

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

EVELIN ANTONIELI DA SILVA SANTOS

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CIRCADIANOS EM RATOS *WISTAR* E  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

Maceió  
2015

EVELIN ANTONIELI DA SILVA SANTOS

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CIRCADIANOS EM RATOS *WISTAR* E  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

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  
2015

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

- S237e Santos, Evelin Antonieli da Silva.  
Expressão diferencial de genes circadianos em ratos *Wistar* e em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal/ Evelin Antonieli da Silva Santos. – 2015.  
87 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, 2015.
- Bibliografia: f. 77-86.  
Anexos: f. 87.
1. Ritmo circadiano. 2. Genes - Análise. 3. Epilepsia – Lobo temporal.  
4. RT-qPCR. 4. Expressão gênica. I. Título

CDU: 577.31

## Folha de Aprovação

Evelin Antonieli da Silva Santos

Expressão diferencial de genes circadianos em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

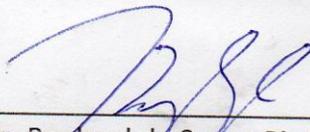
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 26 de janeiro de 2015.



---

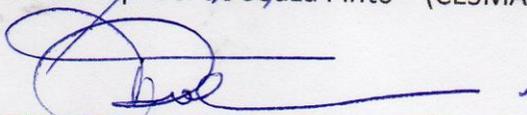
Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai (Orientador)

### Banca Examinadora



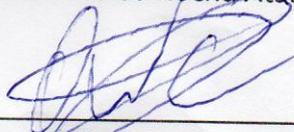
---

Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto – (CESMAC)



---

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



---

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

*À Santíssima Trindade,  
Deus que é Pai,  
Filho e  
Espírito Santo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de todo o impulso que me levou à frente mesmo diante de todas as dificuldades. Obrigada, Senhor, por sustentar a mim e ao peso que eu não pude carregar.

Ao Prof. Dr. Daniel Gitaí pela orientação, pelo apoio e incentivo à ciência.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Heloísa, Tayhana, Bruna, Wanessa, Yngrid, Chiara, Isabelle, Maísa, João Born, Jamile, Carmem e Layanne e muito especialmente a Myka, por todo o amor e orações dedicados a mim, e a Thalita, pela ajuda e apoio em todos os momentos.

Ao Laboratório de Cronobiologia Molecular, pelo espaço cedido e pela dedicação aos experimentos e análises.

Ao Laboratório DNA Forense.

Ao biotério setorial da FANUT.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

A todos os funcionários do ICBS-UFAL.

As instituições CAPES, CNPQ e FAPAL pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, não há como agradecer todo o apoio e toda a ajuda que me deram e talvez não seja possível recompensá-los. Muito obrigada pelos abraços confortantes e por toda dedicação. As pessoas que me cederam o que não tinham e que inclusive me substituíram e admitiram meu papel quando não pude mais assumi-lo. São meus exemplos de amor. Amo vocês!

Aos meus irmãos, pela contribuição total e pelo amor emanado, não apenas por mim, mas pelo Yan.

A Yan, meu filho, que tem sido o meu combustível, que consome a energia física, mas que alimenta a alma. É quem me dá motivos para acreditar em um mundo melhor. Quem me ensinou o que é o amor em sua plenitude.

A todos os amigos e familiares que me enviaram bons pensamentos!

*Por isso vos digo: Não andeis cuidadosos quanto à vossa vida, pelo que haveis de comer ou pelo que haveis de beber; nem quanto ao vosso corpo, pelo que haveis de vestir. Não é a vida mais do que o mantimento, e o corpo mais do que o vestuário?*

*Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã, porque o dia de amanhã cuidará de si mesmo. Basta a cada dia o seu próprio mal.*

*Mateus 6:25,34*

## RESUMO

O mecanismo molecular subjacente à epileptogênese tem sido amplamente investigado pela abordagem de expressão gênica diferencial, principalmente pela metodologia *RT-qPCR*. Contudo, dados controversos apontam para a existência de fontes de variação de expressão não previstas. Aqui, nós investigamos se os ritmos diários de transcritos podem ter impacto na análise de expressão gênica diferencial no hipocampo de ratos epiléticos. Para isto, selecionamos seis genes do relógio (*Per1*, *Per3*, *Bmal*, *Clock*, *Cry1* e *Cry2*), cujo padrão de expressão rítmica no hipocampo foi relatado previamente. Inicialmente, identificamos *Tubb2a/Rplp1* e *Tubb2a/Ppia* como normalizadores adequados para estudos circadianos em hipocampo de ratos mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h). Em seguida, confirmamos o perfil temporal do RNA dos genes *Per1*, *Per3*, *Bmal*, *Cry1* e *Cry2* em hipocampo de ratos controle através dos *softwares* para análise circadiana, *Acrophase* e *Circwave*. Mostramos ainda que as diferenças temporais de amostragem podem mudar os resultados experimentais para *Per1*, *Per3*, *Bmal*, *Cry1* e *Cry2*, mas não para *Clock*, que estava consistentemente diminuído em ratos epiléticos em todas as comparações com o grupo controle. Finalmente, analisamos o gene *Gfap*, já que há dados conflitantes com relação a sua expressão na fase crônica da epilepsia. Detectamos a variação diária da expressão deste gene e mais uma vez que diferenças nos horários dos experimentos influenciaram no resultado obtido. Em conclusão, nosso estudo demonstra que a oscilação diária pode levar a conclusões errôneas na análise da expressão gênica em hipocampo de ratos epiléticos. Pesquisadores devem, portanto, estar cientes de que genes com expressão circadiana podem estar fora de fase em diferentes animais dos grupos experimental e controle. Além disso, nossos resultados indicam que a subexpressão de *Clock* pode estar envolvida com epileptogenicidade, embora o significado funcional disto ainda precise ser investigado.

**Palavras-chave:** Ritmo circadiano. Epilepsia do lobo temporal. *RT-qPCR*. Expressão gênica.

## ABSTRACT

The molecular mechanisms underlying epileptogenesis have been widely investigated by differential gene expression approach, especially *RT-qPCR* methodology. However, controversial findings highlight the occurrence of unpredictable sources of variance in the experimental designs. Here, we investigated if daily rhythms of transcript's levels may impact on differential gene expression analysis in hippocampus of epileptic rats. For this, we have selected six core clock genes (*Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* and *Cry2*), whose rhythmic expression pattern in hippocampus had been previously reported. Initially, we identified *Tubb2a/Rplp1* and *Tubb2a/Ppia* as suitable normalizers for circadian studies in hippocampus of rats maintained to 12:12 hour light:dark (LD) cycle. Next, we confirmed the temporal profiling of *Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1* and *Cry2* mRNA levels in the hippocampus of naïve rats by both Acrophase and CircWave statistical tests for circadian analysis. We showed that temporal differences of sampling can change experimental results for *Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1* and *Cry2*, but not for *Clock*, which was consistently decreased in epileptic rats in all comparison to the naïve group. Finally, we observed that *Gfap* showed daily variation of transcript levels, and once again the differences in the times of the experiments influence the results. In conclusion, our study demonstrates that daily oscillation can lead to erroneous conclusions in gene expression analysis in hippocampus of epileptic rats. Investigators, therefore, should be aware that genes with circadian expression could be out of phase in different animals of experimental and control groups. Moreover, our results indicate that a sub-expression of *Clock* may be involved in epileptogenicity, although the functional significance of this remains to be investigated.

**Keywords:** Circadian rhythm. Temporal lobe epilepsy. RT-qPCR. Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

Figura1 – Representação da regulação molecular em mamíferos.....	18
Figura 2 – Representação da circuitaria tri-sináptica hipocampal.....	20
Figura 3 - Curvas de dissociação dos <i>primers</i> analisados, geradas pelo programa <i>StepOnePlus™</i> (Applied Biosystems).....	38
Figura 4 – Gel de poliacrilamida para avaliação da amplificação de <i>Per1</i> .....	40
Figura 5 - Níveis de expressão de potenciais genes de referência em hipocampo de rato ao longo do dia subjetivo.....	42
Figura 6 – Seleção de genes de referência mais estáveis em hipocampo de rato ao longo do dia subjetivo, pelo programa <i>geNorm</i> .....	43
Figura 7 – Determinação do melhor número de genes de referência para normalização em hipocampo de rato ao longo do ciclo circadiano.....	44
Figura 8 - Seleção de genes de referência mais estáveis em hipocampo de rato ao longo do dia subjetivo, pelo programa <i>NormFinder</i> .....	45
Figura 9 – Expressão relativa do gene <i>Per1</i> em hipocampo de rato ao longo do ciclo circadiano.....	46
Figura 10 – Expressão de genes circadianos em hipocampo de rato ao longo de 24h.....	47
Figura 11 – Expressão diária de genes circadianos em hipocampo de rato, pelos softwares <i>Acrophase</i> e <i>Circwave</i> .....	49
Figura 12 – Organização temporal da expressão diária de genes do relógio.....	51
Figura 13 – Expressão de genes circadianos nas fases clara e escura do ciclo circadiano.....	52
Figura 14 – Expressão relativa do gene <i>Bmal</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....	55
Figura 15 – Expressão relativa do gene <i>Cry1</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....	56
Figura 16 – Expressão relativa do gene <i>Cry2</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....	56
Figura 17 – Expressão relativa do gene <i>Per1</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....	57
Figura 18 – Expressão relativa do gene <i>Per3</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....	57

<b>Figura 19 – Expressão relativa do gene <i>Clock</i> em diferentes fases do ciclo circadiano e na epilepsia.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 20 – Análise da expressão de <i>Gfap</i> em hipocampo de rato ao longo de 24h.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 21 – Análise da expressão diária de <i>Gfap</i> em hipocampo de rato, pelos <i>softwares Acrophase e Circwave</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 22 – Organização temporal da expressão diária de genes do relógio.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 23 – Expressão relativa de <i>Gfap</i> em hipocampo de rato ao longo do ciclo circadiano.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 24 – Expressão relativa do gene <i>Gfap</i> nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Pureza, concentração e volume de RNA usado do grupo controle.....	32
Tabela 2- Pureza, concentração e volume de RNA usado do grupo crônico.....	33
Tabela 3- Sequência dos primers usados para <i>RT-qPCR</i> .....	34
Tabela 4- Concentração dos primers utilizada nas reações de RT-qPCR.....	36
Tabela 5- Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> .....	37

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

28S- RNA ribossomal 28s

*Actb* - Beta-actina

AMPC – adenosina monofosfato cíclica

ANOVA- análise de variância

*B2m* - Beta-2-Microglobulina

*Bmal* - Brain and muscle Arnt-like protein-1

CA1, 2 e 3 – corno de Amon 1, 2 e 3

cDNA- DNA complementar

*Clock* - Circadian locomotor output cycle kaput

CRE- crise recorrente e espontânea

CREB- proteína ligante ao elemento de resposta da adenosina monofosfato cíclica

*Cry1* - Criptocromo1

*Cry2* - Criptocromo2

CT- *cycle threshold*

*Dbp*- protein de ligação ao sítio D da albumina

DEPC - dietilpirocarbanato

ELT - epilepsia do lobo temporal

ELTM - epilepsia do lobo temporal mesial

ELTM-EH - epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal

ELTN - epilepsia do lobo temporal neocortical

*Gapdh* - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GD- giro denteado

*Gfap* - Proteína glial fibrilar ácida

*GLP-1R* (glucagon-like peptide-1 receptor)

*Gusb* - Beta-glucuronidase

*Hlf*- Fator de leucemia hepática

i.p. – intraperitoneal

ICBS – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

LTP – potenciação de longa duração

*mGlu2*- receptor metabotrópico de glutamato 2

*mGlu6*- receptor metabotrópico de glutamato 6

NSQ – núcleos supraquiasmáticos

OD – densidade óptica

*Pdxk*- piridoxal quinase

*Per1* - Período1

*Per3* – Período3

*PKC-α*- proteína quinase C

*Polr1a* - RNA polimerase I murino

*Ppia* - Peptidil-prolil-isomerase A (Ciclofilina A)

PTZ - pentilenotetrazol

RNA - ácido ribonucleico

ROR (receptor órfão relacionada com o ácido retinóico)

*Rplp1* - Proteína ribossomal, grande, P1

*RT-qPCR* - *Quantitative Reverse-Transcription PCR*

SE - *status epilepticus*

SNC - sistema nervoso central

*Tef*- fator embrionário tirotrófico

*Tubb2a* - Beta-tubulina

UFAL - Universidade Federal de Alagoas

ZT - *Zeitgeber Time*

*β-pde*- fosfodiesterase da subunidade β

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<b>Ritmo circadiano</b> .....	16
2.2	<b>Ritmo circadiano e hipocampo</b> .....	19
2.3	<b>Epilepsia do lobo temporal</b> .....	22
2.4	<b>Epilepsia do lobo temporal e alterações circadianas em modelos experimentais de epilepsia</b> .....	23
2.5	<b>Influência da variação circadiana em estudos de expressão gênica diferencial em modelo experimental de epilepsia</b> .....	25
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	27
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
5	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
5.1	<b>Estabelecimento dos grupos experimentais</b> .....	29
5.1.1	Animais.....	29
5.1.2	Grupos experimentais .....	29
5.1.3	SE induzido por pilocarpina intraperitoneal .....	29
5.1.4	Avaliação das crises espontâneas e recorrentes .....	30
5.2	<b>Dissecção dos hipocampus</b> .....	30
5.3	<b>Extração de RNA total de hipocampo de rato</b> .....	30
5.3.1	Quantificação das amostras de RNA .....	31
5.4	<b>Seleção de genes de referência</b> .....	33
5.5	<b>Análise da expressão de <i>Gfap</i></b> .....	33
5.6	<b>Primers para os genes estudados</b> .....	33
5.7	<b>Experimentos de <i>RT-qPCR</i></b> .....	34
5.7.1	Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	34
5.7.2	Reações de amplificação.....	35
5.7.3	Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação .....	36
5.8	<b>Análise da estabilidade da expressão pelos softwares <i>geNorm</i> e <i>NormFinder</i></b> .....	40
5.8.1	<i>geNorm</i> .....	40
5.8.2	<i>NormFinder</i> .....	41
5.9	<b>Análises estatísticas</b> .....	41

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>6.1</b>	<b>Identificação de genes de referência para análise da expressão gênica durante o ciclo circadiano</b> .....	42
<b>6.1.1</b>	Análise dos níveis de expressão de potenciais genes de referência com base no CT bruto. ....	42
<b>6.1.2</b>	Análise de estabilidade de expressão.....	43
<b>6.1.2.1</b>	<i>geNorm</i> .....	43
<b>6.1.2.2</b>	<i>NormFinder</i> .....	44
<b>6.1.3</b>	Validação dos dados de estabilidade de expressão .....	45
<b>6.2</b>	<b>Perfil de expressão de genes circadianos em hipocampo de rato <i>Wistar</i> ao longo de 24h</b> .....	47
<b>6.2.1</b>	Análise da expressão de genes circadianos.....	47
<b>6.2.2</b>	Análise da expressão de genes circadianos em hipocampo de rato <i>Wistar</i> ao longo de 24h, através dos softwares <i>Acrophase e Circwave</i> .....	48
<b>6.3</b>	<b>Impacto do perfil de expressão com variação diária em estudos de expressão gênica diferencial em modelo de epilepsia do lobo temporal</b> .....	54
<b>6.4</b>	<b>Perfil de expressão de <i>Gfap</i> ao longo do ciclo circadiano</b> .....	58
<b>6.4.1</b>	Impacto da variação diária de <i>Gfap</i> em estudos de expressão gênica em modelo de epilepsia do lobo temporal.....	61
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7.1</b>	<b>Seleção de genes de referência para análises da expressão gênica durante o ciclo circadiano</b> .....	62
<b>7.2</b>	<b>Análise do perfil de expressão de genes do relógio molecular em hipocampo de rato ao longo do ciclo circadiano</b> .....	63
<b>7.2.1</b>	Significado funcional.....	64
<b>7.2.2</b>	Análises descritivas e comparativas dos perfis de variação diária de cada gene.....	66
<b>7.3</b>	<b>Análise da expressão com variação diária em estudos de expressão gênica diferencial na epilepsia</b> .....	71
<b>7.4</b>	<b>Análise da expressão de <i>Gfap</i> ao longo do ciclo circadiano</b> .....	74
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS</b> .....	87



## 1 INTRODUÇÃO

O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico, localizado bilateralmente nos lobos temporais e está envolvido em diversos processos, como a navegação espacial e a formação da memória, sendo assim importante para aprendizagem e cognição. Recentemente, tem sido observado que várias propriedades estruturais e fisiológicas desta estrutura seguem regulação temporal. De fato, ritmos diários hipocampais já foram descritos para aspectos da morfologia dos dendritos, neurogênese e potenciação de longa duração, que devem estar implicados nas oscilações associadas à aprendizagem dependente do hipocampo e à formação da memória. Neste cenário, uma das questões que vem sendo investigada diz respeito às bases moleculares que controlam as mudanças temporais das funções do hipocampo. Algumas evidências sugerem o envolvimento de genes circadianos nesses processos, bem como em outras funções, que não estão diretamente relacionadas à temporização circadiana. Neste trabalho, realizamos uma caracterização sistemática do perfil de expressão de 6 genes circadianos no hipocampo de ratos *Wistar*, ao longo de 24 horas. Tal estudo representa uma etapa importante, embora inicial, para identificação de vias moleculares associadas aos ritmos circadianos no hipocampo.

Além do mais, é possível que o hipocampo represente um centro de convergência importante para desordens do sistema nervoso central (SNC) associadas a variações circadianas, com particular destaque para a condição epiléptica. De fato, esta estrutura vem sendo objeto de investigação de vias moleculares associadas ao processo epileptogênico e, mais recentemente, aquelas envolvidas na interação entre epilepsia e alterações circadianas. Uma abordagem que tem sido muito utilizada nestas investigações baseia-se em estudos de expressão gênica diferencial através da metodologia de *RT-qPCR* (*Quantitative Reverse-Transcription PCR*). Porém, neste tipo de análise, o impacto de variações experimentais causadas por fatores técnicos ou biológicos pode levar a resultados imprecisos e conclusões equivocadas. O reconhecimento desses fatores é, portanto, essencial para um desenho experimental adequado. Nesta perspectiva, investigamos dois fatores:

1) genes de referência para estudos de ritmo circadiano em hipocampo. Vários estudos têm mostrado que a seleção de normalizadores inadequados influencia nos resultados de expressão gênica. E que a escolha destes genes depende das condições experimentais, espécies e tecidos analisados. Ademais, apesar do hipocampo ser uma estrutura bastante utilizada nas abordagens de expressão gênica diferencial, mesmo em estudos circadianos, ainda não há na

literatura trabalhos que tenham identificados genes de referência adequados para esses estudos.

2) impacto da oscilação diária em estudos de expressão gênica diferencial em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal (ELT). Nossa hipótese é que a oscilação diária na expressão gênica seja uma fonte importante de variação em estudos de expressão gênica diferencial em modelo de epilepsia. De fato, a expressão de *Gfap*, comumente utilizado como marcador de astrogliose em epilepsia, é ainda controversa. Alguns trabalhos descrevem aumento dos níveis de expressão de na fase crônica da epileptogênese, enquanto outros não detectaram modulação da expressão.

A dimensão metodológica deste trabalho, portanto, é de grande relevância, tendo em vista que a inconsistência de dados em estudos de expressão gênica diferencial pode se dever a estes fatores. Além disso, a variação da expressão ao longo do dia pode estar envolvida com os eventos modulados durante o ciclo circadiano no processo epiléptico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ritmo circadiano

Ritmos circadianos são ritmos biológicos com duração de cerca de 24h (HALBERG, 1953), que englobam fenômenos bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e moleculares. Dentre os processos sabidamente regulados ao longo do dia incluem-se controle da expressão gênica, níveis séricos dos hormônios cortisol e melatonina, temperatura corporal, ciclo celular, pressão sanguínea, ciclo sono-vigília e atividade-reposo (REPERT e WEAVER, 2002; LOWREY e TAKAHASHI, 2004; SAHAR e SASSONE-CORSI, 2009). O correto funcionamento do sistema de temporização circadiana confere ao organismo capacidade de se preparar para atividades necessárias à conservação da vida, como, por exemplo, a disponibilidade de comida e predação (GOLDMAN, 2001; GWINNER, 2003; PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009).

Os ritmos circadianos são regulados nos mamíferos pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), localizados no hipotálamo. Aquelas estruturas são responsáveis pela sincronização da ordem temporal interna com a temporalidade externa. O principal fator externo ou *Zeitgeber* (doador de tempo) é a luz, mas existem outros sincronizadores externos, como a alimentação e o ritmo de vida social. Os neurônios dos NSQ estão localizados de maneira estratégica para receber sinais de entrada de luz por meio do feixe retino-hipotalâmico e enviar sinais elétricos para outras estruturas, possibilitando a sincronização da temporalidade interna e externa (REPERT e WEAVER, 2001; ANTLE e SILVER, 2005). Por outro lado, é interessante notar que os neurônios dos NSQ apresentam ritmicidade própria e são capazes de gerar ritmos circadianos independentes mesmo quando dissociados dos NSQ e/ou de pistas ambientais (WELSH *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997; HERZOG, TAKAHASHI e BLOCK, 1998; HONMA *et al.*, 1998). A persistência destes ritmos na ausência de pistas ambientais (livre-curso) os caracteriza como gerados endogenamente (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009).

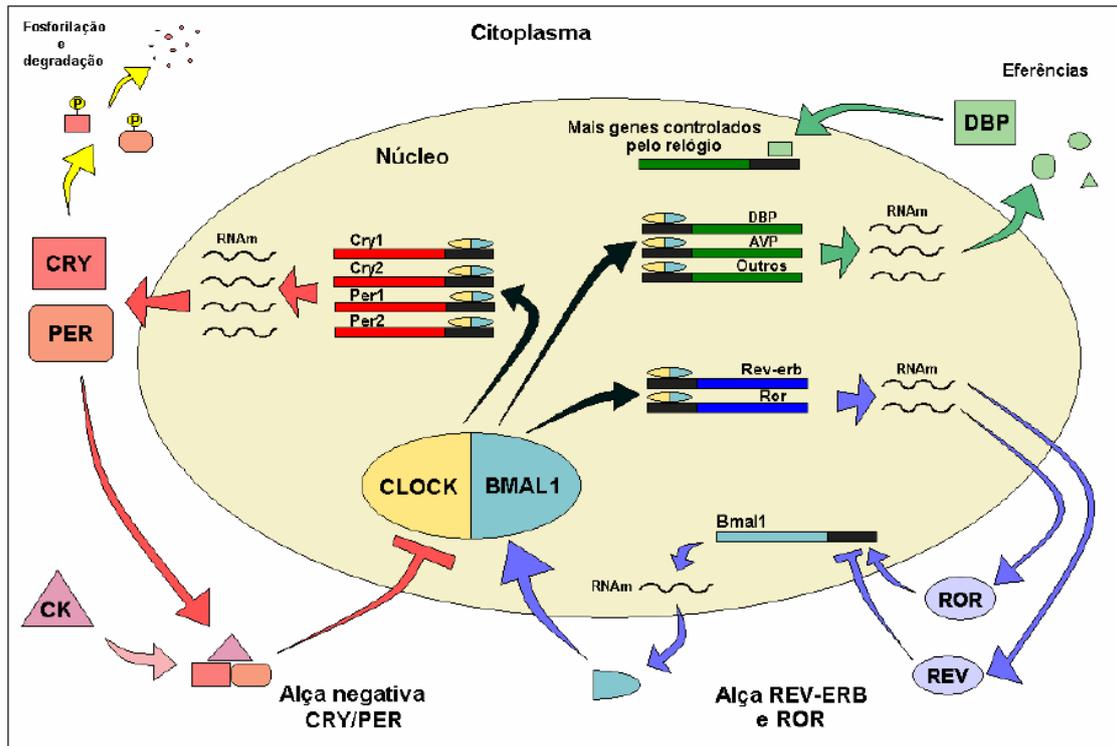
O funcionamento básico do sistema de oscilação endógeno é regulado por um conjunto de genes (*Clock genes*), que possuem mecanismos auto-regulatórios de sua transcrição e tradução (PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009; CECON e FLÔRES, 2010). As primeiras evidências do envolvimento de genes com a ritmicidade circadiana foram descritas em *Drosophila* mutantes, que apresentavam o ritmo de atividade locomotora anormal (KONOPKA e BENZER, 1971).

Há duas alças principais na regulação molecular da ritmicidade circadiana. Na primeira, proteínas CLOCK e BMAL formam um heterodímero (CLOCK:BMAL) que por meio da interação com E-box, ativam a transcrição dos genes *Per* e *Cry*. As proteínas destes, por sua vez, também formam um heterodímero, PER:CRY, que inibem a ação de CLOCK:BMAL, diminuindo, por consequência, a transcrição dos próprios genes. Os níveis de PER e CRY diminuem, até não serem mais capazes de inibir a atividade de CLOCK:BMAL, o que dá início a um novo ciclo (Figura 1) (YOO et al., 2004; OKAMURA et al., 2010; BUHR e TAKAHASHI, 2013).

