. (DG) ↓	- 24 horas, 10 dias, 1 mês e 2 meses pós-SE.
					Variante STREX	HIP. (DG) ↑ HIP. (DG) ↓	- 10 dias pós-SE. - 24 horas, 1 mês e 2 meses pós-SE.
<i>Nos2</i> (óxido nítrico sintase 2)	24599	Gleeson <i>et al.</i> , Brain Behav Immun 2010.	K. R. SC.	RT PCR (TaqMan)	HIP. ↑		- 24 horas pós-injeção de cainato
		Lee <i>et al.</i> , Neurosci Lett. 2008	K. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. (CA1 e CA3) ↑		- 3 dias pós-injeção de cainato
		Sumanont <i>et al.</i> , Biol Pharm Bull. 2007.	K. R. IP.	RT-PCR Semiquantitativa (0h, 6h, 48h e 72h) Real Time PCR (SYBR Green) (72h)	HIP. — HIP. ↑		- zero-hora, 6 horas e 48 horas pós-injeção de cainato - 72 horas pós-injeção de cainato

Quadro 2 (continuação)

GENE ESTUDADO	GENE ID	AUTOR, REVISTA e ANO DE PUBLICAÇÃO	MODELO EXPERIMENTAL	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	ÁREA / TIPO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL		TEMPO DO PROCESSO EPILÉPTICO
<i>Npy</i> (Neuropeptídeo Y)	24604	Wilson <i>et al.</i> , J Mol Neurosci., 2005.	K. R. IP.	qRT PCR (TaqMan)	Ratos P15	HIP. — HIP. ↑	- 1h e 6h pós-início das crises epilépticas - 24h pós-início das crises epilépticas
		Ratos P30			HIP. — HIP. ↑	- 1h e 6h pós-início das crises epilépticas - 24h pós-início das crises epilépticas	
		Ruiz <i>et al.</i> , Brain Res. 2011	P. R. IP	qRT-PCR (TaqMan)	HIP. —		- 24 horas, 10 dias, 1 mês e 2 meses pós-SE
		Goto <i>et al.</i> , Neuroptides. 2010	P. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. — HIP. ↑ HIP. ↑	- 6 horas, 12 horas e 60 dias pós-início do SE - 5 dias pós-início do SE - em ratos com crises parciais (não entraram em SE)	
<i>Tnf</i> (fator de necrose tumoral alfa)	24835	Cardoso <i>et al.</i> , J Control Release 2010	K. M. ICV.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. (direito) ↑		- 24 horas pós-injeção de cainato
		Kuteykin-Teplyakov <i>et al.</i> , Epilepsia 2009.	LP. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. ↑		- 6 horas, 7,5 horas e 10 horas pós-início do SE
		Lee <i>et al.</i> , Neurosci Lett. 2008	K. R. IP.	qRT PCR (SYBR Green)	HIP. (CA1 e CA3) ↑		- 3 dias pós-injeção de cainato

6 DISCUSSÃO

6.1 Seleção de genes de referência para estudos de expressão diferencial em modelos de Epilepsia do Lobo Temporal

Em experimentos de expressão gênica, a etapa de normalização é essencial para atenuar a interferência de vieses metodológicos na obtenção e interpretação dos dados. De fato, o uso de normalizadores internos inadequados leva a resultados imprecisos e conclusões equivocadas. Apesar disso, a maioria dos estudos de expressão gênica diferencial na área da epileptologia utiliza genes de referência sem uma prévia validação dos protocolos. Neste trabalho, avaliamos um painel de oito potenciais genes de referência (*Actb*, *Rplp1*, *Tubb2a*, *Gapdh*, *Gusb*, *Ppia*, *B2m* e *Polr1a*) em dois modelos experimentais de ELT. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investigou e validou genes de referência adequados para normalização da expressão gênica em diferentes períodos do processo epileptogênico em modelos de ELT induzida por pilocarpina.

6.1.1 Seleção de genes de referência no modelo PILO intraperitoneal

Através da análise do perfil de expressão utilizando-se os software *geNorm*, *NormFinder* e *Bestkeeper*, observamos que cinco dos potenciais genes de referência (*Actb*, *Gapdh*, *Rplp1*, *Polr1a*, *Tubb2a*) apresentaram uma expressão estável no hipocampo de ratos dos grupos experimentais e controle. Dependendo do software utilizado, o ranqueamento desses genes de acordo com a estabilidade sofre uma pequena variação, provavelmente por causa dos diferentes algoritmos matemático empregados por cada um dos programas (ANDERSEN et al., 2004; VANDESOMPELE et al., 2002). No entanto, todos os programas indicaram *Gusb* como o gene que apresenta a expressão mais instável no modelo experimental PILO-i.p. De fato, esses resultados são corroborados pelas análises comparativas dos valores não normalizados das médias do Ct obtidos em diferentes condições experimentais. Nestas análises, observamos que somente *Gusb* apresentou diferença estatisticamente significativa nos valores de Ct entre os períodos de 24 horas e 0 hora após o SE (Fig.3).

