



Rafael Breglio Marchesini

**“ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NO
MODELO DE EPILEPSIA DE LOBO
TEMPORAL INDUZIDO PELA
PILOCARPINA”**

Novembro 2011

UNICAMP



Rafael Breglio Marchesini

**“ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NO
MODELO DE EPILEPSIA DE LOBO
TEMPORAL INDUZIDO PELA
PILOCARPINA”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Novembro 2011

UNICAMP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M332a Marchesini, Rafael Breglio, 1983 -
Análise de genes envolvidos no modelo de epilepsia
de lobo temporal induzido pela pilocarpina. / Rafael
Breglio Marchesini. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. Pilocarpina. 3. Interferência de
RNA. I. Lopes-Cendes, Iscia Teresinha. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of genes involved in the temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine

Palavra-chave em inglês:

Epilepsy

Pilocarpine

RNA interference

Área de concentração: Neurociências

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Ischia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Magda Lahorgue Nunes

Débora Amado Scerni

Monica Barbosa de Melo

Edi Lucia Sartorato

Data da defesa: 01-11-2011

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Rafael Breglio Marchesini

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

2. Prof(a). Dr(a). Magda Lahorgue Nunes

3. Prof(a). Dr(a). Monica Barbosa de Melo

4. Prof(a). Dr(a). Edi Lucia Sartorato

5. Prof(a). Dr(a). Débora Amado Scerni

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/11/2011

DEDICATÓRIA

Dedico

**aos meus pais com muito amor,
por toda uma vida dedicada à minha educação,
por todo carinho e amor recebidos**

**À Xam com todo o amor,
pela força, ajuda e amor incondicional
pelo incentivo,
sem os quais nada disso existiria.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra Iscia Lopes-Cendes pela orientação, por me aceitar no laboratório e permitir desenvolver o trabalho com muita liberdade, sempre com muita confiança em mim e em meu trabalho. Obrigado por toda compreensão e ajuda em todos os momentos.

À FAPESP pela bolsa de doutorado (06/58041-0).

Aos amigos do laboratório, DNA e RNAi, pelos momentos de ajuda e também de alegria, sempre presentes no dia-a-dia.

Ao Vinicius Pascoal, pela enorme ajuda, confiança e paciência comigo. Pela dedicação e inteligência, sem os quais esse trabalho seria muito mais difícil.

Ao Alexandre Matos, pela força e ajuda essenciais no final da tese.

Ao Fábio Conte e Ana Conte, amigos para todas as horas, companheiros no trabalho, sempre dispostos à ajudar e com palavras sábias sempre confortando nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, Rui e Li, e a Roberta, minha cunhada, pela força e incentivo. Obrigado por todo amor.

À todos da minha família, especialmente meus tios, Mazuze e Pontes, e meus primos, Zé, Marina, Pedro e Paulo, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Beto, pelo companheirismo e inteligência, sempre com bons conselhos e também pelos momentos de diversão.

Aos meus pais, Regina e Zeca, meus exemplos de vida, que me criaram e me passaram todos os valores mais importantes. Pela dedicação de suas vidas à minha educação, sem a qual nada disso seria possível. Pelo amor, carinho, atenção e também paciência para saber sempre me guiar pelo caminho correto e mostrar o que é a vida e do que ela é feita. Obrigado pelo incentivo incondicional, sem o qual tudo seria mais difícil.

À Xam, amor da minha vida, pessoa maravilhosa com um amor sem limites. Obrigado pelo incentivo, sempre fundamental, pela ajuda no dia-a-dia do trabalho (colocando à mão na massa literalmente), por simplesmente me ouvir, pela inteligência extrema, pela paciência comigo, principalmente nos momentos chatos, quando com pequenos gestos e palavras de amor e carinho, estava sempre ao meu lado. Obrigado por fazer parte de minha vida, por me guiar, pela fé em mim e pelo amor incondicional. Obrigado por ser essa pessoa maravilhosa, e que me faz o homem mais feliz. Sem você nada disso faria sentido!

À todos que contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	23
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 O MODELO DE ELTM INDUZIDO PELA PILOCARPINA	29
1.2 GENES ALVO SELECIONADOS	32
1.3 A INTERLEUCINA 1 BETA E A EPILEPSIA.....	44
1.4 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi).....	48
1.5 TRANSFEÇÃO DE siRNAs NO SNC EM MAMÍFEROS.....	50
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 ANIMAIS	55
3.2 INDUÇÃO DO MODELO DE PILOCARPINA	55
3.3 ANÁLISE DE CRISES RECORRENTES	56
3.4 ALGORÍTIMO PARA DESENHO DAS MOLÉCULAS INTERFERENTES	56
3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INOCULAÇÃO DOS siRNAs	58
3.6 INOCULAÇÃO DOS siRNAs.....	60
3.7 EXTRAÇÃO DE RNA DO CÉREBRO DOS RATOS.....	62
3.8 PCR EM TEMPO REAL	63
3.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT.....	65
3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	66
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4. RESULTADOS	71
4.1 PADRONIZAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO.....	71
4.2 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS E ESPECIFICIDADE	74

4.3 PROCEDIMENTO DE ANESTESIA DOS ANIMAIS	75
4.4 INDUÇÃO DO MODELO DA PILOCARPINA EM RATOS	76
4.5 VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	77
4.6 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SILENCIAMENTO GÊNICO	81
4.7 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO UTILIZANDO O PEPTÍDEO RVG-9DR (PROCEDIMENTO NÃO INVASIVO).....	85
5. RESULTADOS – CAPÍTULOS	89
6. CAPÍTULO 1 - SILENCIAMENTO GÊNICO DURANTE A FASE SILENCIOSA	91
6.1 EXPRESSÃO DO GENE TRKB.....	91
6.2 siTrkB UTILIZADO IN VIVO.....	93
6.3 siPLAT UTILIZADO IN VIVO	94
6.4 CULTURA CELULAR	95
6.5 ANIMAIS ISOGÊNICOS.....	100
7. CAPÍTULO 2 - PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NA FASE SILENCIOSA	103
8. CAPÍTULO 3 (ARTIGO).....	107
9. CAPÍTULO 4 - ESTUDOS ADICIONAIS DA EXPRESSÃO DO <i>Il1b</i> e <i>Il1rn</i>	149
10. DISCUSSÃO	157
11. CONCLUSÕES	169
12. REFERÊNCIAS	171
13. ANEXOS	183

LISTA DE ABREVIATURAS:

Acp	proteína acessória do receptor da interleucina 1
ADP	adenosina difosfato
ANOVA	análise de variância
AP	antero-posterior
ATP	adenosina trifosfato
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BHE	barreira hematoencefálica
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
CA1	<i>Cornu Ammonis</i> área 1
CA3	<i>Cornu Ammonis</i> área 3
cDNA	ácido desoxirribonucleotídeo complementar ao RNA
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
Ct	<i>Threshold Cycle</i>: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção
DNA	ácido desoxirribonucléico

dNTP mix	desorribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
ELT	epilepsia de lobo temporal
ELTM	epilepsia de lobo temporal mesial
EH	esclerose hipocampal
EST	expressed sequence tags
H	Profundidade
IB	Instituto de Biologia
Il1	interleucina 1
Il10	interleucina 10
Il1b	interleucina-1β
Il1f10	interleucina -1, membro 10
Il1f5	interleucina -1, membro 5
Il1r1	interleucina 1, receptor I
Il1rII	interleucina 1, receptor II
Il1rn	antagonista do receptor da interleucina 1
Il33	interleucina 33

Il6	interleucina 6
INF-α	interferon alpha
INF-α	interferon beta
RNAi	interferência por RNA
L	Lateral
RelA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian), sinônimo de Nfkb subunidade p65 (fator de transcrição nuclear kappa B, 65p)
Npy	Neuropeptídeo Y
PBS	Tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
p-ikbk	Ikk fosforilação da quinase do I kappa B
PTGS	silenciamento gênico pós-transcricional
Ptgs2/Cox2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
RVG-9dR	Fragmento do glicocalix do vírus da raiva fundido com cauda de 9 d-argininas
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SE	status epilepticus
siRNA::RVG	Complexo siRNA e peptídeo RVG-9R
siRNAs	small interfering RNAs
Slc1a3	Glutamate transporters sodium- and potassium-dependent members of the solute carrier family 6
SNC	sistema nervoso central
SPF	Specific Pathogen Free
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR	Toll like receptors
Tpa-Plat	Ativador de plasminogênio tecidual
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
TrkB	Tirosina Quinase B
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTR	Untranslated Region
µg	Migrogramas
WB	western blot

LISTA DE FIGURAS:

Página

Figura 1. Mudanças na expressão gênica em resposta ao <i>status epilepticus</i> (SE)..	33
Figura 2. Esquema das expressões de BDNF e NPY, estando ambos superexpressos ..	36
Figura 3. Mecanismos de epileptogênese do BDNF.	38
Figura 4. Ação da Interleucina-1.	41
Figura 5. Cascata fisiopatológica mediada pela sinalização do complexo Il1r/TLR na epilepsia. ..	47
Figura 6. Mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi.....	48
Figura 7. Gráfico gerado pelo programa 7500 System SDS Software mostrando a curva padrão obtida para o gene <i>TrkB</i>	78
Figura 8. Linha de tendência obtida após construção do gráfico para o <i>TrkB-Gapdh</i>	79
Figura 9. Gráfico gerado pelo programa 7500 System SDS Software mostrando a curva padrão obtida para o gene <i>Il1b</i>	80
Figura 10. Curva de Padronização do PCR em Tempo Real.	81
Figura 11. Gráfico referente à análise de expressão do gene <i>Ptgs2</i>	83
Figure 12. Gráfico referente à análise de expressão do gene <i>Ptgs2</i> em animais que receberam seis injeções.....	83
Figura 13. Gráfico referente à análise de expressão do gene <i>Ptgs2</i> em animais controles canulados e não canulados.	84
Figura 14. Gráfico referente à padronização da concentração utilizada de siRNA.....	86
Figura 15. Experimento de padronização da técnica de silenciamento gênico quanto ao tempo de ação do siRNA e relação molar do peptídeo com o siRNA..	87
Figura 16. Gráfico referente à análise de expressão do gene <i>Ptgs2</i> e <i>Il1b</i> em experimento piloto usando o peptídeo RVG-9R.	88
Figura 17. Expressão relativa do gene <i>TrkB</i> utilizando como controle endógeno o gene <i>GAPDH</i> . 92	
Figura 18. Expressão relativa do gene <i>TrkB</i> tendo como controle endógeno o gene <i>GAPDH</i>	93
Figura 19. Expressão relativa do gene <i>Plat</i> tendo como controle endógeno o gene <i>Gapdh</i>	94
Figura 20. Neuro 2a em microscopia de luz. A) Aumento 10x; B) Aumento 40x.....	96
Figura 21. Transfecção de Neuro2a	98
Figura 22. Expressão dos genes <i>TrkB</i> (verde) e <i>PLAT</i> (laranja) das células Neuro 2A.	99

Figura 23. Expressão relativa do gene <i>IL1B</i> tendo como controle endógeno o gene <i>GAPDH</i>	100
Figura 24. Análise da expressão do gene <i>Plat</i> nas fases aguda e silenciosa.	103
Figura 25. Análise da expressão do gene <i>TrkB</i> nas fases aguda e silenciosa.	104
Figura 26. Análise da expressão do gene <i>Tlr2</i> nas fases aguda e silenciosa.	105
Figura 27. Análise da expressão do gene <i>Tlr4</i> nas fases aguda e silenciosa.	106
Figura 28. Análise da expressão do gene <i>Plat</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total...	149
Figura 29. Análise da expressão do gene <i>Plat</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.	150
Figura 30. Análise da expressão do gene <i>TrkB</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total .	150
Figura 31. Análise da expressão do gene <i>TrkB</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo....	151
Figura 32. Análise da expressão do gene <i>Il6</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.	152
Figura 33. Análise da expressão do gene <i>Il6</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.	152
Figura 34. Análise da expressão do gene <i>Il10</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total...	153
Figura 35. Análise da expressão do gene <i>Il10</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.	153
Figura 36. Análise da expressão do gene <i>Tlr2</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total...	154
Figura 37. Análise da expressão do gene <i>Tlr2</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.	155
Figura 38. Análise da expressão do gene <i>Tlr4</i> , 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total...	155
Figura 39. Análise da expressão do gene <i>Tlr4</i> , 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.	156

RESUMO

As epilepsias afetam aproximadamente 1% da população mundial, sendo que a dentre as diferentes síndromes epilépticas a epilepsia de lobo temporal (ELT) é a mais freqüente, e aquela com a maior proporção de pacientes adultos que apresentam crises refratárias ao tratamento clínico. Modelos animais induzidos têm sido já largamente utilizados para estudar a ELT, já que se considera que os mesmos apresentam epileptogenicidade similar àquela observada em tecidos “epilépticos” humanos quando estudados *ex vivo*.

Dentre os vários modelos disponíveis, aquele induzido pela pilocarpina, além de muito bem estabelecido em nosso meio, tem já ampla caracterização, sendo dividido em três fases de acordo com os aspectos fenomenológicos, histopatológicos e moleculares: fase aguda, fase silenciosa e fase crônica. Baseado em padrões de expressão diferencial de genes na fase silenciosa do modelo, tem-se que a modificação de circuitos neuronais é um importante pré-requisito para a plasticidade funcional no sistema nervoso central sob condições patológicas. Levando-se em conta que a remodelação hipocampal ocorre durante o período livre de crises (fase silenciosa), danos estruturais causados pelo *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina na fase aguda acabam resultando em crises espontâneas recorrentes na fase crônica do modelo.

Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivo principal investigar a ação de genes que têm suas expressões induzidas durante a fase silenciosa do modelo da pilocarpina, e que estariam possivelmente relacionados com danos neuronais e epileptogênese através de mecanismos associados à plasticidade e reorganização neuronal. Além disso, o trabalho investigou mais profundamente o papel do gene *interleucina1-β*

(*Il1b*), o qual foi demonstrado previamente estar envolvido no aumento da liberação de glutamato durante a fase aguda do modelo da pilocarpina.

A principal estratégia experimental utilizada foi baseada no silenciamento pós-transcricional pela técnica de interferência por RNA (RNAi) aplicada *in vivo*.

Foi definido um padrão de expressão gênica para os genes *TrkB* e *Plat*, que sabidamente estão envolvidos com a fase silenciosa, e também para os genes da família dos *Toll like receptors*, durante o início da fase silenciosa, demonstrando suas expressões alteradas. Tais alterações parecem participar dos processos críticos que ocorrem na fase silenciosa, processos inflamatórios que associadas à remodelação sináptica geradas pelos genes estruturais (*TrkB* e *Plat*), culminam na fase crônica do modelo.

A expressão dos genes *Il1b* e *Il1ra* também foram definidas, além do silenciamento dos mesmos. O silenciamento na fase aguda do modelo da pilocarpina levou a alterações fenotípicas detectáveis nos animais silenciados.

Sendo assim, acreditamos que nossos resultados fornecem dados relevantes referentes ao papel crítico dos genes investigados na determinação da epileptogênese durante as fases aguda e silenciosa do modelo da pilocarpina para ELT, além de ter demonstrado a viabilidade do uso da RNAi na investigação funcional de genes envolvidos na patogênese das epilepsias *in vivo*.

ABSTRACT

The epilepsies affect approximately 1% of the population worldwide. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent and commonly resistant to clinical treatment. Animal models have been widely used in order to study the mechanisms underlying TLE, especially those induced by chemical agents or electrical stimulation. It is believed that these models present similar epileptogenesis to that of human epileptic tissues studied *ex vivo*.

Among the various animals models available we decided to use the one induced by pilocarpine injections. This model is characterized by three different phases accordingly to phenomenological, histopathological and molecular aspects: acute phase, silent phase and chronic phase. Based on the presence of genes with differential expression patterns in the silent phase, it is believed that it is in this phase that occur the modifications in neuronal circuits that are essential to functional plasticity of the central nervous system under pathological conditions. The changes in hippocampal circuits occurring during the silent phase are the result of the damage caused by the *status epilepticus* (SE) induced by pilocarpine in the acute phase. These events will ultimately result in spontaneous recurrent seizures in the chronic phase of the model.

The main objective of this work was to explore the action of genes that are induced during the silent phase of the pilocarpine model. These would be possibly related with the neuronal damage and the development of epileptogenesis through mechanisms associated with plasticity and neuronal reorganization. In addition, we aimed to explore further the role

of *Interleukin1- β* (*Il1b*), which had been previously demonstrated to be involved in the increase of glutamate release during the acute phase of the pilocarpine model.

To achieve these objectives we used a pos-transcriptional gene silencing strategy named RNA interference (RNAi) applied *in vivo*.

It was defined a pattern of gene expression for *Trkb* and *Plat*, that are known to be involved with the silent phase. Besides that, the *Toll like receptors* genes family had the pattern of expression defined during the beginning of the silent phase, demonstrating the expression altered. These alterations seem to participate in the critical processes that occur in the silent phase, inflammatory processes that associated to the synaptic reorganization generated by the structural genes (*TrkB* and *Plat*), culminate in the chronic phase of the model.

The expression of the genes *Il1b* and *Il1ra* were defined too, besides the silencing of them. The silencing in the acute phase of the pilocarpine model led to phenotypic alterations detectable in the animals that had the genes silenced.

We believe that our results can provide relevant new information regarding the role of genes in the determination of epileptogenesis during the acute and silent phases of the pilocarpine model. In addition, we have demonstrated the fisibility of the using RNAi to study epileptogenesis *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

Formando um grupo de doenças neurológicas crônicas, as epilepsias são decorrentes de alterações das funções cerebrais associadas ou não a outras doenças neurológicas. A grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, gravidade e prognóstico sugere que sejam tratadas como um grupo de doenças ou síndromes e não como uma entidade clínica homogênea. No entanto, a característica comum a todas as síndromes epiléticas é a ocorrência de crises epiléticas, as quais são causadas por descargas neuronais anormais que ocorrem de forma passageira, sincrônica e desorganizada, levando a manifestações clínicas dependentes da região (ou regiões) do sistema nervoso central afetada (Zielinski, 1988).

Dentre as várias síndromes epiléticas, a epilepsia do lobo temporal (ELT) tem grande importância clínica não somente por sua alta incidência, mas também por ser frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso (Engel *et al.*, 1989). Geralmente seu início se dá na infância, muito embora possa aparecer em qualquer idade. Aproximadamente metade dos adultos com epilepsia apresenta ELT, e o controle completo das crises apenas com o tratamento clínico ocorre em menos de 50% desses pacientes. De maneira geral, a ELT se caracteriza por crises parciais simples e/ou complexas recorrentes, sendo que as crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas) são pouco frequentes. Os principais sintomas aparecem em decorrência do acometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, sendo a ELT mesial (ELTM) a forma mais comum de ELT (Guerreiro *et al.*, 2000, Blumcke *et al.*, 1999).

A relação entre ELT e alteração hipocampal vem de longa data. A primeira descrição de perda celular em regiões específicas do hipocampo foi de Sommer, em 1880

(citado por Gloor, 1991), que também contribuiu com suas interpretações sobre a relação entre alterações hipocampais e sintomas clínicos das crises com início no lobo temporal. Outra importante contribuição histórica foi a de Mathern, que no final do século XX fez uma descrição minuciosa da esclerose hipocampal ligada a ELT (Mathern *et al.*, 1997). Atualmente, as alterações anátomo-patológicas podem ser apreciadas *in vivo* com o estabelecimento da correlação entre achados neuropatológicos e imagiológicos (principalmente de ressonância magnética) em pacientes com ELTM (Watson, 1997).

A partir da metade do século passado essas observações também puderam ser feitas em espécimes cirúrgicos de pacientes com ELTM refratária a medicação. O progresso nos tratamentos cirúrgicos associado aos avanços das técnicas moleculares têm tornado possível o estudo sobre as mudanças moleculares e as alterações eletrofisiológicas da ELTM (Blumcke *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 1996). No aspecto histopatológico, o achado mais freqüente no espécime cirúrgico das ELTM intratáveis é a esclerose hipocampal (EH) (Kobayashi *et al.*, 2003; Proper *et al.*, 2000). Essa é caracterizada pela redução da população neuronal, principalmente na região CA1 do hipocampo, atingindo também as regiões CA3 e hilar acompanhadas de gliose em graus variados. Já a região CA2 tem se mostrado mais resistente a esse tipo de insulto (Blumcke *et al.*, 1999; Babb *et al.*, 1987). Um segundo achado patológico que tem sido bem caracterizado em pacientes com ELTM é a reorganização axonal das células granulares (*mossy fibres sprouting*). Acredita-se que após um insulto precoce que ocasiona uma perda de células neuronais na região hilar do hipocampo, as células granulares sobreviventes formam sinapses aberrantes formando um circuito local de retroalimentação excitatório sobre elas mesmas, contribuindo para a geração de crises crônicas (Proper *et al.*, 2000; Mathern *et al.*, 1995).

Apesar da detalhada caracterização morfológica e funcional das estruturas mesiais (principalmente hipocampo) envolvidas na esclerose mesial temporal, pouco se conhece sobre os insultos que levam às alterações encontradas nessas estruturas como substrato patológico na ELTM. As propostas iniciais eram de lesões relacionadas a insultos precoces de causas adquiridas, como as crises epiléticas febris prolongadas na infância (Abou-Khalil *et al.*, 1993). No entanto, mais recentemente, grande debate tem sido criado com a identificação crescente de grupos de pacientes com ELTM sem história de insultos adquiridos e com indícios de uma forte predisposição genética ao desenvolvimento de lesões hipocampais, histopatologicamente idênticas às encontradas nos casos clássicos de esclerose mesial temporal (Kobayashi *et al.*, 2001 e 2003).

1.1 O MODELO DE ELTM INDUZIDO PELA PILOCARPINA

A importância de mecanismos colinérgicos para epilepsia já foi demonstrada por neurologistas na virada do século dezenove. Os modelos experimentais de epilepsia têm contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia das epilepsias seja *in vitro* quanto *in vivo*. Particularmente, os modelos que reproduzem a ELT humana em roedores apresentam uma epileptogenicidade similar à encontrada em tecidos “epiléticos” humanos quando estudados *ex vivo*. Os modelos de ELT apresentam dados comportamentais, eletroencefalográficos e neuropatológicos, principalmente nas regiões límbicas, semelhantes àqueles observados nos pacientes com ELTM (Avanzini *et al.*, 1993; Engel *et al.*, 1996; Isokawa *et al.*, 1996; Lothman *et al.*, 1995).

O modelo de pilocarpina em roedores (Leite *et al.*, 1990; Cavalheiro *et al.*, 1991) tem sido amplamente utilizado para entender a ELT humana. A pilocarpina é uma droga

extraída do *Pilocarpus jaborandi*, que atua nos receptores colinérgicos muscarínicos induzindo uma atividade epilética de longa duração seguida de dano cerebral. Dessa maneira, Turski e colaboradores, em 1983, propuseram que a administração sistêmica da pilocarpina induz o estado de mal epilético. Posteriormente, João Pereira Leite, em sua tese de Doutorado (1992), caracterizou as três fases do modelo: fase aguda, silenciosa e crônica.

A fase aguda caracteriza-se pelas manifestações induzidas diretamente pela ação da pilocarpina sobre os receptores muscarínicos presentes na região límbica. A ativação secundária do sistema glutamérgico promove a intensificação e manutenção desse estado de hiperativação por várias horas, caracterizando um verdadeiro quadro de crises límbicas que culmina em estado de mal límbico (Turski *et al.*, 1983; Cavalheiro, 1995). Aproximadamente 30-40% dos animais morrem durante as primeiras 24-48 horas após a injeção de pilocarpina. O período silencioso ou latente observado nos animais que sobreviveram ao período agudo se caracteriza pela progressiva normalização do comportamento e retorno do padrão eletroencefalográfico observado previamente à injeção da droga. A perda neuronal observada no estudo histológico do cérebro dos animais sacrificados neste período é mais evidente, podendo-se observar a presença de glia reativa e o início do brotamento de fibras musgosas na camada supragranular do giro dentado (Mello *et al.*, 1992). A fase silenciosa, que dura em média 14 dias, termina com a ocorrência da primeira crise epilética espontânea, inaugurando o período crônico do modelo. Nesse período, o fato mais marcante é a presença das crises epiléticas que duram aproximadamente 60 segundos e que ocorrem de 3-6 vezes por semana. Essas crises podem ser consideradas como límbicas com generalização secundária. Do ponto de vista

eletrográfico, as descargas epilépticas aparecem inicialmente no hipocampo com rápida difusão para outras estruturas límbicas e neocorticais. Vários estudos morfológicos, eletrofisiológicos, farmacológicos, bioquímicos, metabólicos, comportamentais, etc, têm caracterizado os diferentes aspectos da fase crônica do modelo e confirmado sua utilidade para a análise experimental da epileptogênese que ocorre nos casos humanos de ELT (para revisão ver: Cavalheiro, Naffah-Mazzacoratti, Mello & Leite – The pilocarpine model of Seizures. In.: Models of Seizures and Epilepsy edited by Pitkänen, Schwartzkroin & Moshé, 2005, 433-448).

Muitos passos foram elucidados na identificação dos eventos que levam a uma permanente modificação da organização do sistema neuronal observado na ELT. Alguns desses passos incluem ativação de genes de fatores de crescimento, alteração em receptores de glutamato, gliose e ainda ativação de várias proteínas kinases (Scorza CA *et al.*, 2005). Um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e funcionais que resultam em uma excitabilidade aumentada na ELT irá resultar em novas estratégias para o tratamento deste distúrbio crônico. Além disso, estudos neuropatológicos mostram a perda neuronal no hilo e nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, com a proliferação de astrócitos, apresentando um padrão referente à esclerose hipocampal. Os astrócitos são responsáveis pelas funções metabólicas e fisiológicas do microambiente, o que os permitem ter um papel muito importante na manutenção da homeostasia cerebral (Scorza CA *et al.*, 2005). Sendo assim, durante a fase silenciosa existe uma remodelação sináptica associada com a plasticidade morfológica, fazendo com que a importância dos astrócitos seja ainda maior.

De acordo com Becker *et al.* (2003), a remodelação hipocampal ocorre durante o período livre de crises, resultando no surgimento de crises espontâneas recorrentes (fase

crônica). Esse estudo também mostra que as respostas genômicas ao SE induzido pela pilocarpina compreendem diferentes padrões de expressão de genes, desde genes imediatos, que têm sua expressão aumentada 3 dias após o SE, até genes de fatores de crescimento envolvidos na transformação do citoesqueleto, gliose e interação célula-célula, que se manifestam 14 dias depois do SE em média.

1.2 GENES ALVO SELECIONADOS

Baseado em padrões de expressões diferenciais de genes na fase silenciosa tem-se que a modificação de circuitos neuronais é um importante pré-requisito para a plasticidade funcional no sistema nervoso central sob condições fisiopatológicas. O potencial para a reorganização funcional e estrutural parece estar ligado a várias cascatas moleculares (Ben-Ari, 2001; Kandel, 2001), dessa maneira, a epilepsia está associada com a plasticidade de transmissões sinápticas, crescimento axonal e neurogênese no hipocampo (Coulter, 2001; Blümcke *et al.*, 2002).

Duas regiões principais do hipocampo mostram respostas diferentes durante a atividade epiléptica crônica: o giro dentado (GD), especificamente as células granulares, e a região CA1. Análises moleculares da plasticidade hipocampal em modelos de epilepsia induzida têm sido focadas em genes candidatos individuais, com particular ênfase naqueles que têm funções conhecidas em aspectos genético-patológicos.