Outra via de regulação, também ativada por CLOCK:BMAL, promove a transcrição de *Rev-erba* e *Rora*, que competem pela ligação a elementos responsivos ao receptor órfão relacionadas com o ácido retinóico (ROR), presentes no promotor de *Bmal* (Figura 1) (PREITNER, 2002; AKASHI e TAKUMI, 2005). A partir daí estas proteínas tem papéis antagônicos, *REV-ERBa* inibe a transcrição de *Bmal*, enquanto *RORa* a ativa (GUILLAUMOND et al., 2005). Além disto, as proteínas DEC1 e DEC2 também parecem inibir o funcionamento de CLOCK:BMAL, competindo pelos elementos E-box ou interagindo diretamente, através de domínios proteína:proteína (HONMA, 2002).

Existem ainda outros genes (*Clock-Controlled Genes*) que são controlados pelo relógio molecular, como, por exemplo, o *Dbp* (D-box binding protein), (RIPPERGER et al., 2000). Estes ciclos de alças de retroalimentação ocorrem subsequente e conjuntamente, e duram aproximadamente 24h (KO e TAKAHASHI, 2006; CECON e FLÔRES, 2010).

**Figura1 – Representação da regulação molecular de genes circadianos em mamíferos**



Esquema representativo da regulação de genes circadianos. As setas apontam para a ativação, já as barras indicam inibição/supressão.

Fonte: CECON e FLÔRES, 2010.

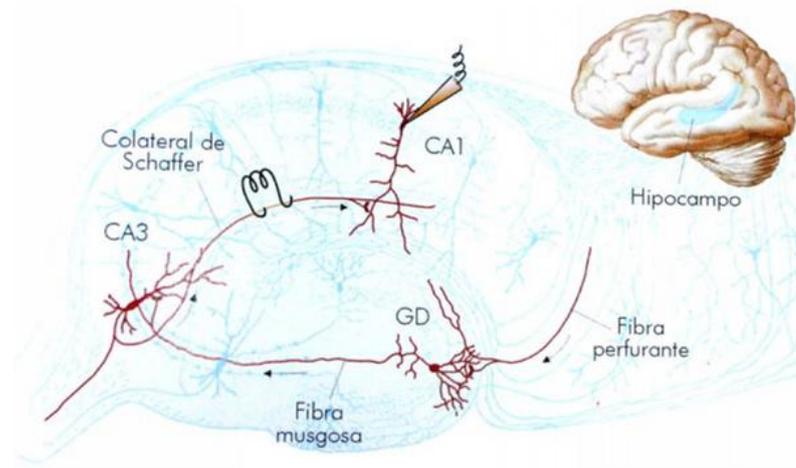
Embora os NSQ sejam o marca-passo central, eles funcionam de maneira sincronizada com a ação de osciladores periféricos, que também variam independentemente e podem ter influência sob o oscilador central (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; SCHEIERMANN, KUNISAKI e FRENETTE, 2013). O fígado, o sangue e os rins são exemplos desses sincronizadores periféricos (GERY e KOEFFLER, 2010; RANA et al., 2014). Além disto, estruturas do próprio cérebro como glândulas pineal e pituitária, hipotálamo ventral, os núcleos no bulbo olfatório (ABE et al., 2002) e, de nosso particular interesse, o hipocampo também apresentam oscilação diária de diversos fenômenos (CHAUDHURY, WANG E COLWELL, 2005). Os mecanismos fisiológicos e moleculares associados ao controle temporal das atividades relacionadas ao hipocampo estão começando a ser explorados.

## 2.2 Ritmo circadiano e hipocampo

Nos roedores, o hipocampo localiza-se bilateralmente nos lobos temporais, entre sua porção medial e o tálamo. O hipocampo se comunica por meio de feixes de fibras com outras regiões do sistema límbico (SHARMA et al., 2007). A formação hipocampal é constituída de quatro partes: o giro denteado (GD), o hipocampo propriamente dito (corno de Amon - CA, que é subdividido em CA1, CA2 e CA3), o complexo subicular e o córtex entorrinal. O corno de Amon é dividido em três camadas: molecular, polimorfa e camadas de células piramidais, de acordo com a disposição dos axônios e dendritos, as camadas subdividem-se em lâminas. O giro denteado também é composto por três camadas: molecular, granular e hilo e é composto por vários tipos celulares (LOPES DA SILVA et al., 1990).

A circuitaria hipocampal é unidirecional (AMARAL et al., 1989), sendo o córtex entorrinal, a principal via de aferência do hipocampo. Assim, a informação chega ao córtex entorrinal e suas fibras a levam para as células granulares da camada molecular do giro denteado. As fibras musgosas (axônios das células granulares) transmitem-na para as células piramidais de CA3, que por meio da via colateral de Schaffer, projetam-na às fibras de CA1, que então a emitem ao complexo subicular (Figura 2). Essa é a tradicional via tri-sináptica hipocampal, na qual o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório. Além da via clássica, existem outras conexões dentro desta estrutura. O córtex entorrinal, por exemplo, faz sinapses diretas com CA1, desta região também saem fibras colaterais que inervam CA3 (MCNAMARA, 1994 *apud* ROCKENBACH, 2011).

**Figura 2 – Representação da circuitaria tri-sináptica hipocampal**



Fonte: Lent, 2010.

O hipocampo está envolvido em diversos processos, como a formação da memória, sendo assim importante para aprendizagem e cognição. Já foi descrito que várias propriedades desta estrutura seguem regulação temporal, incluindo fenômenos estruturais e fisiológicos.

De fato, hamsters submetidos a fotoperíodos com dias longos (claro/escuro 16h/8h) tem aumento do comprimento dos dendritos e da complexidade dendrítica após pulsos de escuro durante a manhã, além de aumentar a densidade de espinhos no giro denteado. Enquanto pulsos de luz no início da noite de dias curtos (claro/escuro 8h/16h) promovem diminuição da ramificação dendrítica e da densidade dos espinhos, bem como aumento de dendritos apicais primários em CA1. Isto indica que pulsos de luz induzem remodelamento da morfologia dendrítica de maneira específica para cada sub-região hipocampal (IKENO, WEIL e NELSON, 2014).

O comprimento total e o número de dendritos, a complexidade dendrítica e a distância da intersecção mais afastada do corpo celular, por sua vez, têm ritmo diário apenas em dias curtos, enquanto a densidade de espinhos dendríticos tem ritmicidade com picos diferentes entre as sub-regiões CA1 e GD e também entre dias longos e curtos, o que reforça a influência do fotoperíodo sobre a morfologia de dendritos em neurônios hipocampais (IKENO, WEIL e NELSON, 2013).

Há evidências de que essas mudanças estruturais ao longo do dia dependam de um controle hormonal. De fato, alguns hormônios que têm ritmo diário de secreção exercem influência sobre o remodelamento hipocampal. O tratamento crônico com melatonina promove o desenvolvimento de dendritos e a formação de espinhas em neurônios hipocampais (GONZÁLEZ-BURGOS et al., 2007; RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011), bem como o tratamento agudo induz dendritogênese em cultura de células hipocampais (DOMÍNGUEZ-ALONSO et al., 2012). Após 4h do tratamento com melatonina há aumento do tamanho e da complexidade de espinhos dendríticos em CA1, assim como diminuição da densidade dos espinhos no giro denteado, sugerindo que o remodelamento de neurônios hipocampais é regulado pelo relógio circadiano, e que este processo pode ser coordenado pelo ritmo diário de melatonina. Em relação a mecanismos moleculares, após o tratamento agudo com melatonina, os genes *Per1* e *Bmal* têm expressão aumentada, o que sugere que esta pode ser uma das vias moleculares que está associada ao processo de regulação de funções hipocampais ao longo do dia (IKENO e NELSON, 2014).

Com relação a processos fisiológicos que sofrem modulação ao longo do ciclo circadiano, destaca-se a neurogênese hipocampal e a potenciação de longa duração (LTP).

Quanto à neurogênese hipocampal, há ritmo diário da proliferação celular na zona subgranular do giro denteado, ocorrendo um maior número de mitoses e de novos neurônios a noite (TAMAI, SANADA e FUKADA, 2008). Esse ritmo é perdido em camundongos nocaute para *Per2* e *Bmal* (BOUCHARD-CANNON et al., 2013), indicando que genes circadianos exercem influência importante sobre a neurogênese hipocampal.

LTP é significativamente maior a noite do que de dia em duas linhagens de camundongos, em que uma secreta melatonina ritmicamente (C3H) e outra não (C57). A decadência de LTP, medida por meio de potenciais pós-sinápticos excitatórios, também sofre variação diária, em ambas as linhagens. Em escuro constante, a cepa C3H mantém o ritmo de LTP maior durante a noite. Isto evidencia a influência da oscilação circadiana sobre a plasticidade sináptica hipocampal (CHAUDHURY, WANG e COLWELL, 2005). Do ponto de vista molecular, é interessante notar que a ritmicidade da fosforilação de CREB (proteína ligante ao elemento de resposta da adenosina monofosfato cíclica), importante no processo de LTP, é perdido em camundongos que não expressam *Per1*. A ausência de *Per1* também promove alterações nas histonas, no ritmo de LTP e na expressão gênica hipocampal. Isto resulta no prejuízo do desempenho da formação da memória espacial (RAWASHDEH et al.,

2014). A memória e a aprendizagem também sofrem modulação circadiana, hamsters arrítmicos têm déficit da capacidade de memória e cognição, o que parece estar relacionado também ao sono (RUBY et al., 2008).

Assim, observa-se que diversos fenômenos dependentes do hipocampo sofrem influência da variação dia/noite, o que evidencia que esta estrutura está intimamente relacionada ao sistema de oscilação circadiana. Além do mais, desde que o sistema límbico e, particularmente, o hipocampo estão envolvidos na patogênese de determinadas condições neurológicas, é possível que o hipocampo represente um centro de convergência importante para desordens do SNC associadas a variações circadianas. Neste cenário, e de nosso particular interesse, destaca-se a condição epiléptica. De fato, há inúmeras evidências de que a crises epiléticas sofrem modulação circadiana, que parece variar de acordo com a síndrome epiléptica e com a origem do foco epileptogênico.

### **2.3 Epilepsia do lobo temporal**

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, associadas a alterações eletrofisiológicas, que levam à atividade elétrica excessiva e hipersincrônica (ENGEL, 2001). Cerca de 1% da população mundial é acometida pela patologia (OMS, 2005), o que somado à morbidade, risco de morte súbita e forte impacto sócio-econômico, faz com que a epilepsia tenha caráter prioritário nas políticas de saúde pública (LI e SANDER, 2003).

A ELT é o tipo mais frequente de epilepsia focal em adolescentes e adultos (ENGEL, 2001), sendo caracterizada por crises parciais simples ou complexas, que podem ou não ter generalizações secundárias. Aproximadamente 30% dos portadores de ELT são resistentes ao tratamento farmacológico, casos em que a ressecção cirúrgica é indicada (ENGEL, 2001). As crises da ELT têm origem em estruturas neocorticais ou mesiais, o que dá nome, respectivamente, aos subtipos: epilepsia do lobo temporal neocortical (ELTN) e epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), (BERCOVICI et al., 2012), sendo a forma mais comum desta última a associada a esclerose hipocampal (ELTM-EH) (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006).

O processo epileptogênico da ELTM é constituído caracteristicamente por 3 fases: insulto inicial, período de latência e período crônico (MATHERN et al., 1996).

Há diversos modelos experimentais que mimetizam o processo que ocorre em humanos (PITKANEN, 2006), dentre os quais destacam-se o de crises crônicas ou epilepsia induzidas por injeção de convulsivantes químicos (ELLIOT e LOWESTEIN, 2004). De fato, em roedores, a administração de pilocarpina intraperitoneal desencadeia um processo epileptogênico bastante similar ao que ocorre na ELTM-EH humana. O *status epilepticus* (SE) gerado pela injeção de pilocarpina seria o insulto inicial caracterizado por crises generalizadas autossustentadas; após a reversão do SE, dá-se um período de latência em que os animais não apresentam crises comportamentais; o fim do período de latência ocorre quando os animais passam a manifestar crises espontâneas e recorrentes – fase crônica (CURIA et al., 2008). Durante todo o processo, há uma série de alterações celulares e moleculares, tais como modificação do perfil de expressão gênica, resposta inflamatória, glial e vascular, superexpressão de fatores de crescimento e morte neuronal. Numa fase tardia, ocorre astrogliose, angiogênese, neurogênese, plasticidade neuronal e aumento da tendência à atividade sincrônica (JACOBS et al., 2009).

Recentemente, esses modelos começaram a ser utilizados para investigar interação entre alterações no ritmo circadiano e o processo epileptogênico.

#### **2.4 Epilepsia do lobo temporal e alterações circadianas em modelos experimentais de epilepsia**

Para a investigação da relação entre epilepsia e ritmo circadiano tem-se utilizado diferentes modelos experimentais e, em geral, esses estudos têm focado em abordagens comportamentais.

Em ratos com epilepsia de ausência a frequência de crises é maior nas primeiras horas da fase escura (VAN LUIJTELAAR e COENEN, 1988).

Em cepa de rato geneticamente susceptível a crises audiogênicas, foi visto que a susceptibilidade às crises é maior na fase escura (WADA e ASAKURA, 1970). Camundongos submetidos a estímulos audiogênicos também são mais susceptíveis a crises na fase escura (SCHREIBER e SCHLESINGER, 1972; POIREL, 1984). Quando esses animais são submetidos a claro ou escuro constante a susceptibilidade aumenta (SCHREIBER E SCHLESINGER, 1972).

Ratos submetidos à estimulação elétrica da amígdala durante a fase escura (às 22h) por vários dias apresentam níveis mais graves de crise após menos dias de estimulação do que

aqueles submetidos ao abrasamento na fase clara (às 10h). Contudo, não foi vista diferença significativa do limiar para crises entre os dois horários de estimulação (FREEMAN, 1980).

Em modelo de epilepsia induzida por estimulação contínua do hipocampo a frequência das crises é maior na fase clara do ciclo circadiano (BERTRAM e CORNETT, 1994; QUIGG et al., 1998; QUIGG et al., 2000). O tempo de latência é menor para a ocorrência de crise entre 14h e 22h nesse modelo (MATZEN, BUCHHEIM e HOLTKAMP, 2012). Taxas de disparo de alta amplitude e curta duração seguem um padrão de oscilação ao longo do dia, após o abrasamento elétrico do hipocampo esse perfil sofre um brusco deslocamento de fase (TALATHI et al., 2009; STANLEY et al., 2013).

Em modelo de crise induzida por pentilenotetrazol (PTZ), há alta sensibilidade a indução de crises às 22h em camundongos (EIDMAN, BENEDITO e LEITE, 1990). A mudança brusca do fotoperíodo claro/escuro 12h/12h para 18h/6h diminui o limiar para crises clônicas em modelo de crise induzida por PTZ. Já a alteração para claro/escuro 6h/18h não promove modificações significantes. A exposição a fotoperíodos mais curtos (claro/escuro 6h/18h) ou mais longos (claro/escuro 18h/6h) durante duas semanas diminui significativamente o limiar de crise induzida por PTZ. Tanto a exposição aguda como a crônica a deslocamentos de 6h no fotoperíodo são revertidas pela administração de melatonina (TAHSILI-FAHADAN et al., 2008).

Em modelo de kainato intraperitoneal a frequência das crises é maior durante o período de inatividade de ratos. Contudo, o número de crises não foi estatisticamente significativo entre as fases (HELLIER e DUDEK, 1998). Já em modelo de kainato via intra-hipocampal, a maioria dos ratos apresentou crises durante a fase clara do dia (RAEDT et al., 2009).

A menor susceptibilidade a crises foi vista às 10:30h, enquanto às 18:30h as crises foram induzidas com doses significativamente menores, o que indica baixo limiar à indução de crises em modelo de kainato neste horário (ROBERTS e KEITH, 1994).

Em modelo de pilocarpina i.p., a latência para crises generalizadas foi menor ao longo da fase escura e foram comumente crises clônicas de corrida ou tônicas. Enquanto a latência para crises eletroencefalográficas não diferiram entre as fases clara e escura, mas durante a fase clara foram associadas a clonias faciais e de patas anteriores e elevação. Isso indica que a

sensibilidade à pilocarpina segue uma oscilação ao longo do ciclo circadiano (STEWART, LEUNG e PERSINGER, 2001).

Após administração de pilocarpina por via sistêmica, ratos tiveram aumento da atividade locomotora logo após o SE, que retornou aos níveis basais após alguns dias. Contudo, a atividade durante a fase escura permaneceu aumentada em ratos epiléticos (PERSINGER e KOREN, 1998). Ratos na fase crônica têm atraso de fase no ritmo de atividade locomotora, este atraso foi correlacionado com a ocorrência de crises (STEWART e LEUNG, 2003). A frequência de crises espontâneas foi relacionada à fase clara (ARIDA et al., 1999; STEWART e LEUNG, 2003). Enquanto outros autores dizem não haver relação da frequência de crises com a fase do ciclo (clara ou escura) (BAJORAT et al., 2011).

De um modo geral os estudos acerca da interação entre ritmo circadiano e epilepsia fazem investigação comportamental, a respeito de ocorrência, frequência ou susceptibilidade a crises. Grande parte dos modelos experimentais são mais susceptíveis a crises na fase escura. Enquanto no modelo de kainato o limiar é menor na fase clara e no de pilocarpina a relação entre crises e determinado momento do dia ainda é controverso. As vias moleculares que contribuem para esta relação são pouco estudadas até então.

Os dados encontrados mostram que embora haja evidências que as crises epiléticas sejam susceptíveis à regulação circadiana, esta relação ainda não está bem caracterizada. O entendimento desta ligação é importante, por exemplo, para o desenvolvimento da cronoterapia, que pode trazer inúmeros benefícios para pacientes portadores de alguma síndrome epilética, especialmente aqueles que são refratários ao tratamento medicamentoso (CHO, 2012).

## **2.5 Influência da variação circadiana em estudos de expressão gênica diferencial em modelo experimental de epilepsia**

Uma abordagem que tem sido muito utilizada com o objetivo de identificar vias moleculares associadas ao processo epileptogênico baseia-se em estudos de expressão gênica diferencial. De fato, tanto estudos em pacientes quanto em modelos experimentais tem revelado um inventário de genes que apresentam a expressão modulada no hipocampo em diferentes momentos da epileptogênese.

Entretanto, muitos dos genes estudados têm dados de expressão conflitantes, o que remete a problemas metodológicos, a exemplo do gene *Gfap*, que codifica uma proteína

específica do citoesqueleto de astrócitos e tem sido utilizado como um marcador de astrogliose reativa na fase aguda da epileptogênese (FELLIN e HAYDON, 2005; LI, XUE et al, 2009). Entretanto, a expressão diferencial de *Gfap* na fase crônica da epileptogênese ainda é inconsistente. Alguns autores mostram aumento da expressão de *Gfap* no hipocampo de animais epiléticos (SOHL et al., 2000; XU et al., 2011), enquanto outros não observaram alteração dos níveis de expressão (STEWART et al., 1990; TORRES et al., 1992; HOLMBERG et al., 2006; PERNOT et al., 2010). A técnica *RT-qPCR* é o método mais poderoso e atualmente o mais utilizado em estudos de expressão gênica diferencial. Entretanto, por ser bastante sensível, com capacidade de detectar pequenas quantidades de transcritos, torna-se necessário controlar muito bem as condições experimentais. Neste tipo de análise, o impacto de variações experimentais causadas por fatores técnicos (erros de pipetagem, eficiência da transcrição reversa, qualidade do RNA (ácido ribonucléico), gene de referência utilizado como normalizador) ou biológicos (idade, sexo, tecido) podem levar a resultados imprecisos e a conclusões equivocadas (MARQUES et al., 2013; de ARAÚJO et al., 2014). O reconhecimento desses fatores, portanto, é essencial para um desenho experimental apropriado. Neste aspecto, destacamos dois fatores:

- 1) Genes de referência: vários estudos têm mostrado que a seleção de normalizadores inadequados influencia nos resultados de expressão gênica, e que a escolha destes genes deve considerar as condições experimentais, espécies e tecidos analisados (KOSIR et al., 2010; MARQUES et al., 2013; de ARAÚJO et al., 2014).

- 2) Oscilação diária na expressão gênica: este fenômeno deve ser uma fonte importante de variação em estudos de expressão gênica diferencial, especialmente quando se usa o método *de RT-qPCR*. De fato, recentemente, Hsu e Harmer (2012) demonstraram, em estudo de larga escala, que mesmo 30 minutos de diferença na fase circadiana podem causar diferenças significativas na expressão de um grande número de genes.

### 3 JUSTIFICATIVA

O ritmo circadiano controla vários aspectos da fisiologia, como a regulação do ciclo sono-vigília, da temperatura corporal e da secreção de alguns hormônios. Este conjunto de ritmos biológicos, que varia em torno de 24h, também exerce influência sobre diversos processos que ocorrem no ambiente hipocampal, como eventos relacionados à formação da memória e à aprendizagem. Distúrbios no controle do ritmo circadiano estão associados com diversas patologias, entre os distúrbios que sofrem influência da oscilação circadiana está a epilepsia. Fatores como frequência e ocorrência de crises epiléticas podem ser modulados pela variação ao longo do dia. Uma frente de estudo que tem se destacado é o estudo de vias moleculares subjacentes à relação entre ritmo circadiano e epilepsia. A variação da expressão ao longo do dia pode interferir nos estudos de expressão diferencial, e isto pode estar envolvido com os eventos modulados durante o ciclo circadiano no processo epilético (ou em outra condição estudada).

Diante do exposto, a realização deste trabalho justifica-se em suas 3 frentes de estudo:

- Identificação de genes de referência para estudos de ritmo circadiano em hipocampo. Apesar do hipocampo ser uma estrutura bastante utilizada nas abordagens de expressão gênica diferencial mesmo em estudos circadianos, ainda não há na literatura trabalhos que tenham identificados genes de referência adequados para esses estudos.
- Investigação de vias moleculares associadas à modulação temporal da fisiologia hipocampal. Diversas funções importantes do hipocampo sofrem variação ao longo do ciclo circadiano, como fenômenos relacionados à memória e à cognição. Entre os eventos que variam estão o LTP, a neurogênese e características estruturais de dendritos. Apesar desses fatos, pouco se conhece sobre as vias moleculares responsáveis pelo controle temporal desses fenômenos. Algumas evidências sugerem o envolvimento de genes do relógio nesses processos, bem como em outras funções, que não estão diretamente relacionadas à temporização circadiana. A caracterização sistemática do perfil de expressão de genes do relógio no hipocampo de ratos *Wistar*, ao longo de 24 horas, representa uma etapa importante, embora inicial, neste processo de investigação.
- Investigação do impacto da oscilação diária em estudos de expressão gênica diferencial em modelo experimental de ELT.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral:

Identificar genes de referência para estudos de ritmo circadiano e avaliar o perfil de expressão de genes circadianos em hipocampo de ratos *Wistar*, bem como avaliar o impacto do estabelecimento de grupos experimentais em diferentes horários em estudos de expressão gênica em epilepsia.

### 4.2 Específicos:

- Avaliar a estabilidade de expressão de potenciais genes de referência, por meio dos softwares *geNorm* e *NormFinder*, em hipocampo de ratos *Wistar* ao longo do ciclo circadiano;
- Analisar a expressão de genes *Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3* em hipocampo de ratos *Wistar* ao longo do ciclo circadiano;
- Investigar a expressão dos genes *Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3* em hipocampo de ratos epiléticos, quando comparados a diferentes ZTs de animais controle;
- Avaliar a expressão de *Gfap* em hipocampo de ratos *Wistar* ao longo do ciclo circadiano;
- Analisar a expressão de *Gfap* em hipocampo de ratos epiléticos quando comparados a diferentes ZTs de animais controle.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Estabelecimento dos grupos experimentais

#### 5.1.1 Animais

Para os experimentos foram usados 35 ratos *Wistar*, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (Biocen - UFAL), pesando entre 400-450g, com idade média de 6 meses, que foram condicionados sob ciclo claro/escuro 12h/12h, a 22°C e com livre acesso à água e comida. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL, com protocolo 02/2012 (Anexo A). Para a manipulação dos animais, foram seguidas as instruções normativas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Todas as medidas possíveis para diminuir o sofrimento dos animais foram tomadas.