Com o objetivo de validar os resultados obtidos, realizamos a análise de expressão relativa do gene *Gfap*, utilizando os potenciais genes de referências como normalizadores internos. O gene *Gfap* codifica uma proteína específica do citoesqueleto de astrócitos que tem sido utilizada como um marcador de astrogliose reativa durante o processo epileptogênico

(FELLIN e HAYDON, 2005; LI, Y. et al., 2009). Diferentes estudos mostraram que *Gfap* é super-expresso em hipocampo de animais e humanos epiléticos (LAURÉN et al., 2010; OZBAS-GERÇEKER et al., 2006; TANG, Yang et al., 2002; XU et al., 2011). Em nossas análises, quando utilizamos como normalizadores, os genes mais estáveis (combinados ou separadamente), observamos um aumento nos níveis de *Gfap* no grupo 24 horas comparado com os grupos 0h e naive. De fato, muitos estudos em diferentes modelos experimentais mostram de maneira consistente uma superexpressão de *Gfap* na fase aguda da epileptogênese (1-4 dias pós SE ou crise) (DO NASCIMENTO et al., 2012; TORRE et al., 1993), correlacionando-se com a grande proliferação de células da glia. É interessante notar que somente quando utilizamos *Gusb* como normalizador, não foi possível detectar o aumento significativo nos níveis relativos de *Gfap* no grupo 24h comparado com os animais naives, provavelmente em decorrência de normalização menos precisa. Os nossos dados indicam, portanto, que *Gusb* é um gene inadequado para normalizar dados de expressão relativa em vários pontos da epileptogênese em modelo de PILO-i.p. Em um estudo semelhante realizado por Pernot et al. (2010), utilizando um modelo murino de SE induzido através a injeção de cainato, também foi observado que quando *Gusb* é utilizado como normalizador, o perfil de expressão de *Gfap* é perdido. Além do mais, é importante observar que em nosso estudo não detectamos um aumento significativo dos níveis de *Gfap* no grupo crônico. Na literatura, a modulação de *Gfap* ainda é controversa, segundo Sohl et al. (2000) foi detectado um aumento dos níveis de transcritos e proteínas em animais 4 semanas após a indução do SE por cainato. Por outro lado, em outros estudos não foi detectado um aumento significativo na expressão desse gene durante o período crônico (PERNOT et al., 2010; STEWARD et al., 1991).

Outro parâmetro que avaliamos foi o impacto do uso de múltiplos genes de referência no processo de normalização da expressão gênica. O número ideal de genes de referência que deve ser utilizado para uma normalização precisa foi determinado calculando o fator de normalização (NF). Observamos que a utilização de mais de dois genes de referência estáveis (*Actb/Rplp1*) não é necessário, dado que o valor de V está abaixo do ponto de corte 0,15, (VANDESOMPELE et al., 2002) (Fig 6B). De fato, com apenas um dos genes estáveis sendo usado como normalizador, os resultados da expressão de *Gfap* são comparáveis aos obtidos usando a melhor combinação dos dois genes apontados pelos programas *Normfinder* e *geNorm*. Entretanto, a interpretação destes dados não podem ser estendida para outros mRNA ou condições experimentais, sem uma validação.

6.1.2 Seleção de genes de referência no modelo PILO intra-hipocampal

Com o intuito de avaliar estes genes de referência candidatos em diferentes condições experimentais, realizamos uma avaliação semelhante na fase aguda (24 horas após SE) da epileptogênese induzida por administração de Pilocarpina intra-hipocampal. Na análise da estabilidade de expressão com todos os programas utilizados (*geNorm*, *NormFinder* e *Bestkeeper*), *Gusb* aparece como um gene estável, enquanto *B2m* foi apontado como mais instável. Os resultados obtidos para os outros genes de referência foram comparáveis aos observados para o modelo PILO-i.p. Estes dados foram validados também pela análise de expressão relativa *Gfap* no hipocampo de ratos. De fato, apenas quando *B2m* foi utilizado como normalizador, o aumento dos níveis de mRNA de *Gfap* em 24 horas após o SE não foi detectada. Isso mostra que o fato de um gene ser estável em um modelo de patologia não quer dizer que o mesmo gene será estável em diferentes condições experimentais relacionadas com esta mesma patologia.

Uma análise conjunta dos nossos dados sugere que diferença no delineamento experimental poderia explicar algumas controversas existentes sobre os melhores genes de referência para estudos de expressão gênica diferencial em modelo de ELT. O gene *Actb*, por exemplo, mostrou-se um bom gene de referência em modelos animais de ELTM, mas não no tecido cerebral humano epilético. Enquanto que em modelo animal de epilepsia, o gene *Gapdh* não é um bom gene de referência para análise de expressão na epileptogênese induzida por cainato e na fase crônica em modelo de pilocarpina (CHEN, J. et al., 2001; MAURER-MORELLI, C. et al., 2012; PERNOT et al., 2010; WIERSCHKE et al., 2010). No entanto, em nosso estudo, *Gapdh* se apresenta como um gene de referência confiável, como mostrado nos resultados de estabilidade de expressão (usando *geNorm*, *NormFinder* e *Bestkeeper*) e pela validação com base na análise da expressão de *Gfap*. Estes achados mostram claramente que não existe um único gene de referência, ideal para análise de expressão em ELTM e, portanto, a escolha dos genes de referência deverá depender da condição experimental em estudo e a importância de uma prévia validação genes de referência, antes de usá-los como normalizadores endógenos em estudos de expressão gênica diferencial.