As análises de DNA através de microarranjos oferecem a oportunidade de monitorar a expressão de genes com uma amplitude genômica aumentada, dando-nos pistas para os genes mais expressos durante a fase silenciosa. Alterações transcricionais após o SE devem não somente estar relacionadas com danos neuronais e epileptogênese, como

também com mecanismos associados à plasticidade e reorganização neuronal (Elliott *et al.*, 2003). Sendo assim, as respostas genômicas ao modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina compreendem diferentes padrões de expressões (Becker *et al.*, 2003) (figura 1):

- Genes de resposta imediata, que se dão 3 dias após o SE;
- Genes de fatores de crescimento;
- Genes envolvidos em transformação de citoesqueleto;
- Genes relacionados com gliose;
- Genes relacionados com a interação célula-célula.

Os quatro últimos grupos têm sua expressão aumentada 14 dias em média após o SE.

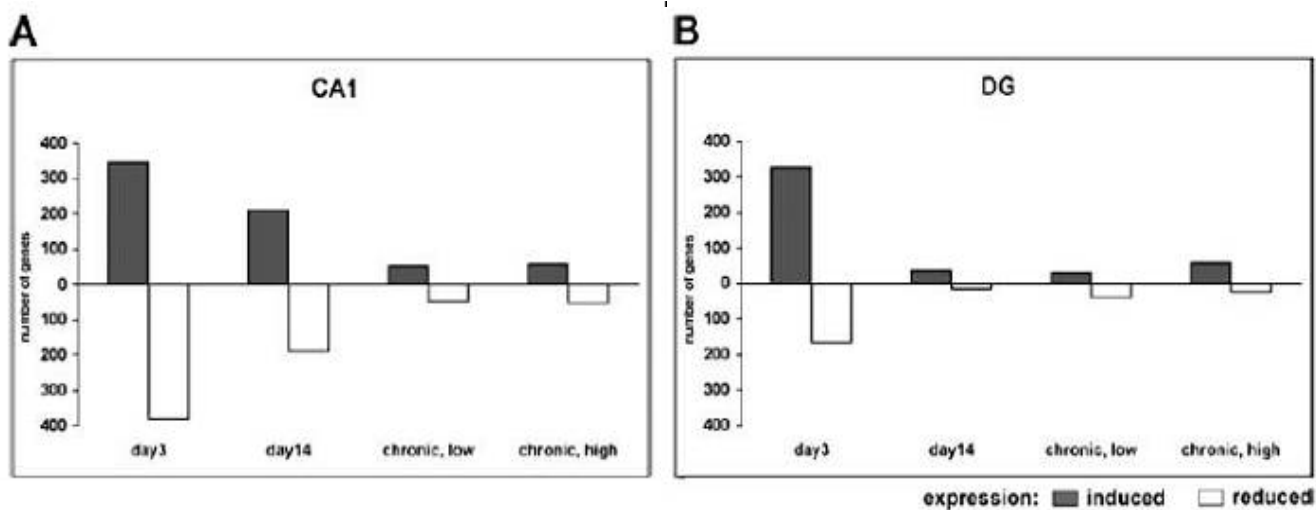


Figura 1. Mudanças na expressão gênica em resposta ao *status epilepticus* (SE). Número de genes com expressão diferenciada em diferentes períodos do estudo (3 e 14 dias após o SE, fase de crises crônicas recorrentes, sendo diferenciado animais com baixa e alta frequência de crises). Em A temos a expressão de genes para a região CA1 do hipocampo e em B para o giro dentado (Becker *et al.*, 2003).

Inicialmente, os genes selecionados foram tPA-PLAT e BDNF. No entanto, após estudos preliminares, pareceu mais informativo utilizarmos como gene alvo o TrkB, e não o

gene BDNF, uma vez que o TrkB é um receptor de neurotrofinas, mais especificamente, ele é ativado pelo BDNF.

Abaixo estão descritos os genes alvos selecionados para o presente estudo (*tPA-Plat*, *TrkB*, *Il1b*, *Il1rn*, *Tlr2* e *Tlr4*).

tPA-Plat

Genes de ação imediata são conhecidos por promoverem danos hipocampais neuronais. O gene “ativador de plasminogênio tecidual” (tPA) mostra uma expressão aumentada durante o período silencioso nas regiões CA1 e GD (Becker *et al.*, 2003). O produto do gene tPA é uma protease de serina que converte plasminogênio inativo em plasmina, uma importante enzima mediadora do metabolismo extracelular. A atividade do tPA nos tecidos neurais está correlacionada com o crescimento neuronal (Krystosek and Seeds, 1981a; Endo A *et al.*, 1999), regeneração, migração (Krystosek and Seeds, 1981b; Endo A *et al.*, 1999) e indução da morte neuronal (Tsirka *et al.*, 1995, 1996). Sendo assim, de acordo com Qian *et al.* (1993), o RNAm do tPA é rapidamente induzido no hipocampo por estímulos farmacológicos ou elétricos da atividade neuronal, mediando a degeneração neuronal. Com o sistema tPA-plasmina ativo, tem-se como consequência a degradação das células neuronais de adesão molecular (NCAMs; *Neuronal Cell Adhesion Molecules*), que são um membro da família de glicoproteínas e estão envolvidas no estabelecimento e manutenção das conexões funcionais célula-célula durante o desenvolvimento e no cérebro adulto. As NCAMs têm um importante papel no reconhecimento e manutenção das ligações da citoarquitetura, e a degradação dessas moléculas pelo sistema tPA-plasmina não é uma simples consequência de morte celular, mas deve indicar uma resposta antecipada do

neurônio a um estímulo perturbador. Dessa maneira, a degradação das NCAMs deve estar relacionada com a desestabilização dos contatos celulares. Sendo assim, o gene tPA (PLAT) será o primeiro alvo para o silenciamento, o que deve diminuir a ativação do sistema produtor de plasmina, reduzindo a degradação de contatos neuronais durante a fase silenciosa e aumentando a resistência do cérebro aos danos hipocampais.

TrkB

Como dito anteriormente, o *Bdnf*, antes selecionado como gene alvo, foi substituído pelo *TrkB*, seu receptor. A maneira como níveis patológicos de atividade neuronal na forma de crises focais são traduzidos para mecanismos celulares e moleculares levando à epileptogênese é bastante incerta, sendo assim, esse foi um dos motivos para a troca do referido gene alvo. É suposto que moléculas de sinalizações extracelulares (como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - BDNF) sejam cruciais nesse processo, e algumas evidências sugerem que o BDNF promova epileptogênese límbica através da ativação de seu receptor cognato, o TrkB (He XP *et al.*, 2004).

As neurotrofinas constituem uma família de moléculas relacionadas com a manutenção e a sobrevivência dos tecidos nervosos. Nas áreas cerebrais onde se dão os insultos epileptogênicos, incluindo o hipocampo, o BDNF é superexpresso à medida que o desenvolvimento da epilepsia ocorre, induzindo um colapso balanceado de excitação e inibição, eventualmente resultando em efeitos epiléticos. Por outro lado, a infusão intrahipocampal de BDNF pode atenuar (ou retardar) o desenvolvimento da epilepsia, sendo que esse efeito anti-epileptogênico parece estar mediado principalmente por um aumento na expressão do neuropeptídeo Y (NPY). O BDNF e o NPY têm um papel oposto

no hipocampo epiléptico. O BDNF causa o aumento da excitabilidade da rede hipocampal, enquanto que o NPY suprime tal excitabilidade e bloqueia a propagação das crises no lobo temporal. Sendo assim, a epileptogênese envolve muitos passos, incluindo a expressão de BDNF e NPY. A hiperatividade dos neurônios hipocampais induz a expressão do BDNF, que por sua vez, acaba levando ao aumento da expressão do NPY (figura 2). Dessa maneira, esses efeitos contrastantes do BDNF não nos permitem concluir se a inibição ou a excitação da sinalização do mesmo finalmente atuam na prevenção da ELT (Koyama *et al.*, 2005).

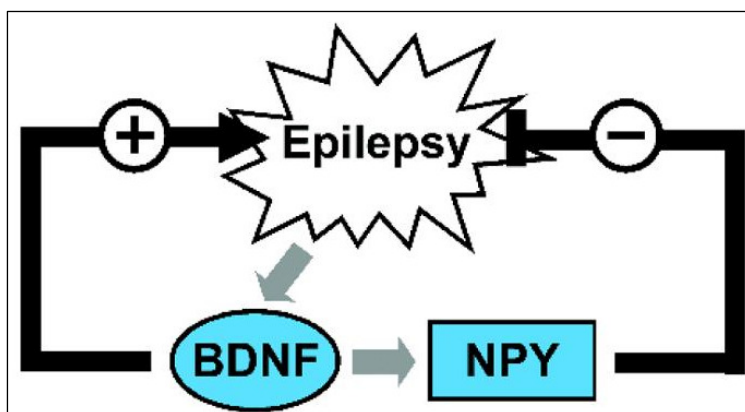


Figura 2. Esquema das expressões de BDNF e NPY, estando ambos superexpressos. A hiperatividade dos neurônios hipocampais induz a expressão do BDNF, que por sua vez, acaba levando ao aumento da expressão do NPY, resultando em um efeito anti-epileptogênico (Koyama *et al.*, 2005).

O BDNF, como outras neurotrofinas, produz seu efeito nos neurônios através de um receptor transmembrana, no caso, um receptor específico de alta afinidade: Tirosina Quinase B (TrkB). Esse receptor modula diversas atividades, e depois que o BDNF se liga, o receptor é dimerizado, auto-fosforilado e inicia uma via de transdução de múltiplos sinais, os quais estão envolvidos no crescimento da rede neural, na plasticidade morfológica e na

síntese de proteínas que apresentam características capazes de diferenciar neurônios e sinapses (Tsai, 2005).

Segundo He XP *et al.*, 2004, o BDNF é o mediador de seu receptor, o TrkB, durante a epileptogênese límbica no hipocampo, e essa ativação é requerida para o desenvolvimento do modelo de Kindling. Essa hipótese foi testada a partir de animais *Knockout* para o BDNF e TrkB (de forma separada) utilizando o modelo de Kindling. Para os animais que não expressavam BDNF houve uma modesta diminuição da epileptogênese e um aumento na ativação do TrkB hipocampal. No entanto, para os animais que não expressavam TrkB houve uma redução de medidas eletrofisiológicas para epileptogênese e nenhuma evidência de comportamento epiléptico foi detectada, nem mesmo crises tônico-clônicas. Conclui-se então que apesar da não expressão do BDNF, ainda existe uma ativação do TrkB, possivelmente por alguma outra neurotrófica, que acaba levando ao desenvolvimento da epilepsia da mesma maneira. Já no caso da eliminação do TrkB, observou-se que a plasticidade da epileptogênese é eliminada, ou seja, para o modelo de Kindling, a ativação do TrkB é exigida para que as vias de sinalização excitatórias levem a epilepsia.

É sugerido que o BDNF tenha um papel modulador na epilepsia. Evidências de que ele tem sua expressão aumentada como consequência das crises e modula positivamente a excitabilidade neuronal no hipocampo sugerem que o BDNF tem um grande papel na epileptogênese. Camundongos transgênicos que superexpressam BDNF apresentam crises mais severas em resposta ao ácido kaínico (Croll *et al.*, 1999; Binder *et al.*, 2001), e, além disso, as ações do BDNF também foram examinadas após SE induzido pelo modelo da pilocarpina e na fase crônica do modelo, quando ocorre a migração das fibras musgosas. Em cortes do hipocampo de ratos submetidos ao modelo o BDNF, observa-se aumento na

resposta de estímulo das fibras musgosas. Dessa maneira, a super-regulação do BDNF através do RNAm, da proteína e de seu receptor, alvo principal dessa via, ocorre durante a epileptogênese, e essa superexpressão é funcionalmente relevante para o aumento da excitabilidade. Essas observações sugerem um modelo celular e molecular das ações do BDNF, que geram uma excitabilidade aumentada no hipocampo (Binder *et al.*, 2001) (figura 3).

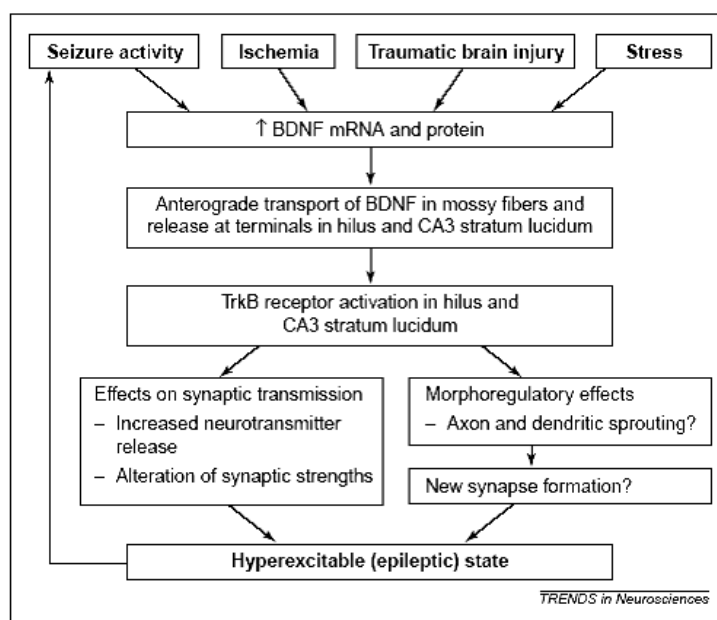


Figura 3. Mecanismos de epileptogênese do BDNF. Vários estímulos podem induzir a super-regulação do RNAm e da proteína do BDNF, levando a efeitos em estruturas e funções sinápticas e, finalmente à hiperexcitabilidade (Binder *et al.*, 2001).

Dentro das várias formas de reorganizações observadas em um hipocampo epiléptico, como a esclerose hipocampal, perda celular neuronal, gliose e neurogênese, a migração das fibras musgosas também é marcante. Sob condições de hiperexcitação elas se dirigem para fora do hilo e são projetadas anormalmente para a camada molecular

profunda, promovendo contatos sinápticos com os dendritos das células granulares, um fenômeno chamado migração das fibras musgosas (*Mossy Fiber Sprouting*). A maioria dessas sinapses anormais é excitatória, sendo recentemente observado que essa migração pode ser induzida pelo BDNF (Koyama *et al.*, 2005). Sendo assim, é indicativo que o BDNF, através da ativação do TrkB, tenha um papel causal na migração das fibras musgosas e essas, por sua vez, promovem evidências morfológicas que a ligação BDNF-TrkB contribui para a hiperexcitação do giro dentato, levando a uma hiperexcitação generalizada no hipocampo.

Finalmente, evidências que implicam em uma função moduladora do BDNF nas transmissões sinápticas através da ação de seu receptor específico levam ao terceiro alvo a ser silenciado nesse estudo, o TrkB. As modulações de muitas conexões sinápticas no sistema límbico provavelmente contribuem para a hiperexcitabilidade seguida de crises, e isso nos embasa na escolha do gene responsável pela síntese do receptor de um crucial fator neurotrófico.

Além dos genes que apresentam uma expressão diferencial na fase silenciosa do modelo, foram realizados diversos estudos em genes com expressões alteradas também na fase aguda, que precede a silenciosa, focados basicamente em genes relacionados à inflamação, como as interleucinas, e também às imunidades ditas inatas, como os *Toll like receptors*.

Interleucina 1 beta

A *Il1b* é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, capaz de induzir a inflamação aguda (cascata de citocinas, febre alta, produção de proteína C reativa) em resposta a infecções ou danos no tecido. A *Il1b* assim como a *Il1a* tem sua atividade agonista ligando-se sobre o mesmo receptor denominado de *Il1rI*, sendo que a *Il1a* tem baixa afinidade ao receptor e está mais envolvida com a regulação intracelular (Lonnemann *et al.*, 1989). Ao ocorrer a ligação dos agonistas ao receptor *Il1rI*, esse se associa à proteína acessória (Acp) a qual ativa uma cascata de transdução de sinal intracelular. O receptor *Il1rII*, que também possui o sítio para ligação da *Il1a* e *Il1b*, não é capaz de fazer a transdução do sinal intracelular. Além da expressão deste receptor para modular a resposta da *Il1a* e *Il1b*, há o gene *Il1rn*, que apresenta alta afinidade pelo sítio ativo do *Il1rI*, mas não gera resposta de transdução do sinal intracelular.

Desta maneira, a resposta da *Il1* pode ser controlada por dois mecanismos, seja pela proporção da abundância dos receptores *Il1rI* e *Il1rII* ou pela concentração dos agonistas *Il1a* e *Il1b* e do antagonista *Il1rn*.

Como as moléculas são produzidas na forma não ativa, ainda precisam ser processadas para apresentarem sua atividade. Um bom exemplo é a pro-*Il1b*, que necessita ser processada pela caspase 1 para se tornar ativa (Figura 4).

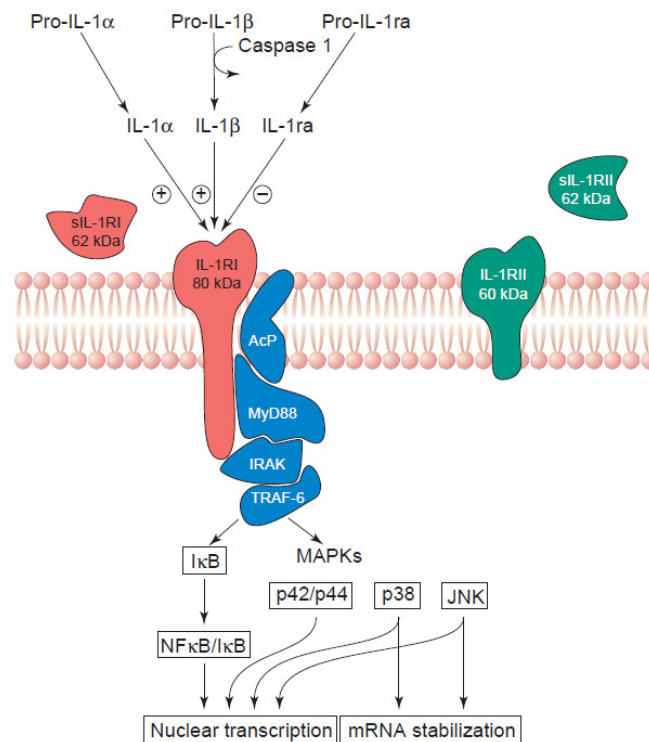


Figura 4. Ação da Interleucina-1. Família II1 incluindo os ligantes (*Il1a*, *Il1b*), o antagonista (*Il1rn/Il1ra*) e os dois receptores (tipo I e II) (Rothwell e Luheshi, 2000).

A interleucina 1 é liberada no início da resposta imune à infecção ou a lesões iniciando uma cascata de eventos a fim de neutralizar as consequências dos insultos. No momento em que a II1 se liga aos seus receptores no cérebro ocorre a indução de febre, bem como profundas alterações de comportamento, que foram agrupadas sob o nome genérico de “síndrome da doença” (Dantzer e Kelley, 2007). Esta síndrome é uma resposta adaptativa não-específica bem organizada, composta de uma depressão global do comportamento locomotor, anorexia, hipersônia (aumento da duração do sono total com seletiva prorrogação dos períodos de sono de ondas lentas), diminuição da interação social e sexual, bem como alteração transitória nas funções cognitivas e depressão (para revisão ver Dantzer *et al.*, 2008). A atividade pirogênica e outras ações levam aos sintomas de

doença que são mediados centralmente através de receptores no hipotálamo, principalmente pelos neurônios sensíveis à temperatura na área medial pré-óptica.

Estudos recentes forneceram elementos consistentes de uma sinalização autócrina na glândula adrenal, sugerindo um mecanismo pelo qual os agentes inflamatórios sistêmicos ativam um circuito intrinsecamente regulado e que gera um sinal local que pode influenciar a resposta das suprarrenais ao estresse imunológico (Engstrom *et al.* 2008). Notavelmente, a administração central e periférica de Il1 induz a liberação de noradrenalina no cérebro, mais acentuadamente no hipotálamo. Embora os efeitos da Il1 sobre a serotonina e a dopamina tenham sido encontrados de forma menos acentuada (Kabiersch *et al.*, 1988, Dunn, 2006), estudos em ratos com superexpressão central de Il1rn indicam um papel da Il1 na sinalização mediada por receptores no metabolismo das catecolaminas (Oprica *et al.*, 2005).

A ativação de células da micróglia e consequente aumento na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a Il1, foram demonstrados em respostas agudas (por exemplo, traumatismo crânio-encefálico e acidente vascular cerebral), bem como em doenças crônicas (por exemplo, a doença de Alzheimer e esclerose múltipla; Lucas *et al.*, 2006). Thornton e colaboradores (2006) demonstraram que a ativação da micróglia é necessária para a ocorrência de neurodegeneração. Muitos estudos em modelos experimentais de neurodegeneração aguda forneceram elementos que comprovam o aumento dos níveis de Il1 no cérebro, observados na micróglia ativada após dano cerebral excitotóxico, com a administração do ácido cáinico ou a isquemia cerebral (Allan *et al.*, 2005).

O papel da Il1 em neurodegeneração é apoiado por estudos em que o antagonista Il1rn tem sido administrado ou superexpresso. Assim, o aumento da expressão da Il1rn no cérebro por meio de transfecção adenoviral (Betz *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998), gera uma condição de neuroproteção em modelos animais de isquemia cerebral. A administração de Il1rn reduziu significativamente a isquemia, excitotoxicidade, trauma ou lesões cerebrais em roedores, quando injetado intracerebroventricular (ICV) ou periféricamente (Garcia *et al.*, 1995; Stroemer e Rothwell, 1997). O bloqueio dos receptores Il1 facilita a recuperação após lesões no cérebro (Tehrani *et al.*, 2002).

O envelhecimento normal do cérebro é caracterizado por um aumento nos níveis basais de citocinas pró-inflamatórias, bem como do estresse oxidativo (devido a um aumento na produção de radicais livres e uma diminuição na atividade dos sistemas de defesa antioxidante). Fenômenos semelhantes têm sido descritos em linhagens de camundongos com o fenótipo de senescência acelerada (Butterfield e Poon, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004). Neuroinflamação e aumento da produção e liberação de Il1 e outras citocinas estão associados ao envelhecimento e doenças neurodegenerativas crônicas como, por exemplo, Alzheimer e doença de Parkinson. As células da glia isoladas de cérebros de idosos são caracterizadas por um desequilíbrio entre as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (levando a um perfil de rede pró-inflamatórias; Ye e Johnson, 1999, 2001), assim, sugere-se que o envelhecimento associado à neuroinflamação crônica mantém a micróglia em um estado "condicionado" (Dilger e Johnson, 2008; Sparkman e Johnson, 2008), o que pode explicar a resposta exagerada e prolongada (Godbout *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.* 2009, para revisão ver Dilger e Johnson, 2008).

Há evidências iniciais que a Il1 é um fator de crescimento importante no desenvolvimento do sistema nervoso (Giulian *et al.* 1988). Os baixos níveis endógenos de Il1 parecem ser essenciais para a sobrevivência dos neurônios embrionários (Brenneman *et al.*, 1992) e a importância da sinalização de Il1 para o cérebro em desenvolvimento é ressaltada pela sua expressão precoce, por exemplo, no décimo segundo dia embrionário no rato (Mano *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* mostraram que a Il1b promove a proliferação de células progenitoras embrionárias mesencefálica de ratos (Akaneya *et al.*, 1995; Carvey *et al.*, 2001), bem como estimula a diferenciação de células precursoras fetais mesencefálicas de neurônios dopaminérgicos em ratos (Carvey *et al.*, 2001; Johansson e Stromberg, de 2002; Ling *et al.*, 1998) e humanos (Riaz *et al.*, 2004; Storch et al ., 2001). Curiosamente, Il1 estimula o brotamento dos axônios dopaminérgicos na sequência de uma lesão (Parish *et al.*, 2002) e a indução de diferenciação neuronal também foi observada em culturas de células humanas do epitélio neuro olfativo (Vawter *et al.*, 1996).

1.3 A INTERLEUCINA 1 BETA E A EPILEPSIA

Muitos trabalhos têm analisado a ação da família gênica Il1 nas epilepsias, seja em pacientes com crises febris esporádicas ou em modelos animais. Os resultados são bem controversos e dificilmente comparáveis entre si devido a grande diversidade nos métodos e procedimentos durante os experimentos.

Ao analisarmos os níveis plasmáticos dos membros da família Il1, não foi encontrado nenhuma correlação de aumento de expressão destes genes em pacientes com epilepsias ou crises febris, porém alguns poucos trabalhos observaram um aumento de alguns dos membros da família gênica quando a coleta do plasma é muito próxima de uma crise.

Esses dados vão na direção oposta a uma prática que tem se tornado muito comum, a recomendação de tratamentos com corticosteróide em epilepsias durante a infância. Aliado a isso, recentemente Gayatri e colaboradores (2007) não demonstraram eficácia nesse tipo de tratamento.

Até o momento não há correlação entre níveis de expressão dos membros da família *IL1* no plasma de pacientes com a ocorrência de crises, ou predisposição a epilepsia, porém mais estudos devem ser realizados para verificar a possível utilização desses genes como um biomarcador de prognóstico de tratamento.

Ao analisarmos os níveis desses genes no líquido cérebro-espinhal os resultados não são promissores uma vez que os kits de Elisa disponíveis para fazer essas quantificações muitas vezes não são adequados, já que foram desenvolvidos para utilização em plasma. Apenas Haspolat e colaboradores (2002) detectaram aumento da *IL1b* em pacientes que haviam passado por crises febris a menos de 6 horas, os outros trabalhos com tempo inferiores a esse não detectaram essa diferença.

Toll like receptors

As proteínas codificadas pelos *Toll like receptors (TLR)* têm um papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação do sistema imune inato. Os padrões patogênicos são reconhecidos e a produção de citokinas é iniciada para o desenvolvimento da imunidade através da estimulação do *Nf-kb*. A possibilidade de que as citokinas contribuem para uma instabilidade neuronal aberrante levando à crises é suportada por achados clínicos e experimentais (Vezzani A *et al*, 2011). No contexto de danos cerebrais e inflamações um mecanismo muito representativo é o *IL1-r/TLR*, sendo que a sinalização

desse mecanismo é chave para a ativação do sistema imune e inflamatório, ocorrendo concomitantemente ao reconhecimento de patógenos pelos TRL e às ligações de moléculas pró-inflamatórias como *Il1b*. Evidências *in vivo* demonstram uma baixa expressão dessas moléculas nas células nervosas, no entanto elas podem ser rapidamente hiper-reguladas no sistema nervoso central, de maneira específica através de condições patológicas, incluindo crises (Vezzani A *et al*, 2011) (figura 5).

Eventos iniciados no SNC por danos locais, infecções, ou crises, levam à ativação da microglia, ou seja, astrócitos e neurônios envolvidos na condição patológica. Essas células liberam citocinas pró-inflamatórias, como a *Il1b*, ativando uma cascata de eventos inflamatórios através da ação do complexo *Il1r* e *TLR4*. Essa sinalização de ativação neuronal resulta em um rápido aumento da condutância dos receptores NMDA de Ca^{+2} , gerando uma hiperexcitabilidade neuronal.

Os efeitos da inflamação cerebral gerada pela ativação do complexo *Il1r*/TRL contribuem para a geração de crises através da diminuição do limiar de excitabilidade neuronal. As crises que se tornam recorrentes ativam ainda mais as vias inflamatórias, estabelecendo-se um ciclo vicioso de eventos que contribuem para o desenvolvimento da epilepsia (Vezzani A *et al*, 2011) (figura 5).