#### 5.1.2 Grupos experimentais

##### A) Grupo Controle

Foram utilizados 30 animais para o grupo controle, distribuídos em 6 horários de coleta (n=5/ZT), intervalados a cada 4 horas ao longo do ciclo circadiano. As luzes do biotério acendem às 6h da manhã e este horário é o correspondente ao primeiro *Zeitgeber Time* (ZT) avaliado. Os pontos avaliados foram: ZT00, ZT04, ZT08, ZT12, ZT16 e ZT20, os 3 primeiros na fase clara do ciclo, e os 3 últimos na fase escura. Estes animais foram manipulados no Laboratório de Cronobiologia Molecular, UFAL, *Campus Arapiraca*.

##### B) Grupo Epiléptico

Para este grupo usaram-se 5 animais, que foram eutanasiados no horário correspondente ao ZT08. O grupo epiléptico foi estabelecido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFAL.

#### 5.1.3 SE induzido por pilocarpina intraperitoneal

Os animais foram submetidos à administração intraperitoneal de butilbrometo de escopolamina (1mg/kg) e após um intervalo de 30min tratados com pilocarpina (300mg/kg, i.p.) para indução do SE. A partir daí, os animais foram monitorados por câmera filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). O SE foi considerado após a ocorrência de crises sustentadas por um período de pelo menos 5 minutos (SHORVON, 1994; LOWENSTEIN e

ALLDREDGE, 1998). Após 90min de SE, os animais foram tratados com diazepam (5mg/kg, i.p.) a cada 30min, até que as crises fossem abortadas completamente. Nos 3 dias seguintes ao SE, quando necessário, foi realizada reposição hidroeletrólítica com soro fisiológico (0,9%) e soro glicosado (5%) i.p..

#### 5.1.4 Avaliação das crises espontâneas e recorrentes

No terceiro dia após o SE os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas de acrílico e monitorados por câmera filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA) diariamente em média por 6h para a detecção de crises epiléticas. A caracterização da fase crônica foi baseada na ocorrência de pelo menos duas crises com gravidade maior ou igual ao nível 3 da escala de Racine (RACINE, 1972).

## 5.2 Dissecção dos hipocampos

Os animais foram imobilizados, decapitados em guilhotina, o cérebro foi removido e os hipocampos dissecados em superfície fria e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-180°C). As estruturas foram mantidas em *freezer* -80°C até o processamento das amostras.

## 5.3 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA foi extraído usando Trizol, seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações.

Os hipocampos esquerdos foram transferidos do *freezer* -80°C para nitrogênio líquido. Foram adicionados 350µL de Trizol a cada tubo contendo o hipocampo esquerdo, o conteúdo foi macerado com pistilos para tubo, adicionaram-se 140µL de clorofórmio, que foram então homogeneizados por inversão dos tubos e mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 3min. As amostras foram centrifugadas (Heal Force ® - High speed refrigerated bench) a 12000g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase contendo o RNA (fase aquosa) foi transferida para outro tubo. O conteúdo remanescente foi armazenado em *freezer* -80°C. Foram adicionados 175µL de isopropanol à fase aquosa, que foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 30min. As amostras foram, então, centrifugadas a 12000g por 30 minutos, a 4°C. Depois disto, o *pellet* de RNA foi visualizado. O líquido foi desprezado cuidadosamente por inversão do tubo e foi adicionado 1mL de etanol 75% . Em seguida, os *pellets* foram deslocados em vórtex e centrifugados a 12000g por 5 minutos, a

4°C. O sobrenadante foi desprezado e os processos de lavagem com etanol 75% e centrifugação repetidos. O conteúdo líquido foi novamente desprezado e os tubos mantidos invertidos em papel absorvente. Os *pellets* foram ressuspensos em 30µL de água milli-Q tratada com dietilpirocarbanato (DEPC) e mantidos 20min à temperatura ambiente e 40min em gelo, para solubilização. Os RNAs foram mantidos em *freezer* -80°C. Todas as soluções usadas foram preparadas com água DEPC.

### 5.3.1 Quantificação das amostras de RNA

A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas por espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza dos RNAs foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e a 280nm.

Nas tabelas 1 e 2 estão dispostos a pureza, a concentração e o volume de RNA usados nos experimentos dos grupos controle e epilético, respectivamente. No grupo controle, as concentrações variaram entre 1,256µg/µL a 3,424µg/µL, enquanto no grupo crônico a variação foi de 1,916µg/µL a 3,496µg/µL. Já os valores da razão  $OD_{260}/OD_{280}$  variaram entre 1,23 a 1,74 no grupo controle e 1,65 e 1,81 no grupo epilético. O que indica que as amostras estão adequadas para experimentos de *RT-qPCR*.

**Tabela 1- Pureza, concentração e volume de RNA extraído do hipocampo do grupo controle**

ZT	Amostra	Razão OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Concentração (µg/µL)	Volume de RNA usado (1µg)
0	1	1,72	2,632	0,37993921
	2	1,74	1,912	0,52301255
	3	1,62	2,088	0,4789272
	4	1,65	2,400	0,41666667
	5	1,69	2,584	0,3869969
4	6	1,55	2,080	0,48076923
	7	1,63	1,984	0,50403226
	8	1,67	2,664	0,37537538
	9	1,62	2,552	0,39184953
	10	1,53	2,296	0,43554007
8	12	1,53	2,744	0,36443149
	13	1,57	2,760	0,36231884
	14	1,73	2,456	0,40716612
	15	1,51	2,152	0,46468401
	16	1,66	2,424	0,41254125
12	18	1,58	2,608	0,38343558
	19	1,52	2,296	0,43554007
	20	1,4	1,656	0,60386473
	21	1,47	2,448	0,40849673
	22	1,4	1,976	0,50607287
16	24	1,55	2,928	0,34153005
	25	1,57	3,424	0,29205607
	26	1,5	2,344	0,42662116
	27	1,57	2,672	0,3742515
	28	1,23	1,256	0,79617834
20	30	1,6	3,064	0,32637076
	31	1,55	2,792	0,35816619
	32	1,57	2,848	0,3511236
	33	1,54	2,352	0,42517007
	34	1,55	2,856	0,35014006

Fonte: Autora, 2015.

**Tabela 2- Pureza, concentração e volume de RNA extraído de hipocampo do grupo crônico**

ZT	Amostra	Razão OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Concentração (µg/µL)	Volume de RNA usado (1µg)
	1	1,65	2,096	0,477099237
	2	1,81	1,916	0,521920668
8	3	1,66	2,944	0,339674
	4	1,75	2,732	0,366032211
	5	1,68	3,496	0,28604119

Fonte: Autora, 2015.

#### 5.4 Seleção de genes de referência

Os genes de referência foram selecionados com base numa revisão sistemática realizada previamente por nosso grupo de estudo. Nesta revisão, o objetivo foi selecionar genes comumente usados como normalizadores para estudos com modelos experimentais de ELT. Tendo em vista a escassez de estudos com genes de referência para ritmo circadiano, optamos por avaliar a expressão desses genes também ao longo do ciclo circadiano.

Os genes usados foram *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb*, *Polr1a*, *Ppia*, *Rplp1* e *Tubb2a*.

#### 5.5 Análise da expressão de *Gfap*

*Gfap* foi selecionado para análise da influência da variação da expressão ao longo do dia. Este gene foi avaliado em todos os pontos do grupo controle e também no ZT08 do grupo epiléptico.

#### 5.6 Primers para os genes estudados

Os primers para os genes de referência e para *Gfap*, *Clock*, *Cry1*, *Per1* e *Per3* foram desenhados com uso dos programas *Oligo Explorer 1.4* e *Oligo Analyzer 1.4* (Gene Link, NY, USA), a partir das sequências disponíveis no NCBI. Enquanto os primers usados para os genes *Bmal* e *Cry2* foram retirados do artigo *Cadmium-induced disruption in 24-h expression of clock and redox enzyme gene* (JIMÉNEZ-ORTEGA, 2011).

Os primers foram desenhados em éxons diferentes para permitir a diferenciação de produtos de amplificação de DNA genômico. Na tabela 3 estão dispostas as sequências dos primers, os números de acesso dos genes e o tamanho dos amplicons.

**Tabela 3- Sequência dos primers usados para RT-qPCR**

Gene	Símbolo	Número de acesso	Sequência dos primers 5'-3'	Amplicon (pb)
Beta-actina	<i>Actb</i>	NM_031144.2	F - AGCCTTCCTCCTGGGTATG R - GAGGTCTTTACGGATGTCAAC	92
Beta-2-Microglobulina	<i>B2m</i>	NM_012512.1	F- ATCTTTCTGGTGCTGTCTCT R - TGAGGTGGGTGGAAGTGAAGA	140
Beta-tubulina	<i>Tubb2a</i>	NM_001109119.1	F - TTGTGTTCCGGTCAGAGTGGT R - GACTCCTTCCTCACCACATC	103
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Gapdh</i>	NM_017008.3	F - TCCATTCTCCACCTTTGATGCT R - ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTCAT	104
Beta-glucuronidase	<i>Gusb</i>	NM_017015.2	F - CCGTGGAAACAGGAATGAG R - CTCAGGTGTTGTCATCGTCA	121
Peptidil-prolil-isomerase A (Ciclofilina A)	<i>Ppia</i>	NM_017101.1	F- AGCACTGGGGAGAAAGGATT R- GATGCCAGGACCTGTATGCT	174
RNA polimerase I murino	<i>Polr1a</i>	NM_031772.1	F - CAGGAGAAGTGCCTGAGACC R - TCCTCCTCTCCGATTCTCT	188
Proteína ribossomal, grande, P1	<i>Rplp1</i>	NM_001007604.1	F - GCATCTACTCCGCCCTCA R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT	58
Proteína glial fibrilar ácida	<i>Gfap</i>	NM_017009.2	F - AACCGCATCACCATTCTCTGT R - CATCTCCACCGTCTTTACCAC	123
Circadian locomotor output cycle kaput	<i>Clock</i>	AB019258.1	F-CTTCAGTTCAGCAGCCAGC R-GCTCTGTTGTAGTGAAAGGCA	125
Criptocromo1	<i>Cry1</i>	NM_198750.2	F-CAGTTGGGAAGAAGGGATGAAG R-ATGCTCCAGTCGGCGTCAA	60
Período1	<i>Per1</i>	NM_001034125.1	F-GCAGAAACAACAGCCACGGT R-GTCCACACAAGCCGTTACATCG	115
Período3	<i>Per3</i>	NM_023978.2	F-CCACAGCATCAGTACAGCAAG R-GCTCTGTCTCTGTCTATCCT	142
Brain and muscle Arnt-like protein-1	<i>Bmal</i>	NM_024362.2	F-CCGTGGACCAAGGAAGTAGA R-CTGTGAGCTGTGGGAAGGTT	97
Criptocromo2	<i>Cry2</i>	NM_133405.2	F-ATTGAGCGGATGAAGCAGAT R-CCACAGGGTGACTGAGGTCT	103

Fonte: Autora, 2015.

## 5.7 Experimentos de RT-qPCR

### 5.7.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase. Aos volumes das amostras de RNA total foram adicionados tampão de DNase (1x) (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de RNaseOUT (Invitrogen). Os conteúdos foram incubados a 37°C, durante 10min. Em seguida, foi adicionado EDTA 5mM e as reações foram, então, incubadas a 75°C por 10min.

Foram usados 10 $\mu$ L do RNA tratado para síntese de cDNA. O volume restante foi armazenado em *freezer* -80°C.

Para a síntese de cDNA foi usado 1 $\mu$ g de RNA total. Utilizou-se o kit High Capacity (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 2 $\mu$ L de RT *Buffer*, 0,8 $\mu$ L de dNTP 25x (100mM), 2 $\mu$ L de RT *Random Primers* (10x), 1 $\mu$ L de *Multiscribe Reverse Transcriptase* (50U/ $\mu$ L) e 4,2 $\mu$ L de água DEPC. As reações foram incubadas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 180 $\mu$ L de água DEPC. O volume total foi dividido em 4 alíquotas (50 $\mu$ L), que foram armazenadas em *freezer* -80°C.

### 5.7.2 Reações de amplificação

Os perfis de expressão dos genes estudados foram obtidos por meio do método *RT-qPCR*, as reações foram realizadas utilizando o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems).

As reações foram feitas em triplicata e eram compostas de 2,5 $\mu$ L de cada amostra de cDNA, 6 $\mu$ L de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 $\mu$ L de água DEPC, 3 $\mu$ L de cada *primer* em concentrações específicas (Tabela 4), constituindo um volume de 12 $\mu$ L. As seguintes condições foram aplicadas para a amplificação: ativação enzimática a 95°C por 10min; seguida de 40 ciclos de desnaturação, 95°C por 15seg e anelamento e extensão, 60°C por 1min. Ao término, foi realizada a 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 (Figura 3). O *software StepOnePlus™* (Applied Biosystems) determinou automaticamente o número de ciclos de PCR em que o limiar da curva de amplificação foi atingido – *cycle threshold* (CT).

Tabela 4 – Concentração dos primers utilizada nas reações de *RT-qPCR*

Gene	Concentração final na reação (µM)
<i>Actb</i>	0,2
<i>B2m</i>	0,4
<i>Tubb2a</i>	0,4
<i>Gapdh</i>	0,4
<i>Gusb</i>	0,4
<i>Ppia</i>	0,6
<i>Polr1a</i>	0,4
<i>Rplp1</i>	0,2
<i>Gfap</i>	0,2
<i>Clock</i>	0,2
<i>Cry1</i>	0,4
<i>Per1</i>	0,4
<i>Per3</i>	0,4
<i>Bmal</i>	0,4
<i>Cry2</i>	0,4

Fonte: Autora, 2015.

### 5.7.3 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação

Foram geradas curvas-padrão com base em cinco pontos de diluição: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, para determinação da eficiência dos *primers*. Para isso, utilizou-se o valor de CT (*cycle threshold*) obtido em cada diluição *versus* o log das respectivas diluições. Então, a eficiência de amplificação (E) foi calculada por meio da fórmula:

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

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

Todos os *primers* funcionaram com eficiência entre 90-110% (Tabela 5), pré-requisito necessário para estudos de expressão gênica que fazem análise por meio do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), usado na técnica RT-qPCR.

A curva de dissociação foi feita para verificação da especificidade das reações e formação de dímeros. Ao observar a formação de apenas um pico nas curvas, é constatada a amplificação específica do fragmento alvo. A Figura 3 mostra as curvas de dissociação de todos os *primers*. Para o *primer Per1*, observou-se a formação de um segundo pico nos controles negativos, realizamos eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da amplificação (Figura 4) e constatamos a ausência de amplificação inespecífica, já que nas

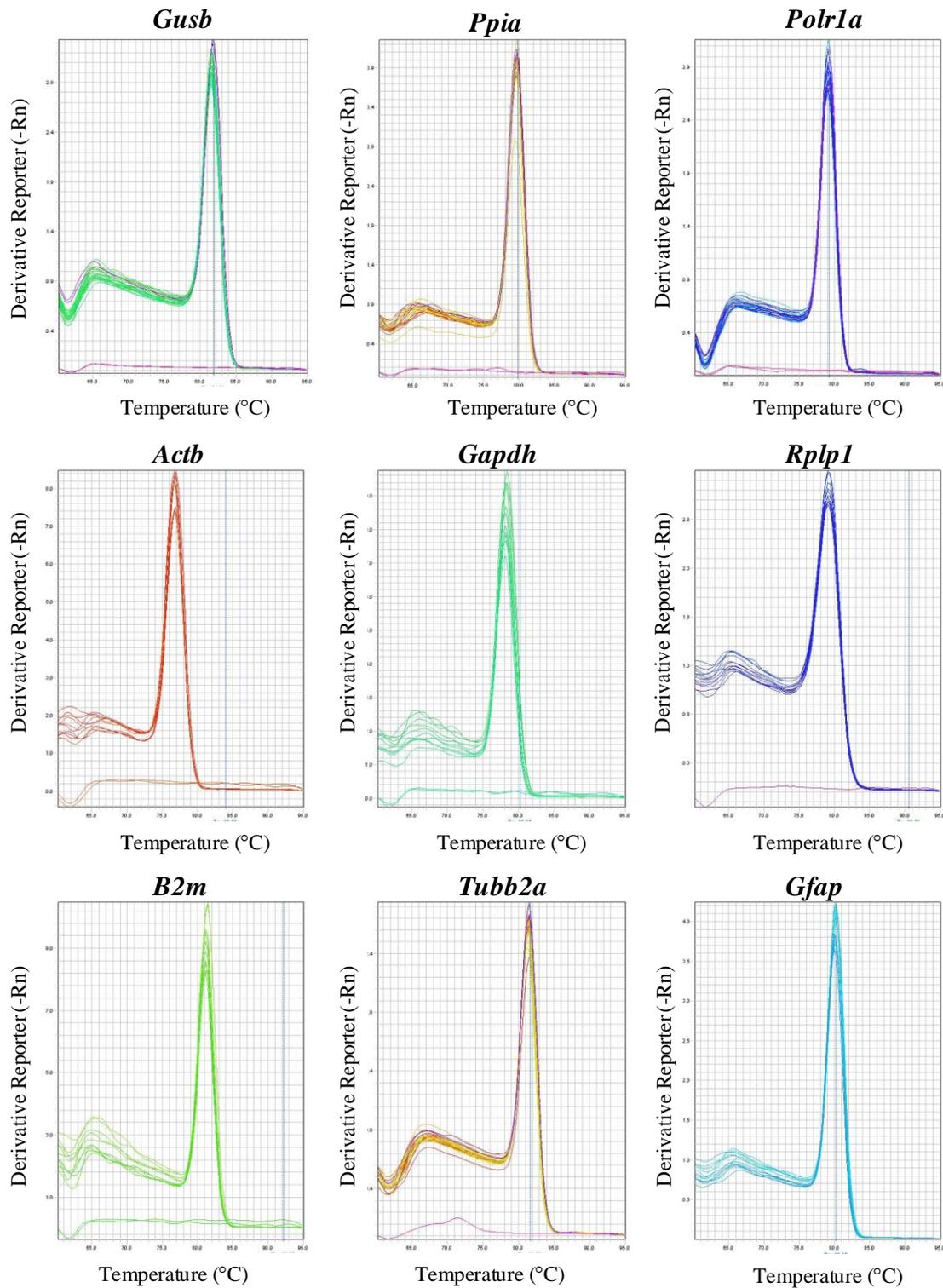
raias (16 e 17) onde os controles negativos foram aplicados apenas pequenos fragmentos foram observados, indicando a formação de dímeros, mas não de produto inespecífico.

**Tabela 5 – Eficiência de amplificação dos *primers***

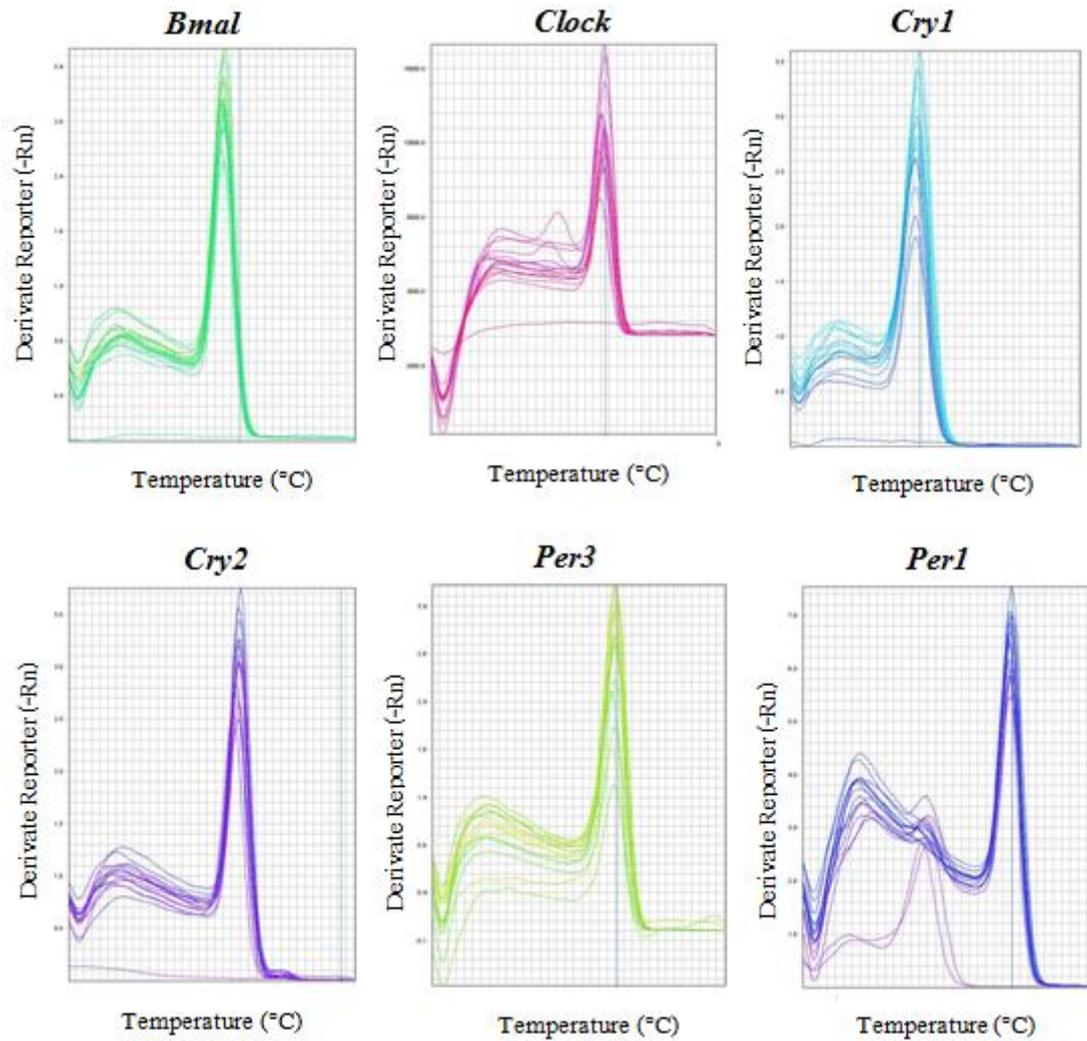
<b>Gene</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<i>Actb</i>	96,61
<i>Ppia</i>	100,07
<i>Polr1a</i>	92,47
<i>Tubb2a</i>	95,46
<i>Gapdh</i>	96,57
<i>Gusb</i>	99,7
<i>B2m</i>	98,81
<i>Rplp1</i>	95,79
<i>Gfap</i>	91,18
<i>Per3</i>	90,22
<i>Bmal</i>	97,66
<i>Cry1</i>	99,78
<i>Cry2</i>	98,63
<i>Clock</i>	109,00
<i>Per1</i>	103,93

Fonte: Autora, 2015.

Figura 3 - Curvas de dissociação dos *primers* analisados, geradas pelo programa *StepOnePlus™* (Applied Biosystems)

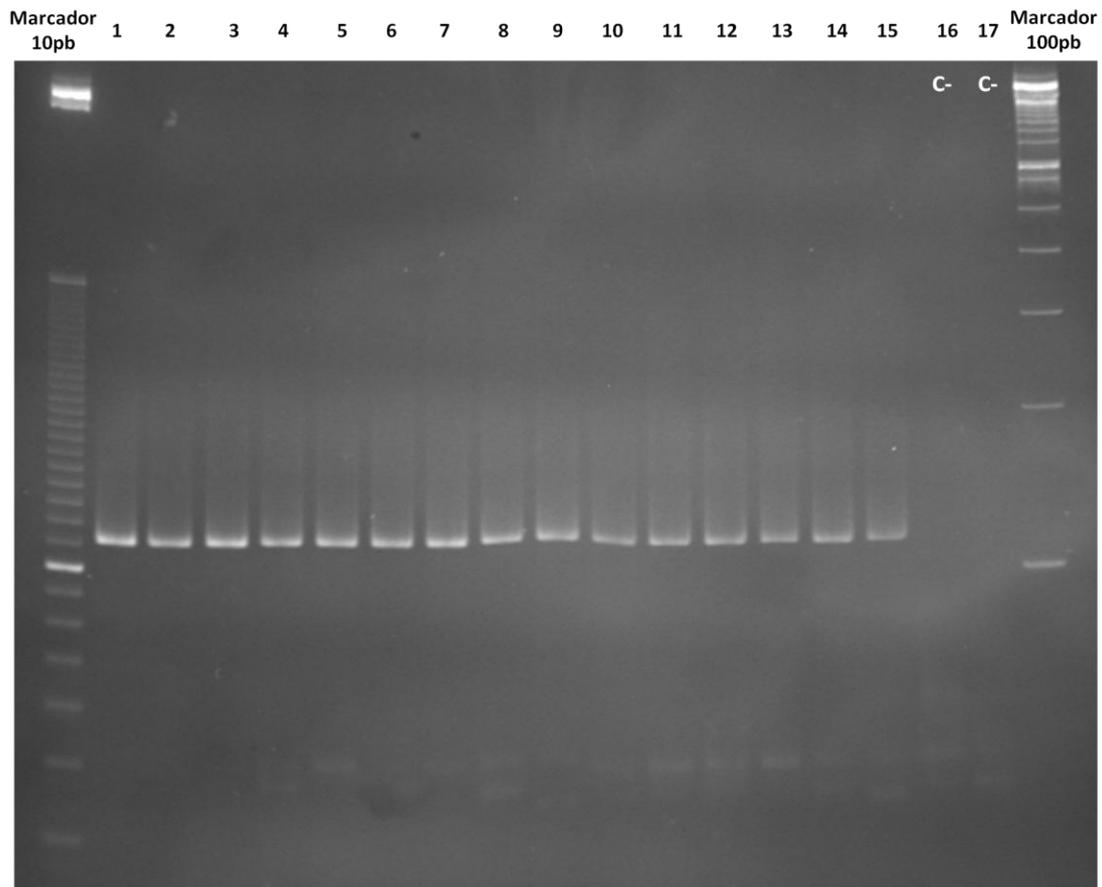


[continuação] Figura 3 - Curvas de dissociação dos *primers* analisados, geradas pelo programa *StepOnePlus*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems)



Fonte: Autora, 2015.