6.1.3 Perfil de expressão de *B2m*

Nós avaliamos também o perfil de expressão de *B2m* na fase aguda da epileptogênese (24h) em modelo de SE induzido pela injeção i.p. e i.h de pilocarpina. Observamos que este

gene sofre um aumento significativo da sua expressão 24h após o SE (fig. 8). Até onde sabemos, esta foi a primeira vez que se relata uma modulação na expressão de *B2m* no processo epileptogênico. *B2m* é um gene que codifica uma proteína sérica que se encontra associada por ligações não covalentes a cadeia pesada do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP) de classe I e pode ser encontrada na superfície de quase todas as células nucleadas (LIABEUUF et al., 2012; TIN et al., 2013; TRAMONTI e KANWAR, 2013). Durante a fase aguda da epileptogênese acontecem modificações histológicas tais como astrogliose e inflamação, o que poderia explicar o aumento dos transcritos de *B2m*, já que este gene é expresso em processos inflamatórios. Além do mais este gene é comumente usado para normalizar dados de expressão diferencial para diferentes patologias e modelos experimentais. Em decorrência da modulação na expressão, o uso de *B2m* como normalizador para estudos de expressão gênica diferencial na epileptogênese não é confiável. De fato, em um estudo realizado por Wang, Q. et al. (2013), o gene *B2m* mostra-se como um gene inadequado para a normalização de dados de expressão em tecido de edema cerebral de humanos post-mortem. Por outro lado, em alguns estudos que utilizaram tecidos cerebrais em condições normais, os níveis de transcritos de *B2m* se mantiveram estáveis, apresentando-se como um bom gene de referência (BODA et al., 2009; COULSON et al., 2008). Em epilepsia, este gene foi utilizado como normalizador (SHARMA et al., 2010).

6.2 Revisão sistemática de genes que apresentam a expressão modulada no processo epileptogênico

No levantamento bibliográfico realizado para identificação dos genes que estão sendo estudados através de expressão diferencial durante o processo epileptogênico foram identificados 211 genes que tiveram suas expressões analisadas. Dos quais 36 genes que foram estudados em dois ou mais trabalhos independentes. Dentre 36 genes mais estudados, destacam-se sete genes (*Bdnf*, *Il1b*, *Tnf*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Kcnma* e *Npy*), a expressão gênica destes foi analisada em três ou mais estudos.

O gene mais estudado foi o codificador do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*), que apresentou expressão aumentada no hipocampo 3 horas após a indução do SE em três estudos em modelo de cainato e um em modelo de Pilocarpina (AID et al., 2007; CHEN, Q. et al., 2007; JESSBERGER et al., 2007; LUBIN et al., 2007). Os dados sugerem que há uma

modulação consistente da expressão de *Bdnf* nesse ponto do processo epileptogênico. Este gene é secretado pelas microglias ativadas (PITKÄNEN e LUKASIUK, 2011) e, assim como outras neurotrofinas, também está envolvido em processos de sinaptogênese e potenciação de sinapses centrais e promove a sobrevivência de neurônios juvenis (ROMCY-PEREIRA et al., 2008).

O gene codificador da interleucina 1-beta (*Il1b*) foi analisado em seis estudos, entretanto três destes estudos analisaram a expressão dessa citocina 24 horas após o SE, em modelo de cainato. As investigações realizadas por Gleeson et al. (2010) e Cardoso et al. (2010) identificaram uma super-expressão desse gene 24 horas após o SE. Enquanto que Pernot et al. (2011), não identificaram alteração na expressão de *Il1b* nesse mesmo ponto do processo epileptogênico. É interessante notar que tanto esse último estudo quanto o estudo de Cardoso et al. (2010) utilizaram camundongos para a indução do SE e ambos utilizaram a mesma técnica de análise de expressão gênica (RT-qPCR - SYBR Green). Apesar disso, esses estudos obtiveram resultados distintos em um mesmo tecido. Tal divergência pode ser decorrente das vias de administração de cainato utilizadas, já que o primeiro estudo utilizou a via intra-hipocampal e o segundo estudo, a via intracerebroventricular. Ou pode ser decorrente da utilização de diferentes genes de referências utilizados pelos três estudos para normalizar os dados de expressão gênica.

O fator de necrose tumoral alfa (*Tnf*) foi outra citocina bastante estudada. Foi detectada uma super-expressão desse gene nos três artigos que a estudaram, porém, os dados analisados são de pontos diferentes das fases aguda e latente do processo epileptogênico. Por esse motivo, não foi possível avaliar a consistência dos dados de expressão gênica descritos para esse gene. Tanto *Il1b* quanto *Tnf* estão envolvidas nos processos de inflamação cerebral e neurodegeneração que ocorrem após injúria cerebral (CARDOSO et al., 2010).

O codificador do mediador inflamatório óxido nítrico sintase-2 (*Nos2*) apresentou uma super-expressão após a indução do SE em dois artigos analisados (LEE et al., 2007; SUMANONT et al., 2007). Sabe-se que esse aumento da expressão do RNAm de *Nos2* é induzido pela ativação de células gliais (astrócitos e microglia) e desempenha um papel importante no processo inflamatório tardio (SUMANONT et al., 2007).

Outro gene investigado é o codificador da prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (*Ptgs2*), um importante mediador inflamatório envolvido em processos que ocorrem durante a epileptogênese, como regulação da apoptose e da plasticidade sináptica e resposta ao estresse oxidativo (PITKÄNEN e LUKASIUK, 2011). Esse gene foi analisado em cinco estudos distintos, dos quais dois apresentaram padrões de expressão conflitantes utilizando modelo de cainato e

um mesmo tempo do processo epileptogênico. Joseph et al. (2006) não detectaram alteração na expressão de *Ptgs2* 6 horas após indução do SE. Enquanto que Sumanont et al. (2007) detectaram super-expressão desse gene nesse mesmo ponto. Os dados contraditórios podem ser atribuídos a possíveis erros metodológicos ou a inconsistência pode ser devida aos diferentes genes utilizados como normalizador endógeno utilizado no estudo, em um estudo os dados são normalizados com *Actb* e outro utiliza *Gapdh*.