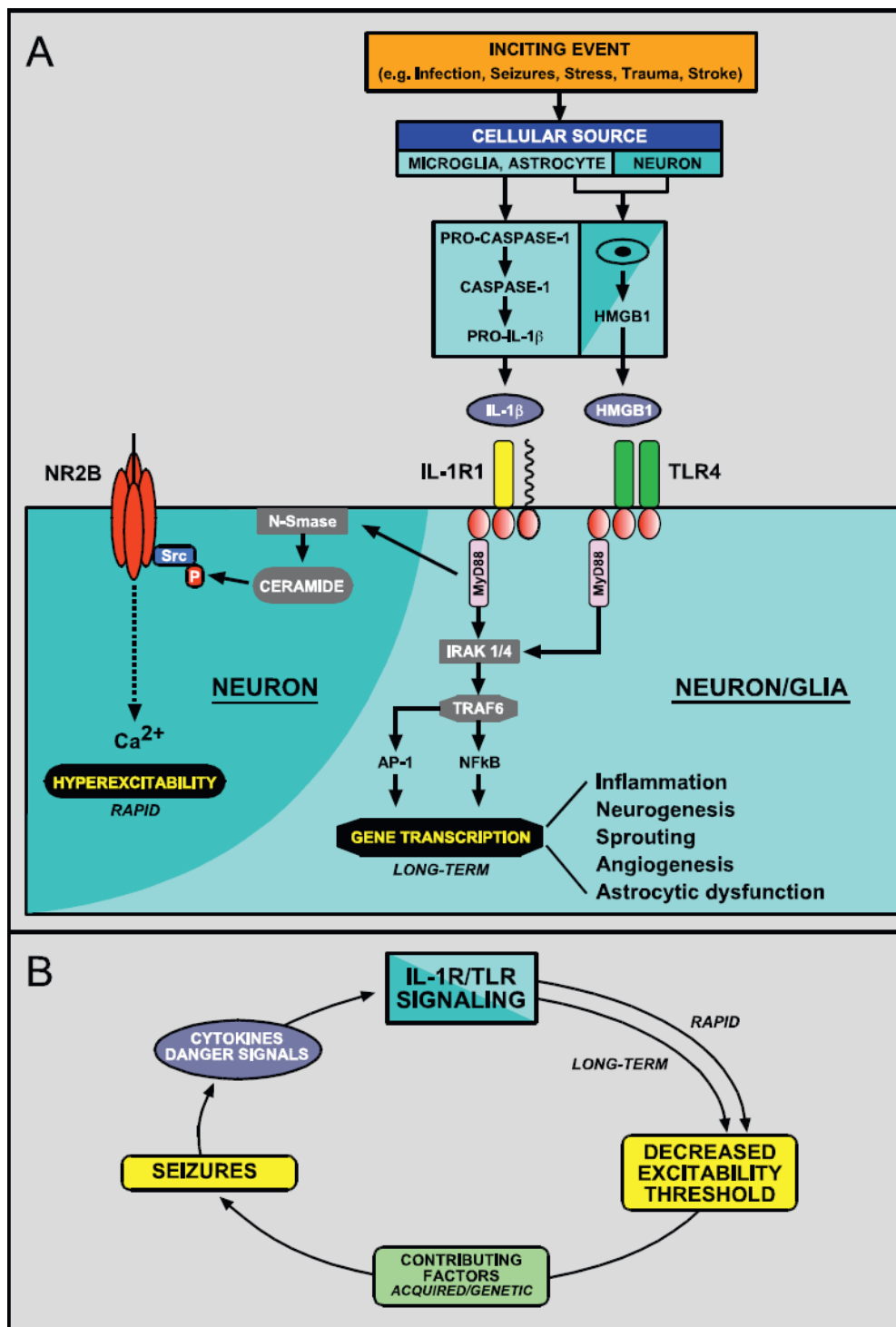


Figura 5. Cascata fisiopatológica mediada pela sinalização do complexo Il1r/TLR na epilepsia (Vezzani A *et al*, 2011).

1.4 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

A interferência por RNA (RNAi) é uma técnica que promove o silenciamento gênico potente e específico através da introdução de moléculas de RNA dupla-fita (Fire *et al.*, 1998). Em mamíferos a técnica é mediada por duplexes de RNA de 21 nucleotídeos (*small interfering* RNAs; siRNAs) que entram na via de um sistema endógeno, conhecido como PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional), degradando RNAs complementares aos siRNAs inseridos (Hannon, 2002) (figura 6).

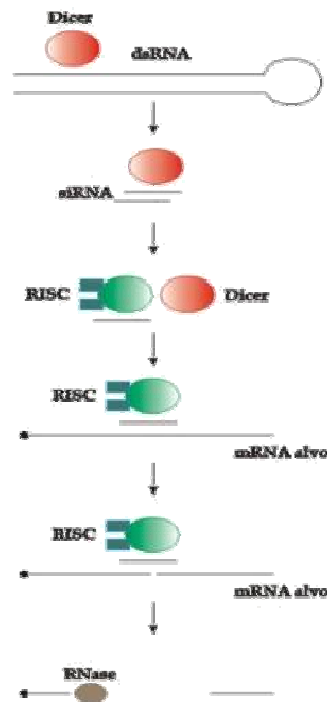


Figura 6. Mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi. O dsRNA é clivado pela enzima DICER em siRNAs (21pb). Um dos oligonucleotídeos é agregado ao complexo enzimático RISC, o qual tem agora sua atividade direcionada, levando à clivagem de moléculas de RNAm alvo que contêm uma sequência (Pereira *et al.*, 2006).

Esta técnica tem sido aplicada com pleno sucesso em vários sistemas, como na análise da genômica funcional do cromossomo I e III de *C. elegans*, (Fraser *et al.*, 2000; Gonczy *et al.*, 2000); silenciamento de genes de camundongo (McCaffrey *et al.*, 2002); silenciamento de genes em células humanas (Elbashir *et al.*, 2001) e estudos de genes envolvidos em desordens de migração neuronal (Bai *et al.*, 2003). Além disso, o silenciamento gênico em ratos utilizando RNAi resulta em animais *knock down*, funcionalmente semelhantes aos animais *knock out* (sem a atividade de um gene específico). A praticidade, baixo custo e eficiência deste protocolo, comparado à amplamente utilizada estratégia *knock out*, são fatores de grande interesse.

A utilização desta metodologia no estudo da fisiopatologia da epilepsia permanece inédita, tanto na produção de animais *knock down* como na tentativa de silenciar genes mutantes. Nosso grupo tem sido pioneiro no Brasil nos estudos de RNAi, principalmente na tentativa de desenvolver modelos animais que mimetizem doenças genéticas e protocolos de combate a doenças infecciosas (Pereira *et al.*, 2006; Grippo *et al.*, 2006). No momento, está em progresso em nosso laboratório o desenvolvimento de vários protocolos de aplicação biomédica dessa técnica em doenças parasitárias, infecciosas, degenerativas e malformações do desenvolvimento cortical (FAPESP 03/10900-7 e 04/03600-0). Nosso grupo também foi um dos pioneiros no Brasil na utilização da interferência por RNA *in vivo*, permitindo a criação e o aperfeiçoamento de ferramentas que auxiliam o desenho de moléculas interferentes com eficiência comprovada, através do programa *Strand Analysis* (depositado no INPE sob o registro 00068371) (Pereira *et al.*, 2006).

1.5 TRANSFEÇÃO DE siRNAS NO SNC EM MAMÍFEROS

Apesar da técnica de interferência por RNA ser utilizada em inúmeros modelos de doenças humanas, aquelas relacionadas ao SNC ainda apresentam grande dificuldade devido à proteção do SNC, gerada pela barreira hematoencefálica e da diversidade de tipos celulares no SNC (Hassani *et al.*, 2005; Pardridge *et al.*, 2007), o que dificultada a obtenção de taxas adequadas de silenciamento.

Considerando as várias tentativas de silenciamento no SNC em mamíferos, independente da técnica de transfecção, os siRNAs tem demonstrado baixa capacidade de transfecção nas células neuronais, quase sempre levando a um silenciamento restrito ao local das injeção das moléculas, através de cirurgias estereotáticas (Miller *et al.*, 2003; revisado em Schlachetzki *et al.*, 2004).

Uma estratégia que poderia resolver essa situação seria a utilização de vetores adeno e retrovirais que conseguem transfectar inúmeros tipos celulares, e poderiam gerar taxas adequadas de produção dos siRNAs nas células do SNC, mas essa técnica continua sendo muito invasiva, uma vez que ainda necessita da cirurgia estereotática para entrega das partículas virais no parênquima cerebral.

Os protocolos para utilização dessas partículas virais no SNC ainda não estão bem padronizados e muitas vezes causam respostas inflamatórias, que podem influenciar os eventos moleculares e fenotípicos que serão observados (Jooss e Chirmule, 2003; Lowenstein e Castro, 2003).

Durante a execução desse projeto, um método de transfecção de siRNAs no SNC de camundongos foi proposto, utilizando os siRNAs complexados com um peptídeo derivado

da sequência do capsídeo do vírus da raiva (RVG-9dR), o que garante boas taxas de transfecção com injeções venosas do complexo (Kumar *et al.*, 2007).

Depois de vários testes, atualmente sabemos que esse método de transfecção não é totalmente seletivo para o SNC, e sim é capaz de transfectar principalmente macrófagos e micróglia (Kim *et al.*, 2010), desta forma foi adequado para os nossos propósitos, porém ainda existe uma grande dificuldade nos estudos utilizando a técnica de interferência por RNA voltados para as células neuronais.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Explorar o papel de genes diferencialmente expressos na fase aguda e silenciosa no modelo de ELT induzido pela pilocarpina.

Objetivos específicos

- Desenhar e sintetizar moléculas interferentes de alta eficiência contra os genes alvos (*Il1b*, *Il1rn*, *Plat* e *TrkB*).
- Verificar o efeito da administração intravenosa dessas moléculas sobre o desenvolvimento e evolução do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina.
- Executar ensaios de RT-PCR para quantificar o silenciamento dos genes alvos no sistema nervoso central dos animais em vários tempos após a indução do SE e do silenciamento gênico.
- Verificar os efeitos *off-target*, assim como possíveis efeitos colaterais, da técnica de silenciamento gênico utilizado.
- Verificar as consequências do silenciamento gênico dos genes alvos na expressão dos genes: *Il1b*, *Il1rn*, *Ptgs2*, *Nfkb*, *Plat*, *TrkB*, *Npy*, *Tnf*, *Tlr2* e *Tlr4*.
- Avaliar as alterações estruturais observadas nos cérebros dos animais submetidos ao tratamento estabelecido (pilocarpina+silenciamento gênico) e comparar os achados com aqueles observados nos grupos controle pertinentes.
- Avaliar a ocorrência de crises recorrentes na fase crônica do modelo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Utilizamos ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar adultos machos, em condições SPF (*Specif Pathogen Free*) oriundos do CEMIB – “Centro Multi-Institucional para Investigação de Bioterismo” da UNICAMP, que são mantidos no Laboratório de Controle de Qualidade Animal, também da UNICAMP, em condições controladas de iluminação, com ciclos claro/escuro de 12 h, com livre acesso à comida e água durante todo o período de estudo, sendo mantidos em isoladores onde todo o fluxo de ar é constantemente renovado e os animais não têm contato com o ambiente externo (vide fotos no anexo 1). O projeto envolvendo a utilização de animais de experimentação foi enviado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP e já recebeu aprovação.

3.2 INDUÇÃO DO MODELO DE PILOCARPINA

O método de indução do modelo é aquele de uso corrente na Disciplina de Neurologia Experimental da UNIFESP-EPM, sendo que os animais apresentam epilepsia induzida de acordo com o descrito por Cavalheiro E.A., 1995. Em resumo, os animais são pré-tratados com metil-escopolamina (1mg/kg; subcutâneo; Sigma Co.) para limitar os efeitos colinérgicos periféricos. Trinta minutos após, eles recebem uma injeção sistêmica de pilocarpina (300 mg/kg; intraperitoneal; Merck). Animais controle são pré-tratados com a metil-escopolamina, mas ao invés da pilocarpina, recebem injeção intraperitoneal de salina.

3.3 ANÁLISE DE CRISES RECORRENTES

Alguns animais foram monitorados por vídeo durante 3 meses após a aplicação da pilocarpina. Esses animais foram filmados em gaiolas especiais, as quais foram fabricadas em acrílico transparente em formato circular, para possibilitar uma melhor visualização dos mesmos. As imagens foram capturadas por câmera TV-IP301 da TRENDnet, 24 horas por dia durante todo o período de observação. Essa câmera conta com luz infravermelha que permite a gravação mesmo na ausência total de luz.

3.4 ALGORÍTIMO PARA DESENHO DAS MOLÉCULAS INTERFERENTES

Muitos trabalhos na literatura apresentam siRNAs com diferentes graus de eficiência. O desenho de siRNAs não se limita única e exclusivamente a escolher uma sequência qualquer de 21nt baseado na sequência do RNA mensageiro. Alguns dos vários parâmetros que determinam essa eficiência são conhecidos. A identificação de alvos para RNAi foi baseada no protocolo de Thomas Tuschl (Elbashir *et al.*, 2001; <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) com algumas modificações. Sendo assim, escolhemos as sequências com as seguintes características:

- O alvo deve estar localizado na região codificante, excluindo os 100 primeiros nucleotídeos após o *start codon* e os 100 últimos nucleotídeos antes do *stop codon*. Isso é importante devido à possibilidade dessas regiões estarem complexadas a proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. As regiões 5' e 3' não traduzidas (*untranslated regions* - UTR) geralmente não são consideradas devido à mesma questão.

- Deve apresentar o conteúdo de GC entre 30% e 55%.
- Os siRNAs que apresentam TT nas extremidade 3' são mais estáveis, logo isso foi priorizado.
- Análise da energia livre das duas extremidades dos siRNAs foi realizada pelo programa *Strand Analysis* desenvolvido no nosso laboratório.
- Não deve apresentar estruturas secundárias (hairpins, duplexes ou loops). Essa análise foi conduzida no programa *Gene Runner*, subprograma *oligo*, sempre trabalhando com o formato *RNA* da sequência.
- Não ter identidade com nenhuma outra sequência no genoma, sendo que mesmo identidades baixas como 16/21 não foram aceitas.

A busca por identidade foi realizada por meio do programa BLAST, *Search for Short - Nearly Exact Matches* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), usando sempre o oligo antisenso do siRNA (o qual será a molécula funcional) contra o banco EST (sequências expressas) do organismo em questão. Sabe-se que a clivagem do RNA alvo por *slicer* ocorre quando há um pareamento perfeito do oligo antisenso com o alvo (100% de complementaridade). A existência de apenas um *mismatch* reduz drasticamente a atividade de *slicer* (menos de 1%), prejudicando o silenciamento gênico.

As sequências escolhidas contra os genes alvo foram sintetizadas quimicamente pela empresa IDT (Coralville, Iowa; USA). Cada fita de RNA foi sintetizada independentemente no laboratório e foram ressuspensas em H₂O Miliq em 100 µM. Após esse procedimento o mesmo volume das fitas senso e anti-senso de cada gene foi misturada e mantida a 95°C por 5 minutos. Posteriormente foram mantidas em ambiente isolado termicamente para

propiciar a queda gradual e lenta da temperatura por 30 minutos para que as mesmas se anelassem. Os siRNAs foram estocados a -80°C até sua utilização nos experimentos.

Sequência dos siRNAs utilizados:

si*Il1b* sense: 5' UGACCCAUGUGAGCUGAAAGC 3'

si*Il1b* anti-sense: 5' UUUCAGCUCACAUGGGUCAGA 3'

si*Il1rn* sense: 5' AGGCACUCCCAGAGUAUGUGU 3'

si*Il1rn* anti-sense: 5' ACAUACUCUGGGAGUGCCUUC 3'

si*Trkb* sense: 5' GCACCAACCAUCACAUUUCUC 3'

si*Trkb* anti-sense: 5' GAAAUGUGAUGGUUGGUGCAA 3'

si*Plat* sense: 5' GCCGCCACUGCUUUGUAGAG 3'

si*Plat* anti-sense: 5' CUACAAAGCAGUGGGCGGCAG 3'

si*Gfp* sense: 5' CAGGCUACUUGGAGUGUAUUU 3'

si*Gfp* anti-sense: 5' AUACACUCCAAGUAGCCUGUU 3'

3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INOCULAÇÃO DOS siRNAs

Por meio da cirurgia estereotáxica os animais foram canulados para que posteriormente fossem injetados os siRNAs no hipocampo, o que possibilita uma maior perfusão dos siRNAs nas regiões com maiores alterações durante o modelo da pilocarpina.

A administração intrahipocampal dos siRNAs, o que possibilita uma maior perfusão dos siRNAs nas regiões com maiores alterações durante a indução do modelo da pilocarpina, foi realizada 48 horas antes da coleta dos tecidos analisados.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (120mg/Kg) e Xilasina (9mg/Kg) no Laboratório de Controle de Qualidade Animal-UNICAMP, e colocados no aparelho estereotático tipo Kopf para ratos. Após corte longitudinal da pele da região craniana, os pontos estereotáticos para o hipocampo dorsal foram marcados (bilateralmente) de acordo com o Atlas Estereotático de Swanson (1992) AP: - 4,3; L: 2,0; H: 3,0. Com a utilização de uma broca ortodôntica foi feito um orifício no ponto determinado, através do qual a cânula guia foi fixada com resina ortodôntica. A agulha de uma microseringa (cânula de infusão) foi então introduzida através da cânula guia. A injeção das soluções de siRNAs foi feita por um período de 2 minutos e a agulha permaneceu no local por mais 30 segundos antes de ser retirada. O orifício foi fechado com cera de osso e a pele suturada. O grupo controle recebeu injeção intrahipocampal do solvente usado nas soluções de siRNAs, no mesmo volume e através do mesmo procedimento.

Durante o primeiro ano, vários testes foram realizados quanto ao processo de canulação seguido da tentativa de silenciamento. Para a transfecção do siRNA ser efetiva, passamos a utilizar dois agentes de transfecção, já que introduzir a molécula de siRNA “nua” gera sua degradação. Os agentes utilizados foram a lipofectamina e o aminofect (ambos da Ambion). A lipofectamina é uma emulsão lipídica que facilita a entrada dos siRNAs dentro das células, já o aminofect é uma emulsão de aminoácidos essenciais que são transportados ativamente para dentro das células. Dessa maneira, ao se complexarem

aos siRNAs, fazem o transporte destes para dentro da célula. Os resultados obtidos não foram suficientes para um silenciamento efetivo, principalmente pelo fato de utilizarmos para esse teste, genes relacionados com processos inflamatórios, como a *Coxigenase* e a *Interleucina*. Dessa maneira, verificamos que além do silenciamento não ser efetivo, a própria canulação estava induzindo processos inflamatórios, mesmo depois de uma semana da cirurgia, já que os genes testados apresentavam-se superexpressos. Sendo assim, verificou-se a necessidade de utilizarmos outro método de transfecção, que fosse menos agressivo e mais eficiente e não gerasse efeitos colaterais paralelos que prejudicassem o experimento.

3.6 INOCULAÇÃO DOS siRNAs

Um fator bastante importante para ser considerado é a barreira hemato-encefálica, que impede a passagem de moléculas do sangue, como o siRNA, para o sistema nervoso, diminuindo nossas opções para os agentes de transfecção. Dessa forma, segundo Kumar *et al.*, 2007, é descrito o acesso de siRNAs no sistema nervoso central através da via vascular, obtendo silenciamento. O trabalho utilizou uma sequência de um peptídeo derivado da glicoproteína da cápsula do vírus da raiva. É um peptídeo de 29 aminoácidos que se liga especificamente aos receptores de acetilcolina expressos nos neurônios. Sendo assim, para que o siRNA se unisse à esse peptídeo foi sintetizada uma quimera através da adição de nove resíduos de arginina no carboxi terminal do peptídeo. Essa quimera é então capaz de se ligar ao siRNA (já que os resíduos de arginina possuem uma carga positiva e o siRNA

uma carga negativa) e transportá-lo para dentro da célula neuronal através dos receptores de acetilcolina, levando ao silenciamento específico.

Os animais utilizados receberam injeções intravenosas (veia caudal) com moléculas de siRNA contra os genes alvos, conjugados a um peptídeo (RVG-9R, YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR) sintetizado pela Biosynthesis (Lewisville, Texas; USA). Essa molécula teve por finalidade transportar os siRNAs através da barreira hematoencefálica (BHE) possibilitando a transfecção de células no sistema nervoso central.

O trabalho de Kumar *et al* descreve a transfecção em camundongos, assim adaptamos para a utilização em ratos. Utilizamos inicialmente 50 µg de siRNA, com relação 20:1 peptídeo/siRNA, mas numa solução de volume total de 500 µL de PBS com 5% de glicose, injetando três vezes de 8 em 8 horas. Finalmente, após a comprovação do silenciamento, passamos a melhorar a padronização no sentido de diminuir os reagentes utilizados. Ficou então estabelecido o protocolo abaixo.

Os siRNAs alvos foram misturados 15 minutos antes com o peptídeo RVG-9R em uma razão molar de 1:10, siRNA::RVG, e mantidos em temperatura ambiente. Cada animal foi injetado duas vezes com esse complexo, com oito horas de intervalo com dose de 25 ou 50 µg de siRNA por injeção, sendo diluído em PBS com 5% de glicose em um volume final de 500 microlitros por injeção.

Concentração siRNA	peptídeo/siRNA	volume total	% glicose no volume total	Acesso animal	Número de injeções
25µg	10:1	500µL PBS	5%	Veia caudal	2 (com intervalo de 8h)

Tabela 1. Resultados da padronização do silenciamento utilizando uma seqüência peptídica associada ao siRNA.

Com relação ao tempo de silenciamento para a coleta do cérebro, segundo o artigo, depois de 48h o órgão era coletado. Para isso, foi realizada uma curva de silenciamento de acordo com vários intervalos. O período definido foi de 72h para ratos, quando houve um silenciamento mais efetivo.

Finalmente, o protocolo foi estabelecido de maneira satisfatória e a cirurgia estereotáxica foi substituída por um processo mais eficiente.

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA DO CÉREBRO DOS RATOS

O RNA total de células de cérebros dos ratos foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen). A determinação da concentração e pureza do material foi realizada com o auxílio do aparelho GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences). A qualidade dos RNAs obtidos também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com SYBR Safe (Invitrogen).

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIIITM *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Califórnia, USA). 2 µg do RNA extraído foram incubados com 250 ng de *primers* randômicos (Invitrogen, Califórnia, USA), 1 µL de dNTP mix (10 mM) e água para um volume de 14 µL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4 µL de 5x *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1M) e 50U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

3.8 PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema *TaqMan*TM (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Os genes *GAPDH* de ratos (*TaqMan*TM - Applied Biosystems) e *Hprt1* foram escolhidos como controles endógenos da reação, os quais servem para normalizar a expressão dos genes alvo nas diferentes amostras. A sonda *GAPDH* está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto os genes alvo e o *Hprt1* estão marcados com o fluoróforo FAM.

Para a quantificação relativa dos genes, as reações de PCR em tempo real são realizadas em triplicatas a partir de: 6,25 µL de *TaqMan* Universal PCR Master Mix 2x; 0,625 µL da solução de *primers* e sonda; 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA (40 ng no total). No controle negativo é adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas são: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e depois 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa são obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems). As análises estatísticas para a verificação da diferença significativa na expressão do gene selecionado foram ANOVA 2 vias com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis.

Antes de se iniciar os experimentos de quantificação relativa da expressão, foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controle endógeno, a fim de se verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes eram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação,

tanto com os *primers* do gene de interesse quanto do controle endógeno e dos cDNAs, em triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão, a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção). Nessa curva foram obtidos os valores da inclinação da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do sistema foi calculada através da fórmula: $E=10^{(-1/slope)}-1$.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema foi eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias do controle endógeno e as médias do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

3.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT

Os cérebros dos animais foram removidos cirurgicamente e em seguida, as regiões cerebrais ou o cérebro total foram pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

A extração de proteínas foi realizada conforme descrito em Deshane *et al.* (2004), com pequenas modificações. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (uréia 7 M, tiouréia 2 M, [(3-colamidopropil) dimetilamônio,]-1-propanossulfonato (CHAPS) a 4%, ditioneitol (DTT) 70 mM e amidosulfobetaina-14 (ASB-14) a 2%, suplementado com coquetel de inibidores de proteases a 1%), com o auxílio do aparelho Politron (Fischer Scientific). Após centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas foi obtida pelo método de Bradford. Os extratos de proteína total foram separados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (GE Healthcares), previamente umedecida em tampão de transferência (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS e 20% de etanol), usando aparelho de eletroblot Multiphor II (GE Healthcares) a 3500 V por 2h. A membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó magro, por 2h em temperatura ambiente e lavado cinco vezes com TBS 1X. Em seguida as membranas foram incubadas por 16 horas a 4°C com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse il1b (ARC0912, Invitrogen, Califórnia, USA), il1rn (SC-25444, Santa Cruz), il1r1 (SC-25775, Santa Cruz), p-ikk (SC-23470, Santa Cruz), Slc1a3 (4166S, Cell Signaling Technology, Inc, USA) todos diluídos 1:750 e beta actina (ab8227, Abcam plc, USA; diluído 1:2000), utilizada como controle endógeno, sendo lavadas cinco vezes com TBS 1X. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo

secundário anti-IgG de acordo com a recomendação dos fabricantes (diluído 1:10000) e conjugada com peroxidase.

A detecção se deu por quimioluminescência. As membranas foram expostas a filmes de RX Kodak em temperatura ambiente. Após a revelação das autoradiografias as bandas obtidas foram quantificadas por meio de densitometria óptica pelo programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os animais foram sacrificados 90 dias após indução do SE pela pilocarpina. Estes foram anestesiados via injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (120 mg/ml) e xilasina (9 mg/ml) e, em seguida, rapidamente perfundidos através do coração com quatro soluções, na seguinte ordem: (1) 25 ml de tampão Millonig; (2) 50 ml de sulfureto de sódio fixados a 0.1% em tampão Millonig; (3) 100 ml de glutaraldeído 3%; (4) 200 ml de sulfureto de sódio fixados a 0,1 % em tampão Millonig. Os cérebros foram removidos rapidamente dos crânios e pós fixados por 2-8 dias, ficando submersos em 30% de sacarose e mantidos a 4°C. Foram congelados cortes coronais de 32µm e processados para coloração neo-timm (Mello *et al.*, 1993). Cortes do hipocampo correspondentes a placas de Swanson 28-38 [intervalo entre 2,6 e 5,6 mm do bregma (Swanson, 1992)] foram coletados, compreendendo um corte total de 3 mm por animal.

Técnica de Neo-Timm

O processamento nas soluções para a coloração de Neo-timm consistiu de 240 ml de 50% goma arábica, e 10,25 g de ácido cítrico, 9,45 g de citrato de sódio em 30 ml de ddH₂O, 3,73 g de hidroquinona em 60 ml de ddH₂O, e 2 ml de solução de 0,51g de nitrato de prata em 3 ml de ddH₂O. Dois lotes com intensidades diferentes de coloração foram processados com diferentes tempos de desenvolvimento: 30-35 minutos com coloração leve e 40-50 com coloração pesada. Os cortes foram lavados duas vezes em água destilada por 5 minutos, desidratados através de álcool / xilol, e montados em lâminulas com balsamo Canadá.

A densidade das fibras musgosas na região supra granular e a camada molecular interna foram analisadas bilateralmente em três seções do hipocampo correspondentes as placas de Swanson's 30, 34 e 38. A reorganização foi avaliada separadamente em duas áreas da camada celular granular. A intensidade de marcação foi quantificada através da imagem obtida no computador pelo valor densidade da escala de cinza (CV). As seções foram fotografadas usando uma câmera de vídeo monocromática (Nikon, DXM1200) acoplado a um microscópio (Nikon, Eclipse E600FN), e a imagem foi capturada e digitalizada no computador. A luminosidade foi mantida uniformemente e verificada regularmente utilizando padrões de densidade óptica (Kodak, Rochester, NY, EUA). Uma vez capturada a imagem foi analisada utilizando o programa System Image (NIH Image). O operador analisou a imagem e delineou a camada molecular interna do giro denteado e o corpo caloso. O corpo caloso (CV) foi adotado como referência interna como controle de intensidade nas diferentes lâminas para corrigir os erros gerados pelos processamentos das inúmeras lâminas. Portanto, a intensidade neo-Timm rotulada em cada região foi

quantificada através do cálculo da densidade de escala de cinza entre os diferentes estudos das regiões e o corpo caloso.