**Figura 4 – Gel de poliacrilamida para avaliação da amplificação de *Per1***



Fonte: Autora, 2015.

### 5.8 Análise da estabilidade da expressão pelos softwares *geNorm* e *NormFinder*

A análise dos perfis de expressão foi realizada por meio dos programas *geNorm* (<http://medgen.ugent.br/~jvdesomp/genorm/>) e *NormFinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>).

#### 5.8.1 *geNorm*

Este *software* ranqueia os genes quanto a estabilidade de expressão, além de indicar o número mínimo de genes necessários para uma normalização eficiente. Os CTs devem, para tanto, estar expressos em quantidades relativas, o que foi feito com base no método  $2^{-\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Estes valores são aplicados no programa que calcula a estabilidade de expressão do gene através de uma análise aos pares, em que cada gene é comparado com todos os demais. A variação da expressão de um gene para cada um dos outros gera o valor de variação. A média aritmética destes valores dá origem ao índice M. Quanto menor o índice M, menor a variabilidade da expressão e mais estável é o gene.

O software *geNorm* calcula também o número mínimo de genes necessários para uma normalização eficiente, isto é feito através do logaritmo  $V_n/n+1$ , em que  $V$  é a variação entre dois conjuntos de genes normalizadores e  $n$  é o número de genes usados. Para este índice o ponto de corte é 0,15, se o valor gerado estiver abaixo disso a inclusão de mais um gene de referência não é significativa para o fator de normalização gerado (VANDESOMPELE et al., 2002).

#### 5.8.2 *NormFinder*

Este programa também requer que os valores de CTs sejam convertidos em quantidades relativas (ANDERSEN et al., 2004). A análise é feita com base nas variações de expressão intra e intergrupo de cada gene. A partir disto, o *software* calcula o valor de estabilidade de cada gene. Então, quanto menor a variabilidade da expressão entre as amostras, menor é o índice de estabilidade e maior a estabilidade de expressão.

### 5.9 Análises estatísticas

Os resultados dos grupos experimental e controle foram comparados através de teste T não pareado (GraphPad Prism, versão 5.00), para comparar os grupos ou diferentes ZTs do ciclo circadiano, e ANOVA (análise de variância) seguida de Bonferroni para comparação entre os diferentes ZTs.

Para análise da ritmicidade circadiana da expressão, foram usados os softwares *Acrophase* (<http://www.circadian.org/software.html>) e *Circwave* (<http://www.euclock.org/results/item/circ-wave.html>).

O *software Acrophase* faz análise dos dados pelo teste de Cosinor para análise estatística das variações diárias. Este programa fornece várias informações acerca de parâmetros cronobiológicos. Neste estudo foram usados a acrofase, ponto em que há maior expressão ao longo do ciclo, e a amplitude, distância entre os pontos máximo (acrofase) ou mínimo (nadir) e o ponto médio (mesor) da curva cosseno (que indica ritmicidade da expressão).

O *Circwave* produz uma curva de Fourier, adicionando médias harmônicas, para o ajuste à curva da maneira que os dados permitirem. O programa usa um teste estatístico específico (teste F) para cada harmônica que acrescentou, de maneira similar à regressão múltipla. A curva gerada pelo *software* encaixa os dados de expressão sobre o ciclo circadiano.

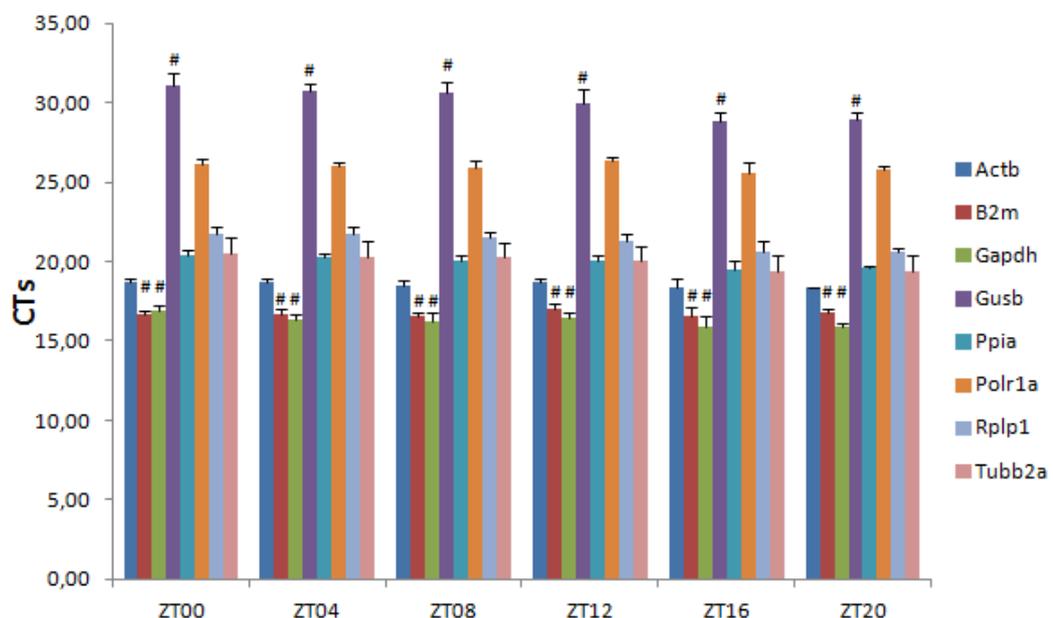
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Identificação de genes de referência para análise da expressão gênica durante o ciclo circadiano

#### 6.1.1 Análise dos níveis de expressão de potenciais genes de referência com base no CT bruto.

Desde que o nível de expressão é um dos critérios utilizados para a seleção de genes de referência, avaliamos o nível de expressão dos 8 potenciais genes de referência em hipocampo de rato, durante 6 pontos ao longo do dia, intervalados a cada 4 horas. Na figura 5 estão representadas as médias dos CTs de cada gene, nos 6 pontos (horários) estudados. Observamos que os genes *B2m* e *Gapdh* apresentaram valores de CT similares entre si e significativamente menores comparados com os demais, em todos os pontos estudados. O gene *Gusb*, por sua vez, apresentou valores de CT significativamente maiores. Embora não normalizados, esses dados indicam que os genes *B2m/Gapdh* e *Gusb* apresentam, respectivamente, os menores e os maiores níveis de expressão em todos ZTs analisados.

**Figura 5 - Níveis de expressão de potenciais genes de referência em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano**



Os valores representam média dos CTs  $\pm$  desvio padrão. ANOVA, Bonferroni. # $p < 0,001$ , com relação aos demais genes (exceto entre *B2m* e *Gapdh*).

Fonte: Autora, 2015.

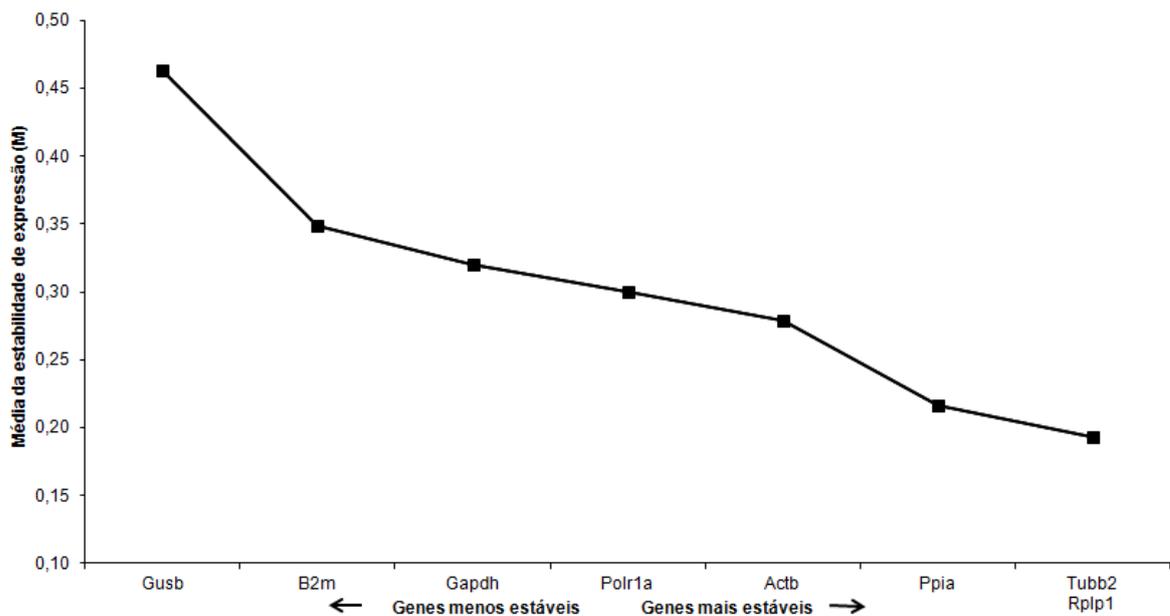
### 6.1.2 Análise de estabilidade de expressão

Para avaliação da estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência nos 6 horários ao longo do dia, os dados de CTs foram analisados através dos softwares *geNorm* e *NormFinder*.

#### 6.1.2.1 *geNorm*

Na figura 6, observa-se o valor médio para estabilidade de expressão (índice M) de cada gene, gerado pelo *geNorm*. O ranqueamento em ordem crescente de estabilidade foi *Gusb*, *B2m*, *Gapdh*, *Polr1a*, *Actb*, *Ppia*, e a dupla *Tubb2a* e *Rplp1*, esta indicada como a combinação de genes com maior estabilidade de expressão.

**Figura 6 – Seleção de genes de referência mais estáveis em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano, pelo programa *geNorm***

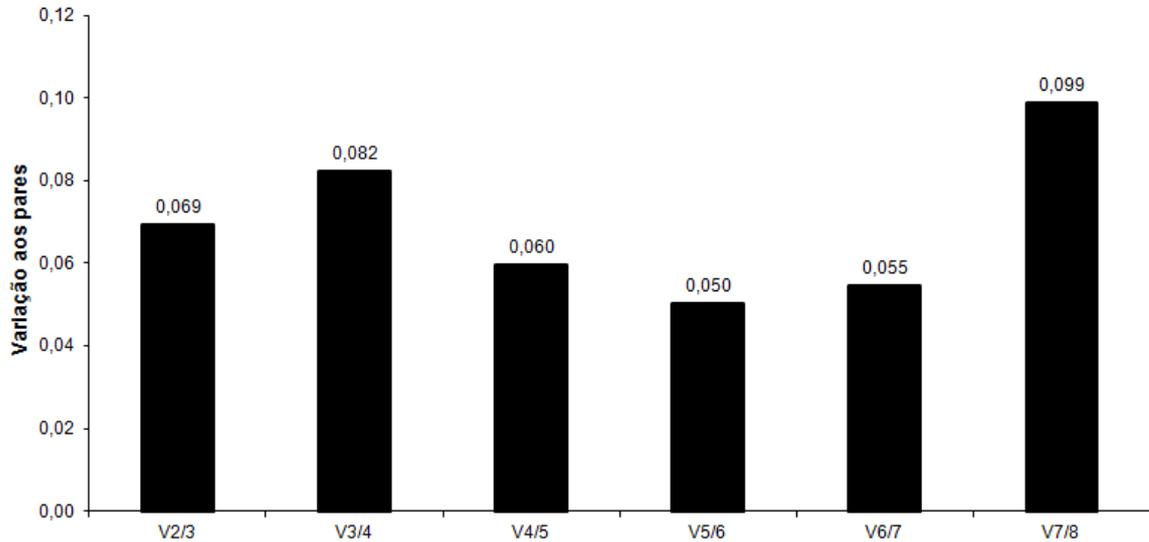


Média de estabilidade de expressão. Foi gerado o índice M para cada gene, quanto menor o valor de M maior a estabilidade. A ordem crescente de estabilidade é lida da esquerda para direita.

Fonte: Autora, 2015.

Para este estudo, o valor de  $V2/3$  foi 0,069 (Figura 7), indicando que uma combinação dos dois genes com maior estabilidade de expressão é suficiente para uma normalização apropriada.

**Figura 7 – Determinação do melhor número de genes de referência para normalização em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano**

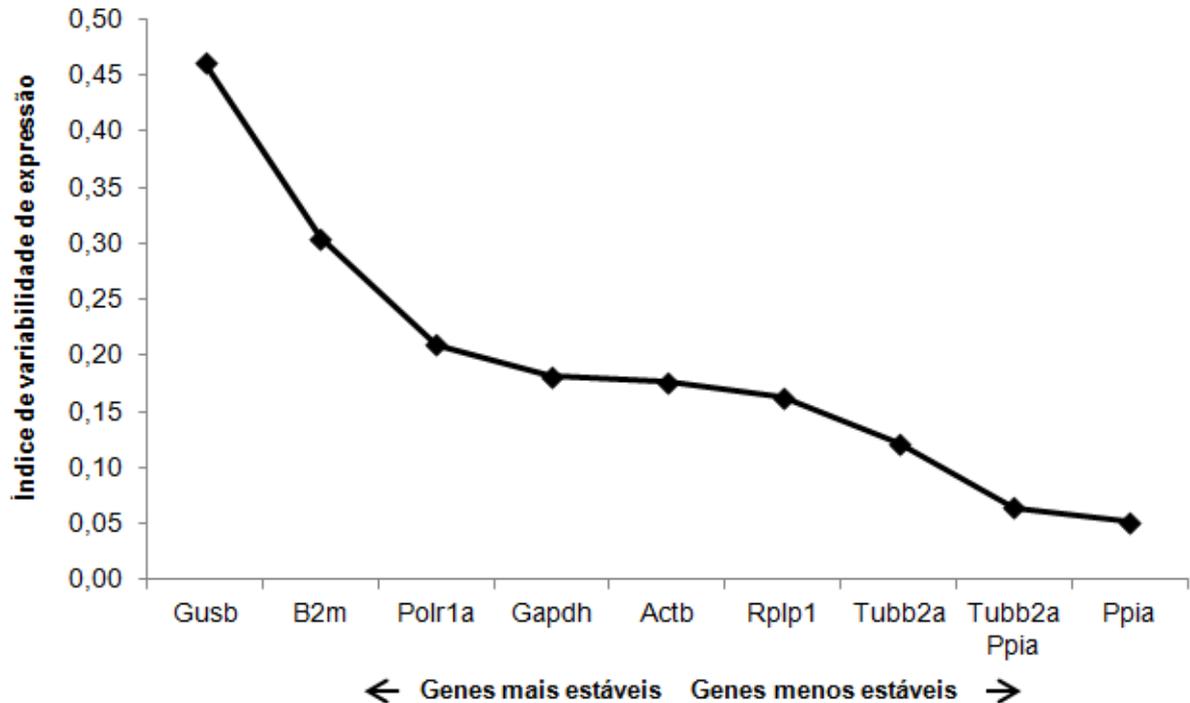


Fonte: Autora, 2015.

#### 6.1.2.2 *NormFinder*

Os valores de estabilidade também foram calculados pelo programa *NormFinder*, que realiza um cálculo baseado nas variações intra e intergrupo. O menor e maior valor de estabilidade foram 0,052 e 0,461, para os genes *Ppia* e *Gusb*, respectivamente (Figura 8). A melhor combinação de genes normalizadores indicada foi dos genes *Tubb2a* e *Ppia*, com valor de 0,064. Os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos pelo programa *geNorm*, com discretas alterações na ordem de ranqueamento dos genes.

**Figura 8 - Seleção de genes de referência mais estáveis em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do dia subjetivo, pelo programa *NormFinder***



Valores de estabilidade dos candidatos a genes de referência. A ordem crescente de estabilidade é lida da esquerda para direita.

Fonte: Autora, 2015.

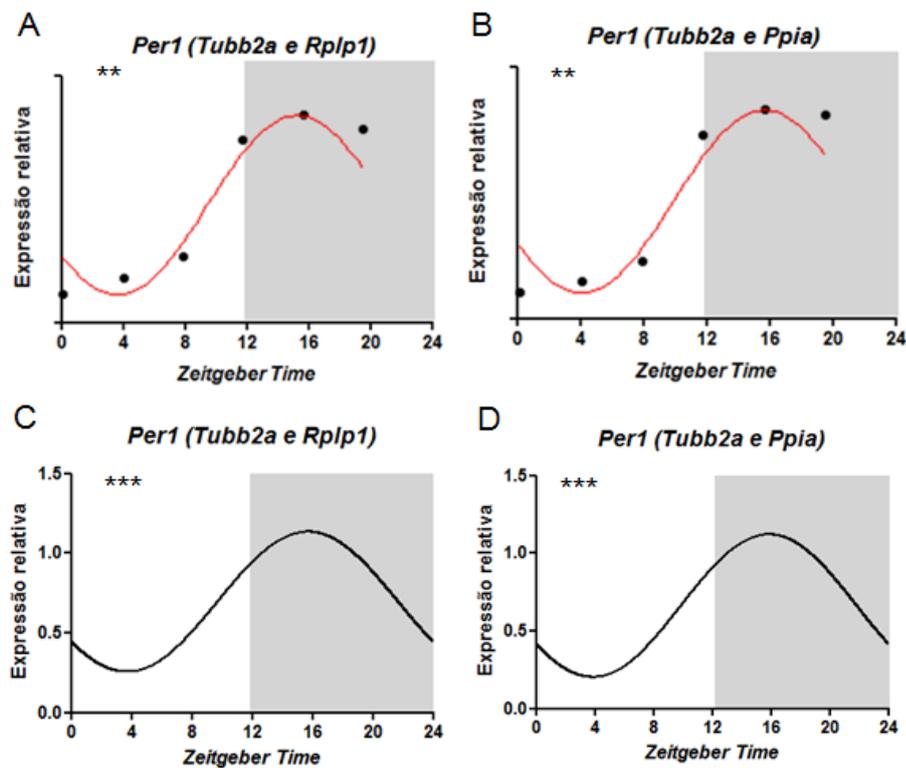
### 6.1.3 Validação dos dados de estabilidade de expressão

As análises de estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência indicaram que as combinações dos genes *Tubb2a* e *Rplp1* (*geNorm*) e *Tubb2a* e *Ppia* (*NormFinder*) representam a melhor estratégia para normalização dos dados de expressão gênica diferencial ao longo do dia subjetivo. Para validar este resultado, avaliamos a expressão do gene *Per1* a partir destas estratégias de normalização (Figura 9). A seleção de *Per1* justifica-se pelo fato de que este gene apresenta uma expressão modulada ao longo do ciclo circadiano em hipocampo de rato, conforme relatado consistentemente em estudos independentes (RAMANATHAN *et al.*, 2010; GOLINI *et al.*, 2012; FONKEN *et al.*, 2013; NAVIGATORE-FONZO *et al.*, 2013). Essa avaliação foi feita com base nos softwares *Acrophase* (Figura 9A-B) e *Circwave* (Figura 9C-D), que calculam estatisticamente se o perfil de expressão observado segue um padrão de variação diária. Observamos que, com ambos os programas, os

dados da expressão de *Per1*, normalizados tanto por *Tubb2a* e *Rplp1* (*geNorm*) quanto por *Tubb2a* e *Ppia* (*NormFinder*), apresentam ajuste à curva cosseno e portanto, seguem um modelo de variação diária.

Esses dados mostram que nas condições experimentais analisadas, ambas as combinações de genes são eficientes para normalização dos dados de expressão gênica no hipocampo de animais em diferentes pontos do ciclo circadiano. Para o nosso estudo usamos a dupla indicada pelo *geNorm*, *Tubb2a* e *Rplp1*, para normalizar os dados. Já que em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo foi visto que estes genes são bons normalizadores também para o processo epileptogênico (MARQUES et al., 2013).

**Figura 9 – Expressão relativa do gene *Per1* em hipocampo de rato Wistar ao longo do ciclo circadiano**



Validação dos genes de referência por *Per1*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os pontos pretos representam os dados de expressão relativa e as linhas vermelhas e pretas as curvas cosseno ajustadas ao período de 24h. Em A e C, os genes foram normalizados pela dupla indicada pelo *geNorm* (*Tubb2a* e *Rplp1*) e em B e D pela combinação indicada pelo *NormFinder* (*Tubb2a* e *Ppia*). A-B: Variação diária detectada pelo *Acrophase*, análise de cosinor, \*\* $p < 0,01$ . C-D: Variação diária detectada pelo *Circwave*, análise regressão harmônica, curva de Fourier, \*\*\* $p < 0,001$ .

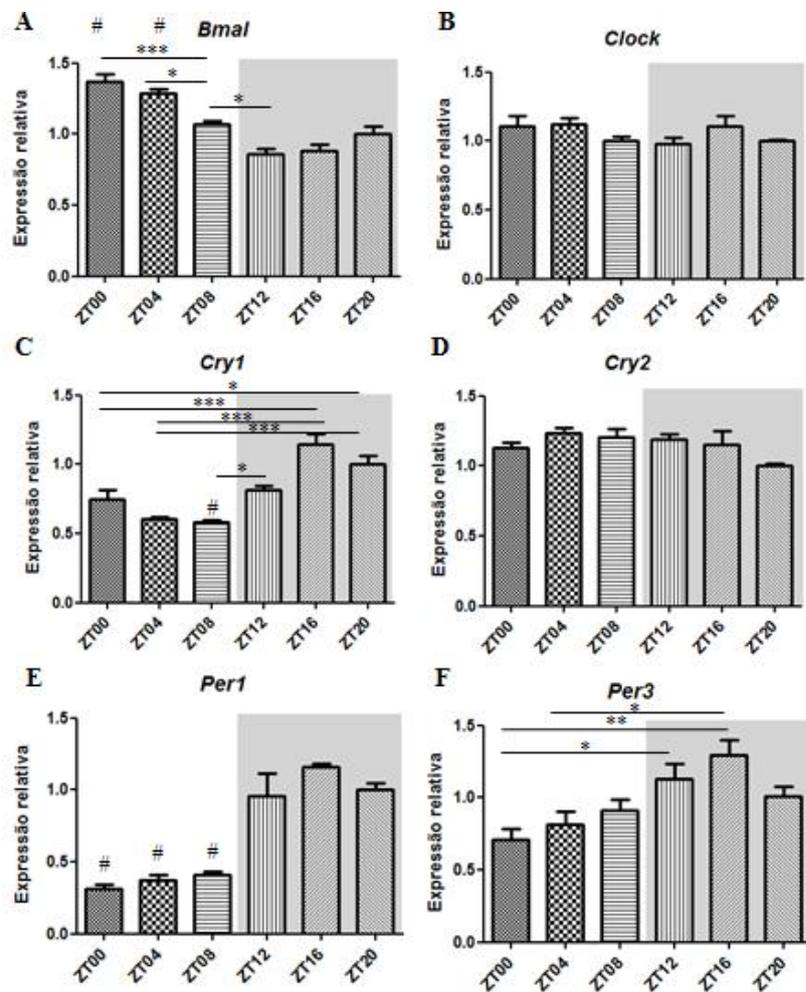
Fonte: Autora, 2015.

## 6.2 Perfil de expressão de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar* ao longo de 24h

### 6.2.1 Análise da expressão de genes circadianos

A análise estatística (ANOVA) do perfil de expressão de 6 genes circadianos (*Bmal*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*), ao longo do ciclo circadiano (24h) mostra que há diferença significativa dos níveis de expressão entre os diferentes ZTs para os genes *Bmal*, *Cry1*, *Per1* e *Per3*, enquanto não é possível detectar diferentes níveis para os genes *Clock* e *Cry2* (Figura 10).