Alguns trabalhos analisaram a expressão do gene *Kcnma1* (codificador da subunidade alfa 1 do canal de potássio cálcio-ativado). Todos os três estudos que o analisaram detectaram uma sub-expressão desse gene 24 horas após o SE no giro denteado de hipocampus de rato, utilizando o modelo de Pilocarpina intraperitoneal (ERMOLINSKY, B. et al., 2008; ERMOLINSKY, B. S. et al., 2011; PACHECO OTALORA et al., 2008). Esses dados indicam uma modulação consistente da expressão de *Kcnma1* nesse ponto do processo epileptogênico.

O último gene mais estudado é o codificador do neuropeptídeo Y (*Npy*), um neuropeptídeo anticonvulsivante que apresenta atividade neuroprotetora (RUIZ et al., 2011). Esse gene foi estudado em três artigos, dos quais dois estudaram sua expressão 24 horas após o SE. No entanto, enquanto Wilson et al. (2005) detectaram uma super-expressão desse gene nesse ponto, Ruiz et al. (2011) não identificaram alteração na expressão desse gene. Essas divergências podem ser decorrentes da utilização de modelos de ELT distintos, já que o primeiro estudo foi realizado em modelo de cainato e o segundo, em modelo de pilocarpina. Os genes endógenos usados para normalização foram diferentes para os dois estudos.

7 CONCLUSÃO

- Na análise da expressão de estabilidade acoplada a validação com base na quantificação relativa de transcritos de *Gfap*. Através desse estudo, concluímos que: *Actb*, *Gapdh*, *Rplp1*, *Tubb2a* e *Polr1a* permitem uma normalização eficiente de expressão gênica diferencial durante a epileptogênese nos modelos de ELT induzidos por pilocarpina.
- *Gusb* foi apontado como gene de referência não confiável para os experimentos de RT-qPCR em modelo de ELT PILO-i.p.
- *B2m* não se apresentou como um bom gene de referência em modelo de ELT PILO-i.h, pois sofre uma modulação em sua expressão na fase aguda da epileptogênese (24h).
- No levantamento bibliográfico realizado foram identificados 211 genes que tiveram suas expressões gênicas analisadas durante o processo epileptogênico, destes destacam-se os sete mais estudados *Bdnf*, *Il1b*, *Tnf*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Kcnma* e *Npy*.

REFERÊNCIAS

AID, T., et al. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **J Neurosci Res**, v.85, n.3, p.525-35, Feb 15. 2007.

AKIYAMA, K., et al. Ionotropic excitatory amino acid receptors in discrete brain regions of kindled rats. **Brain Res**, v.587, n.1, p.73-82, Jul 31. 1992.

AL SUFIANI, F. ;ANG, L. Neuropathology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research and treatment**, v.2012, p.6245192012.

ANDERSEN, C. L., et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v.64, n.15, p.5245-50, Aug 1. 2004.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.12, n.Suppl 1, p.31-362006.

ARIDA, R. M., et al. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy research**, v.37, n.1, p.45-52, Oct. 1999.

ARONICA, E., et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Eur J Neurosci**, v.31, n.6, p.1100-7, Mar. 2010.

BABB, T. L., et al. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.25, n.6, p.729-40, Dec. 1984.

BARAM, T. Z. ;HATALSKI, C. G. Neuropeptide-mediated excitability: a key triggering mechanism for seizure generation in the developing brain. **Trends Neurosci**, v.21, n.11, p.471-6, Nov. 1998.

BARTOLOMEI, F., et al. [Spatio-temporal dynamics of neuronal networks in partial epilepsy]. **Revue neurologique (Paris)**, v.161, n.8-9, p.767-80, Sep. 2005.

BECKER, A. J., et al. Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. **Neuroreport**, v.13, n.10, p.1327-33, Jul 19. 2002.

BENZON, J., et al. Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. **Neuroscience**, v.53, n.2, p.433-46, Mar. 1993.

BERCOVICI, E., et al. Neocortical temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research and treatment**, v.2012, p.1031602012.

BIAGINI, G., et al. Endogenous neurosteroids modulate epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v.201, n.2, p.519-24, Oct. 2006.

BODA, E., et al. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. **J Mol Neurosci**, v.37, n.3, p.238-53, Mar. 2009.

BUGRA, K., et al. aFGF, bFGF and flg mRNAs show distinct patterns of induction in the hippocampus following kainate-induced seizures. **Eur J Neurosci**, v.6, n.1, p.58-66, Jan 1. 1994.

BUSTIN, S. A., et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. **J Mol Endocrinol**, v.34, n.3, p.597-601, Jun. 2005.

CARDOSO, A. L., et al. Tf-lipoplex-mediated c-Jun silencing improves neuronal survival following excitotoxic damage in vivo. **Journal of Controlled Release**, v.142, n.3, p.392-403, Mar 19. 2010.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v.16, n.1-2, p.33-7, Feb-Mar. 1995.

CAVALHEIRO, E. A., et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v.32, n.6, p.778-82, Nov-Dec. 1991.

CAVALHEIRO, E. A., et al. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v.37, n.10, p.1015-9, Oct. 1996.

CHANG, B. S. ;LOWENSTEIN, D. H. Epilepsy. **N Engl J Med**, v.349, n.13, p.1257-66, Sep 25. 2003.

CHEN, J., et al. Activity-induced expression of common reference genes in individual cns neurons. **Laboratory investigation**, v.81, n.6, p.913-6, Jun. 2001.