Técnica de Nissl

Para a análise quantitativa da perda celular apresentada pelos grupos experimentais, uma série de cortes foram montados em lâminas gelatinadas, hidratados e mergulhados sequencialmente em solução aquosa de ácido acético 1 M, violeta de cresil (0,38 g de violeta de cresil em 100 mL de água destilada) por cerca 5 minutos e então em água destilada. Para a desidratação dos cortes, estes foram mergulhados nas soluções de álcool 50% e 70% e depois no diferenciador (1 mL de ácido acético em 100 mL de álcool). Depois foram passados em soluções crescentes de etanol, no xilol e cobertos com Enthelan®. O número de células foi contado nas subregiões hipocâmpais (giro denteado, CA1, CA3 e hilo), bilateralmente e em triplicata. Esta contagem foi realizada por um pesquisador que desconhecia o tratamento dos grupos experimentais com a ajuda de microscopia óptica as seções foram fotografadas usando uma câmera de vídeo monocromática (Nikon, DXM1200) acoplado a um microscópio (Nikon, Eclipse E600FN), com grade quadriculada. Esta área de contagem apresentava duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão). As células que tocavam as linhas proibidas não foram contadas, porém as células que tocavam as linhas aceitáveis e que se encontravam dentro da área foram contadas. Cada subregião hipocâmpal foi subdividida em três campos, sendo que cada campo representava 1/6 da subregião. Desta forma, o resultado obtido foi determinado através da média dos valores dos campos.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste Kruskal-Wallis foi usado para avaliar as diferenças entre os diferentes grupos estudados. Porém onde houve a análise de vários parâmetros no mesmo grupo, utilizamos o teste Mann-Whitney. Um exemplo disso foi na avaliação da expressão da Il1b nas diferentes regiões cerebrais.

Para os resultados do PCR em Tempo Real nos animais 5 dias pós SE, assim como nos resultados de WB dos animais 48 horas pós-silenciamento, utilizamos ANOVA como teste estatístico. Quando os valores de expressão gênica variavam significativamente, era aplicado o teste post-hoc de Tukey, a fim de que fossem ajustados os valores de p.

Em todos os experimentos foram consideradas diferenças significativas $p < 0,05$ em comparação aos controles. Análises estatísticas foram realizadas com o programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO

Inicialmente foi realizada a escolha dos oligos ideais para a síntese do siRNA. A seguir seguem os passos para cada gene escolhido.

Cálculo da Energia Livre de Gibbs

Abaixo se encontram o valor de energia livre calculado pelo programa *Strand Analysis*, junto com a posição do siRNA no gene e os respectivos oligos de RNA que formam o siRNA (tanto *sense* quanto *anti-sense*).

TrkB

Numero de acesso: **NM_012731**

Rattus norvegicus neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (Ntrk2)

Cálculo da energia livre de gibbs para verificação da efetividade *in silico* do siRNA
(Programa Strand Analysis):

Posição no gene: 854

Alvo: TTGCACCAACCATCACATTTCTC

RNA sense: GCACCAACCAUCACAUUUCUC

RNA antisense: AACGUGGUUGGUAGUGUAAAG

Valor: **5.70 kcal/mol** => ACTIVE Guide Strand

Il1b

Numero de acesso: **NM_031512.1**

Rattus norvegicus interleukin 1 beta (Il1b), mRNA

Cálculo da energia livre de gibbs para verificação da efetividade *in silico* do siRNA

(Programa Strand Analysis):

Posição no gene: 485

Alvo: TCTGACCCATGTGAGCTGAAAGC

RNA sense: UGACCCAUGUGAGCUGAAAGC

RNA antisense: AGACUGGGUACACUCGACUUU

Valor: **3.60 kcal/mol** => ACTIVE Guide Strand

Il1rn

Numero de acesso: **NM_022194.2**

Rattus norvegicus interleukin 1 receptor antagonist (Il1rn), mRNA.

Cálculo da energia livre de gibbs para verificação da efetividade *in silico* do siRNA

(Programa Strand Analysis):

Posição no gene: 1821

Alvo: TGAGGCACTCCCAGAGTATGTGT

RNA sense: AGGCACUCCCAGAGUAUGUGU

RNA antisense: ACUCCGUGAGGGUCUCAUACA

Valor: **4.10 kcal/mol** => ACTIVE Functional Strand

Plat

Numero de acesso: **NM_013151**

Rattus_norvegicus-plasminogen_activator,tissue_(Plat)

Cálculo da energia livre de gibbs para verificação da efetividade *in silico* do siRNA

(Programa Strand Analysis):

Posição no gene: 1057

Alvo: GCCGCCCACTGCTTTGTAGAG

RNA sense: GCCGCCCACUGCUUUGUAGAG

RNA antisense: CUACAAAGCAGUGGGCGGCAG

Valor: **5.20 kcal/mol** => ACTIVE Functional Strand

O cálculo da energia livre representado em kcal/mol é de extrema importância, pois segundo o algoritmo do programa quanto maior o valor obtido é indicado que a molécula em questão apresenta uma energia livre maior na extremidade 5' da fita *senso*, e uma energia livre menor na extremidade 5' da fita *anti-senso*. Dessa maneira, ao escolhermos moléculas com energia livre alta, em torno de 4 e 5, garantimos que a maioria das fitas que serão incorporadas ao complexo *RISC* serão as *anti-senso*, já que têm uma energia livre menor, apresentando uma estabilidade menor também na estrutura de dupla-fita facilitando a entrada do complexo *RISC* e sua ligação com a fita *anti-senso*, considerando a hipótese de que a *RISC* aceita preferencialmente a fita do siRNA que apresenta a extremidade 5' menos estável (Silva *et al.*, 2003). Logo, a fita que terá mais chances de ser incorporada ao complexo *RISC* quando esse for acoplado, será a *anti-senso*, justamente a molécula

funcional, que terá a capacidade de guiar o complexo para a clivagem dos RNAm alvos complementares a própria fita *anti-senso*.

4.2 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS E ESPECIFICIDADE

Além do cálculo da energia livre das moléculas estudadas, um fator bastante importante para a obtenção de siRNAs efetivos é a análise das seqüências quanto à presença de estruturas secundárias, como hairpins, duplexes ou loops. Essa análise foi realizada pelo programa *Gene Runner* (gratuito em www.generunner.net), garantindo que as seqüências escolhidas não apresentavam qualquer estrutura secundária que pudesse prejudicar a formação do siRNA.

Na avaliação da presença de estruturas secundárias no RNAm alvo foi utilizado o programa *MFold* (Zuker, 2003) disponível em <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>. Essa análise tem a importância de verificar se a região na qual o siRNA vai se acoplar através do complexo *RISC*, apresenta uma boa acessibilidade, sem estruturas secundárias, que dificultariam o acesso da molécula ao RNAm alvo (vide anexo 2).

Finalmente, foi realizada a busca por similaridades tanto do gene alvo contra o banco EST de ratos (programa *Blast-NCBI* - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), para verificar a presença de algum alvo semelhante (o que foi descartado), quanto a busca de similaridades da seqüência do siRNA em todo o banco EST de ratos (*Search for Short - Nearly Exact Matches* - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Essa busca garantiu que não houvesse alvos *off-target*, ou seja, a molécula selecionada é específica contra o gene alvo

selecionado. O resumo do *Blast* da sequência anti-senso do siRNA mostrou complementariedade de 21 nucleotídeos com o gene alvo e apenas 15 nucleotídeos de identidade com outra sequência depositada no banco de dados EST, o que minimiza a possibilidade de silenciamento inespecífico.

4.3 PROCEDIMENTO DE ANESTESIA DOS ANIMAIS

Apesar de não mais utilizarmos a cirurgia estereotáxica para inocular a molécula de siRNA, pois foi realizada a padronização da injeção pela veia caudal utilizando o siRNA complexado com o peptídeo (como já descrito), considerando que esse método chegou à nosso conhecimento somente no segundo semestre de 2007, a padronização das doses de anestésias mostraram-se necessárias e foram realizadas no primeiro semestre, como constava no cronograma.

Dessa maneira, foi realizado um teste de concentração de anestésico e respostas dos animais para a dose. Ficou então estabelecida uma dose de 120 mg/Kg de Ketamina e 9 mg/Kg de Xilasina, o que garantiu uma anestesia de 45 minutos por animal, tempo suficiente para a realização da cirurgia (tabela 2).

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6	Teste 7
Conc. Ketamina (mg/Kg)	50	60	80	90	110	110	120
Conc. Xilasina (mg/Kg)	6,25	7,25	9	9	7,5	9	9
Tempo de anestesia (minutos)	0	0	10	15	25	40	45

Tabela 2. Teste de concentração de anestesia contra tempo de resposta dos animais. A concentração e o tempo ideais são referentes ao teste 7.

4.4 INDUÇÃO DO MODELO DA PILOCARPINA EM RATOS

O processo de padronização inicial do modelo da pilocarpina nos ratos oriundos do CEMIB-UNICAMP foi importante, devido à grande diferença entre as linhagens dos animais e também aos distintos *pools* gênicos entre essas linhagens, o que faz com que a concentração da droga utilizada para a obtenção do resultado ideal para o modelo seja específica para cada linhagem.

De acordo com a literatura (Leite *et al.*, 1990; Cavalheiro *et al.*, 1991) a dose de pilocarpina varia de 300 à 380 mg/Kg para ratos. Dessa maneira, após alguns testes chegou-se à concentração ideal para os ratos provenientes do CEMIB, 300 mg/Kg, indicando que esses animais são mais sensíveis à droga (tabela 3).

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Conc. Pilocarpina (mg/Kg)	350	320	300	300
Número de animais	5	5	5	4
Número de animais que chegaram ao <i>Status Epilepticus</i>	2	2	2	3
Número de animais sobreviventes ao <i>Status Epilepticus</i>	0	0	2	3

Tabela 3. Testes para definir a concentração ideal de pilocarpina para a linhagem *Wistar* de ratos provenientes do CEMIB. A concentração de 300 mg/Kg foi padronizada, já que a taxa de sobrevivência foi maior, além do número de animais que entraram no *Status Epilepticus* também ser maior com o uso desta concentração.

4.5 VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

Antes de se realizar um experimento de expressão gênica utilizando PCR em Tempo Real deve-se fazer a validação do sistema gene alvo/controle endógeno, ou seja, verificar se as eficiências de amplificação são semelhantes e próximas a 100%.

Sendo assim, a validação do sistema *TrkB* e *GAPDH* foi realizada utilizando-se sete concentrações diferentes de cDNA (seriadas na razão de 5 vezes) provenientes do cérebro total de um rato adulto (8 semanas). A partir dos dados da cinética de amplificação das amostras, utilizando-se o programa *7500 system SDS Software*, construiu-se uma curva padrão para cada gene. Os valores das inclinações (*slope*) das curvas foram -3,544 para o *TrkB* e -3,394 para o *GAPDH* e as eficiências foram 91% para o *TrkB* e de 97% para o *GAPDH* (sendo os parâmetros aceitáveis de 90 à 110%). Dessa maneira, a confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R^2 foi de 99,8% para o *TrkB* e de 99,5% para o *GAPDH*. A figura 7 representa as curvas de validação obtidas para os genes.

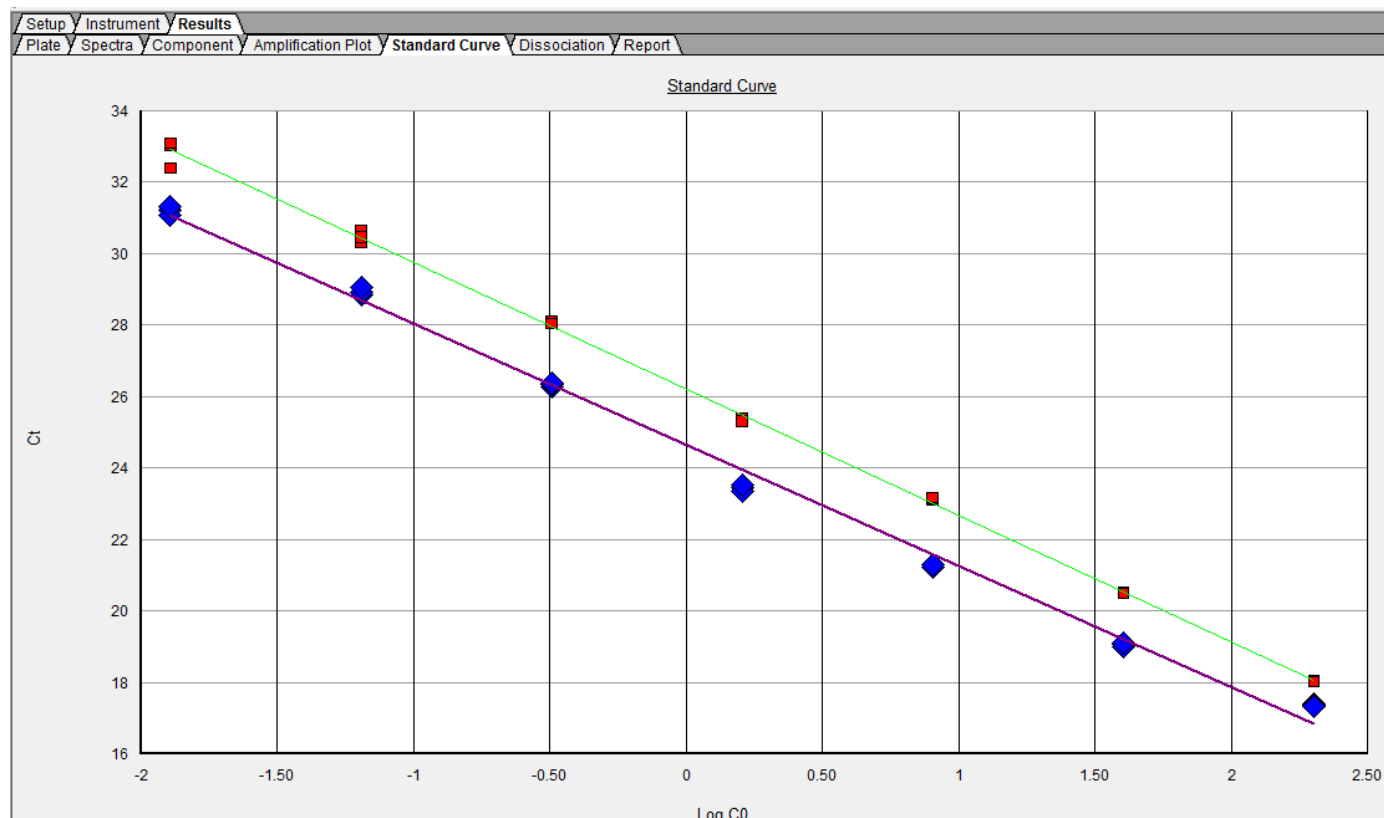


Figura 7. Gráfico gerado pelo programa 7500 System SDS Software mostrando a curva padrão obtida para o gene *TrkB* (em verde) e a curva padrão obtida para o controle endógeno *GAPDH* (em roxo). Os pontos sobre as curvas representam as réplicas.

Para se determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, foi construído um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNAs utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos CTs do controle endógeno e do gene alvo obtidas para cada concentração (eixo Y). Com isso, obteve-se uma reta com inclinação igual a - 0,0198, mostrando que os ΔC_t s das amostras não estão variando entre as diferentes concentrações testadas. Sendo assim, as sete concentrações testadas foram validadas. Na figura 8 é mostrado a curva de eficiência para o sistema *TrkB-GAPD* e a equação da reta.

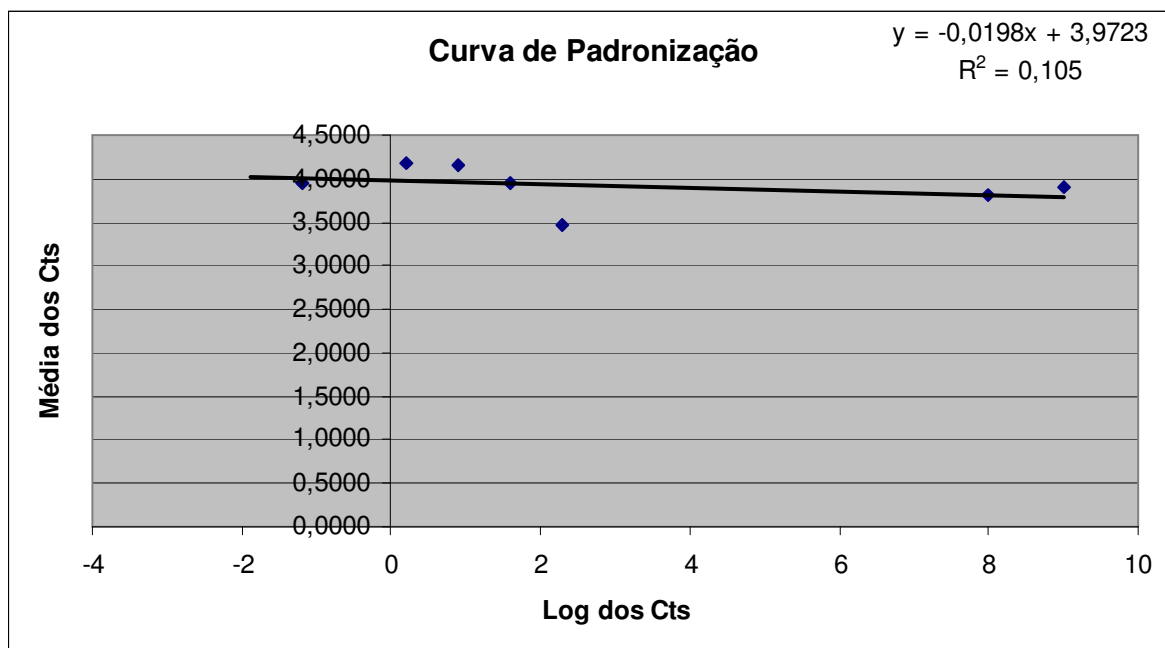


Figura 8. Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene alvo. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Após toda a padronização descrita acima o sistema encontra-se validado para detectar as variações de expressão do gene alvo *TrkB* de maneira robusta e confiável.

Quanto aos outros genes alvo os valores das inclinações (*slope*) das curvas foram -3,36 e as eficiências foram 98,43% para *Il1b* e slope -3,62 com eficiência de 90% para *GAPDH*. A confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R^2 foi de 95,01% para *Il1b* e de 98,4% para o controle endógeno, sendo importante que a eficiência entre os dois genes não se distanciem em mais que 10%. A Figura 9 mostra as curvas obtidas para os genes *Il1b* e *GAPDH*.

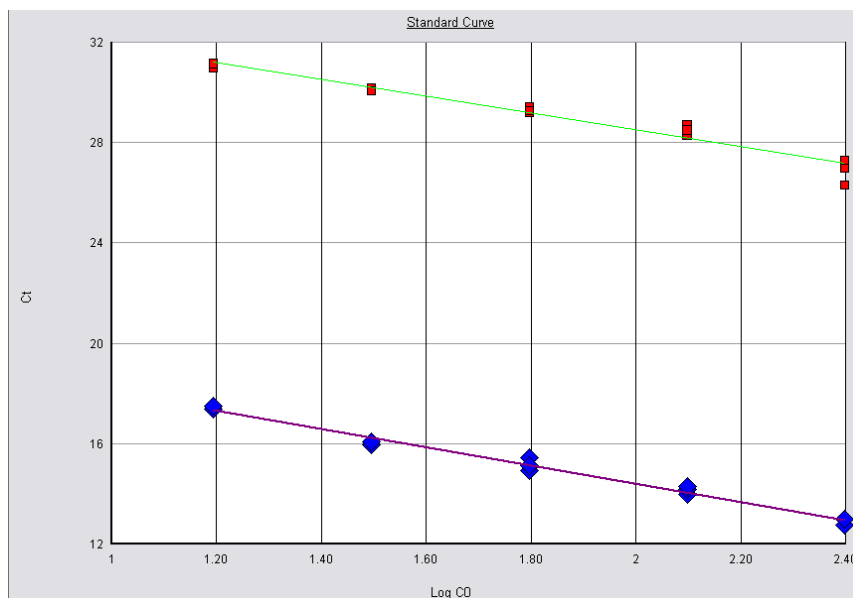


Figura 9. Gráfico gerado pelo programa 7500 System SDS Software mostrando a curva padrão obtida para o gene *Il1b* (em verde) e a curva obtida para o controle endógeno *Gapdh* (em roxo). Os pontos sobre as curvas representam as triplicatas.

Para determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, construiu-se um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos Cts do controle endógeno e do gene de interesse obtidas para cada concentração (eixo Y). Com isso, obteve-se uma reta com inclinação igual a -0,0296, mostrando que os ΔC_t s das amostras não estão variando entre as diferentes concentrações testadas. Na figura 10 observa-se a curva de eficiência para o sistema *Il1b/GAPDH* e a equação da reta correspondente à linha de tendência.

Após esta padronização o sistema apresenta-se validado para detectar variações na expressão do gene *Il1b* quando comparado ao gene endógeno *GAPDH*, de forma confiável e robusta. Foram repetido todos esses procedimentos para cada um dos genes analisados (*Il1rn*, *Ptgs2*, *Tnf*, *Npy*, *RelA*, *Nrtk2*, *Plat*, etc.) sempre comparando-os com os genes endógenos *GAPDH* e *Hprt1*.

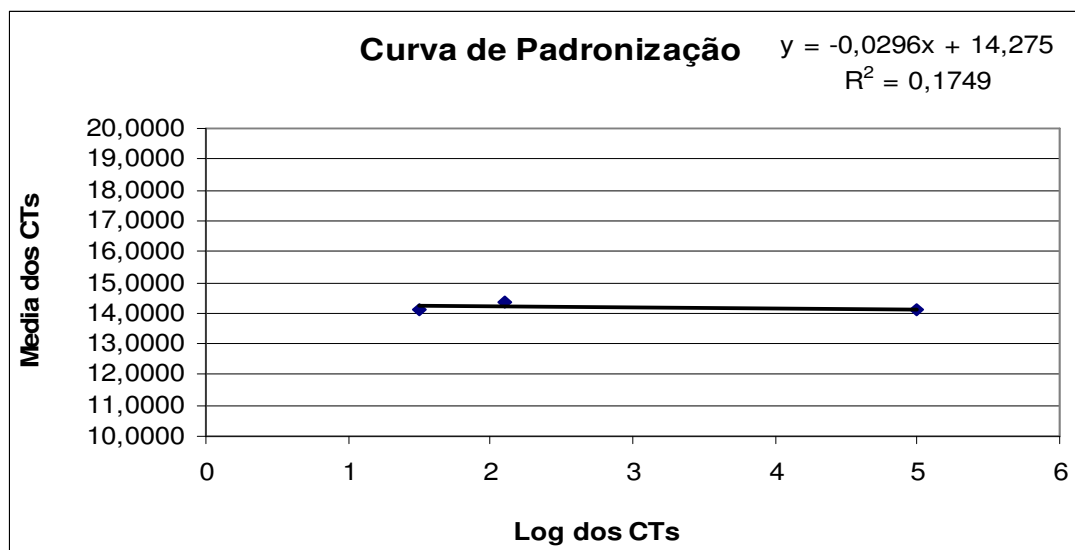


Figura 10. Curva de Padronização do PCR em Tempo Real. Podemos analisar a linha de tendência obtida após construção do gráfico, a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

4.6 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SILENCIAMENTO GÊNICO

Com o intuito de padronizar a transfecção no sistema nervoso central dos ratos adultos que serão utilizados nos modelos de ELT induzidos pela pilocarpina, decidimos utilizar uma molécula de siRNA já descrita na literatura (Wang T. *et al.*, 2008). Esse siRNA contra o gene *Ptgs2/Cox2*, foi utilizado por nós, em vários métodos diferentes para entregar esta molécula, sendo que nessa etapa de padronização a confirmação do silenciamento foi feita apenas por PCR em Tempo Real.

Testes de Silenciamento da *Ptgs2* usando Lipofect e Aminofect

Inicialmente tentamos obter o silenciamento do gene *Ptgs2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) com a utilização de dois coadjuvantes de transfecção complexados com os siPtgs2. A lipofectamina é uma emulsão lipídica que facilita a entrada dos siRNAs dentro das células, já o aminofect é uma emulsão de aminoácidos essenciais que são transportados ativamente para dentro das células. Dessa maneira, ao se complexarem aos siRNAs, fazem o transporte destes para dentro da célula. O procedimento foi realizado no cérebro após a canulação. No primeiro experimento utilizamos uma única injeção de siPtgs2 com 25 µg, cinco dias após o procedimento de canulação, e coletamos o cérebro 24 horas após a injeção dos siRNAs (figura 11).

Uma vez que o primeiro experimento não propiciou um silenciamento consistente, decidimos tentar o mesmo procedimento, entretanto repetindo as injeções durante seis dias consecutivos com intervalo de 24 horas. Isso foi feito devido aos trabalhos que conseguiram silenciamento em cérebro e que se baseavam na disponibilidade de grande quantidade de siRNA por um longo período de tempo (Dorn *et al.*, 2004; Thakker *et al.*, 2004). Nesses experimentos o cérebro também foi coletado 24 horas após a última injeção (figura 12).

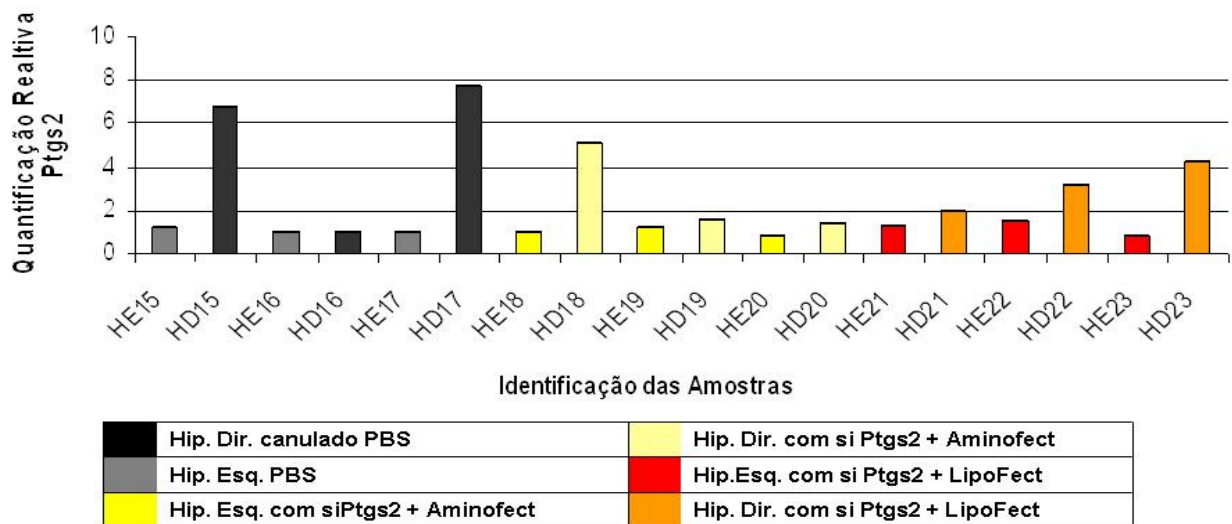


Figura 11. Gráfico referente à análise de expressão do gene *Ptgs2*. Animais que receberam uma injeção de 25 µg de siPtgs2 com os agentes de transfecção. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*Ptgs2*) e o eixo X refere-se à identificação de cada amostra (HE = Hipocampo Esquerdo, HD = hipocampo Direito).