**Figura 10 – Expressão de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano**



As barras representam os valores do *fold change* + erro padrão da média. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. ANOVA, Bonferroni. As barras representam diferença significativa entre os ZTs que estão nos extremos. # $p < 0,001$  em relação a todos os ZTs da fase oposta, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

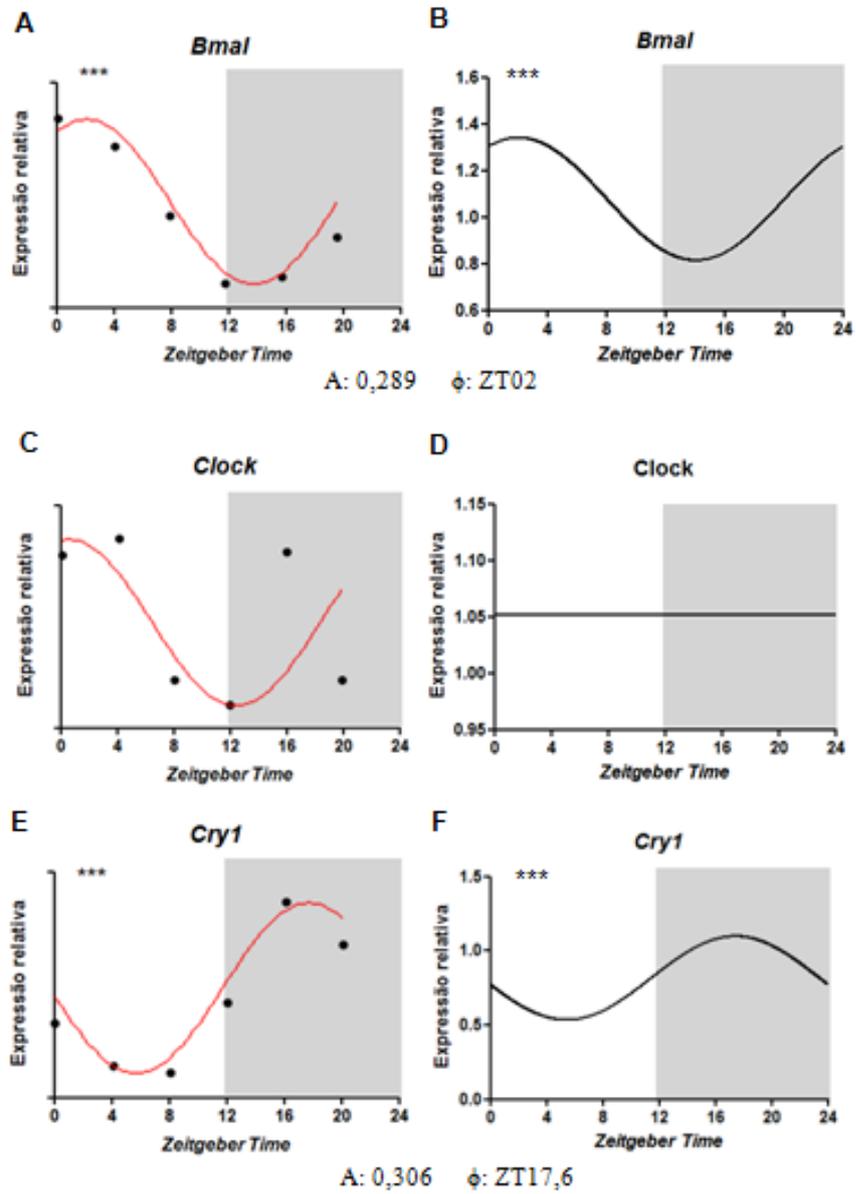
### 6.2.2 Análise da expressão de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar* ao longo de 24h, através dos softwares *Acrophase* e *Circwave*

Realizamos análise do perfil de expressão de 6 genes circadianos (*Bmal*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*), ao longo do ciclo circadiano (24h) em hipocampo de rato *Wistar*, com auxílio dos softwares *Acrophase* e *Circwave*. Conforme observado na Figura 11, a análise com ambos os softwares mostrou que os genes avaliados apresentam uma variação diária nos níveis dos transcritos, com exceção do gene *Clock*. De fato, podemos observar que a expressão de *Clock* nos diferentes ZTs não se ajusta à curva gerada pelo *Acrophase*. Por sua vez, o *Circwave* não gerou curva, pois não há significância estatística para variação diária.

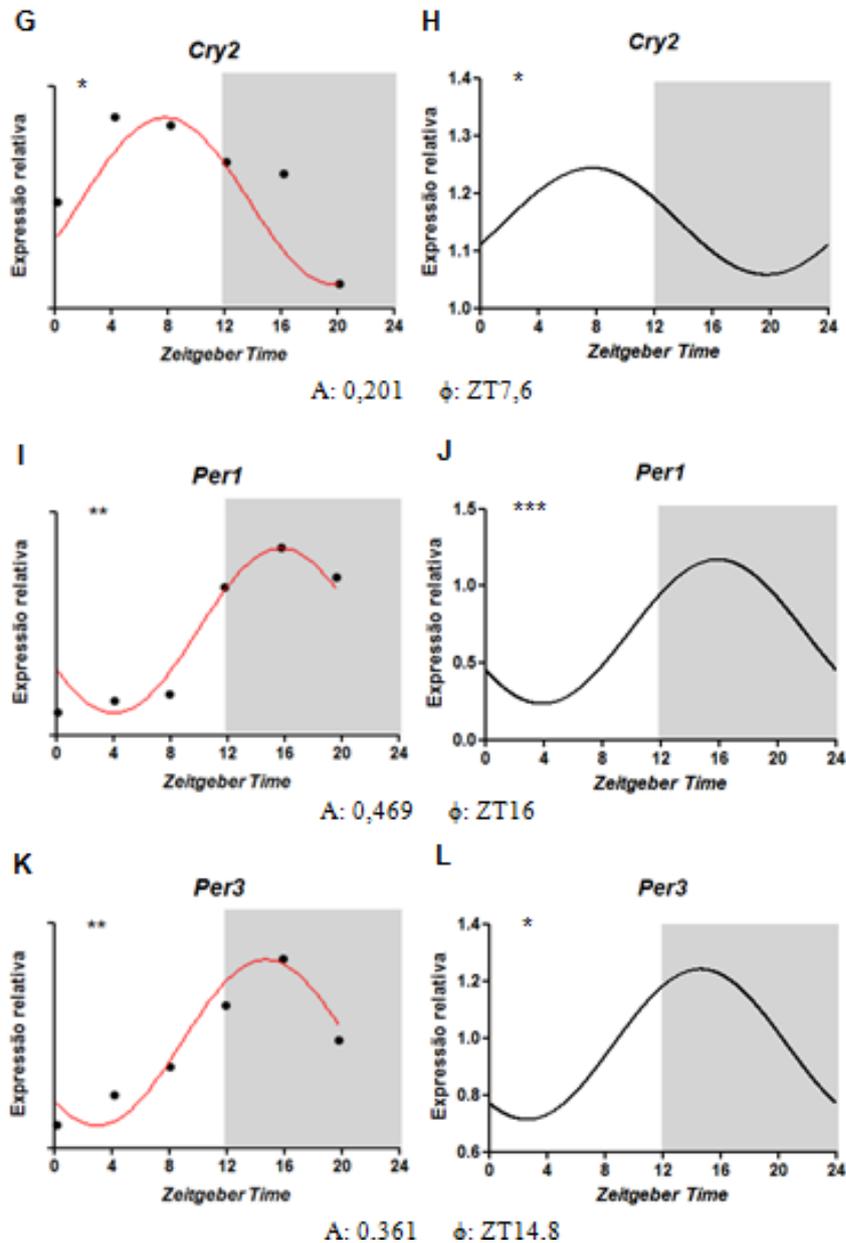
Uma característica cronobiológica relevante é a amplitude (A), distância entre o valor médio (mesor) e o máximo (acrofase) ou o mínimo (nadir) da curva. No nosso estudo, o gene com maior amplitude foi *Per1* (0,469), este gene apresenta a maior variação da expressão ao longo do ciclo circadiano, entre os genes estudados neste trabalho. O contrário acontece com *Cry2* (0,201), que tem menor amplitude e, portanto, é o gene com menor variação dentre os avaliados.

A acrofase ( $\phi$ ) é o ponto máximo da curva, ou seja, representa o horário em que ocorre o pico do fenômeno estudado, neste caso, o momento do ciclo em que há o maior nível de expressão do gene. Observamos que os genes *Bmal* (ZT02) e *Cry2* (ZT7,6) tem pico de expressão durante a fase clara, enquanto os genes *Cry1* (ZT17,6), *Per1* (ZT16) e *Per3* (ZT14,8) têm acrofase na fase escura do ciclo circadiano.

Figura 11 – Expressão diária de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar*, pelos softwares *Acrophase* e *Circwave*



[continuação] Figura 11 – Expressão diária de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar*, pelos softwares *Acrophase* e *Circwave*

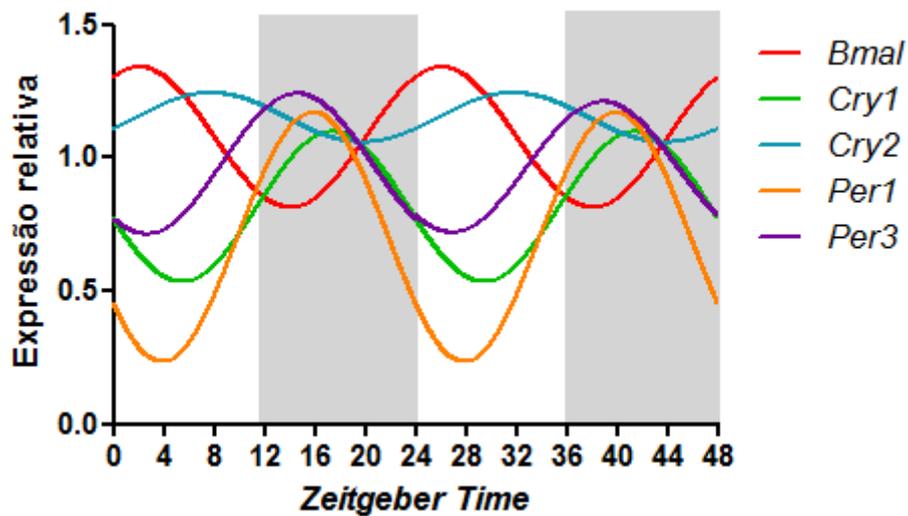


A, C, E, G, I, K: análise realizada com os valores do *fold change*. Os pontos pretos representam os dados de expressão relativa e as linhas vermelhas as curvas cosseno ajustadas ao período de 24h. Análise de cosinor, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . B, D, F, H, J, L: gráficos gerados com os valores representativos fornecidos pelo software *Circwave*. Análise de regressão harmônica, curva de Fourier. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os genes foram normalizados por *Tubb2a* e *Rplp1*.

Fonte: Autora, 2015.

Na Figura 12 está exposta a organização temporal da expressão diária dos genes estudados. A sobreposição das curvas permite a observação de que *Bmal* está em antifase com os genes *Cry1*, *Per1* e *Per3*, já que apresentam acrofase em fases distintas.

**Figura 12 – Organização temporal da expressão diária de genes circadianos**

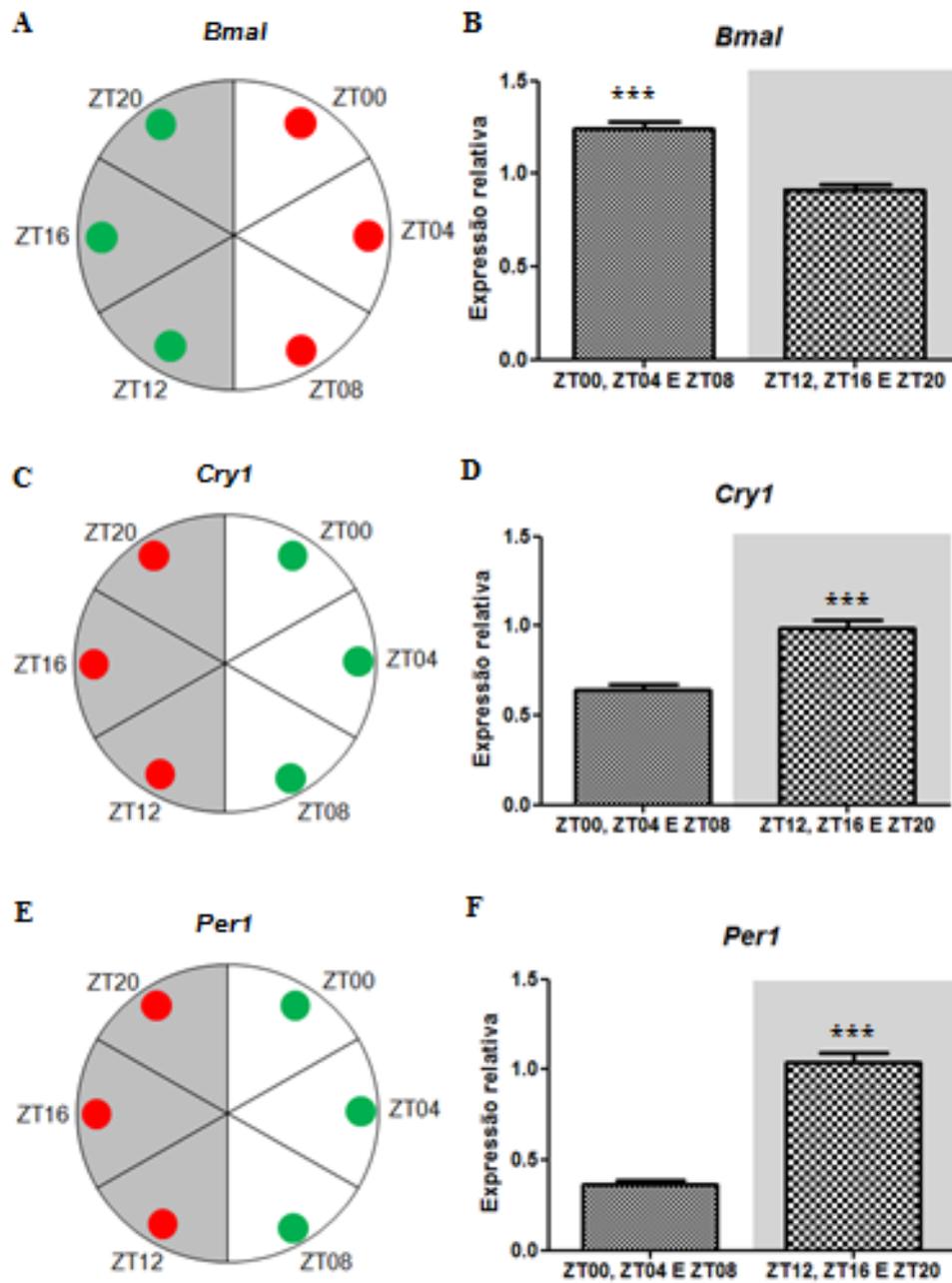


Curvas geradas com os valores representativos fornecidos pelo *software Circwave*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo.

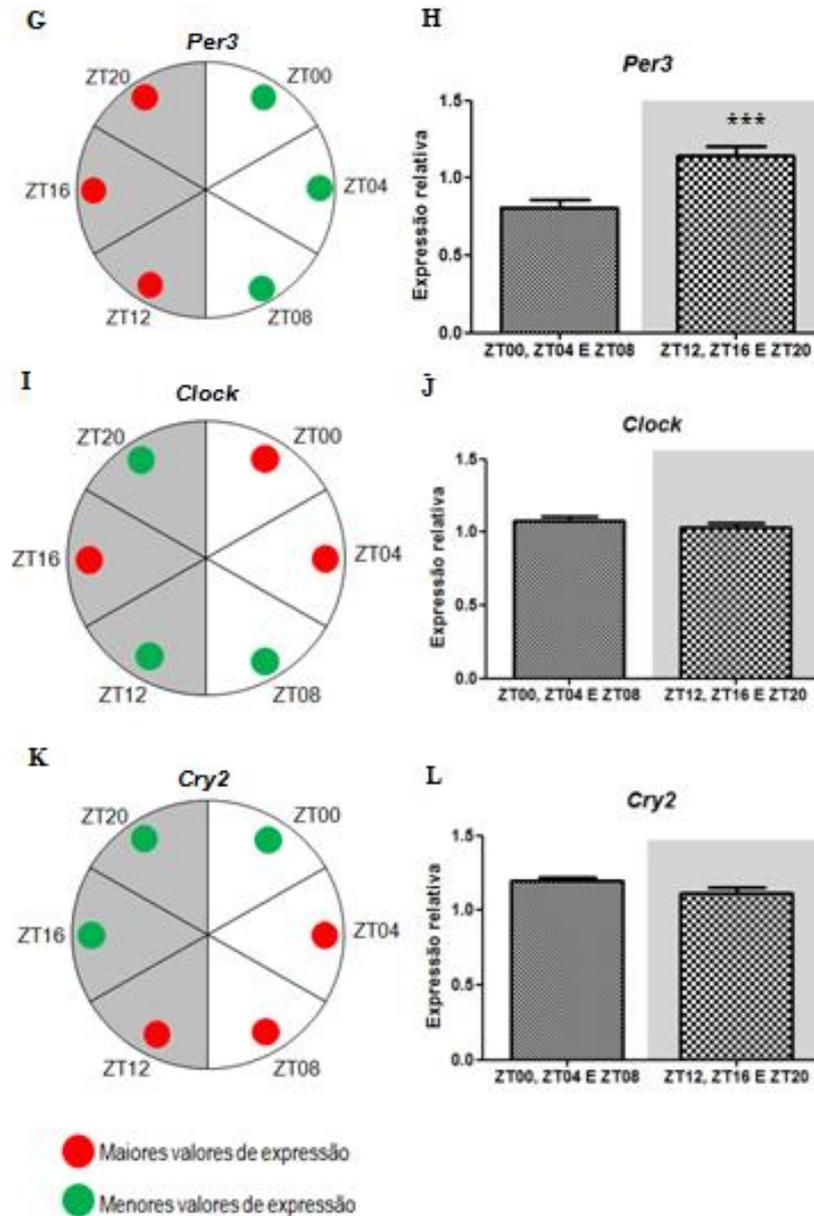
Fonte: Autora, 2015.

A Figura 13 permite avaliar uma possível associação entre níveis de expressão e fases de claro/escuro. Observamos que para os genes *Cry1*, *Per1* e *Per3*, os 3 pontos com maiores valores de expressão ao longo do dia estão na fase escura do ciclo (Figura 13C, E e G). Enquanto para *Bmal* ocorre o contrário, os 3 pontos mais expressos estão na fase clara (Figura 13A). De fato, através de análises estatísticas, constatamos que para esses genes há diferença de expressão entre as fases do ciclo estudadas (Figura 13B, D, F e H). No entanto, para os genes *Clock* (Figura 13J), que não apresentou variação diária, e *Cry2* (Figura 13L), que apresentou baixa amplitude, não houve diferença estatística significativa entre as fases do dia, o que associa-se com o fato de que, ambos os genes, não têm os maiores valores de expressão localizados na mesma fase do ciclo (Figura 13I e K). Esses dados indicam que a luz poderia influenciar no perfil de expressão dos genes *Cry1*, *Per1*, *Per3* e *Bmal* no hipocampo de ratos *Wistar*. Entretanto, para avaliar esta questão de uma forma mais apropriada fazem-se necessários experimentos adicionais e complementares.

Figura 13 – Expressão de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano



[continuação] - Figura 13 – Expressão de genes circadianos em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os genes foram normalizados por *Tubb2a* e *Rpl1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Autora, 2015.

### 6.3 Impacto do perfil de expressão com variação diária em estudos de expressão gênica diferencial em modelo de epilepsia do lobo temporal

Avaliamos se o perfil de expressão com variação diária no hipocampo poderia interferir nas investigações de expressão gênica diferencial associadas a epilepsia. Para isto, comparamos o nível de expressão dos 6 genes do relógio molecular entre animais epiléticos referentes ao ZT08 (fase clara) e animais controles referentes a diferentes ZTs (ZT00, ZT04, ZT08, ZT12, ZT16 e ZT20).

Para o gene *Bmal*, só há aumento dos níveis no hipocampo de animais epiléticos quando a comparação é feita entre o ZT08 do grupo crônico e os ZTs agrupados da fase escura do controle (Figura 14H). Não há diferença nos níveis de expressão quando outras comparações são feitas (Figura 14A-G).

*Cry1* apresenta aumento significativo da expressão no hipocampo de animais epiléticos, quando comparados com animais controle referentes ao ZT04, ZT08 ou ZTs da fase clara agrupados (Figura 15B, C e D), mas não há diferença nos níveis de expressão quando comparado com os ZT00, ZT12, ZT16, ZT20 ou ZTs da fase escura agrupados (Figura 15A, E, F, G e H).

O gene *Cry2* apresenta níveis de expressão significativamente menores em animais epiléticos apenas quando comparados com animais do controle referentes ao ZT04 ou aos ZTs da fase clara agrupados (Figura 16B e D).

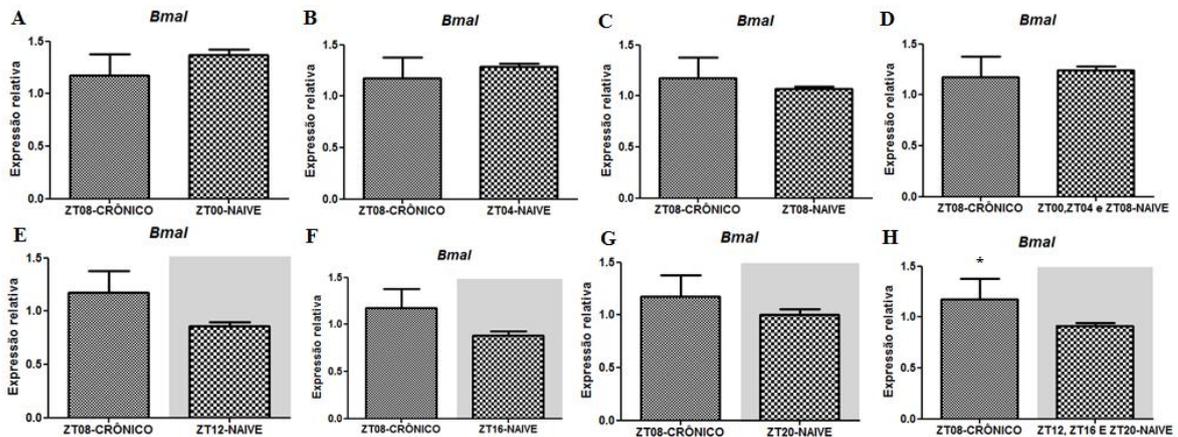
Em relação a *Per1*, observamos que os níveis de expressão são significativamente maiores em animais epiléticos, quando comparados com os controles, nos ZT00, ZT04 ou ZTs da fase clara agrupados. Entretanto, quando comparamos com animais controle na fase escura, com exceção do ZT12, observamos níveis significativamente reduzidos dos transcritos no hipocampo de animais epiléticos (Figura 17).

O *Per3* tem expressão significativamente menor no hipocampo de animais epiléticos, quando comparados com controles, na fase escura. Enquanto, não apresenta níveis significativamente alterados quando a comparação é feita com os pontos da fase clara do grupo controle (Figura 18).

Em relação ao gene *Clock*, observamos uma diminuição estatisticamente significativa no hipocampo de animais epiléticos quando comparados com os animais do grupo controle, nos ZTs da fase clara e também da fase escura (Figura 19).

A análise conjunta desses dados mostra que, com exceção de *Clock*, o perfil de expressão diferencial entre animais epiléticos e controle sofre mudança decorrente da fase do ciclo (ZTs) utilizada nas análises. Tal impacto no perfil de expressão acarreta em uma série de implicações metodológicas.