CHEN, Q., et al. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. **The Journal of neuroscience** v.27, n.3, p.542-52, Jan 17. 2007.

CORDOBA, E. M., et al. Selection of reference genes in Hedysarum coronarium under various stresses and stages of development. **Anal Biochem**, v.409, n.2, p.236-43, Feb 15. 2011.

COULSON, D. T., et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. **BMC Mol Biol**, v.9, p.462008.

CURIA, G., et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of neuroscience methods**, v.172, n.2, p.143-572008.

DE SIMONI, M. G. ;IMERI, L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. **Biol Signals Recept**, v.7, n.1, p.33-44, Jan-Feb. 1998.

DO NASCIMENTO, A. L., et al. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**, v.1470, p.98-110, Aug 27. 2012.

EID, T., et al. Gene expression of glutamate metabolizing enzymes in the hippocampal formation in human temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.54, n.2, p.228-38, Feb. 2013.

ELLIOTT, R. C. ;LOWENSTEIN, D. H. Gene expression profiling of seizure disorders. **Neurochem Res**, v.29, n.6, p.1083-92, Jun. 2004.

ENGEL, J. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? **The Neuroscientist**, v.72001.

ERMOLINSKY, B., et al. Deficit of Kcnma1 mRNA expression in the dentate gyrus of epileptic rats. **Neuroreport**, v.19, n.13, p.1291-4, Aug 27. 2008.

ERMOLINSKY, B. S., et al. Upregulation of STREX splice variant of the large conductance Ca²⁺-activated potassium (BK) channel in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurosci Res**, v.69, n.1, p.73-80, Jan. 2011.

ESCLAPEZ, M. ;HOUSER, C. R. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. **J Comp Neurol**, v.412, n.3, p.488-505, Sep 27. 1999.

FELLIN, T. ;HAYDON, P. G. Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? **Trends in molecular medicine**, v.11, n.12, p.530-3, Dec. 2005.

FOLLESA, P., et al. Regional and temporal pattern of expression of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA in rat brain following electroconvulsive shock. **Exp Neurol**, v.127, n.1, p.37-44, May. 1994.

FRENCH, J. A., et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Ann Neurol**, v.34, n.6, p.774-80, Dec. 1993.

GALL, C., et al. Seizures and the regulation of neurotrophic factor and neuropeptide gene expression in brain. **Epilepsy Res Suppl**, v.4, p.225-451991.

GALL, C. M. ;ISACKSON, P. J. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. **Science**, v.245, n.4919, p.758-61, Aug 18. 1989.

GASTAUT, H., et al. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v.16, n.3, p.457-61, Sep. 1975.

GITAI, D. L., et al. [Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations]. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.3, p.272-8, May-Jun. 2008.

GLEESON, L. C., et al. The beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol elicits neuroprotective, anti-inflammatory and neurotrophic actions in the kainic acid model of excitotoxicity. **Brain Behav Immun**, v.24, n.8, p.1354-61, Nov. 2010.

GOFFIN, K., et al. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. **Exp Neurol**, v.205, n.2, p.501-5, Jun. 2007.

GOMEZ-PINILLA, F., et al. Regulation of astrocyte proliferation by FGF-2 and heparan sulfate in vivo. **J Neurosci**, v.15, n.3 Pt 1, p.2021-9, Mar. 1995.

GROSS, D. W., et al. Extratemporal white matter abnormalities in mesial temporal lobe epilepsy demonstrated with diffusion tensor imaging. **Epilepsia**, v.47, n.8, p.1360-3, Aug. 2006.

HAMILTON, S. E., et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.24, p.13311-6, Nov 25. 1997.

HAUSER, W. A. ;MOHR, J. P. Seizures, epilepsy, and vascular malformations. **Neurology**, v.76, n.18, p.1540-1, May 3. 2011.

HENSHALL, D. C., et al. Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. **Neurobiol Dis**, v.8, n.4, p.568-80, Aug. 2001.

HENSHALL, D. C. ;SIMON, R. P. Epilepsy and apoptosis pathways. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v.25, n.12, p.1557-72, Dec. 2005.

HU, K., et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurosci Lett**, v.488, n.3, p.252-7, Jan 25. 2011.

HUMPEL, C., et al. Fast and widespread increase of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the forebrain after kainate-induced seizures. **Neuroscience**, v.57, n.4, p.913-22, Dec. 1993a.

HUMPEL, C., et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level in pentylentetrazol-induced epileptic seizures. **Neuroscience**, v.53, n.4, p.909-18, Apr. 1993b.

ISACKSON, P. J., et al. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. **Neuron**, v.6, n.6, p.937-48, Jun. 1991.

JACOBS, M. P., et al. Curing epilepsy: progress and future directions. **Epilepsy & behavior : E&B**, v.14, n.3, p.438-45, Mar. 2009.

JESSBERGER, S., et al. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. **The Journal of neuroscience**, v.27, n.22, p.5967-75, May 30. 2007.

JOSEPH, S. A., et al. Enhanced cyclooxygenase-2 expression in olfactory-limbic forebrain following kainate-induced seizures. **Neuroscience**, v.140, n.3, p.1051-65, Jul 7. 2006.

KAN, A. A., et al. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. **J Neuroinflammation**, v.9, p.2072012.

KASHIHARA, K., et al. Temporal profile of CRE DNA-binding activity in the rat hippocampus following a kindling stimulation. **Epilepsy research**, v.40, n.2-3, p.171-7, Jul. 2000.