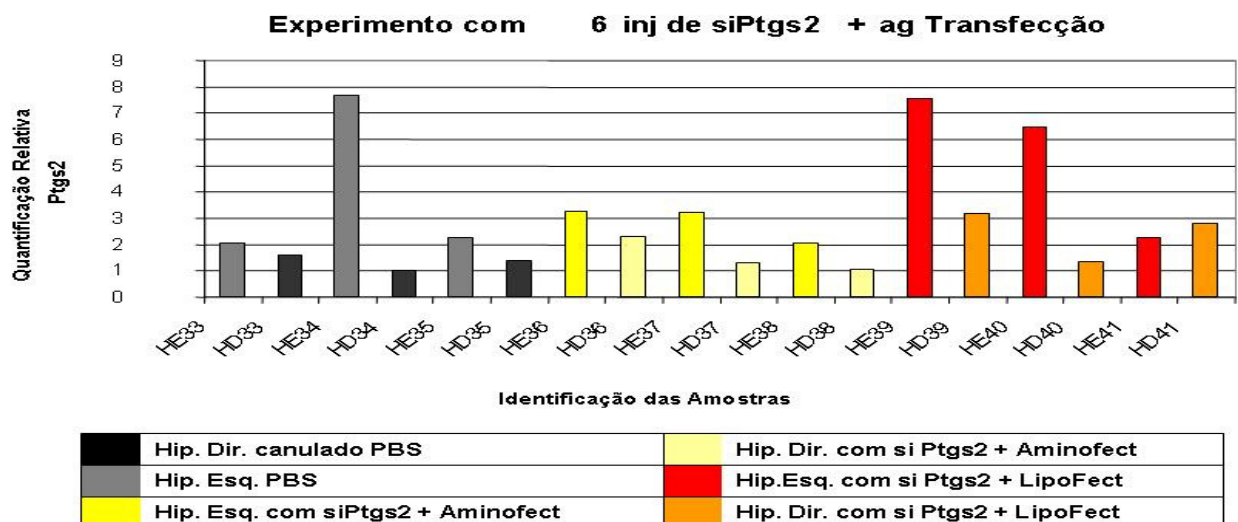


Figura 12. Gráfico referente à análise de expressão do gene *Ptgs2* em animais que receberam seis injeções. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*Ptgs2*) e o eixo X refere-se à identificação de cada amostra (as injeções tiveram um intervalo de 24 horas entre si, HE = Hipocampo Esquerdo, HD = Hipocampo Direito).

Após esse experimento não foi verificado um silenciamento potente e específico, que são as principais características da técnica da RNAi. Quando observamos os resultados obtidos apenas dos controles canulados, demonstrado na figura 13, verificou-se que o procedimento de canulação, independente da quantidade de injeções da molécula de siPtgs2 ou período de recuperação do procedimento, gerou uma resposta inflamatória que consequentemente está levando ao aumento da expressão do *Ptgs2*.

Com o intuito de confirmar se o procedimento de canulação e/ou injeções estaria levando ao aumento da expressão da *Ptgs2*, fizemos a quantificação do gene em animais controles não canulados (figura 13).

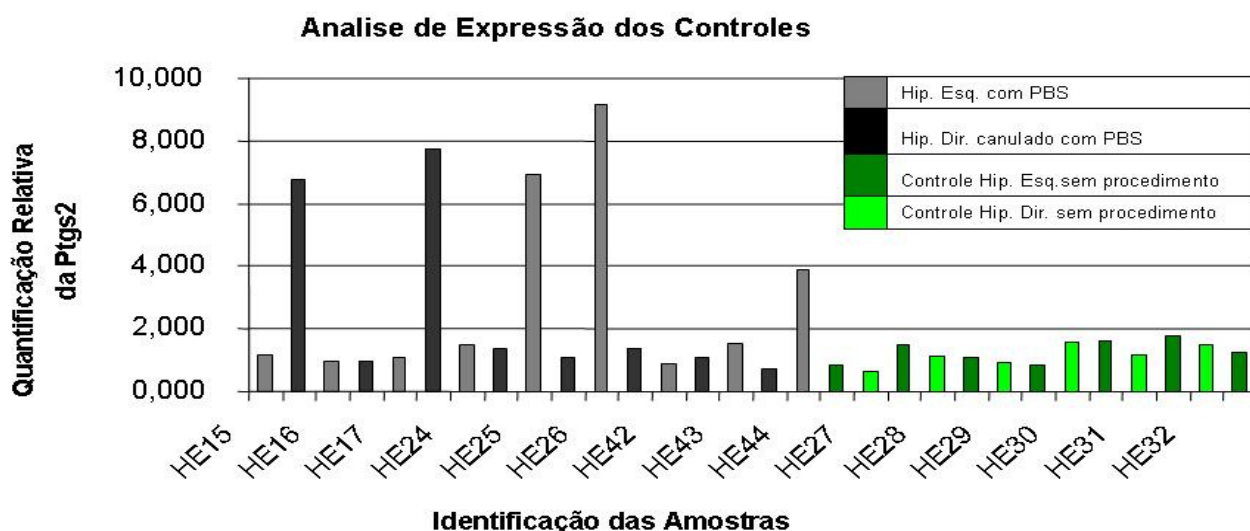


Figura 13. Gráfico referente à análise de expressão do gene *Ptgs2* em animais controles canulados e não canulados. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*Ptgs2*) e o eixo X refere-se à identificação de cada amostra (HE = Hipocampo Esquerdo, HD = Hipocampo Direito).

Com esses resultados percebemos que o procedimento de canulação estava influenciando o experimento como um todo, inviabilizando a confirmação do silenciamento, uma vez que não poderíamos diferenciar os animais que tiveram uma

resposta inflamatória dos que realmente tinham uma expressão diminuída como consequência do silenciamento.

Apesar de todos os cuidados na manutenção dos animais, no procedimento cirúrgico, assim como no tratamento de todo o aparato utilizado para as injeções intra-cérebroventricular, os animais estavam tendo uma reação inesperada de aumento de expressão do gene alvo que não se restringia ao hemisfério canulado do cérebro.

Desta forma decidimos utilizar outro método de transfecção e abandonar o procedimento de canulação. O novo método utilizado foi o descrito por Kumar e colaboradores em novembro de 2007, que apesar da necessidade de padronização para uso em ratos, nos parecia o método mais eficiente e menos invasivo.

4.7 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO UTILIZANDO O PEPTÍDEO RVG-9DR (PROCEDIMENTO NÃO INVASIVO)

A padronização dessa nova técnica de silenciamento gênico foi realizada também com o gene *Il1b*, além do *Ptgs2*, pois esse gene já estava validado para as reações de Real Time e seu *assay* também já estava disponível em nosso laboratório. A técnica utilizada parte do princípio da associação entre um neuropeptídeo e o siRNA de interesse (injetados via intravenosa – veia caudal), e já foi descrita em Material e Métodos. Para a padronização da técnica foi feita uma curva de silenciamento, na qual foi variada a concentração dos siRNAs e o tempo de ação dos mesmos no organismo (figura 14).

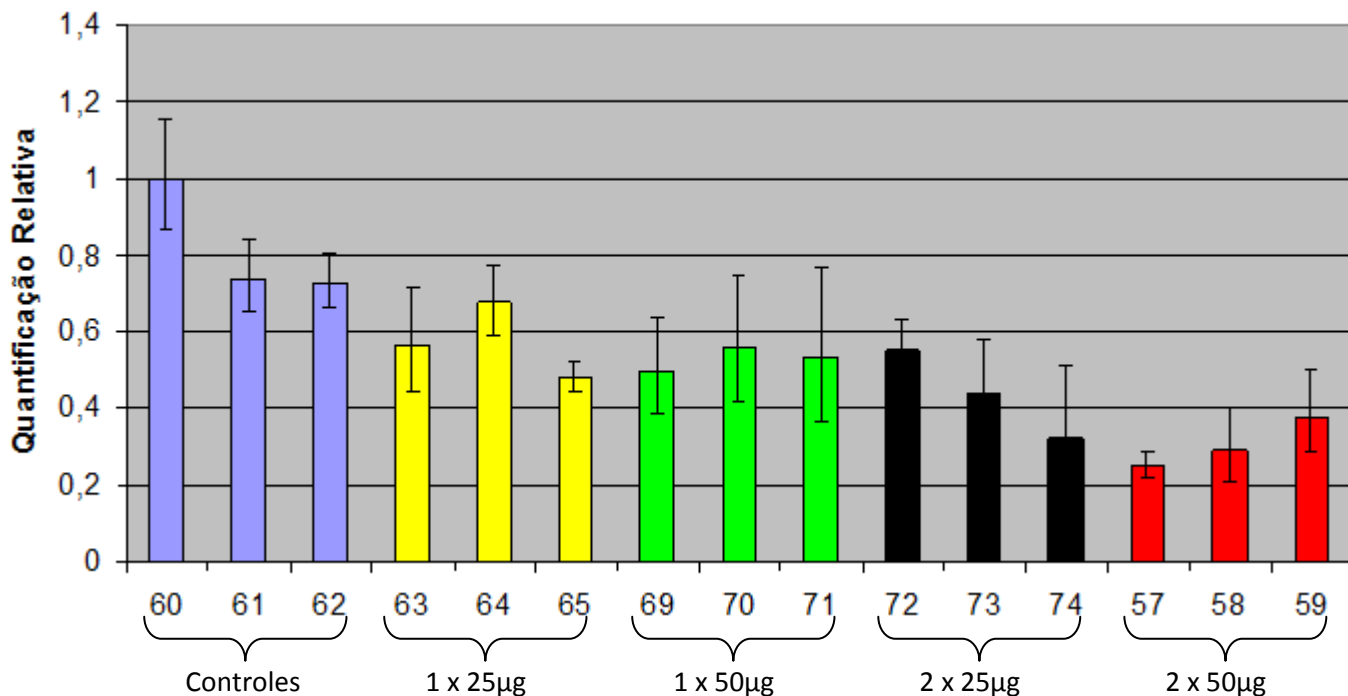


Figura 14. Gráfico referente à padronização da concentração utilizada de siRNA. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*IL1B*) e o eixo X refere-se à identificação de cada animal. Os animais 60, 61 e 62 são controles (barras azuis), e receberam uma dose de PBS. Os animais 63, 64 e 65 (barras amarelas) receberam uma dose com concentração de 25 µg. Os animais 69, 70 e 71 (barras verdes) receberam uma dose com concentração de 50 µg. Os animais 72, 73 e 74 (barras pretas) receberam duas doses (8h de intervalo) com concentração de 25 µg cada. Os animais 57, 58 e 59 (barras vermelhas) receberam duas doses (8h de intervalo) com 50 µg de siRNA cada. Todos os animais foram sacrificados 24h após a primeira dose e a relação molar entre peptídeo e siRNA foi de 20:1.

Este experimento deixa bem evidente que a utilização de 50 µg de siRNA ou 25 µg gera o mesmo resultado, não influenciando no silenciamento final. Além disso, duas doses, com 8 horas de intervalo entre elas, também se mostraram mais eficientes do que uma dose somente. Sendo assim, ficou padronizado a administração de duas doses do complexo peptídeo/siRNA, com 8 horas de intervalo entre as doses, e a utilização de 25 µg de siRNA em cada dose (o que gera uma economia considerável de reagentes quando comparado com 50 µg).

Após a definição da concentração ideal de siRNA partimos para a padronização do tempo ideal após a inoculação do complexo, para obtermos o silenciamento mais efetivo (figura 15)

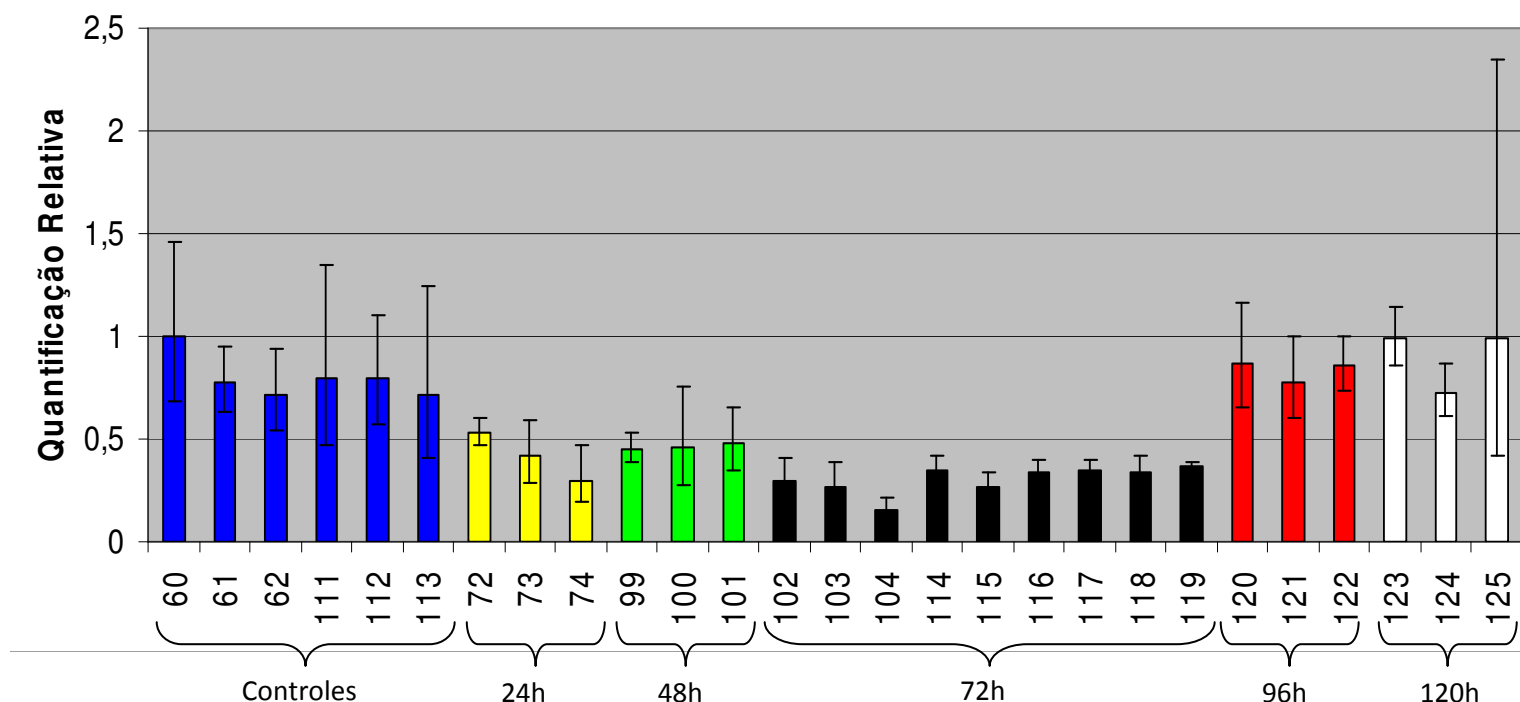


Figura 15. Experimento de padronização da técnica de silenciamento gênico quanto ao tempo de ação do siRNA e relação molar do peptídeo com o siRNA. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*IL1B*) e o eixo X refere-se à identificação de cada animal. Todos os animais receberam duas doses (intervalo de 8h) de siRNA com 25 µg cada. Os animais 60, 61, 62, 111, 112 e 113 (barras azuis) são controles, injetados somente com PBS. Os animais 72, 73 e 74 (barras amarelas) sofreram a ação do siRNA por 24h. Os animais 99, 100 e 101 (barras verdes) sofreram a ação do siRNA por 48h. Os animais 102, 103, 104 e 114 à 119 (barras pretas) sofreram a ação do siRNA por 72h. Os animais 120, 121 e 122 (barras vermelhas) sofreram a ação do siRNA por 96h. Os animais 123, 124 e 125 (barras brancas) sofreram a ação do siRNA por 120h. Quanto às relações molares, somente os animais 114, 115 e 116 receberam uma relação de 10:1 (peptídeo/siRNA), sendo que todos os outros receberam uma relação de 20:1.

O experimento evidenciado acima finaliza a padronização dessa nova técnica de silenciamento para a utilização em ratos. De acordo com os dados gerados, o período ideal para que o silenciamento se mostre mais eficiente é entre 48 e 72h após a primeira inoculação. Fica bem claro que o silenciamento é bastante efetivo até 72h após a primeira

inoculação, e a partir de 96h os níveis de expressão do gene alvo voltam ao mesmo patamar dos controles, sendo que após 120h esse patamar chega a ser ultrapassado, o que pode ser uma indicação de uma resposta positiva contra a queda dos níveis de expressão do gene. Uma hipótese seria que após a queda de expressão, o organismo passa a sintetizar mais RNAm do gene em questão para então tentar compensar sua falta. De qualquer maneira, existe um período ideal para a realização das análises, sendo esse período relativamente extenso, o que nos permite promover os ensaios com uma maior segurança e confiabilidade. Além disso, é possível utilizar a relação molar de peptídeo para siRNA em 10:1, já que a eficácia do silenciamento mostrou-se a mesma quando comparada com 20:1.

Finalmente, ficou definido como ideal e padronizado para esse método a utilização de duas inoculações de 25 µg de siRNA cada, associada ao peptídeo numa concentração de 10:1 molar (peptídeo/siRNA), sendo o silenciamento mais efetivo principalmente entre 48h e 72h após a primeira injeção (figura 16).

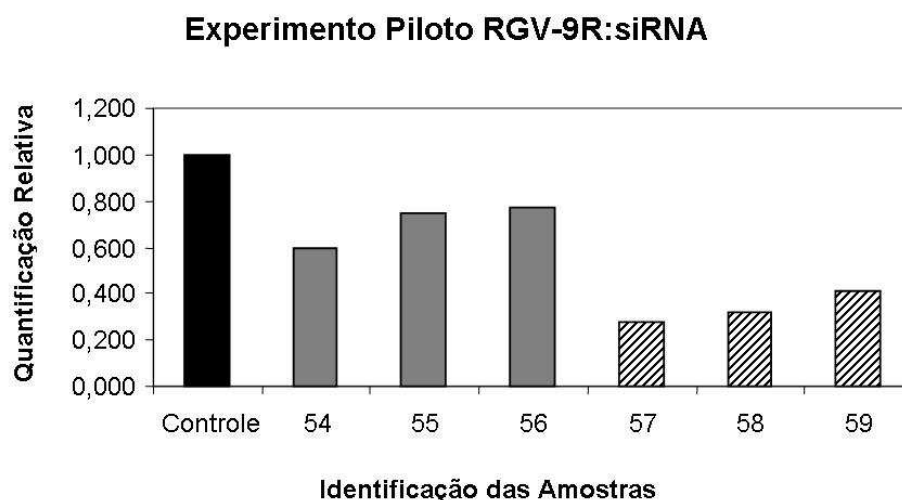


Figura 16. Gráfico referente à análise de expressão do gene *Ptgs2* e *Il1b* em experimento piloto usando o peptídeo RVG-9R. Os animais receberam duas injeções do complexo siRNA::RVG-9R, com intervalo de 8 horas. O eixo Y refere-se à expressão dos genes alvos e o eixo X refere-se à identificação de cada amostra, o valor de controles foi obtido pela media de cinco animais, os animais 54, 55, e 56 foram tratados com duas injeções si*Ptgs2* e 57, 58 e 59 foram tratados com duas injeções de si*Il1b*. As barras em cinza referem-se a expressão do *Ptgs2* e as em listrado a expressão do *Il1b*. Esse experimento foi feito em duplicata biológica e gerou resultados equivalentes.

5. RESULTADOS – CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

Experimentos de silenciamento gênico durante a fase silenciosa.

CAPÍTULO 2

Padrão de expressão gênica na fase silenciosa.

CAPÍTULO 3

O papel da interleucina 1 beta – artigo.

CAPÍTULO 4

Estudos adicionais em animais silenciados para *il1b* e *il1rn*.

6. CAPÍTULO 1 - SILENCIAMENTO GÊNICO DURANTE A FASE SILENCIOSA

6.1 EXPRESSÃO DO GENE TRKB

Foram gerados dados de quantificação relativa quanto à expressão do *TrkB* para os animais experimentais comparados com os animais controles. Os animais experimentais foram submetidos ao modelo da pilocarpina quando estavam com a idade de 8 semanas, idade ideal para a caracterização correta do modelo. Após a administração da pilocarpina os animais passaram por duas horas de *status epilepticus* (fase aguda) e depois as crises foram cessadas pela administração de diazepam. Sendo assim, a fase aguda perdurou por mais dois dias de acordo com análises comportamentais, e somente após o quinto dia, quando os animais estavam na fase silenciosa, é que foram sacrificados e tiveram os cérebros coletados. A partir do momento que os animais passaram para a fase silenciosa, eles apresentaram características fenotípicas iguais aos controles, ou seja, sem crises e com comportamento normal. Após obter a validação do gene alvo, *TrkB*, partimos para a avaliação de sua expressão relativa. Os dados gerados demonstraram que os animais experimentais na fase silenciosa do modelo da pilocarpina apresentam uma expressão aumentada desse gene quando comparados aos animais controle, que não haviam sido submetidos à injeção de pilocarpina (figura 17).

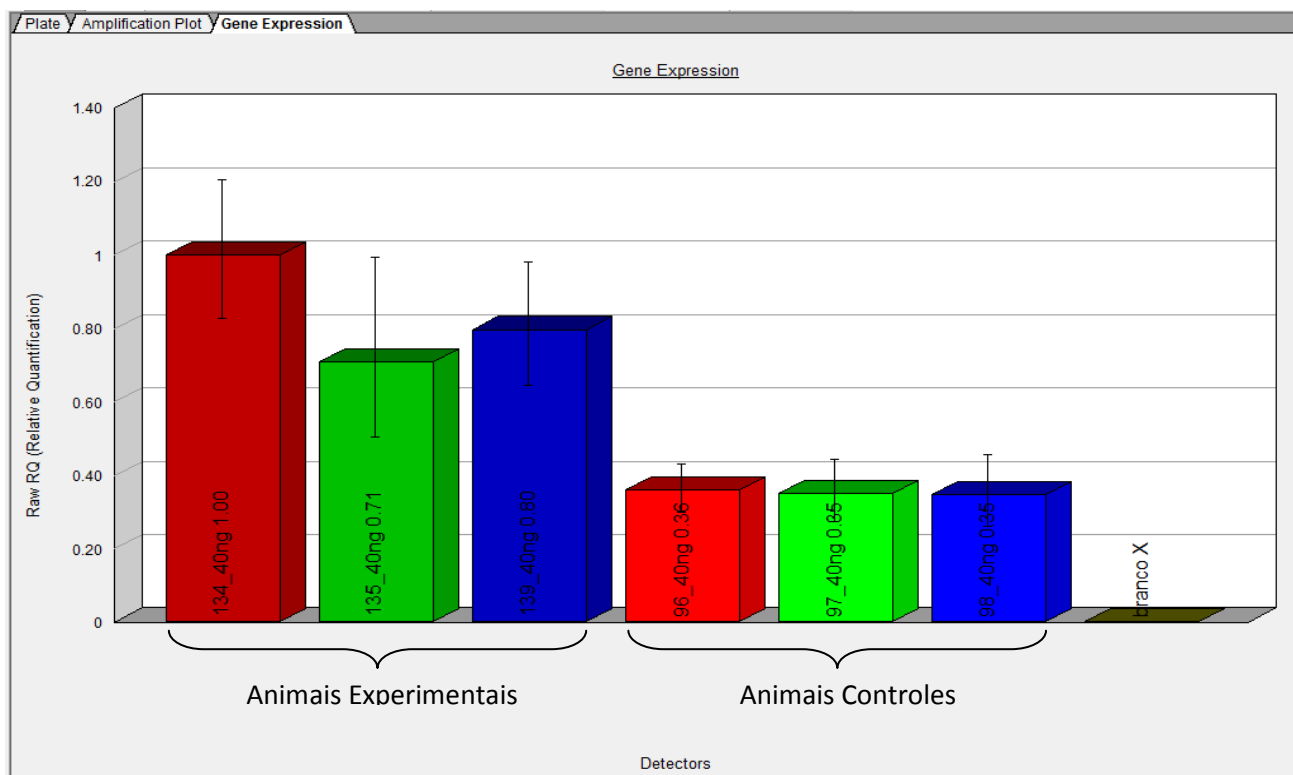


Figura 17. Expressão relativa do gene *TrkB* utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*. O eixo Y refere-se à expressão do gene alvo (*TrkB*) e o eixo X refere-se à identificação de cada animal. Foram utilizados três animais controles (96, 97 e 98) e três animais experimentais (134, 135 e 139), além do branco, que é o controle da reação. Os animais controles não foram induzidos ao modelo da pilocarpina, enquanto os animais experimentais estavam na fase silenciosa do modelo quando foram sacrificados e seus cérebros coletados, cinco dias após a indução do modelo.

Fica claro que os animais experimentais apresentam uma expressão do gene *TrkB* no mínimo 50% maior quando comparados com os animais controles, corroborando o fato de que durante a fase silenciosa há uma superexpressão tanto do gene *BDNF* quanto de seu receptor *TrkB*, que levam à uma excitabilidade aumentada principalmente no hipocampo, contribuindo para a epileptogênese límbica.

6.2 siTrkB UTILIZADO IN VIVO

O experimento de silenciamento utilizando as moléculas de *siTrkB* não obtiveram um resultado satisfatório, já que houve um discreto silenciamento nos animais em que foram utilizados 50 ug de siRNA quando comparados com os de 25 ug. No total foram utilizados 12 animais, sendo 7 controles, 2 com 50 ug de *siTrkB* e 2 com 25 ug de *siTrkB*. Os três primeiros controles foram de animais que estavam na fase silenciosa, os quatro próximos são controles injetados somente com PBS e os restantes são animais experimentais (figura 18).