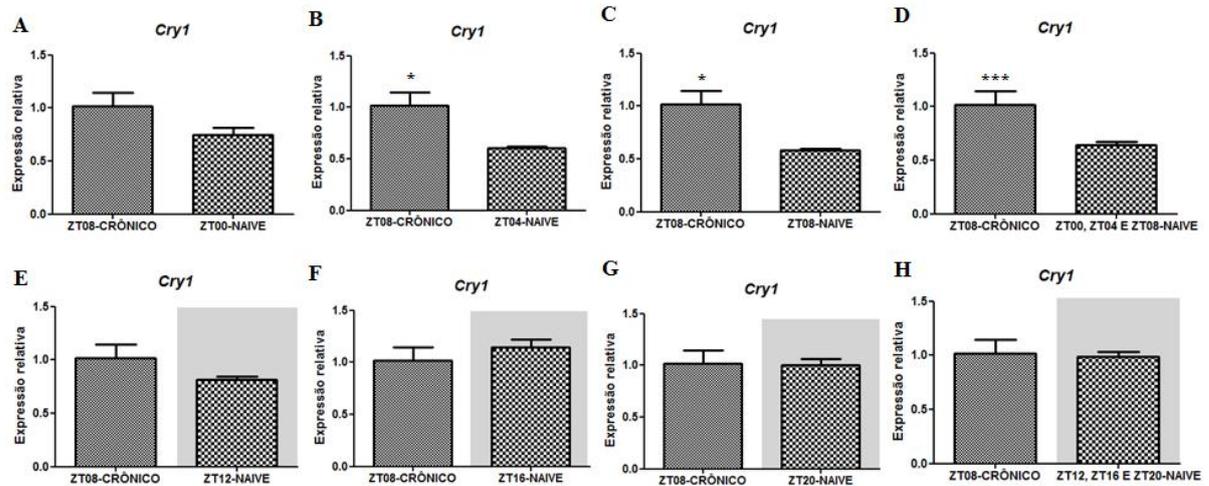
**Figura 14 – Expressão relativa do gene *Bmal* em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ .

Fonte: Autora, 2015.

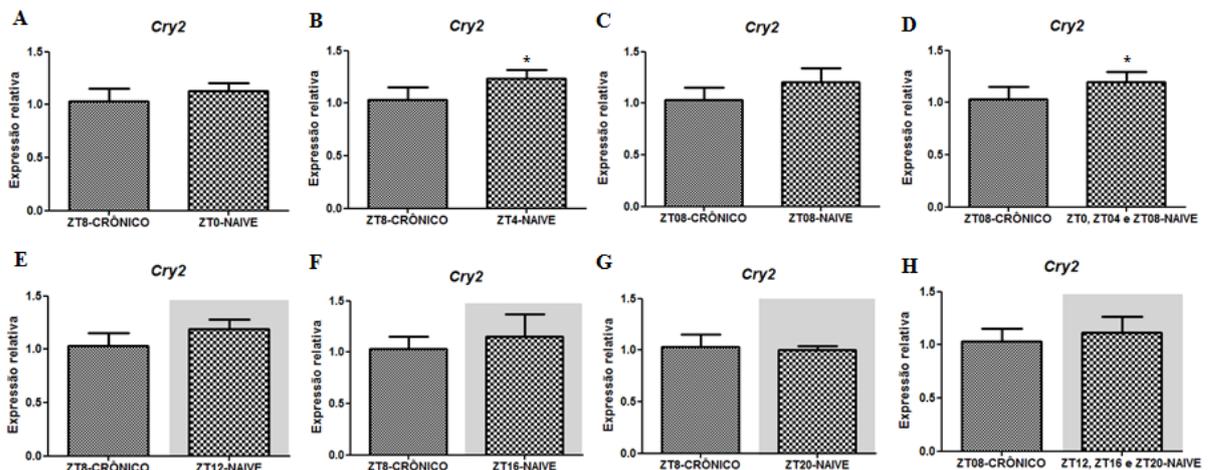
**Figura 15 – Expressão relativa do gene *Cry1* em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Autora, 2015.

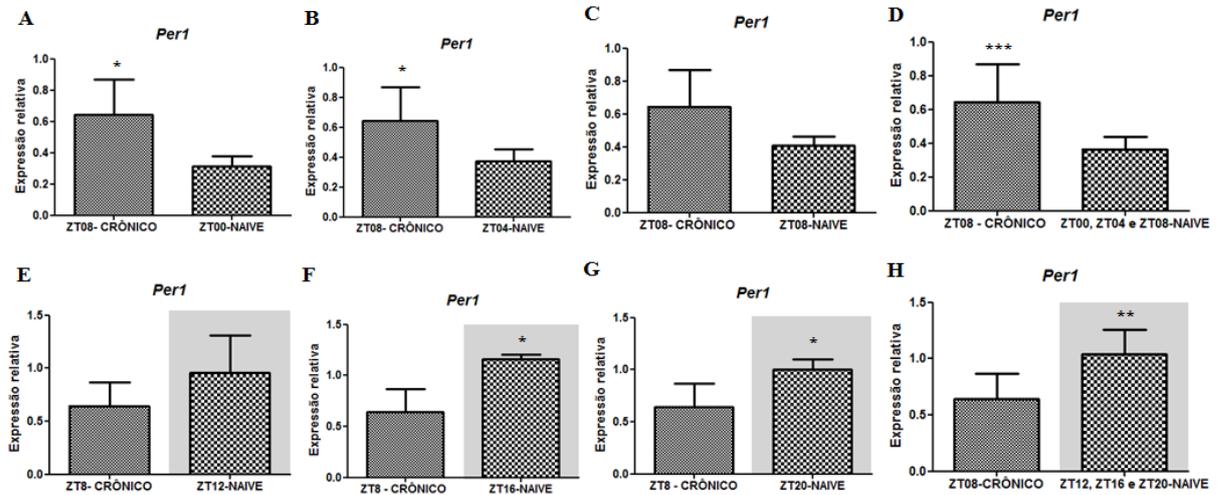
**Figura 16 – Expressão relativa do gene *Cry2* em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ .

Fonte: Autora, 2015.

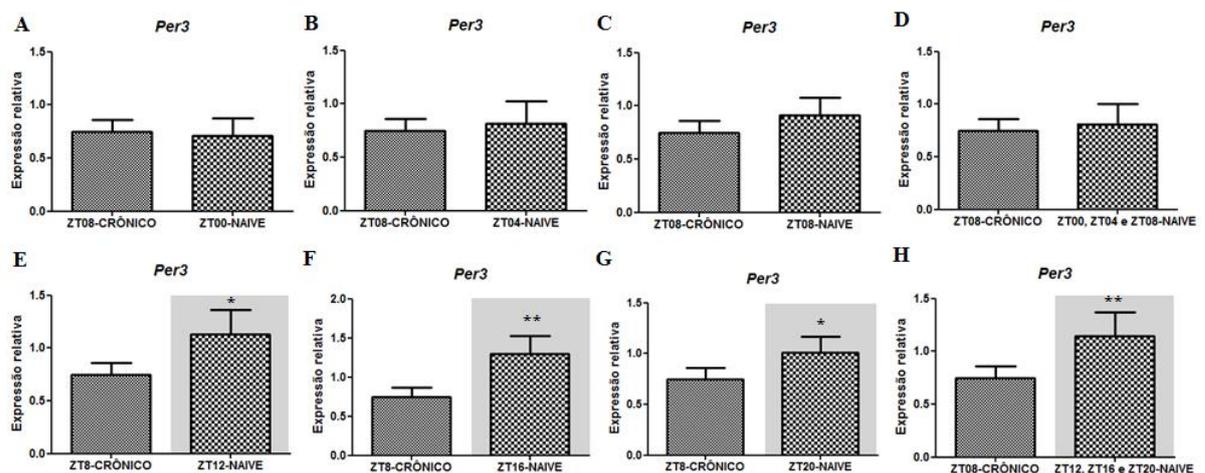
**Figura 17 – Expressão relativa do gene *Per1* em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Autora, 2015.

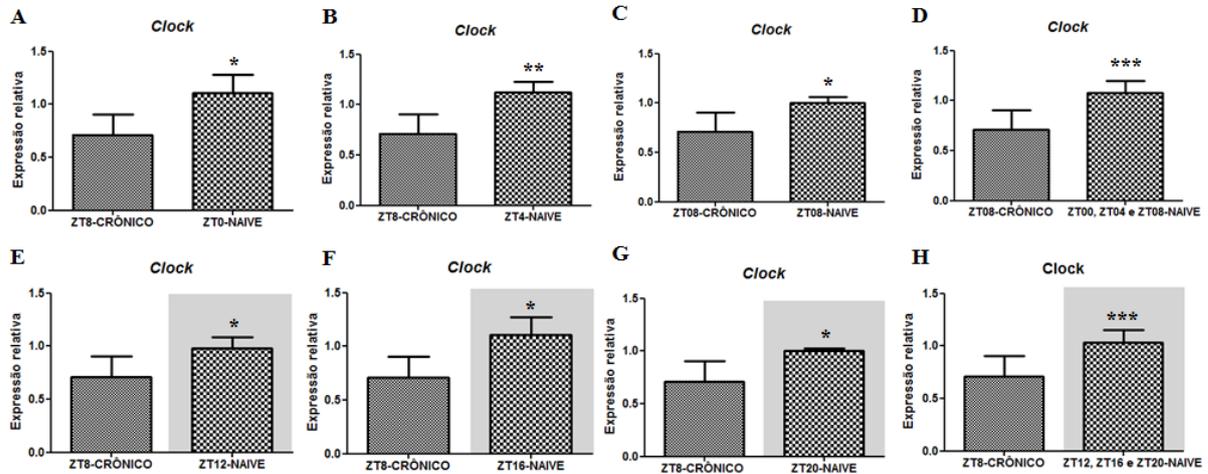
**Figura 18 – Expressão relativa do gene *Per3* em hipocampo de rato *Wistar* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Fonte: Autora, 2015.

**Figura 19 – Expressão relativa do gene *Clock* em hipocampo de rato *Wistar* em diferentes fases do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

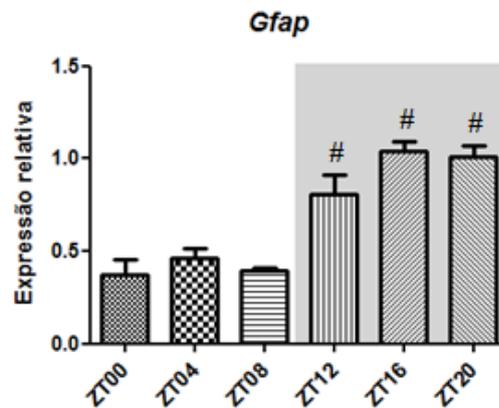
Fonte: Autora, 2015.

#### 6.4 Perfil de expressão de *Gfap* ao longo do ciclo circadiano

Avaliamos o perfil de expressão de *Gfap* no hipocampo durante o ciclo circadiano, tendo em vista que a variação diária pode alterar os resultados de expressão diferencial. As análises foram realizadas nos 6 horários abordados neste trabalho (ZT00, ZT04, ZT08, ZT12, ZT16 e ZT20). Os dados foram normalizados por *Tubb2a* e *Rplp1* e, em seguida, aplicados nos *softwares* para avaliação circadiana.

A análise estatística (ANOVA) dos níveis de expressão de *Gfap* mostra que há diferença estatisticamente significativa entre os diferentes ZTs da fase clara e os da fase escura, o que sugere variação diária da expressão (Figura 20).

**Figura 20 – Expressão *Gfap* em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano**

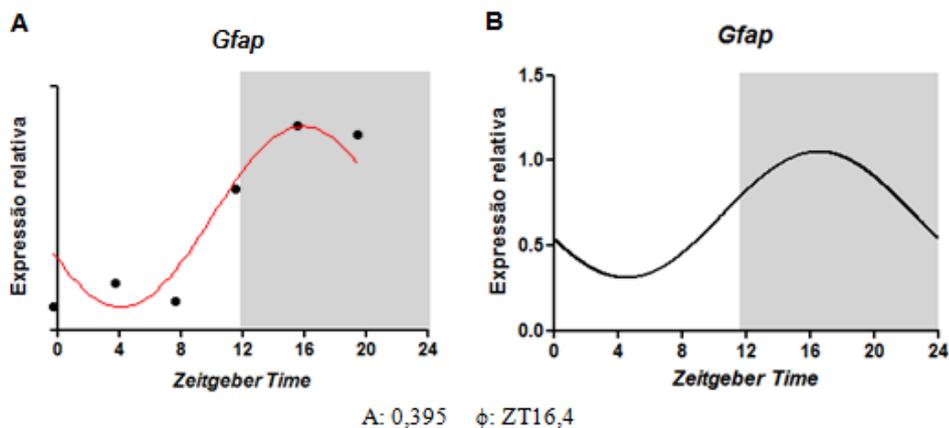


As barras representam os valores do *fold change* + erro padrão da média. ANOVA, Bonferroni. # $p < 0,001$  em relação a todos os ZTs da fase oposta.

Fonte: Autora, 2015.

Confirmamos que a expressão de *Gfap* apresenta modulação diária, por meio dos programas *Acrophase* (Figura 21A) e *Circwave* (Figura 21B), com amplitude de 0,395 e acrofase de 16,4h.

**Figura 21 – Análise da expressão diária de *Gfap* em hipocampo de rato *Wistar*, pelos softwares *Acrophase* e *Circwave***



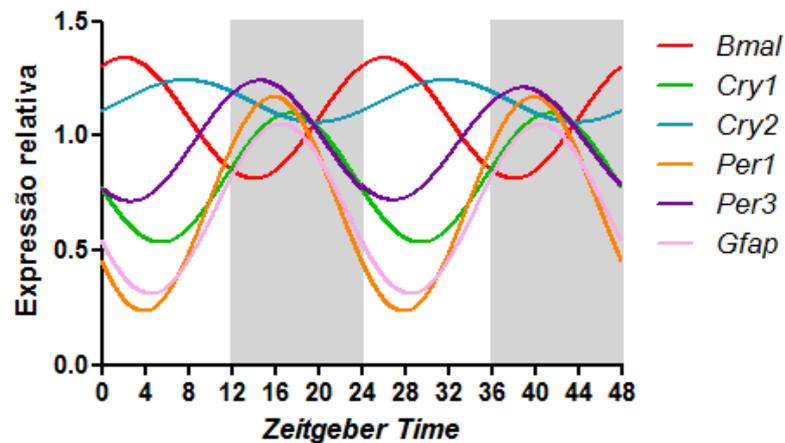
A: análise realizada com os valores do *fold change*. Os pontos pretos representam os dados de expressão relativa e a linha vermelha a curva cosseno ajustada ao período de 24h. Análise de cosinor, \* $p < 0,05$ . B: gráficos gerados com os valores representativos fornecidos pelo software *Circwave*. Análise de regressão harmônica, curva de Fourier, \* $p < 0,05$ .

A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os genes foram normalizados por *Tubb2a* e *Rplp1*.

Fonte: Autora, 2015.

A Figura 22 repete a organização temporal dos genes do relógio e acrescenta a expressão de *Gfap*. Vimos que *Gfap* tem perfil similar ao de *Per1*, estando, assim, em fase com *Per1*, *Cry1* e *Per3* e em antifase com *Cry2* e com *Bmal*.

**Figura 22 – Organização temporal da expressão diária de genes circadianos e de *Gfap***

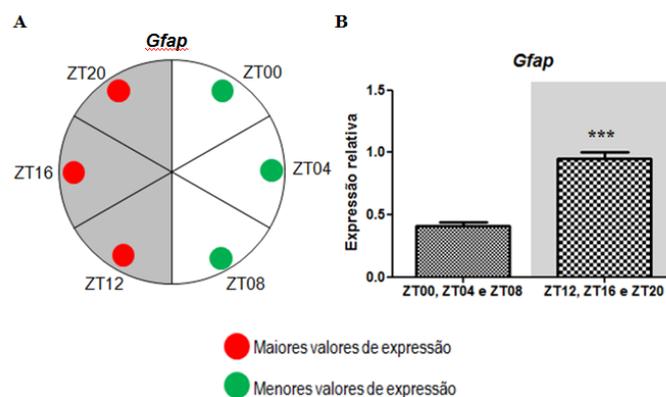


Curvas geradas com os valores representativos fornecidos pelo *software Circwave*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Análise de regressão harmônica, curva de Fourier.

Fonte: Autora, 2015.

Na figura 23, podemos observar que os maiores níveis de expressão de *Gfap* ocorrem em ZTs da fase escura e que são significativamente diferentes dos níveis encontrados na fase clara.

**Figura 23 – Expressão relativa de *Gfap* em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado, \*\*\*p<0,001.

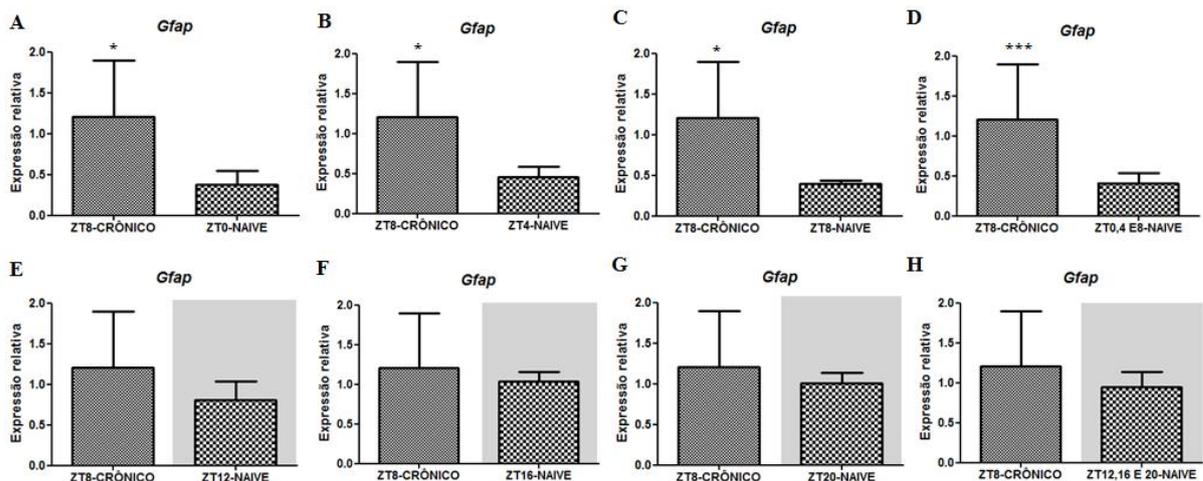
Fonte: Autora, 2015.

#### 6.4.1 Impacto da variação diária de *Gfap* em estudos de expressão gênica em modelo de epilepsia do lobo temporal

Foi visto que *Gfap* apresenta variação diária da sua expressão, o que poderia interferir nas análises de expressão gênica diferencial e, de particular interesse, durante o processo epileptogênico. Para investigar esta questão, comparamos o nível de expressão de *Gfap* entre animais epiléticos (ZT08) e animais controles em pontos da fase clara e da fase escura individualmente ou agrupados, similarmente ao que fizemos com os genes do relógio.

Observamos que os níveis de expressão de *Gfap* são significativamente maiores no hipocampo de animais epiléticos, quando comparados com animais controles, referentes aos diferentes ZTs da fase clara (Figura 24A, B, C e D). Entretanto, não há diferença estatisticamente significativa quando os comparamos com animais controle referentes aos ZTs da fase escura (Figura 24E, F, G e H). Isto indica que *Gfap* tem níveis aumentados na epilepsia, mesmo quando os grupos experimentais são estabelecidos em diferentes horários, desde que estejam ainda na fase clara. Se a comparação feita for entre as fases clara e escura não é possível perceber a modulação da expressão.

**Figura 24 – Expressão relativa do gene *Gfap* nas fases clara e escura do ciclo circadiano e na epilepsia**



Análise realizada com os valores do *fold change*. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. O gene foi normalizado por *Tubb2a* e *Rplp1*. Teste T não pareado. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Fonte: Autora, 2015.

## 7 DISCUSSÃO

Este trabalho traz contribuições importantes em 3 aspectos: 1) seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica com ritmo circadiano; 2) avaliação do perfil de expressão de genes do relógio durante o ciclo circadiano, em hipocampo de ratos *Wistar* e 3) influência da variação diária nos estudos de expressão gênica diferencial em modelo de epilepsia do lobo temporal.

### 7.1 Seleção de genes de referência para análises da expressão gênica durante o ciclo circadiano

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a identificar genes de referência para análises de expressão gênica do ritmo circadiano em hipocampo de rato. Com base nos dados de estabilidade de expressão acoplados à validação do perfil de expressão de *Per1* no hipocampo de ratos, este estudo mostrou que as combinações dos genes *Tubb2a/Rplp1* e *Tubb2a/Ppia* são eficientes para normalização dos dados de expressão gênica no hipocampo de animais nos diferentes pontos do ciclo circadiano aqui analisados (Figura 9). De fato, usando as duas duplas de genes de referência foi possível detectar a variação da expressão de *Per1* ao longo de um ciclo de 24 horas, conforme consistentemente relatado em trabalhos independentes (GOLINI et al., 2012; FONKEN et al., 2013; NAVIGATORE-FONZO et al., 2013), baseados em roedores tanto com atividade diurna quanto noturna (RAMANATHAN et al., 2010).

Em estudos de expressão gênica diferencial, a estratégia de normalização mais utilizada baseia-se no uso de genes de referência, os quais não devem apresentar variação de expressão na condição estudada. Se um gene com expressão variável for usado como gene de referência para a normalização, o resultado da análise pode ser duvidoso e a conclusão incorreta (de ARAÚJO et al., 2014). Usualmente, genes envolvidos com funcionamento basal da célula são usados como normalizadores (BUSTIN et al., 2005). Contudo, já é sabido que a expressão destes genes pode sofrer influência das condições experimentais (KAMPHUIS et al., 2005; KOSIR et al., 2010; BUENAFE, 2012). Em relação ao ritmo circadiano, apenas 2 trabalhos investigaram genes de referência apropriados para os estudos de expressão gênica. Esses estudos foram realizados em retina, fígado e glândula adrenal, não existindo, portanto, relatos de estudos utilizando o hipocampo.

Kamphuis et al. (2005) identificaram os genes  *$\beta$ -pde*, *28S*, *mGluR6*, *GluR2*, *PKC- $\alpha$*  e  *$\beta$ -actina* como genes de referência apropriados para normalização da expressão gênica, ao longo de 24 horas, na retina de ratos submetidos a um ciclo de 12h/12h (claro/escuro). Esses estudos foram baseados somente em análises de estabilidade de expressão realizadas através do programa *geNorm*. Kosir et al. (2010) mostraram que as duplas dos genes *Eif2a/Tbcc* e *Rn18s/Eif2a* permitem uma normalização eficiente da expressão ao longo de 24 horas no fígado de diferentes linhagens de camundongos. Curiosamente,  *$\beta$ -actina*, apesar de ser um dos normalizadores mais utilizados em estudos de expressão gênica, não se apresentou como gene de referência confiável para normalização de dados nessas condições experimentais. Tais resultados foram obtidos através de análise da estabilidade de expressão através dos programas *geNorm* e *NormFinder*, acoplada à validação através do perfil de expressão de *Dbp*, um gene com expressão circadiana consistente em fígado de roedores. No mesmo trabalho, os autores também mostraram que as duplas *Gapdh/Hmbs* e *Rn18s/Ppid*, indicadas pelos softwares *geNorm* e *NormFinder*, respectivamente, são adequadas para normalização dos dados ao longo do ciclo circadiano em glândula adrenal nas diferentes linhagens estudadas, mais uma vez o gene  *$\beta$ -actina* não foi indicado como um bom normalizador (KOSIR et al., 2010).

A análise conjunta desses dados, incluindo os nossos, corrobora os estudos na área, os quais tem mostrados que genes indicados como bons normalizadores podem variar em diferentes condições experimentais, espécies e órgãos (KOSIR et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Faz-se necessário, portanto, definir bons genes de referência, de acordo com as especificidades do protocolo experimental, especialmente no tocante à estrutura de interesse. Assim, nossos dados são de grande relevância para o planejamento de delineamentos experimentais que visam estudar a expressão gênica diária no hipocampo de ratos.

## **7.2 Análise do perfil de expressão de genes do relógio molecular em hipocampo de rato ao longo do ciclo circadiano**

Realizamos um estudo do perfil de expressão de 6 genes (*Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*) do relógio molecular em hipocampo de rato, ao longo de 24 horas. A análise estatística permite observar que há diferença significativa dos níveis de expressão entre os ZTs para os genes *Bmal*, *Cry1*, *Per1* e *Per3*, contudo para *Clock* e *Cry2* não é possível detectar diferenças entre os horários por essa análise. Com o auxílio dos programas *Acrophase* e *Circwave*, observamos que, com exceção de *Clock*, todos os genes avaliados apresentam uma variação

diária nos níveis dos transcritos (Figura 11). Isso indica que para genes de baixa amplitude, como é o caso de *Cry2*, apenas a análise por uma ferramenta específica permite a constatação da variação diária da expressão. A discussão desses dados foi desenvolvida com base em dois aspectos: a) significado funcional e b) análises descritivas e comparativas dos perfis de variação diária de cada gene.