KRAUS, J. E. ;MCNAMARA, J. O. Measurement of NMDA receptor protein subunits in discrete hippocampal regions of kindled animals. **Brain Res Mol Brain Res**, v.61, n.1-2, p.114-20, Oct 30. 1998.

LAURÉN, H., et al. Transcriptome analysis of the hippocampal CA1 pyramidal cell region after kainic acid-induced status epilepticus in juvenile rats. **PloS one**, v.5, n.52010.

LEE, T. S., et al. Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. **Mol Med**, v.13, n.1-2, p.1-13, Jan-Feb. 2007.

LEITE, J., et al. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy research**, v.50, n.1-2, p.93-1032002.

LEITE, J. P., et al. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.23, n.8, p.681-31990.

LEMOS, T. ;CAVALHEIRO, E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Experimental brain research**, v.102, n.3, p.423-81995.

LEMOS, T. ;CAVALHEIRO, E. A. Status epilepticus and the late development of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res Suppl**, v.12, p.137-441996.

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência. São Paulo, Atheneu. 2004.

LI, L. M. ;SANDER, J. W. [National demonstration project on epilepsy in Brazil]. **Arq Neuropsiquiatr**, v.61, n.1, p.153-6, Mar. 2003.

LI, Y., et al. ERK1/2 activation in reactive astrocytes of mice with pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurological**2009.

LIABEUF, S., et al. Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. **Kidney Int**, v.82, n.12, p.1297-303, Dec. 2012.

LIVAK, K. ;SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v.25, n.4, p.402-082001.

LOWENSTEIN, D. H. ;ALLDREDGE, B. K. Status epilepticus. **N Engl J Med**, v.338, n.14, p.970-6, Apr 2. 1998.

LUBIN, F. D., et al. Nuclear factor-kappa B regulates seizure threshold and gene transcription following convulsant stimulation. **J Neurochem**, v.103, n.4, p.1381-95, Nov. 2007.

MATHERN, G. W., et al. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. **Prog Brain Res**, v.135, p.237-512002.

MATHERN, G. W., et al. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy research**, v.26, n.1, p.151-61, Dec. 1996.

MATHERN, G. W., et al. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v.56, n.2, p.199-212, Feb. 1997.

MATHERN, G. W., et al. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. **Epilepsy research**, v.32, n.1-2, p.154-71, Sep. 1998.

MAURER-MORELLI, C., et al. A comparison between different reference genes for expression studies in human hippocampal tissue. **Journal of neuroscience methods**, v.208, n.1, p.44-472012.

MAURER-MORELLI, C. V., et al. A comparison between different reference genes for expression studies in human hippocampal tissue. **Journal of neuroscience methods**, v.208, n.1, p.44-7, Jun 30. 2012.

MIKUNI, N., et al. NMDAR1 receptor proteins and mossy fibers in the fascia dentata during rat kainate hippocampal epileptogenesis. **Exp Neurol**, v.163, n.1, p.271-7, May. 2000.

MORGAN, J. I., et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**, v.237, n.4811, p.192-7, Jul 10. 1987.

MORIMOTO, K., et al. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol**, v.73, n.1, p.1-60, May. 2004.

NAGAO, T., et al. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. **Neuroscience**, v.72, n.2, p.399-408, May. 1996.

NILSSON, D., et al. Bilateral diffusion tensor abnormalities of temporal lobe and cingulate gyrus white matter in children with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, v.81, n.2-3, p.128-35, Oct. 2008.

OLBRICH, A., et al. Semiology of temporal lobe epilepsy in children and adolescents. Value in lateralizing the seizure onset zone [corrected]. **Epilepsy research**, v.48, n.1-2, p.103-10, Jan. 2002.

OZBAS-GERÇEKER, F., et al. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, v.138, n.2, p.457-742006.

PACHECO OTALORA, L. F., et al. Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Res**, v.1200, p.116-31, Mar 20. 2008.

PERNOT, F., et al. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. **J Neurosci Res**, v.88, n.5, p.1000-8, Apr. 2010.

PERNOT, F., et al. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.52, n.12, p.2315-25, Dec. 2011.

PFÄFFL, M. W., et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v.26, n.6, p.509-15, Mar. 2004.

PITKANEN, A. New data suggest that discontinuation of status epilepticus is not necessary for antiepileptogenic effect in immature brain. **Epilepsy currents**, v.6, n.5, p.170-2, Sep-Oct. 2006.

PITKÄNEN, A. ;LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet neurology**, v.10, n.2, p.173-862011.

PRIEL, M. R. ;ALBUQUERQUE, E. X. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. **Epilepsia**, v.43 Suppl 5, p.40-62002.

PURPURA, D. P. ;SHOFER, R. J. Excitatory action of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on immature cerebral cortex. **Brain Res**, v.38, n.1, p.179-81, Mar 10. 1972.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v.32, n.3, p.281-94, Mar. 1972.

ROMCY-PEREIRA, R. N., et al. [Genes and epilepsy II: differential gene expression in epilepsy]. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.5, p.461-6, Sep-Oct. 2008.

RUIZ, N., et al. Metabolic gene expression changes in the hippocampus of obese epileptic male rats in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Res**, v.1426, p.86-95, Dec 2. 2011.

SCHMITTGEN, T. D. ;ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Methods**, v.46, n.1-2, p.69-81, Nov 20. 2000.

SCHOENE-BAKE, J. C., et al. Widespread affections of large fiber tracts in postoperative temporal lobe epilepsy. **Neuroimage**, v.46, n.3, p.569-76, Jul 1. 2009.