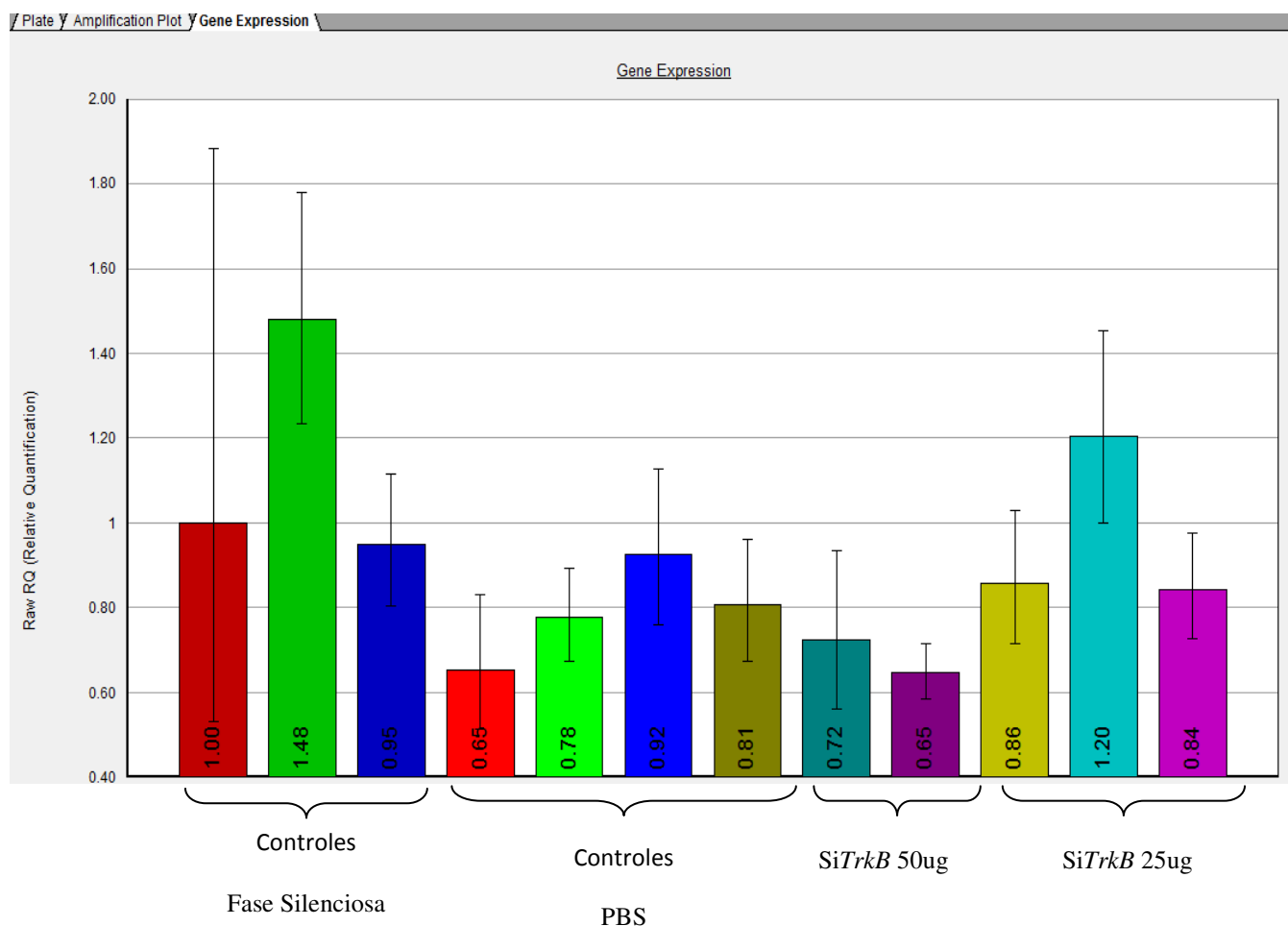


Figura 18. Expressão relativa do gene *TrkB* tendo como controle endógeno o gene *GAPDH*.

6.3 siPLAT UTILIZADO IN VIVO

Para o experimento de silenciamento utilizando a molécula de siRNA contra *PLAT* foram utilizadas soluções de RNA interferentes em uma concentração de 100 uM cada fita. Após o anelamento das fitas foi obtido uma solução com concentração de 50 uM. A concentração final de siRNA injetado em cada animal foi de 25 ug. De acordo com a massa molecular da molécula de RNA dupla fita que é 13637,2 g/mol, em 25 ug tem-se 1833,2 pmols, o que na concentração da solução resulta em aproximadamente 37 uL de siRNA. Junto a isso se adiciona 3,7 uL de peptídeo (5 mM) que irá se complexar à molécula interferente.

Dessa maneira, foi realizado o experimento *in vivo* utilizando a molécula do *PLAT* (figura 19).

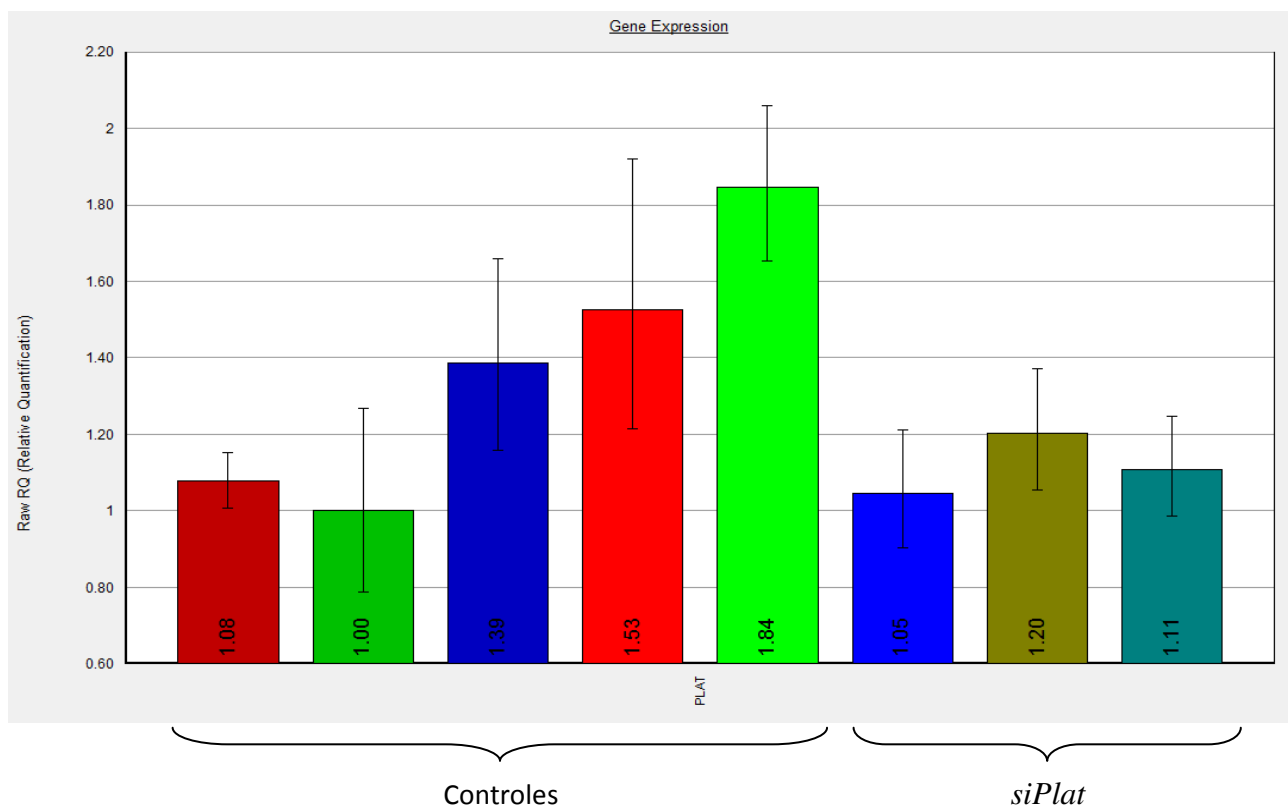


Figura 19. Expressão relativa do gene *Plat* tendo como controle endógeno o gene *Gapdh*.

Percebe-se, de acordo com a figura acima, que não há um padrão quanto à expressão dos animais controles, o que deixa a interpretação de um silenciamento real duvidoso. Em um primeiro momento, parece que os animais experimentais estão com a expressão do gene *PLAT* abaixo dos controles; no entanto, são necessários experimentos adicionais, com mais animais para que seja comprovado o silenciamento.

6.4 CULTURA CELULAR

Como forma de melhor analisar a ação dos RNAs interferentes, avaliamos que a utilização de uma cultura celular poderia colaborar com informações valiosas e que viriam de maneira mais prática e rápida do que as análises *in vivo*. Sendo assim, passamos a trabalhar com uma cultura originada de neuroblastoma de camundongo (Neuro2a), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As células foram mantidas em ambiente umidificado controlado a 5% de CO₂ e 37°C e cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (Gibco, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 18 mM de HEPES e 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina. Ao atingir confluência, as células passavam pelo processo de tripsinização, que consiste em duas lavagens com Hank's seguida de uma incubação de 10 min à 37°C com 2 ml de tripsina-EDTA para uma garrafa de 75 cm². Em seguida, as células eram ressuspensas em meio de cultura completo e divididas em duas garrafas novas.

Foi padronizada a manutenção da cultura de células de neuroblastoma de camundongo (Neuro2a), sendo estabelecidos a melhor composição do meio de cultura e o tempo ideal para o repique das células. As células são repicadas e divididas em novas

garrafas com meio de cultura 3 vezes por semana. Essa cultura é composta por neuroblastos, com propriedade de aderência ao substrato. A morfologia das células pode ser caracterizada como neuronais ou amebóides, sendo que por volta de 30% das células crescem como neurônios e 70% são arredondadas (Figura 20). O estabelecimento desse modelo celular neuronal foi de grande importância para o laboratório, possibilitando a realização de diversos estudos de genes relacionados ao sistema nervoso e o mecanismo de interferência por RNA.

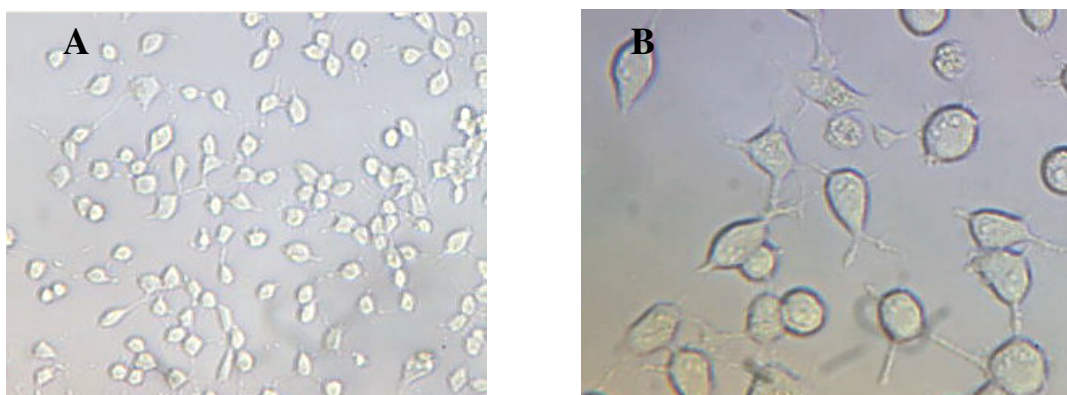


Figura 20. Neuro 2a em microscopia de luz. A) Aumento 10x; B) Aumento 40x.

Foram realizados diversos experimentos para padronizar e testar a eficiência da transfecção das células. A transfecção com um plasmídeo de expressão para a proteína GFP (pCX-EGFP) foi realizada em duas concentrações diferentes (0,5 e 2 μ g, para uma placa de 60 mm de diâmetro). A menor concentração utilizada já foi suficiente para obter células expressando a proteína GFP, no entanto apenas 10% das células foram transfectadas. A concentração mais alta permitiu uma transfecção de aproximadamente 50% das células, sendo que a marcação verde proveniente da excitação da proteína GFP a partir da incidência de luz a 494nm pôde ser vista por toda a extensão da célula após 48h da

transfecção (Figura 21A). A morfologia das células foi mantida após o tratamento mostrando a aplicabilidade desse método em nossos experimentos futuros.

Antes de realizar a transfecção, as placas foram tratadas com poli-D-lisina para aumentar a adesão das células à placa. Toda a extensão da placa foi coberta pela solução de poli-D-lisina, 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) e colocada na estufa à 37°C por 2 h. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril. As células Neuro2a foram distribuídas em placas de 60 mm de diâmetro (Corning) na concentração de 4×10^5 células em 3 ml de meio de cultura completo. No dia seguinte ao plaqueamento foram misturados 10 µl de lipofectamine 2000 (1 mg/ml - Invitrogen) e 490 µl de OptiMEM (Invitrogen) e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se uma solução de 500 µl do plasmídeo diluído em OptiMEM na concentração de 0,5 ou 2 µg, seguindo um incubação de 20 min. O meio de cultura das placas foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS. A mistura completa de lipofectamine, plasmídeo e OptiMEM foi gotejada na placa e acrescentado mais 1 ml de OptiMEM. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e após 5h foram adicionados 2 ml de meio de cultura completo com 20% de soro fetal bovino.

A transfecção das células com oligo de RNA dupla fita marcado com fluoresceína (BLOCK iT fluorescent oligo, Invitrogen) permitiu a verificação da viabilidade e eficiência da transfecção de uma molécula de siRNA para o interior de células de neuroblastoma. A concentração mais baixa testada, 10 nM, já foi suficiente para transfectar em média 30% das células. As concentrações de 100 nM e 200 nM apresentaram uma taxa semelhante de transfecção, aproximadamente 60% (Figura 21B). Esse método também não alterou a morfologia das células.

O reagente lipofectamine 2000 (Invitrogen) é utilizado de forma recorrente na literatura (Wang, 2007; Fei, 2007), sendo composto por um lipídeo catiônico e considerado um método simples e altamente eficiente na transfecção e expressão protéica para diversos tipos celulares. Com o reagente lipofectamine 2000 em nossos experimentos foram obtidos resultados muito satisfatórios. A taxa de transfecção ocorre, em média, em 50% das células, o fenótipo das células não é alterado e não ocorre indução de morte celular.

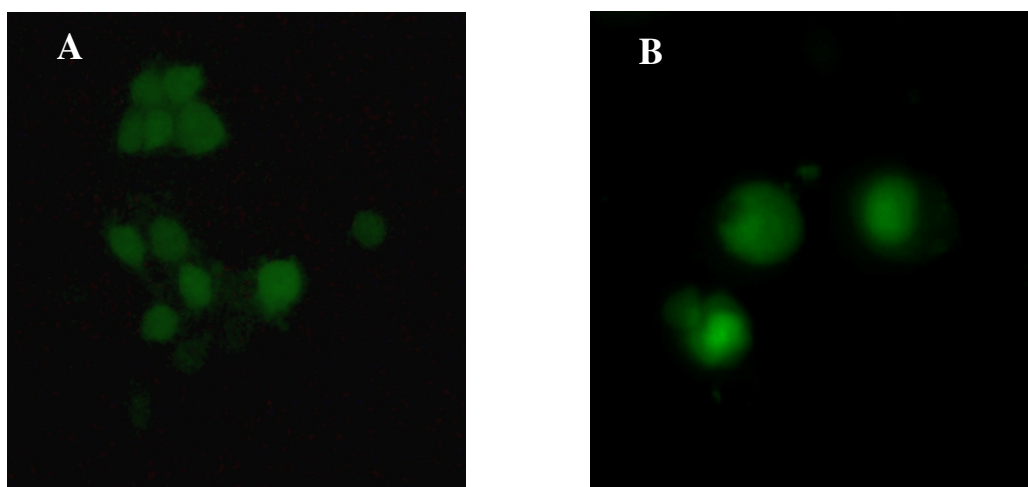


Figura 21. A. Transfecção de Neuro2a com pCX-EGFP visto com filtro FITC, aumento 40x. B. Transfecção de Neuro2a com oligo de RNA dupla fita marcado com fluoresceína visto com filtro FITC, aumento 40x.

Expressão Neuro 2A

Quanto a expressão dos genes das células Neuro 2A não foi verificado sinal para o gene *TrkB*, indicando que o mesmo é pouco expresso nessa cultura celular. No entanto, para o gene *PLAT* foi verificada uma expressão relativamente boa, que se inicia no Ct 30 (figura 22). Para esse expressão foi utilizado somente 40 ng de cDNA, comprovando que ainda é possível o aumento dessa quantidade de template para que seja obtida uma expressão ainda melhor.

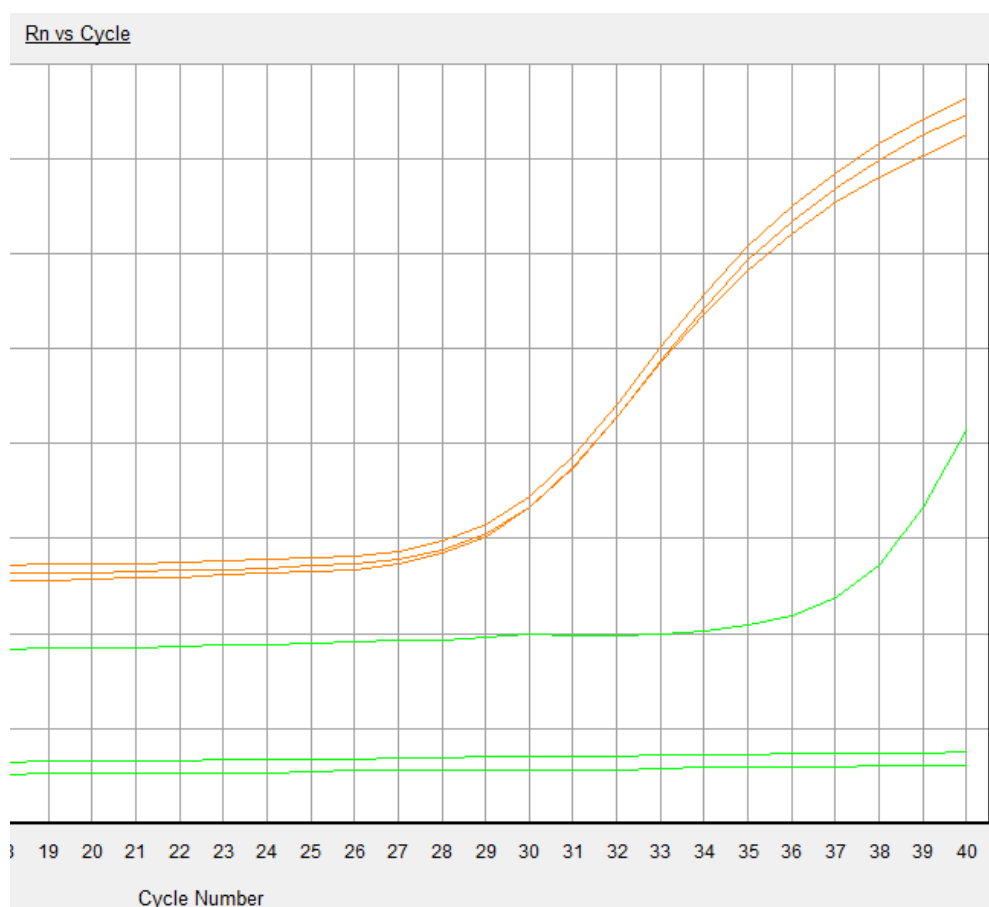


Figura 22. Expressão dos genes *TrkB* (verde) e *PLAT* (laranja) das células Neuro 2A.

6.5 ANIMAIS ISOGÊNICOS

Além de partir para procedimentos com culturas celulares, em que não obtivemos resultados satisfatórios também, resolvemos avaliar qual a interferência que a variação individual dentro de uma linhagem poderia apresentar e que prejudicaria os resultados finais. Para que essa dúvida fosse sanada resolvemos utilizar uma linhagem de rato isogênica.

Para isso utilizamos os animais Lewis adultos machos, em condições SPF, oriundos do CEMIB da UNICAMP. Foram utilizados nove animais, os quais foram comparados com animais Wistar (figura 23).

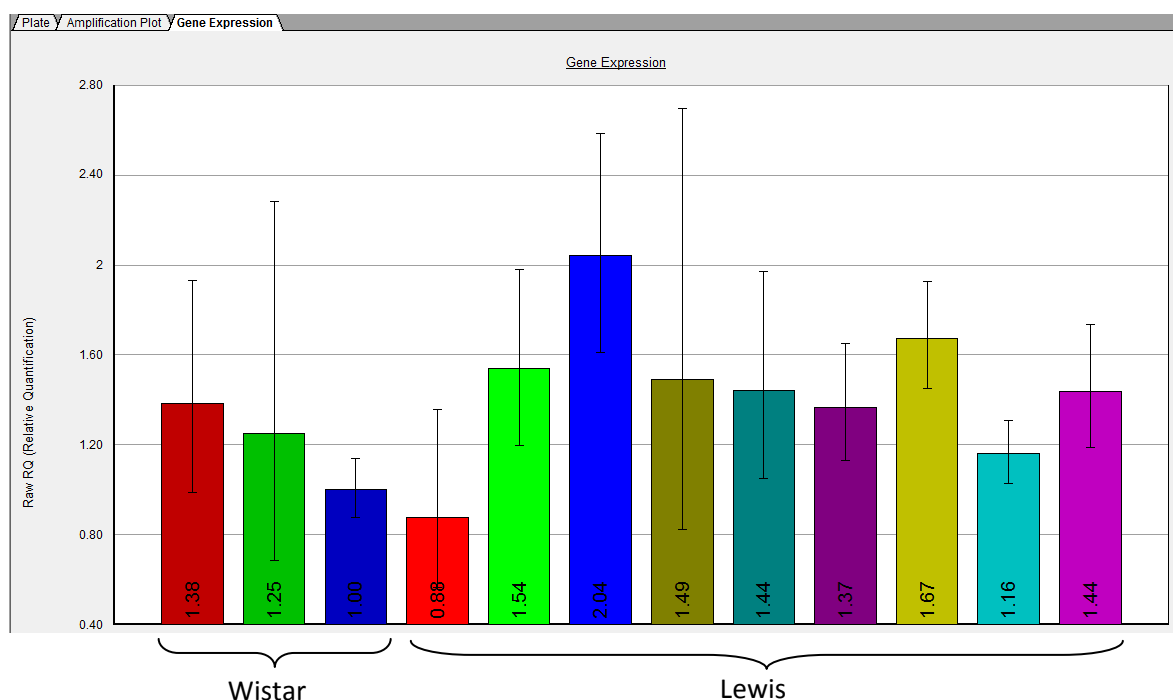


Figura 23. Expressão relativa do gene *IL1B* tendo como controle endógeno o gene *GAPDH*.

Os resultados demonstraram que tanto os animais Lewis, quanto os Wistar, apresentaram as mesmas variações individuais, comprovando que essas variações são provenientes não somente dos próprios animais, mas de uma somatória de vários fatores, desde qualidade de pipetagem para os experimentos moleculares até o nível de estresse dos animais. Dessa maneira, o ideal é que sejam utilizados animais em quantidades suficientes para que qualquer diferença significativa seja representada e passível de ser detectada.

7. CAPÍTULO 2 - PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NA FASE SILENCIOSA

Além dos experimentos de tentativas de silenciamento descritos acima, foram realizadas também análises da expressão de alguns genes na fase silenciosa (*Plat*, *TrkB*, *Tlr2* e *Tlr4*) para traçar um perfil da mesma comparando-se com expressões na fase aguda (figuras 24 à 27). Concomitante foram realizadas análises da ação de silenciamentos dos genes *Il1b* e *Il1rn* na fase silenciosa (capítulo 4).

Para as comparações entre as fases foram coletadas amostras da fase aguda com 1h, 3h e 6h pós SE. Para a fase silenciosa foram utilizados animais com 5 dias pós SE.

Fases aguda e silenciosa - *Plat*

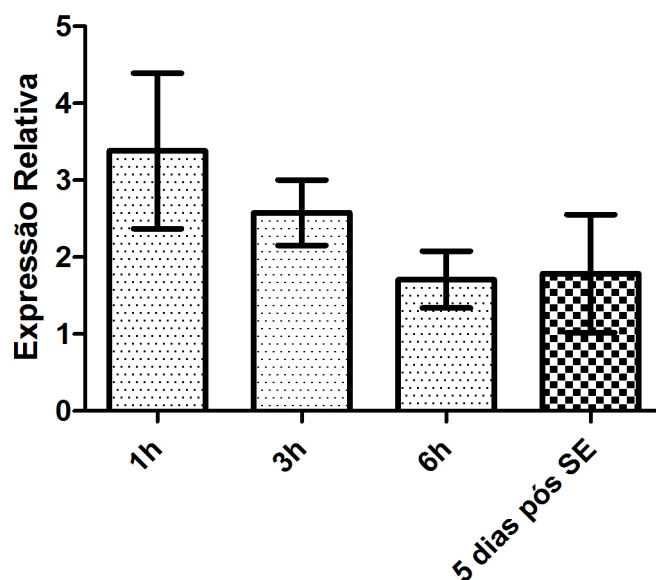


Figura 24. Análise da expressão do gene *Plat* nas fases aguda e silenciosa.

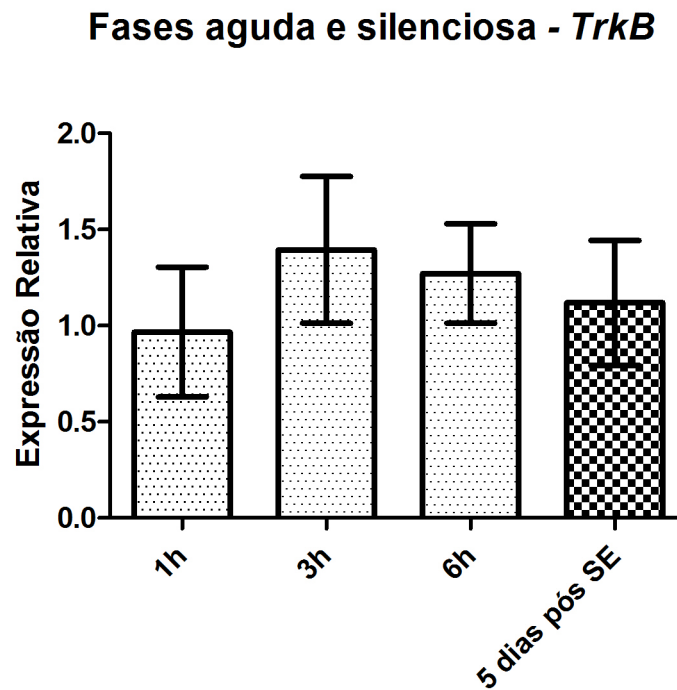


Figura 25. Análise da expressão do gene *TrkB* nas fases aguda e silenciosa.

Nas análises acima percebe-se que para os genes *Plat* e *TrkB* não foram observadas diferenças significativas quanto à expressão dos mesmos. Esses dados vão de encontro ao detalhado na figura 1, já que os genes em questão estão diretamente relacionados à plasticidade neuronal, ou seja, com 5 dias pós SE os mesmos ainda não estão com suas expressões alteradas.

Para que pudessemos obter a comprovação da alteração de expressão gênica no início da fase silenciosa realizou-se a análise de expressão para os genes *Tlr2* e *Tlr4* (figuras 26 e 27).

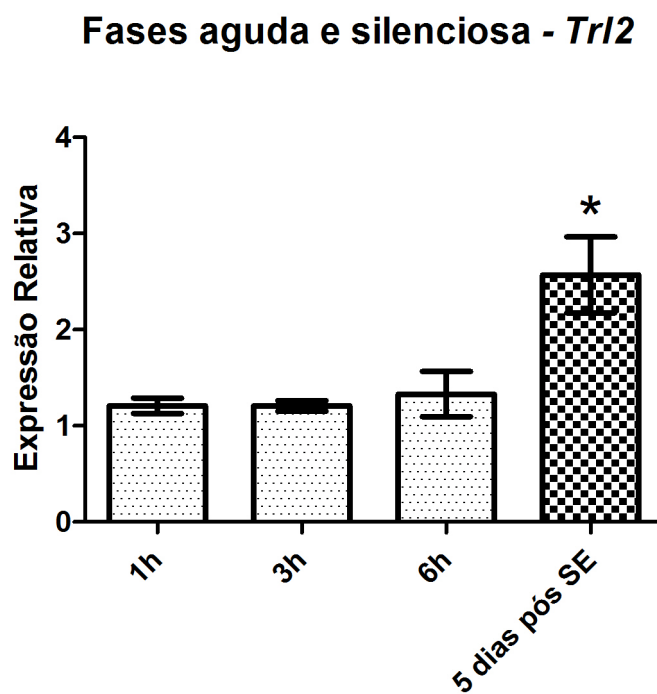


Figura 26. Análise da expressão do gene *Tlr2* nas fases aguda e silenciosa.