### 7.2.1 Significado funcional

É possível que a variação diária da expressão dos genes do relógio no hipocampo, aqui observada, esteja associada a um controle temporal de determinadas funções executadas por este órgão. De fato, algumas propriedades estruturais e eletrofisiológicas de células neurais do hipocampo sofrem modulação ao longo de 24 horas (CHAUDHURY, WANG E COLWELL, 2005; TAMAI, SANADA e FUKADA, 2008; IKENO, WEIL e NELSON, 2013). O padrão e a densidade de espinhas dendríticas de neurônios do hipocampo de hamster siberiano exibem um perfil de modulação rítmica diária que é influenciada pelo fotoperíodo (IKENO, WEIL e NELSON, 2013) e por pulsos de luz (IKENO, WEIL e NELSON, 2014). Há evidências, também, de que determinados processos biológicos no hipocampo apresentam um ritmo diário de variação, incluindo neurogênese (TAMAI, SANADA E FUKADA, 2008) e potenciação de longa duração (CHAUDHURY, WANG E COLWELL, 2005). Provavelmente, a ritmicidade dessas mudanças morfo-fisiológicas esteja implicada na modulação temporal de comportamentos dependentes da fisiologia do hipocampo. De fato, a formação de memória e determinados processos de aprendizagem sofrem uma regulação circadiana (RUBY et al., 2008; TAKAHASHI, SAWA e OKADA, 2013; RAWASHDEH et al., 2014). Por exemplo, em rato, a mudança de fase do ciclo claro e escuro interrompe tanto a aquisição quanto a retenção de memória espacial em testes de labirinto aquático para tarefas dependentes de hipocampo (TAKAHASHI, SAWA e OKADA, 2013).

Embora pouco se conheça sobre as vias moleculares envolvidas no controle circadiano desses processos associados ao hipocampo, alguns estudos baseados em ensaios funcionais de perda de função têm mostrado que genes do relógio estão envolvidos.

Mutantes para *Clock* tiveram a atividade locomotora preservada, mas mostraram aumento da atividade de elevação e deficiência de habituação. Em camundongos deficientes para *Bmal* foi vista hipertividade em novos ambientes e dificuldade de habituação, o que indica defeito na formação da memória a curto e longo prazo. Os animais nocaute para *Bmal*

também tiveram a oscilação circadiana da expressão gênica e a homeostase de espécies reativas de oxigênio alteradas no cérebro. Com isso, admite-se que o dímero CLOCK:BMAL é importante para o comportamento exploratório e habituação adequada, e além disso, que o sistema de temporização circadiana está envolvido com a aprendizagem comportamental (KONDRATOVA *et al.*, 2010).

Camundongos nocautes para *Cry1* e *Cry2* apresentam capacidade de aprendizagem para experiências sensoriais desagradáveis e para localizar comida como recompensa, mas não conseguiram relacionar o lugar que a comida era ofertada ao horário do dia em que isso acontecia. Esta deficiência de aprendizagem e memória específica mostra que os genes *Cry* podem estar ligados à organização temporal da memória, ou seja, à utilização de horários do dia como informação (VAN DER ZEE *et al.*, 2008). Outro trabalho com nocautes para *Cry1* e *Cry2* mostrou atividade exploratória reduzida e habituação acelerada (KONDRATOVA *et al.*, 2010).

Em camundongos nocautes para *Per1* a expressão rítmica de genes do relógio está desordenada. Além disso, os animais são severamente deficientes para a aprendizagem espacial de longa duração dependente do hipocampo (JILG *et al.*, 2010).

Camundongos mutantes para *Per2* têm potenciação de longa duração atípico. O mecanismo proposto para isto é que os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) fosforilado por proteína de ligação estão diminuídos nos animais mutantes. Estes camundongos também tiveram recordações e medo condicionado. Assim, assume-se que o gene *Per2* pode estar ligado à regulação da potenciação de longa duração e em algumas maneiras de comportamento aprendido.

Também já foi descrita a expressão de *Per2* em células progenitoras neurais em proliferação e em neurônios pós-mitóticos e adultos do giro denteado. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de uma linhagem mutante de *Per2* mostrou alta densidade de células progenitoras neurais em proliferação e número de neurônios maduros aumentado. Porém, mutantes para *Per2* não apresentam número de neurônios alterado, já que parece haver um aumento compensatório da morte neuronal. Isso aponta que o gene *Per2* participa da regulação molecular subjacente à neurogênese hipocampal (BORGS *et al.*, 2009).

Em *Drosophila* mutantes para *Per*, a formação da memória a longo prazo está comprometida, enquanto mutações em outros genes do relógio não interferem neste processo.

Também foi visto que a superexpressão simultânea de *Per* e *dCREB2-b* (isoforma de CREB) aumenta a formação da memória a longo prazo. Isto indica que *Per* tem papel na formação da memória e que seu funcionamento deve estar ligado ao de *dCREB2-b* (SAKAI et al., 2004).

Contudo, dois testes de aprendizagem (labirinto aquático e condicionamento ao medo) não sofrem influência da mutação nos genes *Per1* e *Per2* em camundongos (ZUEGER et al., 2006).

Através da observação de que os genes do relógio apresentam uma variação diária em seus níveis de expressão no hipocampo, este trabalho fortalece a hipótese da participação desses genes no controle temporal das funções deste órgão. Alternativamente, é importante considerar a possibilidade de que no hipocampo, os genes do relógio também estejam envolvidos diretamente com processos biológicos outros que não o controle do ritmo circadiano. De fato, evidências sugerem que o gene *Per1* está envolvido no controle do ciclo celular e mecanismos de reparo do DNA e eventos epigenéticos (GERY et al., 2006; RAWASHDEH et al., 2014).

#### 7.2.2 Análises descritivas e comparativas dos perfis de variação diária de cada gene

Em relação ao gene *Bmal*, observamos que o nível de transcritos apresentou um perfil rítmico com amplitude de 0,289 e acrofase em ZT02. Um estudo realizado no giro denteado também mostrou variação diária da expressão de *Bmal* a nível de transcritos, com acrofase bastante similar, ZT2,5, e amplitude um pouco maior (0,35) que no nosso trabalho (HARBOUR et al., 2014). Ducan et al. (2013) compararam os níveis de expressão de *Bmal* (RNA) nas subregiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo de hamsters jovens (3-5 meses) e idosos (17-21 meses), foi visto que a expressão deste gene tem variação diária em todas as regiões estudadas dos animais jovens e que nos idosos a expressão estava diminuída, chegando a ser arrítmica em CA3. O pico de expressão ocorreu na fase clara do ciclo em CA1 (ZT01), CA2 (ZT06) e CA3 (ZT06) de hamsters jovens (DUNCAN et al., 2013). Corroborando estes achados, Gerstner et al. (2014), que analisaram dois ZTs em fases opostas de hipocampo de camundongo, perceberam que os níveis de RNA de *Bmal* estavam aumentados no ZT01 ao compará-lo ao ZT15, em ciclo claro/escuro 14h/10h (GERSTNER et al., 2014). Por outro lado, alguns trabalhos mostraram uma variação diária da expressão deste gene, mas com acrofase na fase oposta, o pico de expressão ocorreu no ZT15,5 (GOLINI et al., 2012), em ZT18 (FONKEN et al., 2013) e em ZT17 (REALE et al., 2013), horários

razoavelmente próximos. Outro trabalho mostra acrofase de *Bmal* às 16h, que corresponde ao ZT10 do nosso trabalho (BOONE et al., 2012). Fonzo et al. (2009) descreveram a variação ao longo do dia para proteína de *Bmal*, que teve pico de expressão no ZT22, que está adiantada quando comparado aos nossos dados (FONZO et al., 2009). Um estudo realizado com fetos de ratos mostrou a variação diária da expressão de *Bmal* no hipocampo de ratos, a acrofase está adiantada quando comparada ao nosso estudo. Neste mesmo trabalho, em animais adultos (90 dias) foi visto que a expressão é maior no ZT23 quando comparado ao ZT11 (VILCHES et al., 2014), o que também pode indicar um adiantamento do pico de expressão quando comparado ao nosso estudo, em que a acrofase ocorreu nas primeiras horas da fase clara (ZT02).

As diferenças relatadas para o perfil rítmico da expressão de *Bmal* podem ser decorrentes de variáveis metodológicas, tais como idade, espécie e linhagens de roedores usados nos diferentes estudos, além do desenho experimental do trabalho. Alguns estudos, por exemplo, fizeram uso do fotoperíodo claro/escuro 14h/10h. É importante frisar que alguns dos estudos citados tinham como objetivo central avaliar algum fenômeno ou efeito de substância durante o ciclo circadiano e com isso o delineamento experimental variou conforme suas próprias necessidades.

No nosso trabalho, não detectamos variação diária da expressão ao longo do período de 24h para *Clock*, por ambos os *softwares* utilizados para análise. Diferentemente dos nossos dados, Fonken et al. (2013) observaram variação diária da expressão de *Clock* (RNA) no hipocampo, em que os níveis foram maiores na fase escura, por volta do ZT22, o ciclo claro/escuro foi de 14h/10h (FONKEN et al., 2013), enquanto Boone et al. (2012) mostraram que a expressão de *Clock* é oscilante ao longo do dia, apontando nos gráficos um pico de expressão as 16h e expressão uniforme nos demais horários avaliados, ciclo claro/escuro 12h/12h (BOONE et al., 2012). Contudo, estes trabalhos não fizeram uso de ferramentas específicas para estudos circadianos. O'Callaghan et al. (2012) demonstraram que a expressão de proteínas CLOCK varia nas sub-regiões do hipocampo de camundongos ao longo do ciclo circadiano, depois do condicionamento em livre-curso por 2 ciclos (24h/cada). Em CA1 e no giro denteado o perfil de expressão foi semelhante, os níveis foram maiores nas primeiras horas do ciclo, atingindo pico em CT10, e depois desse horário diminuiu até chegar à batifase, no CT22. CA3

apresentou a menor variação (amplitude) entre as regiões estudadas, o pico de expressão ocorreu em CT6 e o nadir no CT18 (O'CALLAGHAN et al., 2012).

Por outro lado, nossos dados estão de acordo com alguns relatos de que este gene não apresenta ritmicidade de expressão em núcleos supraquiasmáticos (PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009), bem como em outras regiões, como, por exemplo, em tecido adiposo (FONKEN *et al.*, 2013). Assim, o papel de *Clock* no controle do ritmo circadiano tanto no hipocampo quanto em outros tecidos precisa ser mais investigado. Porém, é interessante considerar que *Clock* tem características funcionais importantes, tais como, predição de ligação ao DNA, dimerização de proteínas e ativação de domínios (KING *et al.*, 1997).

O gene *Cry1* apresentou variação diária da expressão, o valor de sua amplitude foi 0,306 e a acrofase ZT16,7 (fase escura) no nosso estudo. A expressão deste gene no hipocampo já foi descrita em alguns trabalhos. Fonken et al. (2013) também observaram variação da expressão de RNA deste gene em hipocampo de camundongo ao longo de ciclo claro/escuro 14h/10h, a acrofase também ocorreu na fase escura do ciclo, por volta do ZT18 (FONKEN *et al.*, 2013). Também corroborando este dado, Boone et al. mostraram variação da expressão de RNA de *Cry1* em hipocampo de rato, com acrofase em ZT14 (BOONE *et al.*, 2012), cerca de 2h adiantada em relação ao nosso estudo. Este mesmo trabalho aponta variação da expressão de proteína deste gene ao longo do dia.

Para *Cry2*, observamos a variação diária da expressão com a menor amplitude e a acrofase em ZT7,6. A expressão de *Cry2* no hipocampo já foi descrita tanto para RNA quanto para proteína (GRIESAUER *et al.*, 2014). Fonken et al. (2013) mostraram uma clara variação da expressão de *Cry2* ao longo do dia em hipocampo de camundongo, sendo que o pico de expressão ocorreu na fase escura do ciclo, por volta do ZT18 (FONKEN *et al.*, 2013). As diferenças entre os achados podem ser devidas às diferentes espécies usadas nos trabalhos, como também podem ter sido influenciadas pelo fotoperíodo em que os animais foram submetidos, no trabalho em questão o ciclo claro/escuro foi de 14h/10h.

No nosso trabalho, o gene *Per1* teve variação diária da expressão com a maior amplitude de expressão entre os genes avaliados. A acrofase ocorreu no ZT16 (fase escura). A expressão de *Per1* já foi descrita várias vezes para RNA e proteína no hipocampo de roedores. Alguns trabalhos corroboram os nossos dados de expressão diária de RNA deste gene no hipocampo, com acrofase na fase escura do ciclo (WANG *et al.*, 2006; FONKEN *et al.*,

2013). Bem como foi visto que a expressão diária de *Per1* permanece com ritmo parecido ao obtido com fotoperíodo claro/escuro, quando os animais são submetidos a escuro constante, em que a acrofase foi em CT17 (NAVIGATORE-FONZO *et al.*, 2013). Isso caracteriza o ritmo endógeno de expressão deste gene no hipocampo. Diferentemente, Golini *et al.* (2012) observaram acrofase de *Per1* na fase clara do ciclo (~ZT5). A expressão modulada ao longo do ciclo circadiano de proteínas *Per1* em hipocampo também já foi descrita, inclusive mostrando diferenças na expressão entre roedores ativos durante o dia ou noite. Foi visto que em animais diurnos o pico de expressão ocorre por volta do ZT10, tanto no giro denteado como em CA1. Já em animais noturnos, o pico costuma ocorrer na fase escura, por volta do ZT22, esses resultados demonstram que há interação entre cronotipo e ZT (RAMANATHAN *et al.*, 2010). Os dados para roedores noturnos é corroborado por Navigatore-Fonzo *et al.* (2013), que viram expressão rítmica de *PER1*, com acrofase em CT22:54, com animais em livre-curso. Em outro estudo também em escuro constante, a expressão de *PER1* foi avaliada nas sub-regiões do hipocampo, no GD o pico de expressão ocorreu no CT2, em CA1 no CT6 e em CA3 no CT22 (O'CALLAGHAN *et al.*, 2012). Há um atraso no pico de expressão no GD e em CA1, ao compará-los com outros estudos.

Também detectamos variação diária da expressão de *Per3*, que teve amplitude de 0,361 e acrofase em ZT20,8. A expressão deste gene já foi demonstrada em hipocampo (TAKUMI *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2012), sua expressão ao longo do ciclo circadiano foi descrita por apenas um trabalho, com pico de expressão às 16h (corresponde ao ZT10 do nosso trabalho) (BOONE *et al.*, 2012).

A análise da sobreposição das curvas cosseno representativas da expressão diária dos genes estudados mostrou que *Bmal* está em antifase com os genes *Cry1*, *Per1* e *Per3* (Figura 12), ou seja, apresentam acrofase em fases diferentes. Isso poderia ser explicado pelo mecanismo de regulação molecular, em que, resumidamente, CLOCK:BMAL estariam em antifase com os genes *Per* e *Cry* (PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009; ECKELMAHAN e STORM, 2009; WISOR *et al.*, 2002). Contudo, essas alças de retroalimentação são bem descritas no NSQ. Os dados apontam que *Cry2* está em fase com *Bmal*, embora sua acrofase esteja 5,6h atrasada em comparação a *Bmal*. Com isso, surge a hipótese de que os mecanismos regulatórios da transcrição e tradução destes genes sigam um modelo diferente do que ocorre no NSQ em outras estruturas. De fato, já foi descrito que os genes *Bmal*, *Clock*,

*Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2* têm acrofase na mesma fase do dia (fase escura) em hipocampo de camundongo (FONKEN et al., 2013).

Através da análise da curva cosseno, observamos que alguns genes apresentaram os três maiores pontos de expressão na mesma fase, indicando um possível efeito da luz na expressão gênica (Figura 13). De fato, quando comparamos a expressão entre as fases claras e escuras, observamos que *Bmal* é mais expresso na fase clara do que na escura, já os genes *Cry1*, *Per1* e *Per3* tem níveis significativamente maiores na fase escura. Enquanto *Cry2* e *Clock* não apresentam diferença de expressão entre as fases, o que pode ser decorrente do fato que o primeiro gene tem baixa amplitude, ou seja, a diferença entre os ponto médio e máximo da curva é pequena e, por isso, não seria possível detectar diferença entre as fases. Já *Clock* não apresenta variação diária da expressão, o que justificaria os valores não serem significativamente diferentes quando se comparam as fases clara e escura.

Os organismos fazem uso do fotoperíodo para prever parâmetros ambientais importantes e com isso conseguem adaptar-se às mudanças sazonais (GOLDMAN, 2001). Alguns estudos têm mostrado a influência do fotoperíodo em processos fisiológicos de um modo geral. Por exemplo, a reprodução e o metabolismo são ativados em roedores em dias mais longos, como no verão, enquanto são inibidos em dias curtos, como no inverno. Outro exemplo é a secreção de melatonina, que com base no fotoperíodo tem secreção diferenciada, atingindo níveis mais altos na fase escura (GOLDMAN, 2001). Do ponto de vista molecular, há relatos de que a luz muda o perfil de expressão de alguns genes no NSQ e em outros tecidos (MESSAGER et al., 1999; STEINLECHNER et al., 2002; SUMOVA et al., 2002). Hamsters submetidos a ciclo claro/escuro 16h/8h ou 8h/16h apresentam diferentes perfis de expressão dos genes *Per1*, *Per2* e *Cry2* no NSQ. As diferentes durações das fases clara e escura influenciam o perfil de expressão de *Per1* em coração e pulmão e de *Dbp* em coração. De um modo geral, a amplitude de expressão é diminuída quando a fase clara dura 8h, mas aumentada se esse fotoperíodo for mantido por um período prolongado (nesse caso, 28 semanas) (CARR et al., 2003). A expressão do gene *Per1* pode ser induzida por estímulo fótico em determinados horários do dia (STEINLECHNER et al., 2002; SUMOVA et al., 2002). Foi visto que *Per3* não tem expressão alterada pela ocorrência de pulsos de luz em nenhum horário do ciclo em NSQ, diferentemente do que ocorre com os genes *Per1* e *Per2* (TAKUMI et al., 1998; ZYLKA et al., 1998). Contudo, em claro constante, o ritmo de atividade de animais nocautes foi mais curto que nos animais selvagens, o que estava ligado à

intensidade da luz imposta, isto indica que o fenótipo *Per3<sup>-/-</sup>* pode estar associado à alteração da sensibilidade à luz, e não necessariamente à capacidade de resposta a ela (VAN DER VEEN e ARCHER, 2010).

Nossos dados sugerem que genes circadianos podem ter sua expressão no hipocampo modulada pela luz, o que fortaleceria a hipótese do fotoperíodo como regulador da expressão gênica em estruturas fora do NSQ. Entretanto, esta hipótese necessita ser investigada através de um desenho experimental apropriado para este tipo de questão, tais como o uso de análises em livre curso no escuro e no claro.

### **7.3 Análise da expressão com variação diária em estudos de expressão gênica diferencial na epilepsia**

Avaliamos se a variação diária dos níveis de transcritos no hipocampo provoca um impacto nos estudos de expressão gênica diferencial em epilepsia. Para isto, comparamos os níveis de transcritos no hipocampo entre animais epiléticos eutanasiados no ZT08 e animais controles referentes a diferentes ZTs (ZT00, ZT04, ZT08, ZT12, ZT16 e ZT20). Observamos que, com exceção de *Clock*, os dados de expressão diferencial muda dependendo do ZT usado para análise. Tal impacto no perfil de expressão acarreta em uma série de implicações metodológicas. De fato, nossos dados revelam que a oscilação circadiana é uma importante fonte de variação nos estudos de expressão diferencial em epilepsia. Portanto, os desenhos experimentais devem ser conduzidos de maneira criteriosa quanto ao horário de coleta das amostras dos grupos experimentais e controle. Recentemente, Hsu e Harmer (2012) mostraram que diferenças pequenas de até 30 minutos na coleta de amostras tem um efeito significativo em dados de expressão diferencial de centenas de genes da planta *Arabidopsis*, em fotoperíodo claro/escuro 12h/12h, através de análise de *microarray* (HSU e HARMER, 2012).

Além dessas relevantes considerações metodológicas, essas análises comparativas permitiram discutir o envolvimento dos genes do relógio nas crises recorrentes e espontâneas, a saber:

- *Clock* apresentou uma expressão diminuída no hipocampo de animais epiléticos quando comparados com quaisquer ZTs da fase clara e também da fase escura, individualmente ou agrupados (Figura 19). Este dado indica que *Clock* pode ter um papel associado à geração e manutenção das crises recorrentes e espontâneas (CREs). Não temos

conhecimento de que o gene *Clock* tenha sido descrito em trabalhos com epilepsia, mas há relatos do seu envolvimento com outras desordens neurológicas, como mania. Camundongos nocautes para *Clock* apresentam hiperatividade, diminuição do comportamento associado à depressão e ansiedade e aumento da preferência por estímulos com recompensas (ROYBAL et al., 2007). Animais que não expressam *Clock* apresentam também aumento da excitabilidade de neurônios dopaminérgicos na área tegmentar ventral do mesencéfalo, o que é ainda associado ao aumento da expressão de tirosina hidrosilase, enzima que controla a velocidade de síntese da dopamina. Isto indica a relação de *Clock* com a regulação da transmissão dopaminérgica (MCCLUNG et al., 2005). Neurônios mesocorticais dopaminérgicos estão envolvidos com funções cognitivas e com a formação da memória.

A dopamina tem efeito modulador sobre crises epiléticas e vias dopaminérgicas estão alteradas na epilepsia. Em pacientes portadores de ELT há diminuição de dopamina ipsilateral. Em ratos, após SE o volume de dopamina é modificado no hipocampo e no córtex frontal. O uso de um inibidor da recaptção de dopamina tem ação anticonvulsivante de maneira dose-dependente no hipocampo de rato (WERNER e COVEÑAS, 2011).

A expressão de *Clock* diminuída na fase crônica da epilepsia pode estar relacionada ao seu envolvimento com o sistema dopaminérgico. Já que a epilepsia é uma condição de hiperexcitabilidade neuronal.

- Para *Per1* vimos que a expressão está regulada positivamente quando o ZT08 de ratos epiléticos é comparado aos ZT00 e ZT04 ou aos ZTs da fase clara agrupados (Figura17). Este dado indica que *Per1* pode estar associado à epilepsia. De fato, já foi relatado que a estimulação elétrica ou por kainato promove aumento dos níveis de RNA nas primeiras 4h e de proteína nas primeiras 2h após o tratamento no hipocampo e córtex cerebral. Também foi visto que em cultura de neurônios corticais a despolarização ou tratamento com kainato promovem o aumento da expressão de *Per1*. O que indica que a expressão de *Per1* é dependente da atividade neuronal e epileptogênica (EUN et al., 2011). Contudo, este trabalho não avaliou a fase crônica da epilepsia.

- *Bmal* parece não ter expressão alterada pelo processo epileptogênico, uma vez que a expressão foi menor apenas quando comparamos o grupo epilético (ZT08) com os três ZTs da fase escura agrupados (Figura 14). O que é sugestivo de que esta expressão diferencial não seja influenciada pela epilepsia, mas sim pela luz. Outro trabalho também avaliou a expressão

de *Bmal* na presença de crises. Foi descrito que *BMAL* não tem expressão alterada em camundongos que foram estimulados por choque eletroconvulsivo em ZTs correspondentes, porém independente das crises os níveis são maiores em ZT1 (fase clara) e menores em ZT15 (fase escura) em ambos os grupos, experimental e controle. Esse mesmo trabalho descreve que o limiar para ocorrência de crise é maior nos animais estimulados na fase escura em animais selvagens. Em animais nocaute para *Bmal* esse ritmo foi perdido e, além disso, o limiar para crise foi diminuído em todos os tempos testados. Esses resultados sugerem que *Bmal* pode estar envolvido com o controle da excitabilidade neuronal (GERSTNER *et al.*, 2014).

- O gene *Cry1* tem expressão regulada positivamente quando comparamos o ZT08 da fase crônica aos ZT04 e ZT08 do grupo controle (Figura 15). Isto indica que este gene deve estar associado ao processo epileptogênico. Já *Cry2* apresenta expressão diminuída no grupo crônico (ZT08) quando é comparado ao ZT04 ou aos ZTs da fase clara juntos dos animais controle (Figura 16). Este gene mostra que a variação de 4h no estabelecimento dos grupos experimentais pode alterar os resultados gerados. Não temos conhecimento da investigação da expressão dos genes *Cry1* e *Cry2* em epilepsia. Contudo, já foi descrito que a ausência da regulação circadiana, decorrente da falta das proteínas CRY promove o aumento constitutivo da ativação de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , mediado pela via de sinalização NF-KB (NARASIMAMURTHY *et al.*, 2012). Tendo em vista a relação entre epilepsia e processos inflamatórios, a regulação de genes do relógio pode estar relacionada a fase crônica da epilepsia por mediação de moléculas pró-inflamatórias.

- Para o gene *Per3*, vimos que a expressão no ZT08 do grupo epiléptico está diminuída quando comparada aos ZTs da fase escura no grupo controle (Figura 18). Quando a comparação é feita na mesma fase e mais especificamente no mesmo horário do dia, não é possível detectar modulação da expressão. Isso sugere que os níveis de expressão deste gene não são influenciados pela epilepsia.