SCHWARTZKROIN, P. A., et al. Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the in vitro slice preparation. **Ann Neurol**, v.13, n.3, p.249-57, Mar. 1983.

SCORZA, F. ;ARIDA, R. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**2009.

SHARMA, S., et al. The hippocampus of Ames dwarf mice exhibits enhanced antioxidative defenses following kainic acid-induced oxidative stress. **Exp Gerontol**, v.45, n.12, p.936-49, Dec. 2010.

SHORVON, S. The outcome of tonic-clonic status epilepticus. **Curr Opin Neurol**, v.7, n.2, p.93-5, Apr. 1994.

SIMPSON, J. E., et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiol Aging**, v.31, n.4, p.578-90, Apr. 2010.

SMOLDERS, I., et al. Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. **J Neurochem**, v.68, n.5, p.1942-8, May. 1997.

SOHL, G., et al. Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. **Brain Res Mol Brain Res**, v.83, n.1-2, p.44-51, Nov 10. 2000.

SONG, Y. J., et al. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. **Brain Res**, v.1387, p.134-40, Apr 28. 2011.

STEWART, O., et al. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.15, p.6819-23, Aug 1. 1991.

SUMANONT, Y., et al. Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus. **Biol Pharm Bull**, v.30, n.9, p.1732-9, Sep. 2007.

SZOEKE, C. E., et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. **Lancet neurology**, v.5, n.2, p.189-96, Feb. 2006.

TANG, Y., et al. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. **The European journal of neuroscience**, v.15, n.12, p.1937-52, 2002.

TANG, Y., et al. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. **The European journal of neuroscience**, v.15, n.12, p.1937-52, Jun. 2002.

THELLIN, O., et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **J Biotechnol**, v.75, n.2-3, p.291-5, Oct 8. 1999.

TIN, A., et al. Genome-wide association study identified the human leukocyte antigen region as a novel locus for plasma beta-2 microglobulin. **Hum Genet**, v.132, n.6, p.619-27, Jun. 2013.

TORRE, E. R., et al. Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. **Brain Res**, v.631, n.2, p.256-64, Dec 24. 1993.

TRAMONTI, G. ;KANWAR, Y. S. Review and discussion of tubular biomarkers in the diagnosis and management of diabetic nephropathy. **Endocrine**, v.43, n.3, p.494-503, Jun. 2013.

TURSKI, W. A., et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v.9, n.3, p.315-35, Sep. 1983.

VALENTE, V., et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Mol Biol**, v.10, p.172009.

VANDESOMPELE, J., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v.3, n.7, 2002.

VELISKOVA, J. ;MOSHE, S. L. Update on the role of substantia nigra pars reticulata in the regulation of seizures. **Epilepsy currents**, v.6, n.3, p.83-7, May-Jun. 2006.

WANG, Q., et al. Molecular pathology of brain edema after severe burns in forensic autopsy cases with special regard to the importance of reference gene selection. **Int J Legal Med**, May 24. 2013.

WANG, W., et al. Elevated corticotropin releasing hormone/corticotropin releasing hormone-R1 expression in postmortem brain obtained from children with generalized epilepsy. **Ann Neurol**, v.50, n.3, p.404-092001.

WIEBE, S., et al. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. **N Engl J Med**, v.345, n.5, p.311-8, Aug 2. 2001.

WIERSCHKE, S., et al. Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, v.403, n.3-4, p.385-90, Dec 17. 2010.

WIESER, H. G. ;HANE, A. Antiepileptic drug treatment in seizure-free mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis following selective amygdalohippocampectomy. **Seizure**, v.13, n.8, p.534-6, Dec. 2004.

WILSON, D. N., et al. Microarray analysis of postictal transcriptional regulation of neuropeptides. **J Mol Neurosci**, v.25, n.3, p.285-982005.

XU, Z., et al. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. **Neurochem Res**, v.36, n.12, p.2208-15, Dec. 2011.

APÊNDICE A

APÊNDICE A - Protocolo de estabelecimento do modelo experimental de *status epilepticus* induzido por pilocarpina intra-hipocampal

1. Estabelecimento do grupo experimental de *status epilepticus* induzido por pilocarpina intra-hipocampal

O estabelecimento dos grupos experimental e controle do modelo de pilocarpina intra-hipocampal foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, colaborador deste projeto.

Foram utilizados 11 ratos *Wistar* machos pesando entre 180 e 373 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos a 22 °C, em ciclo claro-escuro 12h/12h, com livre acesso a comida e água. Todos os esforços foram feitos para minimizar a quantidade e o sofrimento dos animais utilizados nos experimentos. O grupo experimental consistiu em 5 animais submetidos à injeção intra-hipocampal de pilocarpina e o grupo controle consistiu em 6 animais, que foram injetados com salina (0.9%; 1 µl).

1.1 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas

Os animais foram anestesiados com 10ml/Kg de tribromo etanol (2.5%; Aldrich Chemical Inc., Milwaukee, WI, USA) e 1ml/kg de pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) e foi realizada uma cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas no hipocampo, nas coordenadas específicas (Paxinos & Watson, 1986): hilus do GD: - 6.30mm anterior-posterior (AP, referencia: bragma), 4.50mm medial-lateral (ML, referencia: sagital sinus), - 4.50mm dorsal-ventral (DV, referencia: dura mater).

Após a cirurgia os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP durante 7 dias para recuperação.