Fases aguda e silenciosa - *Tlr4*

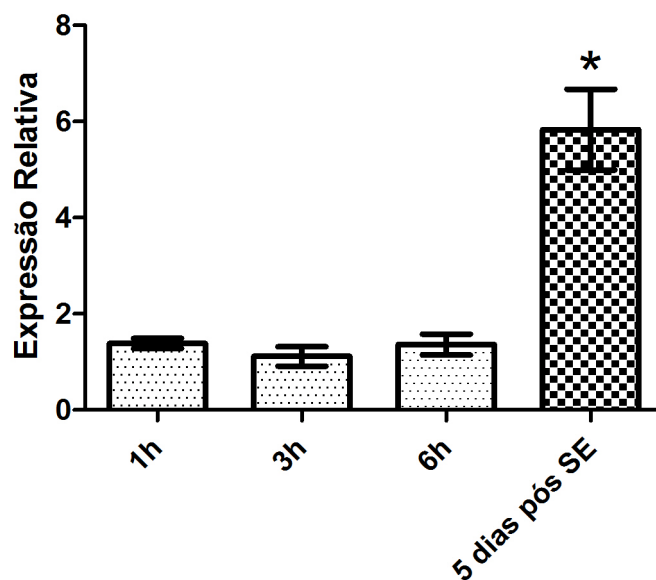


Figura 27. Análise da expressão do gene *Tlr4* nas fases aguda e silenciosa.

Diferente do observado nas análises de genes envolvidos com plasticidade, os genes relacionados com atividades inflamatórias apresentam uma expressão aumentada na fase silenciosa quando comparado com as amostras da fase aguda. Mesmo depois de 5 dias do SE, ou seja, no momento inicial da fase silenciosa, ainda podemos observar um aumento significativo de genes envolvidos com processos de inflamação.

O PAPEL DA INTERLEUCINA 1 BETA

Investigating the role of interleukin 1 beta in the animal model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine using RNA interference as a functional tool

Pascoal V.D.B.^{1‡}, Marchesini R.B.^{1‡}, Matos A. H. B.¹, Conte F.F.¹, Pereira T.C.^{1,2}, Gilioli R.³, Malheiros, J.M.⁴, Polli, R.S.⁴, Tannús, A.⁴, Covolan, L.⁵, Pascoal L. B.⁶, Velloso L.A.⁶, Cavaleiro, E. A.⁷, Cendes, F.⁸ & Lopes-Cendes I.¹

1 - Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

2 - Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Languages of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo - USP, Ribeirao Preto, SP, Brazil;

3 - Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB), University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

4 - Department of Physics and Informatics, Institute of Physics, University of Sao Paulo- USP, Sao Carlos, SP, Brazil;

5 - Department of Physiology, Federal University of Sao Paulo - UNIFESP/EPM, Sao Paulo, SP, Brazil;

6 - Laboratory of Cell Signaling, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

7 - Department of Neurology and Neurosurgery, Federal University of Sao Paulo, UNIFESP/EPM, Sao Paulo, SP, Brazil;

8 - Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

‡ Both authors contributed equally to this work.

key words: epilepsy, neuroinflammation, RNA interference *in vivo*, il1b, RVG-9R

CORRESPONDING AUTHOR

Iscia Lopes-Cendes, M.D., Ph.D.
Department of Medical Genetics
Faculty of Medical Sciences
University of Campinas – UNICAMP
Tessália Vieira de Camargo, 126
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas, SP, Brasil, 13083-887
Tel: +55 19 3521 8909
Fax: +55 19 3289 1818
e-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

The epilepsies affect approximately 1% of the world population; among the different epilepsy syndromes temporal lobe epilepsy is one of the most frequent, and commonly leading to resistance to medical treatment. Among the several animal models of TLE available, the pilocarpine induced model has extensive molecular characterization, as well as histological, physiological and phenomenological studies. In this study we investigate the role of interleukin 1 beta, using a post-transcriptional gene silencing strategy called RNA interference applied in the pilocarpine model.

Our results indicate that *il1b* has an important role in controlling homeostasis in the CNS by modulating the activity and expression of transcription factors which interfere with glutamate re-uptake. In addition, we observed a phenotypic impact of *il1b* gene silencing in the mortality rate of animals after status epilepticus (SE).

In addition, we observed that by silencing the *Il1rn* (alias *il1ra*) there was a significant decrease in cell death in CA1, CA3 and dentate gyrus of animals in the chronic phase of the pilocarpine model. However, despite the effect of *il1b* in the acute phase of the pilocarpine model, the modulation of its expression by RNAi was not sufficient to change the frequency of recurrent seizure or synaptic reorganization (sprouting) in the chronic phase.

In conclusion, our results demonstrate that changes in *il1b* activity were able to cause phenotypic changes in animals during the acute phase of the pilocarpine model, as well as to reduce cell death in critical hippocampal regions in the chronic phase. However, this seems not to have a critical role in the epileptogenic process in the chronic phase. Furthermore, our study

demonstrated the feasibility of using RNAi as a tool for functional studies of epileptogenesis *in vivo*.

Author Summary

Epilepsy is a very common brain disorder characterized by recurrent seizures. Among the different epilepsy syndromes temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most frequent and often refractory to medical treatment. One approach to investigate the mechanisms involved in epilepsy is the study of experimental animal models. Most experimental models of TLE undergo an induced *status epilepticus* (SE) in the ‘acute phase’. This is followed by a latent period, with no seizures, and a ‘chronic phase’ during which spontaneous seizures appear. In the model we used, SE was induced by pilocarpine injection. It is known that one of the most important biological phenomena present in the acute phase of the pilocarpine model is cell death due to apoptosis, necrosis and cell swelling due to massive edema. Furthermore, it has been suggested that this phenomena could be induced by inflammatory responses. In the present study, we investigated the molecular and phenotypic effects of decreased *il1b* and *il1rn* expression in the early stages of the acute phase of the pilocarpine epilepsy model. The phenotypic characterization of animals in our *in vivo* RNAi experiments favors a neuroprotective role for *il1b* which, however is not sufficient to prevent, at least in the experimental conditions we tested, to prevent epileptogenesis.

INTRODUCTION

The epilepsies affect approximately 1% of the world population [1,2,3]. It is estimated that approximately half of the adult patients with epilepsy have temporal lobe epilepsy (TLE) and among these only about 60% achieve optimal seizure control with clinical treatment, making TLE one of the most frequent and severe forms of epilepsy [4,5].

One approach used to investigate the pathophysiology of TLE is the study of experimental animal model, which presents epileptogenicity similar to that observed in the so-called ‘epileptic’ human tissue studied *ex vivo*. Among the various models available, the pilocarpine-induced (PILO) is well established and presents extensive molecular, histological, physiological and phenomenological characterization [6,7,8,9]. In addition, the sequence of events observed in the different phases of the PILO model is somewhat similar to that seen in some patients with TLE in whom an initial precipitating event can be identified, such as a prolonged febrile seizure [10]. Furthermore, the histological characteristics of the hippocampal lesion observed in the chronic phase of PILO animals is also similar to that found in TLE patients with the typical findings of mesial temporal sclerosis [6,7,8,9,11,12], although the lesion in the PILO model extends also to extra-hippocampal regions of the brain [13,14].

It has been well characterized that one important biological phenomena observed in the acute phase of the PILO model is cell death which is believed to be caused by apoptosis [15], necrosis (Friedman et al. 2011), as well as cell swelling due to massive

edema (Damek, 2009). Furthermore, it has been suggested that these events could be induced by inflammatory response [16,17]. Therefore, changes in expression of genes related to inflammatory pathways such as interleukins, interferons, tumor necrosis factor (*Tnf*) and others have been studied in the acute phase of the PILO model [18,19,20]. However, it is still unclear which of these genes and/or signaling pathways would be critical (sufficient or necessary) to determine the specific hippocampal lesion leading to epileptogenesis in the chronic phase of the model. Because of the increase in expression of interleukin 1 beta (*Il1b*) in the acute phase of the PILO model [15,21] this cytokine emerges as a candidate for a key player in the molecular mechanisms underlying the damage induced by pilocarpine. Although a large body of literature has been produced regarding the investigation of *il1b* in the PILO model (for a review see [22]) there are still a number of unanswered questions and the matter is far from resolved [23]. Therefore, our main objective was to apply a more specific tool for gene silencing (RNA interference, using small interference RNA; siRNA) combined with a non-invasive delivery strategy of interfering molecules, in order to investigate the molecular and phenotypic effects of decreased expression of interleukin 1 beta (*Il1b*) and *Il1rn* (an *Il1b* endogenous antagonist) in the early stages of the acute phase of the PILO model of TLE. Furthermore, we aimed to investigate whether the strategy we used for non-invasive delivery of molecules, a peptide derived from the rabies virus glycoprotein (RVG), could induce damage to the blood brain barrier (BBB).

RESULTS

Determining the best experimental conditions for gene silencing and checking for off-target effects

We observed that gene silencing using siRNA against *Il1b* (siil1b) was dose-dependent, reaching the highest knockdown effects (more than 80% reduction of mRNA 48 h post injection) by using two tail injections of 50 µg of siRNA (fig. 1). However, since two injections of 25 µg of siRNA yielded similar silencing results, all subsequent experiments were performed with this smaller mass to avoid possible off-target effects [24]. In addition, three different strategies were used to assess RNAi specificity. Initially we tested the effects of siil1b on expression levels of *Ptgs2* and *Nfkb* (fig. 1). As expected, two injections of 25 µg lead to a clear knockdown effect in both genes, since they are biologically related to *Il1b* [25,26]. However, increasing the mass of siil1b injected to 50 µg, an unspecific effect was observed. This was characterized by a significant increase in expression of *Ptgs2*, making it similar to controls. By contrast, siRNA against green fluorescent protein (siGFP, used as negative control) did not affect expression of any of these two genes (fig. 1); clearly showing that RNAi was dependent on target sequence complementarity. The second approach to check for RNAi specificity focused on the expression of two genes not related to *Il1b*: *Ntrk2* and *Plat*. In this experiment, using siil1b and siGFP, there were no gene knockdown effects (fig. 2). Finally, we analyzed expression of three additional genes over a longer period of time after siil1b injections: *Tlr3*, *Il6* and *Tnf*. In this experiment we observed no increased expression of these genes, what would be expected if there was an induction of off-target effects by siil1b (maximum observation time = 120h after siil1b

injections, data not shown). However, we observed a decrease in *tnf* expression at 72 h (60%) and 96 h (45%) after siil1b injections (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), which could result from the decreased expression of *Il1b* induced by siil1b injections.

Figure 1

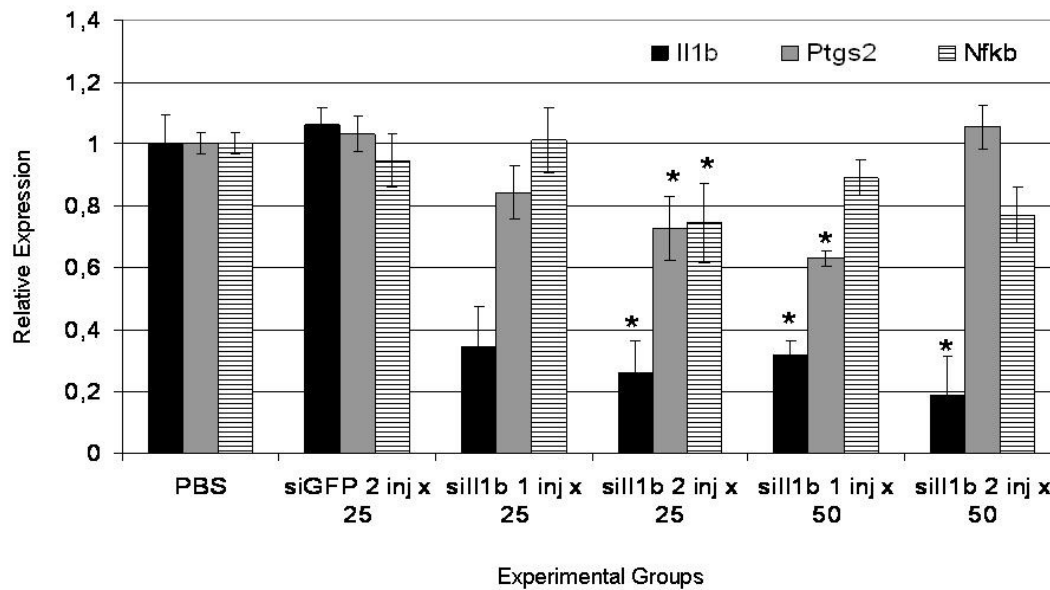


Figure 1. Dose-response curve of gene silencing effects after siil1b intravenous tail injection in rats. Efficiency of gene silencing was enhanced with increased number of injections and increased mass of siRNA. We investigated expression of the target gene *Il1b*, as well as of two biologically related genes *Ptgs2* and *Nfkb*. All groups were composed of five animals. * Kruskal-Wallis test confirmed significant silencing in the group injected twice with siil1b ($p < 0.05$) at 8 h interval using 25 μ g or 50 μ g. Vertical bars indicate standard deviation.

Figure 2

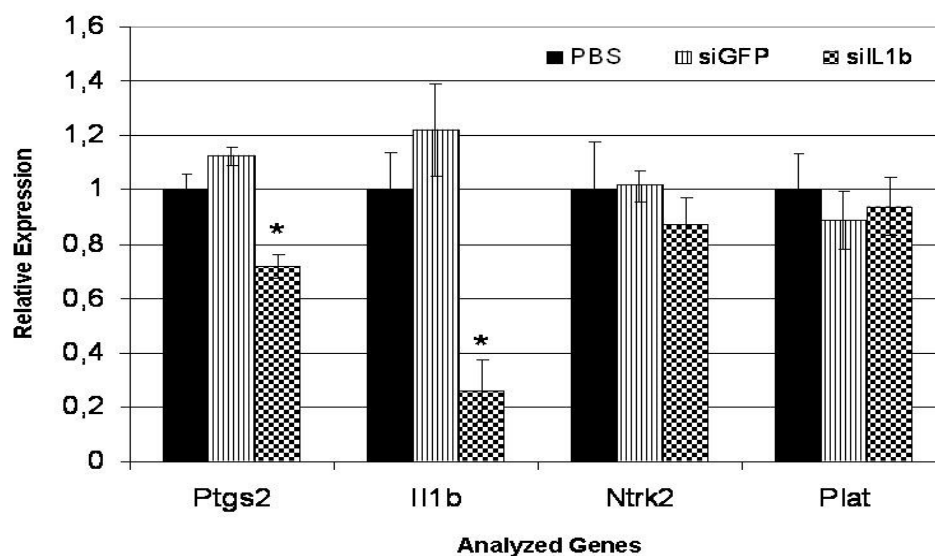


Figure 2: Assessment of RNA interference specificity. Relative gene expression quantification (RT-qPCR) of *Ptgs2*, *Il1b*, *Ntrk2* and *Plat* in animals which received two injections of 25 μ g of siRNAs (8 h apart). Brains were collected and RNA was extracted 72 h after the first injection. As expected, PBS alone or siGFP did not affect expression of any of the assessed genes. By contrast, siil1b lead to silencing of both *Il1b* and *Ptgs2* (which are in the same biological pathway as *Il1b*); whereas, *Ntrk2* and *Plat* (which are not biologically related to *Il1b*) were not affected. Each experiment was performed in tissue extracted from five animals. *Kruskal-Wallis confirmed gene silencing ($p < 0.05$). Vertical bars indicate standard deviation.

Testing blood-brain barrier integrity after RVG-9dR tail injection

To verify whether the crossing of siRNA::RVG-9R complexes from periphery to the central nervous system (CNS) could induce significant damage to the *blood-brain barrier* (BBB), we performed magnetic resonance imaging in animals from two RNAi control groups (injected with PBS and siGFP) and in one RNAi experimental group

(injected with siil1b) using Gd-DTPA as a paramagnetic contrast. As a positive control we used animals that remained in pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE) for 2 h, which is known to damage the BBB [27]. After image acquisition we selected two slices near the middle of the cerebellum and one in the hippocampal region for visual analysis (fig. 3). Our data clearly shows that there was no sign of BBB damage. However, it is noteworthy to point out that this approach takes into account the limitation of the paramagnetic contrast used (Gd-DTPA, molecular weight nearly 550 g/mol). Therefore, BBB integrity is confirmed for molecules of equivalent size or larger, what is enough to establish that, the complex of siRNA:RVG9R do not cause significant damage to the BBB.

Figure 3

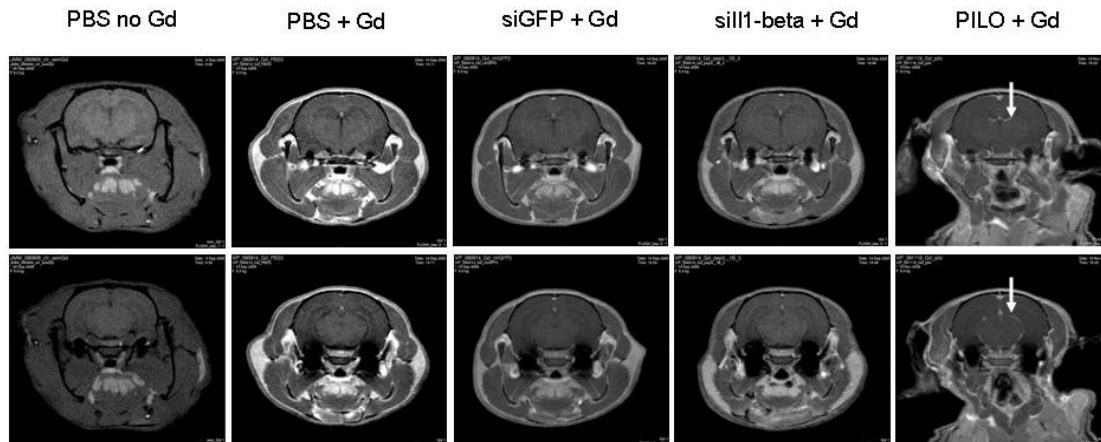


Figure 3. Representative magnetic resonance images of animals used in our experiments with RNA interference. We selected two slices near the middle of the cerebellum and another one in the hippocampal region. **A)** Images from an animal which was injected with PBS but no paramagnetic contrast (Gd-DTPA); **B)** animals injected with PBS (control) followed by Gd-DTPA; **C)** animals injected with siGFP::RVG9R followed by Gd-DTPA; **D)** animals injected with siil1b::RVG9R followed by Gd-DTPA; and **E)** animals injected with Gd-DTPA after two of hours *status epilepticus* induced by pilocarpine (PILO) injection (positive control). All groups were composed of three animals. White arrows indicate the presence of Gd-DTPA (intensified signal) within the brain as an image marker of blood brain barrier damage.

Determining gene silencing effects over time

Transvascular tail injections of siil1b resulted in significant gene silencing in the rat brain, which was detected after 48 h post injections (fig. 4), with the maximum effect on mRNA levels occurring at 72 h after siil1b injections as determined by RT-qPCR. Normal mRNA levels were restored only 96 h after siil1b injections. Western blot analysis also revealed a significant decrease in il1b protein levels; starting at 48 h after siil1b tail injections and remaining significantly low until 96 h post siil1b injections (fig. 4).

Transvascular tail injections of siil1rn resulted in significant gene silencing in the brain (60% mRNA reduction based on RT-qPCR) 48 h post injections. Western blot also revealed a significant decrease in proteins levels (maximum of 30% reduction) which was detected up to 48 h post injections (data not shown).

Figure 4

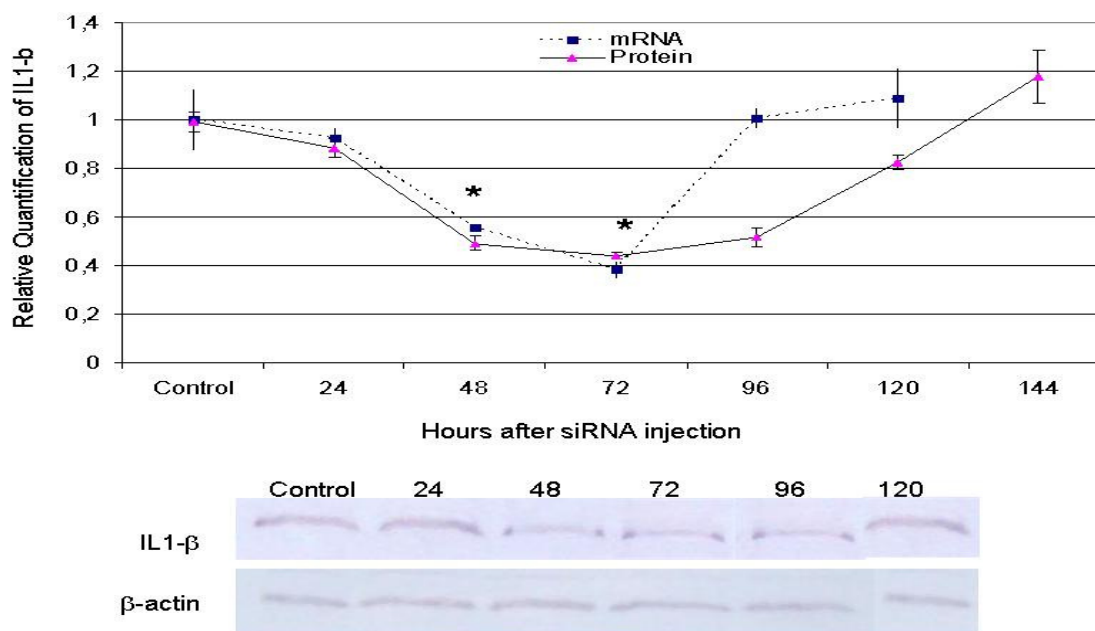


Figure 4. Gene silencing effect of siil1b over time. Animals were injected twice (8 h interval) with 25 µg of siil1b in the tail vein. Gene expression was quantified in the brain by RT-qPCR and protein levels by western blot. Control animals were injected with PBS and siGFP (data not shown). All groups had three animals. * Kruskal-Wallis confirmed silencing $p < 0.05$. Vertical bars indicate standard deviation. p.i. post injection.

Determining gene silencing effects in different parts of the brain and the spinal cord

Gene knockdown was achieved in four out of five brain regions analyzed (only in brainstem *Il1b* was not silenced; fig. 5), with efficiencies ranging from near 20% (hippocampus) to 40% (cerebellum). In the spinal cord gene expression was only slightly decreased as compared to controls.

Figure 5

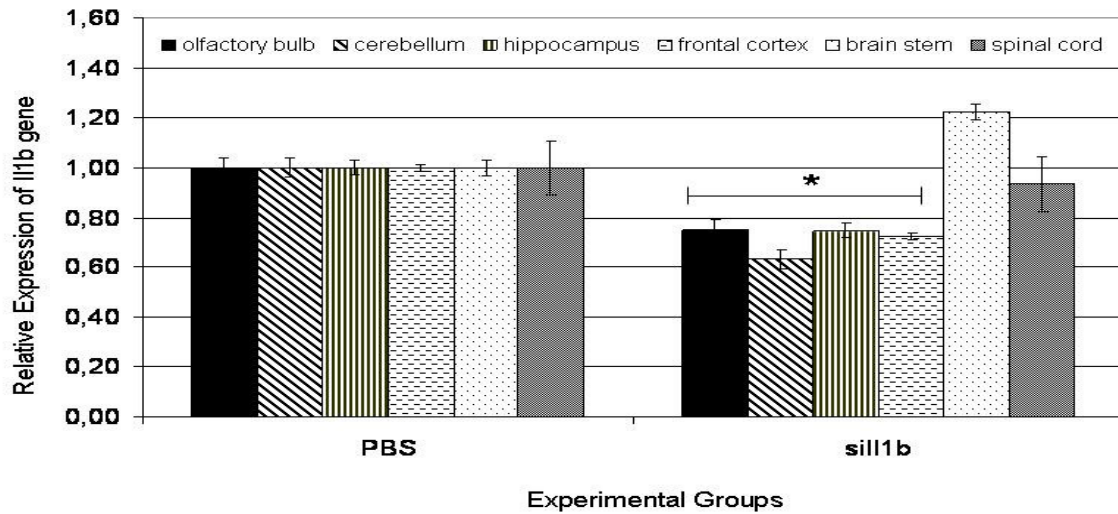


Figure 5. Gene silencing effects in different regions. Animals were injected twice (8 h interval) with 25 μ g of si11b in the tail vein. Gene expression was quantified by RT-qPCR 48 h post-injection. Gene silencing was observed in four out of five brain regions (olfactory bulb, cerebellum, hippocampus and frontal cortex). Control animals were injected with PBS. All groups were composed of five animals. *Mann-Whitney revealed significant gene silencing in four brain regions ($p < 0.05$). Vertical bars indicate standard deviation.

Expression of *il1b* and *il1rn* in the PILO model

It is well known that *Il1b* is up-regulated in the PILO animal model (for a review see [22]). However, in order to achieve timely knockdown it was important to determine more precisely the time frame when the increase in expression takes place; therefore, we quantified *Il1b* transcripts at short intervals (1, 3, 6 and 24 h) after SE (three animals per group). Surprisingly, we observed a very early and fast increase in *Il1b* mRNA starting in the first hour after SE. The continuing observation showed that within six hours after SE *Il1b* mRNA expression reached a tenfold increase as compared to control animals (fig. 6). In addition, we observed up-regulation of *Il1rn*, but at a more modest proportion (fig. 6). Considering the very early increase in *Il1b* expression in the course of PILO SE induction,

we decided to inject siil1b 48 h **prior** to pilocarpine administration. By doing so, we expect that at the time of the fast increase in *Il1b* expression, injection of siil1b would be able to control the striking pilocarpine-mediated *Il1b* up-regulation.

Figure 6

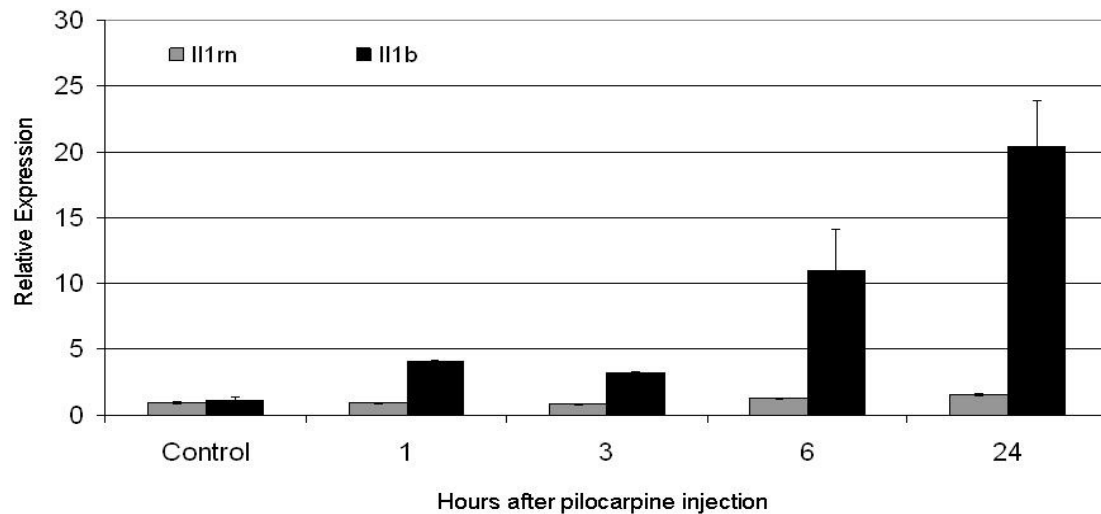


Figure 6. *il1b* and *il1rn* gene expression profiles over time in the brain after pilocarpine injection. Expression profiles by RT-qPCR of both genes were assessed 1, 3, 6 and 24 hours after injection of pilocarpine and compared with control (no siil1b or pilocarpine administration). We observed a very rapid increase in *Il1b* which was ten times higher than the control six hours after pilocarpine injection. All groups had three animals. * Kruskal-Wallis test confirmed significant changes in gene expression, $p < 0.05$. p.i.: post (pilocarpine) injection. Vertical bars indicate standard deviation.

Phenotypic changes induced by *il1b* and *il1rn* knockdown using RNAi in the acute phase of the PILO model

From fifty animals injected with pilocarpine, forty-two (84%) developed SE; however, fourteen animals suffered fatal seizures or died during SE. There were no statistically significant differences in death rates among the groups in the period immediately following SE: controls (19%), pre-injected with siil1b (22%) or siil1rn (25%).