Através da análise conjunto desses dados percebe-se que há poucos trabalhos que avaliaram a expressão de genes do relógio em modelos de epilepsia. Outros genes não incluídos no nosso trabalho também já foram estudados na congruência do ritmo circadiano e da epilepsia. Por exemplo, DBP, cuja superexpressão aumentou os níveis de transcritos de *Hlf*, *Tef*, *Per1*, *Per2* e *Pdxk* no hipocampo, diminuiu o aprendizado espacial, mas não afetou a memória, enquanto aumentou a susceptibilidade a crises induzidas por kainato. Foi visto

também que a ativação de *GLP-1R* (glucagon-like peptide-1 receptor), que influencia a plasticidade hipocampal, o aprendizado e a neuroproteção, diminui os níveis de *DBP*. Isto indica que *DBP* está ligado à sinalização mediada por *GLP-1R* e a neuroplasticidade (KLUGMANN *et al.*, 2006).

#### 7.4 Análise da expressão de *Gfap* ao longo do ciclo circadiano

Embora o gene *Gfap* venha sendo utilizado como um marcador de astrogliose reativa na fase aguda da epileptogênese (FELLIN e HAYDON, 2005; LI *et al.*, 2009), em animais da fase crônica (epilépticos), a expressão diferencial de *Gfap*, é ainda controversa. Alguns autores mostraram uma superexpressão de *Gfap* no hipocampo de animais epilépticos (SOHL *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2011), enquanto outros observaram uma expressão inalterada (STEWART *et al.* 1990; HOLMBERG *et al.* 2006; PERNOT *et al.* 2010). Desde que observamos que uma variação diária pode alterar o perfil de expressão diferencial, selecionamos o gene *Gfap* com objetivo de avaliar o perfil de expressão deste gene no hipocampo durante o ciclo circadiano. Constatamos que *Gfap* tem expressão com variação diária (Figura 21), o que foi indicado pelos dois *softwares* usados para análise. Não temos conhecimento de trabalhos que tenham relatado esta constatação.

Na Figura 22 está disposta a organização temporal dos genes circadianos e também de *Gfap*. Este gene tem acrofase na mesma fase que os genes *Cry1*, *Per1* e *Per3*. *Gfap* tem um perfil bastante similar ao de *Per1*, podendo ser regulado pela mesma alça molecular.

Foi vista co-expressão de *Gfap* e *Per1* no córtex, striatum e no GD, mas no NSQ a expressão de *Per1* ocorre exclusivamente em neurônios de camundongos. Já a co-localização de *Per2* e *Gfap* foi vista apenas no striatum. Contudo, não foram identificados neurônios expressando *Per2* em várias regiões do cérebro, incluindo o GD. A expressão dos genes *Per* e de *Gfap* concomitantemente indica que nessas regiões, células gliais também são capazes de expressar genes do relógio, apontando a possibilidade destas células terem seu próprio sistema de temporização (CHENG *et al.*, 2009).

Com relação à influência da luz, pudemos observar que a expressão deste gene é significativamente maior na fase escura (Figura 23). Foi relatado que camundongos mantidos em claro constante apresentam níveis reduzidos de GFAP no NSQ quando comparados com camundongos mantidos em ciclo claro/escuro ou escuro constante, o que sugere que a

exposição a luz de forma constante pode levar ao remodelamento estrutural de astrócitos no NSQ (CANNAL, MOHAMMED, RODRÍGUEZ, 2009).

Os níveis de *Gfap* estão aumentados no grupo epilético (ZT08) quando comparado aos ZTs da fase clara do grupo controle, mas não é possível detectar esse aumento na expressão se a comparação for feita com quaisquer horários da fase escura (Figura 24). Esse achado pode justificar os dados conflitantes na literatura com relação a expressão de *Gfap* na fase crônica da epilepsia. De fato há trabalhos que mostram um aumento da expressão deste gene em hipocampo de animais epiléticos (SOHL *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2011), enquanto outros não observaram modulação da expressão na fase crônica (STEWART *et al.*, 1991; TORRE, LOTHMAN e STEWARD, 1993; HOLMBERG e PATTERSON, 2006; PERNOT *et al.*, 2011). Embora os autores não tenham relatado o momento do dia em que foi realizada a experimentação, é possível que a coleta das amostras em fases diferentes contribua para esses resultados controversos. Alternativamente, é possível que essas diferenças na expressão de *Gfap* estejam relacionadas a uma variação individual no nível de astrogliose hipocampal durante a epileptogênese. De fato, Garzillo e Mello (2002) observaram que apenas metade dos animais submetidos a SE induzido por pilocarpina apresentam gliose reativa.

Estudos ao longo do ciclo circadiano na fase crônica da epilepsia são necessários para avaliar se a variação da expressão de genes circadianos e também de *Gfap* ocorrem em animais epiléticos, bem como para entender qual a influência do processo epileptogênico sobre o ritmo de expressão destes genes.

## 8 CONCLUSÕES

Através deste estudo, concluímos que:

- As duplas *Tubb2a* e *Rplp1* e *Tubb2a* e *Ppia* são adequadas para normalização de dados de expressão gênica em hipocampo de rato *Wistar* ao longo do ciclo circadiano;
- Os genes *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3* tem variação diária da expressão em hipocampo de rato *Wistar*;
- Os genes *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3* têm dados de expressão diferentes na fase crônica da epilepsia, quando a comparação é feita com horários diferentes do grupo controle;
- O gene *Bmal* não tem níveis de expressão alterados no processo epileptogênico;
- O gene *Clock* apresenta expressão diminuída na fase crônica da epilepsia;
- O gene *Gfap* tem variação diária da expressão em hipocampo de rato *Wistar*;
- Há aumento da expressão de *Gfap* na fase crônica da epilepsia comparado ao grupo controle na fase clara do ciclo circadiano.

## REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Circadian Rhythms in Isolated Brain Regions. **J. Neurosci.**, v.22, n.1, p.350-356, 2002.
- AKASHI, M. and TAKUMI, T. The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, p. 441–448, 2005.
- AMARAL, D. G., WINTER, M. P. The Three-Dimensional Organization of the Hippocampal Formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, p.571-591, 1989.
- 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**, vol. 12, n.1. Feb. 2006.
- ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 3, p. 145-51, 2005.
- ARIDA et al. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v.34, p.99-107, 1999.
- BAJORAT, R. et al. Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm. **Epilepsia**, v.52, n. 9, e118-e122,, 2011.
- BERCOVICI, E., et al. Neocortical temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research and treatment**, v.2012, ID 1031602012, 2012.
- BERTRAM, E.H. e CORNETT, J.F. The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. **Brain Research**, v.661, p. 157-162, 1994.
- BLASTUND et al. Spontaneous epileptic rats show changes in sleep architecture and hypothalamic pathology. **Epilepsia**, v.46, p.934-938, 2005.
- BOONE, D. R. et al. Traumatic brain injury-induced dysregulation of the circadian clock. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46204, 2012.
- BORGS, L. Period 2 regulates neural stem/progenitor cell proliferation in the adult hippocampus. **BMC Neuroscience**, v. 10, n. 30, 2009.
- BOUCHARD-CANNON, P. et al. The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit. **Cell Reports**, v.5, p.961-973, 2013.

BUENAFE, A. C. Diurnal rhythms are altered in a mouse model of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 243, n. 1-2, p. 12-7, 2012.

BUHR, E. D.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. **Handb Exp Pharmacol**, n. 217, p. 3-27, 2013.

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

CANNAL, M.M.; MOHAMMED, N.M.; RODRÍGUEZ, J.J. Early programming of astrocyte organization in the mouse suprachiasmatic nuclei by light. **Chronobiol Int**, v.26, n.8, p. 1545-1558, 2009.

CARR, A.J.F. et al. Photoperiod Differentially Regulates Circadian Oscillators in Central and Peripheral Tissues of the Syrian Hamster. **Currente Biology**, v.13, p.1543-1548, 2003.

CECON, E. e FLÔRES, D.E.F.L. Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. **Revista da Biologia**, v.4, p. 28-33, 2010.

CHAUDHURY,D.; WANG, L.M. e COLWELL, C.S. Circadian Regulation of Hippocampal Long-Term Potentiation. **J Biol Rhythms**, v. 20, n.3, p. 225-236, 2005.

CHENG, H-IM et al. Segregation of expression of mPeriod gene homologs in neurons and glia: possible divergent roles of mPeriod1 and mPeriod2 in the brain. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n.16, p. 3110-3124, 2009.

CHO, C-H. Molecular mechanism of circadian rhythmicity of seizures in temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.6, n.55, 2012.

CURIA, G., et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of neuroscience methods**, v.172, n.2, p.143-57, Jul. 2008.

de ARAÚJO, M.A. et al. Identification of Endogenous Reference Genes for the Analysis of microRNA Expression in the Hippocampus of the Pilocarpine-Induced Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **PIOs One**, v. 9, n. 6, p. e100529, 2014.

DOMINGUEZ-ALONSO, A.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G.; BENÍTEZ-KING, G. Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. **J Pineal Res**, v. 52, p. 427-436, 2012.

DUNCAN, M.J. et al. Influence of aging on *Bmal1* and *Per2* expression in extra-SCN oscillators in hamster brain. **Brain Res**, 1491C, p. 44-53, 2013.

ECKEL-MAHAN, K.L.; STORM, D.R. Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears. **EMBO reports**, v. 10, n. 6, 584-591, 2009.

EIDMAN, D.S; BENEDITO, M.A.C. e LEITE, J.R. Daily changes in Pentilenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v.47, p.853-856, 1990.

- 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? **Neuroscientist**, v.7, p.340-52, 2001.
- EUN, B. et al. Induction of Per1 expression following an experimentally induced epilepsy in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 498, n. 2, p. 110-3, 2011.
- FELLIN, T. e HAYDON, P. G. Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? **Trends in molecular medicine**, v.11, n.12, p.530-3, Dec. 2005.
- FONKEN, L. K. et al. Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. **J Biol Rhythms**, v. 28, n. 4, p. 262-71, 2013.
- FONZO, L. S. et al. Temporal patterns of lipoperoxidation and antioxidant enzymes are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. **Hippocampus**, v. 19, n. 9, p. 869-80, 2009.
- FREEMAN, F.G. Development of kindled seizures and circadian rhythms. **Behavioral and Neural Biology**, v.30, p.231-235, 1980.
- GACHON, F. et al. The loss of circadian PARbZip transcription factors results in epilepsy. **Genes Dev.**, v. 18, p. 1397–1412, 2004.
- GARZILLO, C.L. e MELLO, L.E.A.M. Characterization of Reactive Astrocytes in the Chronic Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy. **Epilepsia**, v.5, p. 107-109, 2002.
- GERSTNER, J. R. et al. BMAL1 controls the diurnal rhythm and set point for electrical seizure threshold in mice. **Front Syst Neurosci**, v. 8, p. 121, 2014.
- GERY, S. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. **Mol Cell**, v.22, p.375-382, 2006.
- GERY, S.; KOEFFLER, H. P. Circadian rhythms and cancer. **Cell Cycle**, v. 9, n. 6, p. 1097-103, 2010.
- GOLDMAN, B.D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **J Biol Rhythms**, v.16, p.283-301, 2001.
- GOLDMAN, B.D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **J Biol Rhythms**, v.16, p.283-301, 2001.
- GOLINI, R. S. et al. Daily patterns of clock and cognition-related factors are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. **Hippocampus**, v. 22, n. 8, p. 1720-32, 2012.
- GONZÁLEZ-BURGOS, I. et al. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 423, p.162–166, 2007.
- GORBACHEVA, V.Y. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK\_BMAL1 transactivation complex. **PNAS**, v.102, n.9, p.3407-3412, 2005
- GRIESAUER, I. et al. Circadian abnormalities in a mouse model of high trait anxiety and depression. **Ann Med**, v. 46, n. 3, p. 148-54, 2014.

- GUILLAUMOND, F.; DARDENTE, H.; GIGUERE, V.; CERMAKIAN, N. Differential control of Bmall circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **J Biol. Rhythms**, v.20, p.391–403, 2005.
- GWINNER, E. Circannual rhythms in birds. **Current opinion in Neurobiology**, v.13, p.770-778, 2003.
- HALBERG, F. Some physiological and clinical aspects of 24-hour periodicity. **J Lancet**, v. 73, n. 1, p. 20-32, 1953.
- HARBOUR, V. L. et al. Phase differences in expression of circadian clock genes in the central nucleus of the amygdala, dentate gyrus, and suprachiasmatic nucleus in the rat. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103309, 2014.
- HASTINGS, M.H.; REDDY, A.B.; MAYWOOD, E.S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature reviews**, v.4, 649-661, 2003.
- HELLIER, J.L. e DUDEK, F.E. Spontaneous motor seizures of rats with kainate-induced epilepsy: effect of time of day and activity state. **Epilepsy Res.**, v. 35, p.47–57, 1999.
- HERZOG, E.D.; TAKAHASHI, J.S.; BLOCK, G.D; Clock controls circadian period in isolated Suprachiasmatic nucleus neurons. **Nature neuroscience**, v.1, n. 8, p. 708-713, 1998.
- HOFSTRA, W.A. et al. Temporal distribution of clinical seizures over the 24-h day: a retrospective observational study in a tertiary epilepsy clinic. **Epilepsia**, v.50, p. 2019–2026, 2009a.
- HOFSTRA, W.A. et al. Diurnal rhythms in seizures detected by intracranial electrocorticographic monitoring: an observational study. **Epilepsy Behav.** v.14, p.617–621, 2009b.
- HOLMBERG, K. H.; PATTERSON, P. H. Leukemia inhibitory factor is a key regulator of astrocytic, microglial and neuronal responses in a low-dose pilocarpine injury model. **Brain Res**, v. 1075, n. 1, p. 26-35, 2006.
- HONMA, S. et al. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. **Neurosci Lett**, v. 250, n. 3, p. 157-60, 1998.
- HONMA, S. et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. **Nature**, v. 419, p. 841-844, 2002.
- HSU, P.Y e HARMER, S.L. Circadian Phase Has Profound Effects on Differential Expression Analysis. **PLoS ONE**, v.7, n.11, e49853, 2012.
- IKENO, T. e NELSON, R.J. Acute Melatonin Treatment Alters Dendritic Morphology and Circadian Clock Gene Expression in the Hippocampus of Siberian Hamsters. **Hippocampus**, v. 00, p. 1-7, 2014.
- IKENO, T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Photoperiod affects the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of Siberian hamsters. **Chronobiol Int**, v. 30, n. 9, p. 1089-1100, 2013.

- IKENO, T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Timing of light pulses and photoperiod on the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of siberian hamsters. **Neuroscience**, v.270, p. 69-75, 2014.
- JACOBS, M. P., et al. Curing epilepsy: progress and future directions. **Epilepsy & behavior : E&B**, v.14, n.3, p.438-45, Mar. 2009.
- JILG, A. et al. Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. **Hippocampus**, v.20, p.377-388, 2010.
- JIMÉNEZ-ORTEGA, V. et al. Cadmium-induced disruption in 24-h expression of clock and redox enzyme genes in rat medial basal hypothalamus: prevention by melatonin. **Frontiers in Neurology**, v. 2, n.13, doi: 10.3389/fneur.2011.00013, 2011.
- KAMPHUIS, W. et al. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, n. 1, p. 18-26, 2005.
- KING, D. P. et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 641-53, 1997.
- KLUGMANN, M. et al. A novel role of circadian transcription factor DBP in hippocampal plasticity. **Mol Cell Neurosci**, v. 31, n. 2, p. 303-14, 2006.
- KO, C.H. e TAKAHASHI, J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human Molecular Genetics**, v. 15, R271-R277, 2006.
- KONDRATOVA, A. A. et al. Circadian clock proteins control adaptation to novel environment and memory formation. **Ageing** (Albany NY), v. 2, n. 5, p. 285-97, 2010.
- KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 9, p. 2112-6, 1971.
- KOSIR, R. et al. Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. **BMC Mol Biol**, v. 11, p. 60, 2010.
- LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência . São Paulo, Atheneu, 2004.
- LI, L. M. e 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**, v.31, p.1108-1114, 2009.
- LIU, C. et al. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. **Cell**, v. 91, n. 6, p. 855-60, 1997.
- LIVAK, K. ;SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), v.25, n.4, p.402-08. 2001.
- LOPES DA SILVA, F.H. et al. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. **Phisio Rev**, n.70, n.2, 453-511, 1990.
- LOWENSTEIN, D. H.; ALLDREDGE, B. K. Status epilepticus. **N Engl J Med**, v.338, n.14, p.970-6, Apr 2. 1998.

- LOWREY, P.L.; TAKAHASHI, J.S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**, v. 5, p. 407–441, 2004.
- MARQUES, T.E.B.S. et al. Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **PIOs One**, v. 8, n. 8, p. e71892, 2013.
- MATHERN, G. W., BABB, T. L., LEITE, J. P., et al. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 151-161, 1996.
- MATZEN, J.; BUCHHEIM, K. e HOLTKAMP, M. Circadian dentate gyrus excitability in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v.234, p.105-111, 2012.
- MCCLUNG, C. A. et al. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9377-81, 2005.
- MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 3413–25, 1994.
- MESSAGER, S. et al. Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 17, p. 9938-43, 1999.
- NARASIMAMURTHY, R. et al. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 31, p. 12662-7, 2012.
- NAVIGATORE-FONZO, L. S. et al. Retinoic acid receptors move in time with the clock in the hippocampus. Effect of a vitamin-A-deficient diet. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 5, p. 859-67, 2013.
- O'CALLAGHAN, E. K. et al. Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47087, 2012.
- OKAMURA, H. et al. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 9-10, p. 876-84, 2010.
- PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. [Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, n. 1, p. 63-71, 2009.
- 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, 2011.
- PERSINGER, M.A. e KOREN, S.A. Persistent elevation of nocturnal activity in rodents following apparent recovery from lithium/pilocarpine-induced limbic seizures. **Perceptual and Motor Skills**.v.86, p. 1243-1248, 1998.
- 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.
- POIREL, C. Circadian rhythms and temporal structure of the susceptibility to tonic-clonic seizures in the mouse. **Brain Research**, v.301, p.384-388, 1984.

PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBa controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, p. 251–260, 2002.

QUIGG et al. Effects of Circadian Regulation and Rest-Activity State on Spontaneous Seizures in a Rat Model of Limbic Epilepsy. **Epilepsia**, v.41, p.502-509, 2000.

QUIGG et al. Temporal Distribution of Partial Seizures: Comparison of an Animal Model with Human Partial Epilepsy. **Ann Neurol**, v.43, p.748-755, 1998.

QUIGG, M. Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v.42, p. 43-55, 2000.

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.

RAEDT, R. et al. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. **Acta Neurol Scand**, v. 119, p. 293-303, 2009.

RAKHADE, S.N et al. A common pattern of persistent gene activation in human neocortical epileptic foci. **Ann.Neurol**. v. 58,p. 736–747, 2005.

RAMANATHAN, C. et al. Phase preference for the display of activity is associated with the phase of extra-suprachiasmatic nucleus oscillators within and between species. **Neuroscience**, v. 170, n. 3, p. 758-72, 2010.

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. et al. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. **J Pineal Res**, v. 50, p. 29–37, 2011.

RANA, S. et al. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 1, p. 95-103, 2014.

RAWASHDEH, O. et al. PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. **Hippocampus**, v.24, p. 712-723, 2014.

REALE, M. E. et al. The transcription factor Runx2 is under circadian control in the suprachiasmatic nucleus and functions in the control of rhythmic behavior. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54317, 2013.

REPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 647-76, 2001.

REPERT, S.M.;WEAVER, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, p. 935–941, 2002.

RIPPERGER, J. A. et al. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. **Genes Dev**, v. 14, p. 679-689, 2000.

ROBERTS, A.J. e KEITH,L.D. Sensitivity of the Circadian Rhythm of Kainic Acid-induced Convulsion Susceptibility to Manipulations of Corticosterone Levels and Mineralocorticoid Receptor Binding. **Neuropharmacology**, v.9, p. 1087-1093, 1994.

ROCKENBACH, I. Expressão da proteína prion celular no modelo de pilocarpina de epilepsia do lobo temporal. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,Porto Alegre. 2011.

ROYBAL, K. et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 15, p. 6406-11, 2007.

RUBY, N.F. et al. Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. **PNAS**, v.105, n. 40, p. 15593-15598, 2008.

SAHAR, S.; SASSONE-CORSI, P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 12, p. 886-96, 2009.

SAKAI, T. et al. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in Drosophila. **PNAS**, v,101, n.45, p.16058-63, 2004.

SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 190-8, 2013.

SCHREIBER, R.A. e SCHLESINGER, K. Circadian Rhythms and Seizure Susceptibility: Effects of Manipulations of Light Cycles on Susceptibility to Audiogenic Seizures and on Levels of 5-Hydroxytryptamine and Norepinephrine in Brain. **Physiol and Behavior**, v8, p.699-703, 1972.

SHARMA, A.K. et al. Mesial Temporal Lobe Epilepsy Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 984-999, 2007.

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

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, 2000.

STANLEY et al. Phase shift in the 24-hour rhythm of hippocampal EEG spiking activity in a rat model of temporal lobe epilepsy. **J Neurophysiol**, v.110, p.1070-1086, 2013.

STEINLECHNER, S. et al. Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. **J Biol Rhythms**, v. 17, n. 3, p. 202-9, 2002.

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, 1991.

STEWART, L.S. e LEUNG, L.S. Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. **Epilepsy e Behavior**, v. 4, p.153-160, 2003.

STEWART, L.S.; LEUNG, L.S. e PERSINGER, M.A. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v.44, p.207-212, 2001.

SUMOVA, A. et al. The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. **Brain Res**, v. 947, n. 2, p. 260-70, 2002.

TAHSILI-FAHADAN et al. Effect of acute and chronic photoperiod modulation on pentylentetrazole-induced clonic seizure threshold in mice. **Epilepsy Research**, v.82, p. 64-69, 2008.

TAKAHASHI, Y.; SAWA, L. e OKADA, T. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p.488-493, 2013.

TAKUMI, T. et al. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. **EMBO J**, v. 17, n. 16, p. 4753-9, 1998

TALATHI, S.S. et al. Circadian control of neural excitability in an animal model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience Letters**, v.455, p.145-149, 2009.

TAMAI, S.; SANADA, K. e FUKADA, Y. Time-of-day-dependent enhancement of adult neurogenesis in the hippocampus. **PLoS ONE**, v.3, n.12, e3835, 2008.

TORRE, E. R.; LOTHMAN, E.; STEWARD, O. 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, 1993.

VAN DER VEEN, D. R.; ARCHER, S. N. Light-dependent behavioral phenotypes in PER3-deficient mice. **J Biol Rhythms**, v. 25, n. 1, p. 3-8, 2010.

VAN DER ZEE, E.A. et al. Circadian Time-Place Learning in Mice Depends on Cry Genes. **Current Biology**, v.18, n.11, 844-848, 2008.

VAN LUIJTELAAR, E.L.J.M. e COENEN, A.M.L. Circadian rhythmicity in absence epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v.2, p.331-336, 1988.

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.

VILCHES, N. et al. Gestational chronodisruption impairs hippocampal expression of NMDA receptor subunits Grin1b/Grin3a and spatial memory in the adult offspring. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91313, 2014.

WADA, J.A. e ASAKURA, T. Circadian Alteration of Audiogenic Seizure Susceptibility in Rats. **Experimental Neurology**, v.29, p.211-214, 1970.

WANG, X. et al. A promoter polymorphism in the Per3 gene is associated with alcohol and stress response. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e73, 2012.

WANG, X. et al. Altered expression of circadian clock gene, mPer1, in mouse brain and kidney under morphine dependence and withdrawal. **J Circadian Rhythms**, v. 4, p. 9, 2006.

WELSH, D. K. et al. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. **Neuron**, v. 14, n. 4, p. 697-706, 1995.

WERNER, F-M e COVEÑAS, R. Classical Neurotransmitters and Neuropeptides Involved in Generalized Epilepsy: A Focus on Antiepileptic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v.18,p. 4933-4948, 2011.

WISOR, J.P. et al. A role for cryptochromes in sleep regulation. **BMC Neuroscience**, v.3, p.20, 2002.

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, 2011.

YOO, S. H. et al. A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n. 7, p. 2608-2613, 2004.

ZUEGER, M. mPer1 and mPer2 mutant mice show regular spatial and contextual learning in standardized tests for hippocampus-dependent learning. **J Neural Transm**, v.113, p. 347-356, 2006.

ZYLKA, M. J. et al. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1103-10, 1998.

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS****UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Maceió, 25 de junho de 2012.

**Processo:02/2012**

**Título: Análise da expressão diferencial de genes circadianos em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal**

**Coordenador: Daniel Leite Góes Gitai**

**Situação: Aprovado**



**Robinson Sabino da Silva  
Coordenador do CEUA-UFAL**