1.1.2 Microinjeção de pilocarpina

Os animais do grupo experimental ($n = 5$) foram imobilizados e através de uma seringa de 5 μ l (Hamilton Company, Reno, NV, EUA), ligada a uma bomba de microinjeção (Harvard Apparatus PHD 2000, Holliston, MA, EUA) foi injetado um volume total de 1 μ l de pilocarpina (doses de 2,4 mg / μ L), a uma velocidade de 0,5 μ l / min. O grupo controle ($n = 6$) foi constituído por animais tratados com salina (0.9%; 1 μ l) em substituição à pilocarpina. Após 90 minutos de SE os animais receberam diazepam (5 mg/Kg; ip) para cessar as crise. Após 24 horas do SE os animais foram anestesiados com isofluorano, decapitados e imediatamente após, os tecidos foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80°C. Apenas o hipocampo contra lateral foi utilizado para as análises de expressão.

ANEXO A- Aprovação do Comitê De Ética Em Pesquisa





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 05/08/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Daniel Leite Góes Gitai
Leila Rodrigues de Mendonça

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 05/08/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **011462/2010-83** sob o título, **Identificação de Genes de referência para estudos de expressão gênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais



Prof. Dr. Waller Matias Lima
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B –Artigo publicado na revista PlosOne

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Thalita Ewellyn Batista Sales Marques¹, Leila Rodrigues de Mendonça¹, Marília Gabriela Pereira², Tiago Gomes de Andrade³, Norberto Garcia-Cairasco², Maria Luisa Paçó-Larson⁴, Daniel Leite Góes Gitai^{1*}

1 Department of Cell, Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, AL, Brazil, **2** Department of Physiology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **3** Campus Arapiraca, Federal University of Alagoas, AL, Brazil, **4** Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

It is well recognized that the reference gene in a RT-qPCR should be properly validated to ensure that gene expression is unaffected by the experimental condition. We investigated eight potential reference genes in two different pilocarpine PILO-models of mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) performing a stability expression analysis using geNorm, NormFinder and BestKeeper softwares. Then, as a validation strategy, we conducted a relative expression analysis of the *Gfap* gene. Our results indicate that in the systemic PILO-model *Actb*, *Gapdh*, *Rplp1*, *Tubb2a* and *Polr1a* mRNAs were highly stable in hippocampus of rats from all experimental and control groups, whereas *Gusb* revealed to be the most variable one. In fact, we observed that using *Gusb* for normalization, the relative mRNA levels of the *Gfap* gene differed from those obtained with stable genes. On the contrary, in the intrahippocampal PILO-model, all softwares included *Gusb* as a stable gene, whereas *B2m* was indicated as the worst candidate gene. The results obtained for the other reference genes were comparable to those observed for the systemic Pilo-model. The validation of these data by the analysis of the relative expression of *Gfap* showed that the upregulation of the *Gfap* gene in the hippocampus of rats sacrificed 24 hours after status epilepticus (SE) was undetected only when *B2m* was used as the normalizer. These findings emphasize that a gene that is stable in one pathology model may not be stable in a different experimental condition related to the same pathology and therefore, the choice of reference genes depends on study design.

Citation: Marques TEBS, de Mendonça LR, Pereira MG, de Andrade TG, Garcia-Cairasco N, et al. (2013) Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. PLoS ONE 8(8): e71892. doi:10.1371/journal.pone.0071892

Editor: Gavin L Woodhall, Aston University, United Kingdom

Received: January 22, 2013; **Accepted:** July 4, 2013; **Published:** August 23, 2013

Copyright: © 2013 Marques et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by the Brazilian Agencies FAPESP grant #2007/50261-4 (<http://www.fapesp.br/>) and FAEPA-HCRP (<http://www.faepea.br/>). TEBSM received fellowships from FAPEAL. LRM received fellowships from CNPq. TGA, NGC and MLPL are CNPq research fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: danielgital@gmail.com.br

Introduction

Uncovering the molecular mechanisms involved in iotogenesis and epileptogenesis is critical to understand the physiopathology of epilepsies and for developing new therapeutic options. An approach that has been widely used is the analysis of differential gene expression in the affected tissue [1–4]. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is currently the gold standard for the quantification of steady-state mRNA levels due to its accuracy and sensitivity [5–7]. However, in this type of analysis, an appropriate normalization strategy is required for the correction of experimental variations introduced by pipetting errors, inhibitory compounds, reverse transcription efficiency or quality of starting material [8]. At present, the most common method for such normalization is the use of endogenously expressed control genes – also known as “reference or housekeeping genes” [9].

Ideally, reference genes should present high expression stability levels in different experimental conditions [10,11]. Genes related to basic and structural processes in the cell (beta-actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ribosomal subunits, beta-tubulin, and others) have been used directly as normalizers in

quantitative assays. However, there are strong evidences in the literature suggesting that expression of these types of genes vary between cell types and experimental conditions [12–14]. The impact of using an unstable internal control can lead to inaccurate results and erroneous conclusions. It is essential, therefore, to identify and validate the reference gene prior to its use for normalization during specific experimental set ups.

Many of human Mesial Lobe Temporal Epilepsy (MTLE) characteristics can be reproduced in rodents by injection of pilocarpine (PILO). In this animal model, SE is followed by a latent period and later by the appearance of spontaneous recurrent seizures (SRSs) [15–18]. A large amount of expression gene data obtained at distinct time points corresponding to the latent to chronic phase transition of the PILO-model has been reported. Surprisingly, with one exception [19] as far as we know, reference genes are almost always used as internal controls without any preliminary evaluation of their suitability. In fact, combining different terms, such as “gene expression”, “pilocarpine”, “epilepsy” and “PCR”, we performed a PubMed search for articles published from January 1, 2005 to February 1, 2012 and