However, we observed significant differences in animal mortality **five days after SE**: control group = 50%; siil1b group = 75% and siil1rn = 30% (chi-square; $p = 0.001$ and $p = 0.03$, respectively). Indeed, the higher mortality observed in the siil1b group hindered further analyses such as gene expression studies and histological characterization in the chronic phase.

Time intervals between pilocarpine injection and the first observed seizure were: 34 min ($SD \pm 12$) in controls, 26 min ($SD \pm 14$) in animals pre-injected with siil1b (ANOVA and Tukey, $p < 0.05$), and 49 min ($SD \pm 16$) in animals pre-injected with siil1rn (ANOVA and Tukey, $p > 0.05$).

In addition, significant differences in latency for SE for both groups were observed. Time intervals between pilocarpine injection and SE were: 58 min ($SD \pm 19$) in controls, 46 min ($SD \pm 25$) in animals pre-injected with siil1b (ANOVA and Tukey, $p < 0.01$), and 70 min ($SD \pm 18$) in animals pre-injected with siil1rn (ANOVA and Tukey, $p < 0.01$).

Studying Il1b signaling pathway and glutamate re-uptake after *il1b* and *il1rn* knockdown

We analyzed expression of several genes related to Il1b signaling pathway as well as glutamate re-uptake in the synaptic cleft. Our aim was to gain additional information regarding Il1b signaling pathway regulation, as well as to investigate a possible involvement of glutamate mediated damage induced by changes in Il1b expression. Experiments were carried out 48 h after siRNAs were injected, so that the molecular effects

of gene silencing were at maximum. For genes related to *Il1b* pathway we observed that *Nfkb* (p65) (an important transcription factor) and p-I κ B protein levels were reduced after *siil1b* treatment (ANOVA and Tukey confirmed changes in expression, $p < 0.05$) and up-regulated in animals treated with *siil1rn* (ANOVA and Tukey confirmed changes in expression, $p < 0.05$, fig. 7). In addition, our results showed that *Slc1a3* (alias *Eaat1*), which is one of the most important glutamate re-uptake transporters in the CNS, is indeed down-regulated when *Il1b* is silenced (as determined by mRNA quantification, (*supplemental data, fig. S1*)). The opposite effect (up-regulation of *Slc1a3*), was observed when *Il1rn* was silenced. The same trend was observed for protein levels, as demonstrated by western blot densitometry (fig. 7).

Figure 7

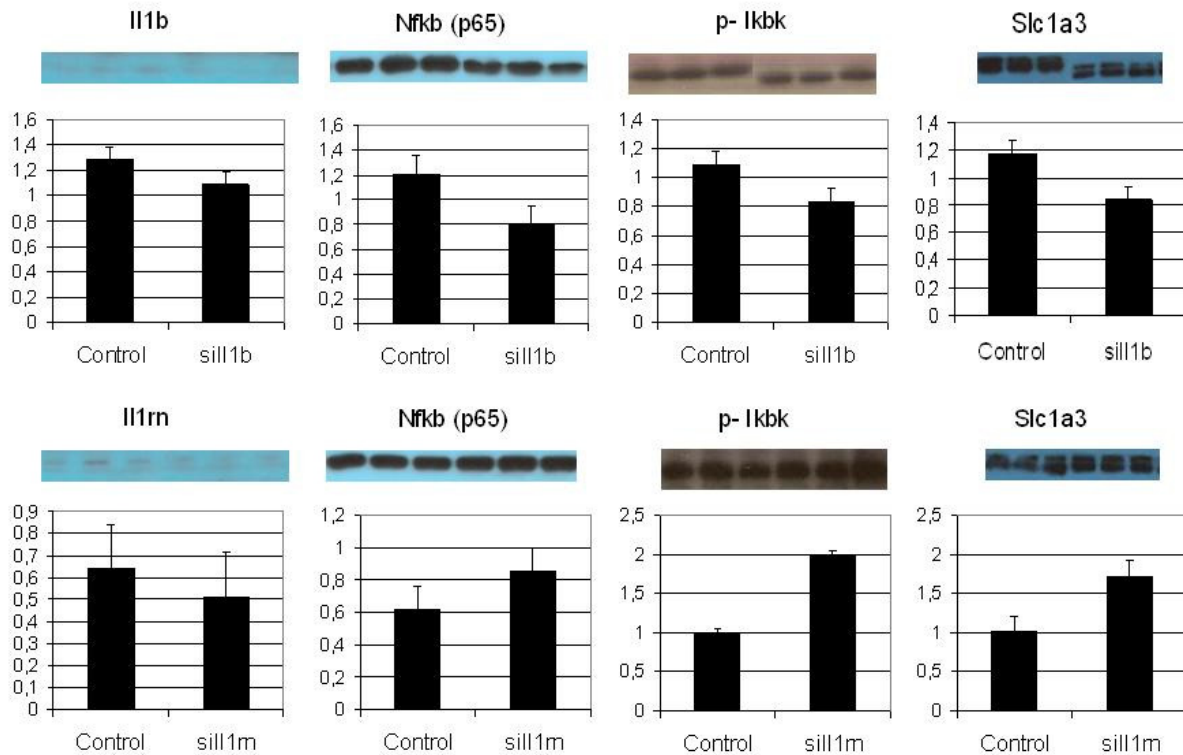


Figure 7. Protein analysis of four genes 48 hours after siil1b or siil1rn injection (no pilocarpine administration). Western blot analysis showing protein levels (Mol weight of the proteolytically processed IL1B is 17.5 kD, Mol weight il1rn is 20kD, Mol weight Nfkb is 65 kD, p-Ikbkb and Slc1a3) in the brain of silenced animals. All groups had five animals. * ANOVA and Tukey confirmed significant changes in gene expression, $p < 0.05$. Vertical bars indicate standard deviation.

Expression studies of genes in the silent phase of the PILO model after siil1rn knockdown

We investigate whether changes in expression of several genes related to the silent phase of the PILO model could be induced by the temporary knockdown of *Il1rn* in the acute phase. Indeed, we observed that genes expressed in the silent phase such as *Npy*, *Plat* and *Ntrk2* [28,29,30,31] were up-regulated in animals which had *Il1rn* silenced (fig. 8). In

addition, we still observed the up-regulation effect of siil1rn on *Nfkb*, which had been documented in the acute phase. Unfortunately, we could not perform a similar experiment with animals which had *Il1b* silenced due to the high mortality rate observed in this group.

Figure 8

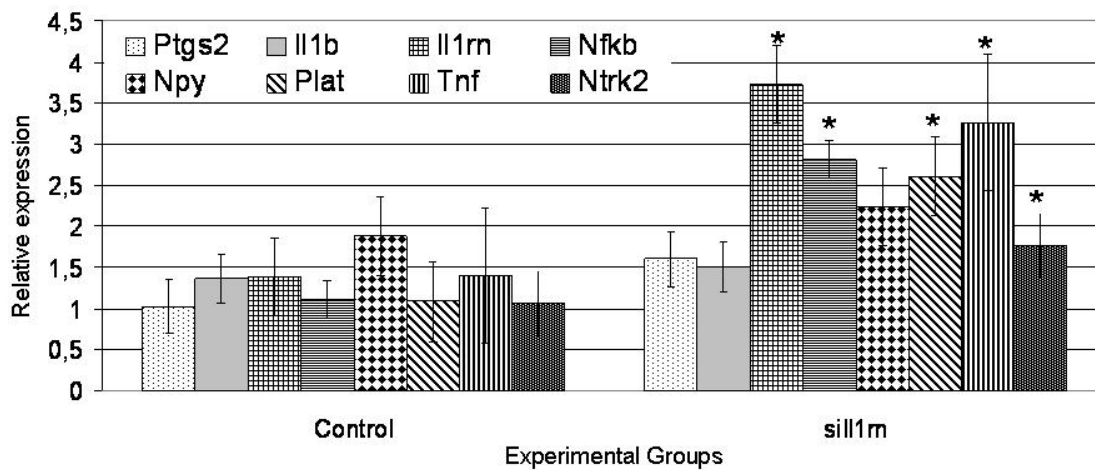
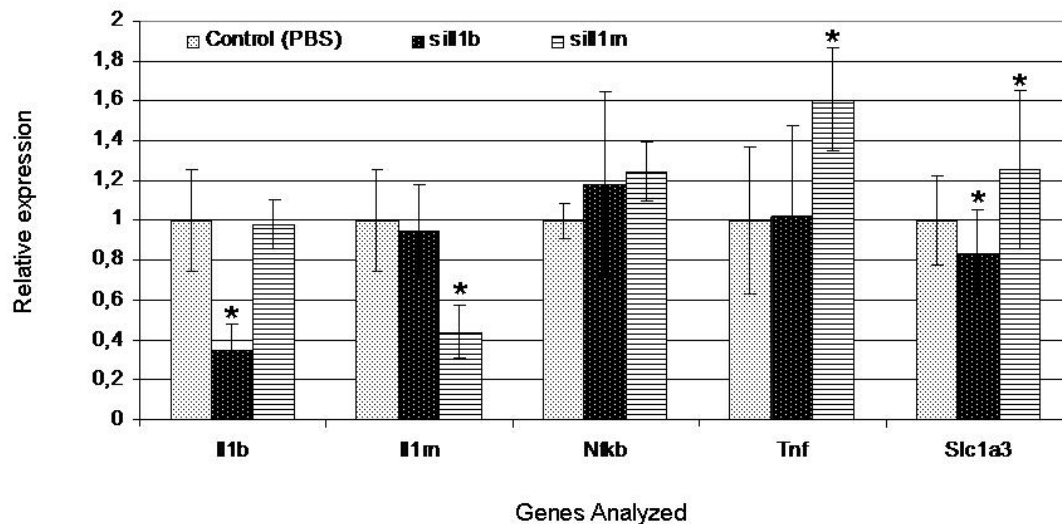


Figure 8. Relative quantification of eight genes in animals pre-treated with siil1rn and injected with pilocarpine. Animals were injected twice (8 h interval) with 25 µg of siil1rn in the tail vein 48 hours before pilocarpine administration, mRNA levels of eight genes were determined in the brain **five days after SE**. We observed significant increase in *Il1rn*, *Tnf*, *Nfkb*, *Plat* and *Ntrk2* mRNA levels in animals pre-treated with siil1rn as compared to control (PBS group). By contrast, there was no change in expression of *Npy*, *Ptgs2* and *Il1b*. All groups had five animals. *ANOVA and Tukey confirmed significant change in expression, $p < 0.05$. Vertical bars indicate standard deviation.

Phenotypic characterization of the chronic phase in animals which suffered transient knockdown of *Il1rn*

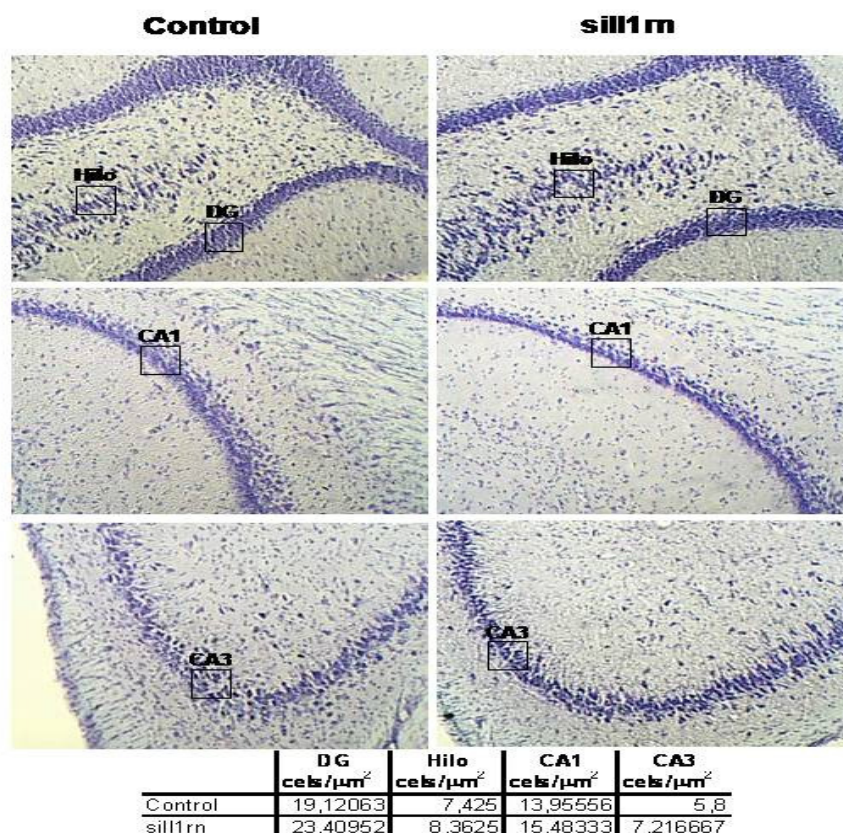
In order to determine whether the molecular changes induced by the temporary knockdown of *Il1rn* in the acute phase could lead to significant repercussions in the chronic phase of the PILO model, we obtained tissue from animals three months after SE. This analysis was performed only with those injected with siil1rn due to the high mortality rate of the group injected with siil1b. We found no significant differences in neuronal reorganization as analyzed by Neo-Timm between samples obtained from animals silenced for *Il1rn* and controls (data not show). However, Nissl staining clearly demonstrated decreased neuronal loss in hippocampi of animals which had been treated with *Il1rn* (supplemental data fig. S2, ANOVA and Tukey, $p < 0.01$).

SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental data, figure S1. Transcript expression analysis of genes 48 hours after siil1b or siil1rn injection (no pilocarpine administration). RT-qPCR assays showing mRNA levels of *Il1b*, *Il1rn*, *Nfkb* and *Slc1a3* in animals injected with siil1b or siil1rn. Control animals were injected with PBS. All groups had five animals. *Kruskal-Wallis test confirmed significant changes in gene expression, $p < 0.05$. Vertical bars indicate standard deviation.

SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental data, figure S2. Neuronal count using Nissl staining in hippocampi of animals in the chronic phase of the pilocarpine model: Animals which were injected twice (8 h interval) with 25 μg of si11rn in the tail vein 48 hours before pilocarpine administration and survived after SE were kept under observation for 90 days. **a)** hilus and dentate gyrus, **c)** CA1, and **e)** CA3 regions of control animals injected with pilocarpine and PBS; **b)** hilus and dentate gyrus, **d)** CA1, and **f)** CA3 regions of animals pre-treated with of si11rn. We observed neuronal loss in hilus, dentate gyrus, CA1 and CA3 regions in animals pre-treated with si11rn (ANOVA and Tukey confirmed significant difference, $p < 0.05$). D.G. Dentate gyrus.

DISCUSSION

The experimental strategy we used in the present study was RNA interference (RNAi) applied *in vivo*. This technique is based on an endogenous sequence-specific post-transcriptional gene silencing mechanism present in various species, ranging from single-celled organisms [32], parasites [33,34] to mammals[35]. RNAi is triggered by RNA duplexes such as small interfering RNAs (siRNAs) and double-stranded RNAs (dsRNAs; [36,37]). Once inside the cell, siRNAs bind, activate and guide a multi-protein complex named RISC to endogenous mRNAs containing complementary sequences. This site-specific pairing enables an endonucleolytic cleavage of the RNA via RISC [38], resulting in the rapid degradation of the target mRNA.

Although reports have shown remarkable results using this technique in various organs, the CNS remains a difficult target mainly due to the protection of the BBB and to the degree of cellular diversity [39,40]. Many protocols for *in vivo* delivery of siRNAs into the CNS use intrathecal injection associated with a cofactor, in all cases stereotaxic surgery is needed (for a review see [41]). In addition to their invasiveness, these approaches promote only a restricted silencing, limited to the injection site.

Adeno- and retrovirus transduction protocols promote gene silencing in a variety of cell types in the CNS; however, it is also a limited strategy since an injection into the cerebral parenchyma is also needed. In addition, inflammatory responses (triggered by the viral vector) may interfere with molecular and phenotypic analyses [42,43].

Recently, a simple and much less invasive strategy was proposed and tested in mice in which siRNA molecules were conjugated to a short peptide derived from the rabies virus

glycoprotein (RVG). This viral protein enables the transvascular delivery of siRNAs to the brain leading to successful gene silencing [44]. In the present study we targeted *Il1b* and its endogenous antagonist (*Il1rn*) in the PILO model of TLE to investigate whether a similar approach could be used to promote gene knockdown in the rat brain. In addition, we assessed BBB integrity, as well as expression of additional genes involved in inflammatory response and glutamate re-uptake in the CNS.

We introduced a few modifications in the original procedure developed in mice [44]. First we tested the possibility of reducing the number of injections from three to two (with an interval of 8 hours). This modification proved to be satisfactory, decreasing animal stress due to manipulation and overall experimental costs. Therefore, using only two intravenous tail injections we observed gene knockdown effects after 24 h which lasted for up to 4 days (measured at protein level).

Although the non-invasive *in vivo* delivery technique was proven to be efficient for knocking down genes in the CNS, one question that remained unanswered to date was the possibility of significant damage to the BBB by the use of siRNA::RVG-9R complexes. Our MRI experiment was able to rule out this possibility, showing that treatment with different siRNA::RVG-9R complexes (molecular weight of the complex is approximately 62,000 g/mol) did not alter BBB permeability to molecules equal in size or larger than Gd-DTPA - the paramagnetic contrast used in our experiments (molecular weight of approximately 550 g/mol).

Gene silencing in the brain was transient after the two initial endovenous tail injections of siRNA complexes and followed a specific time-course as demonstrated by

decrease in mRNA and protein levels (fig. 4). Although silencing efficiency was around 60-70 % in the brain as a whole (for a mass of 25 µg of siil1b injected twice, figs. 1, 2 and 4), when distinct regions were assessed we found significant regional differences (fig. 5), which may indicate that higher silencing effects, due to different cellular uptake rates, were achieved in brain regions not analyzed in this experiment. More importantly, the hippocampus, a target structure for epileptogenesis in the PILO model, was successfully silenced.

Although RNAi has emerged in the past decade as a promising biological and therapeutic tool, there are some limitations that need to be addressed carefully when applying it to functional studies [45]. Among these, off-target effects are of special concern [46,47]. We assessed this issue carefully by performing a series of experiments (fig. 1, [48,49]). We only observed evidence of off-target effects when using high concentrations of siRNAs (2 x 50 µg); in this scenario we observed that expression of *Ptgs2* was affected as described previously as an evidence of oversaturation of RNAi machinery [24]. Detecting off-target effects are important, since there are a number of experimental procedures that can be adopted to avoid and/or minimize them [45].

Interleukin 1 beta has been identified as a potential key player in epilepsy mainly due to its increased expression in different epilepsy models [21,50,51,52,53,54,55,56,57]. In addition, it has been demonstrated that local injections of recombinant il1b in the brain after trauma, ischemia or excitatory lesions increase edema [58,59]; whereas, antibodies against il1b reduce the amount of damage caused by excitotoxins, trauma or ischemia [59,60,61]. Therefore, it has been suggested that il1b could have neurotoxic and proconvulsant effects [62,63]. One hypothesis to explain the effect of il1b in neuronal excitability is that it

directly increases NMDA-R function, Ca^{2+} influx and inhibits K^{+} efflux, all contributing to seizure susceptibility [64,65,66]. However, it is possible that the over-expression of *Il1b* identified in the structures that are most severely affected by seizures may be only an epiphenomenon, that is a consequence (and not a cause) of excitotoxicity related to a massive release of glutamate activation, influx of Ca^{2+} and cell death [67]. Indeed, there is evidence claiming a neuroprotective role for *il1b*, especially against glutamate excitotoxicity [68,69] and there are certainly contradictory results using similar strategies of investigation (reviewed in [22]).

It is important to point out that there are limitations in many studies performed to date regarding the strategies used to assess *il1b* expression and activity, one example is the transgenic mice Tg *hsIL-1ra* (that over-expressed *Il1rn*). This animal has a significant smaller brain than the wild type [70,71]. Whether the differences are due to a defect in neuronogenesis (*i.e.* lower number of neurons generated in early development) or to a defect in connectivity (*i.e.* less developed dendritic trees) is not known [72], but this ‘complex’ phenotype could potentially change the normal role of *il1b* physiology. In addition, many studies present major limitations regarding the strategy of delivery of molecules into the CNS in order to modulate expression of *Il1b* and *Il1rn*. In most studies, **stereotactic** surgery is used for this purpose [51,52,62,63,73,74,75,76,77,78]. This procedure could potentially induce further inflammatory changes which may make it difficult to study genes involved in inflammatory pathways. Indeed, we observed the activation of genes related to inflammation in the CNS after a stereotactic procedure (data not shown). Furthermore, all the studies performed to date did not offer a cell specific delivery technique. It is known that *il1b* has a variety of actions depending on the target cell

[18,64,79,80,81,82,83,84] and that *il1b* is expressed predominantly in glial cells in the different models of TLE studied (both in astrocytes and microglia) [57,85,86]. In addition, activation of interleukin 1 receptor, type I (*Il1r1*), the receptor responsible for *il1b*, initiates the expression of many genes, ultimately resulting in astroglyosis [17,87,88], neuroinflammatory response, and modulation of BBB permeability [89]. Furthermore, changes in gene expression in glial cells appear to be very important, since these cells are responsible for neuronal homeostasis, electrical excitability, calcium concentration, and glutamate release. Therefore, we used a targeted delivery of siRNAs only to the macrophage/microglia by conjugating siRNAs to the RVG-9R peptide [87,90].

It has been suggested that there is an association between increased expression of *Il1b* and increased re-uptake of glutamate, indicating that *Il1b* may also act as a neuroprotective agent by modulating the glia-neuron network [69]. The phenotypic characterization of animals in our *in vivo* RNAi experiments favors a neuroprotective role for *il1b* since we observed that animals which had *Il1b* silenced showed a significant decrease in the latency for the first seizure as well as for SE. In contrast, animals which had *Il1rn* silenced, and therefore presented an increased *Il1b* receptor availability, showed the opposite effect. In addition, animals which had been silenced for *Il1b* showed an increase in mortality after five days of SE; whereas, the opposite effect was observed in animals silenced for *Il1rn*. Moreover, we showed that changes in expression in *Slc1a3*, one of the most important transporter proteins involved in glutamate re-uptake in the synaptic cleft was indeed influenced by changes in expression of *Il1b* and *Il1rn*, which in turn activated the Nfkb signaling pathway (fig. 7). Therefore, our data supports previous evidence that *il1b*

decreases neuronal excitability by acting in the glutamate re-uptake mechanism explaining the phenotype observed in the experimental animals.

Although gene silencing effects were temporary and present only during the acute phase, we were able to detect molecular and phenotypic changes that persisted beyond this period. We demonstrated that animals, whose *Il1rn* was knocked down 48 h prior to pilocarpine injection, displayed an even greater up-regulation of genes known to be over-expressed in the silent phase of the PILO model (*Plat*, *Ntrk2* and *Npy*, fig.8). Surprisingly, the changes in gene expression induced by temporarily knocking down *Il1rn* 48 h prior to pilocarpine injection were able to induce a significant decrease in neuronal death detected by nissl staining in the chronic phase of the PILO model. Previous experiments using pretreatment of hippocampal cell cultures with agents that activate Nfkb have shown that this approach can prevent neuronal apoptosis *in vitro*, or that inhibition of Nfkb function results in apoptosis of rat PC12 cells [91,92].

In conclusion, we report here the successful use of RVG-9R peptide to deliver siRNA molecules in the rat (*Rattus norvegicus*), demonstrating its versatility and potential use in other mammalian species. These results set the foundations for further investigations of the molecular aspects of brain neuroinflammation in rats, which can be extended to understand human brain inflammation and therapeutics. Silencing experiments targeted specifically endogenous *Il1b* and *Il1rn* expressed in macrophage/microglia in the rat CNS. Our results indicate that *Il1b* seems to have a protective effect in the very early stages of the PILO rat model. In addition, this effect seems to be relevant for animal recovery after the initial insult due to SE.

Acknowledgements. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Brazil. V.D.B.P. and R.B.M. are recipients of scholarships from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil

METHODS

Animal handling

We used specific pathogen free (SPF) Wistar-UNI rats obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB) at the University of Campinas-UNICAMP. All experiments were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation from the University of Campinas-UNICAMP and were performed in a biosafety level 2 animal facility. Eight-week-old male rats were divided into four groups (three animals per group) as follows: i) one control group injected with PBS, ii) a second control group injected with an irrelevant siRNA directed against GFP (siGFP), iii) an experimental group injected with siRNA directed against *Il1b* (siIl1b), and iv) an experimental group injected with siRNA directed against *Il1rn* (siIl1rn). Animals were kept during the experimental period in micro-insulators with sterilized shaving woods in a ventilated rack unit equipped with HEPA filter system and with 12 h light /12 h dark cycle conditions. Nuvital CR-1 pelleted food and water sterilized by autoclaving were provided *ad libitum*.

Peptides and siRNAs

RVG-9R peptide (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR) was synthesized and purified by high-performance liquid chromatography at the Biosynthesis (Lewisville, Texas; USA); the C-terminal nine arginine residues were D-arginine. siRNAs were

designed against the endogenous *Il1b* and *il1rn* using *Strand Analysis* program [93]. and after this the sequency was checked in the Blast program to confirm that do not have homology for any other gene expressed in rat *Il1b* (and its antagonist) was chosen since it is related to several relevant neurological conditions. SiRNAs were purchased from IDT (Coralville, Iowa; USA).

The siRNAs sequences are:

si*Il1b* sense: 5' UGACCCAUGUGAGCUGAAAGC 3'

si*Il1b* antisense: 5' UUUCAGCUCACAUGGGUCAGA 3'

si*Il1rn* sense: 5' AGGCACUCCCAGAGUAUGUGU 3'

si*Il1rn* antisense: 5' ACAUACUCUGGGAGUGCCUUC 3'

siGFP sense: 5' CAGGCUACUUGGAGUGUAUUU 3'

siGFP antisense: 5' AUACACUCCAAGUAGCCUGUU 3'

Delivery of siRNA::peptide complexes

siRNA::peptide complexes (at molar ratio of 1:10 siRNA to peptide) were delivered through *endovenous* route, into the lateral *tail* vein; complexes were prepared in 500 μ L of PBS, 5% glucose. To identify the best experimental conditions (mass of siRNA and number of injections), amounts of 25-50 μ g of siRNA/animal were tested, one or two injections/animal (with an 8 h interval) per animal. Brains were harvested at 48 h after the first injection. In order to characterize *Il1b* silencing time course, rats were given two

injections of 25 µg of siRNAs (at 8 h intervals) and the brains were collected at the following time points: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after first injection of siRNA. To assess silencing effect in different anatomic areas, the brain was divided into five regions as follows: hippocampus, frontal cortex, olfactory bulb, cerebellum and brain stem. The spinal cord was also analyzed.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from the brain using Trizol (TRIzol reagent - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was reverse transcribed with SuperScript III and random primers (both from Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Real-Time PCR was performed with 40 nanograms of complementary DNA with TaqMan System (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR, Foster City, CA, USA). Amplification conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s (melting step) and 60°C for 1 min (annealing/extension step).

In order to assess siRNA specificity, expression profile of two biologically-related genes (*Ptgs2*, *Nfkb*) and two unrelated genes (*Plat*, *Ntrk2*) were determined through real time RT-PCR in all experimental groups.

We used *Gapdh/Hprt1* internal controls for normalization since previous analyses revealed they are the steadiest endogenous controls for the regions analyzed [94]. The relative gene expression was calculated by the comparative threshold cycle method [95]. All primers and probes were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Tissue extraction and immunoblotting

Rats were anesthetized and brain tissue was dissected and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20 S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9000 g in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4°C. Protein concentration of supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti -I11b(ARC0912, Invitrogen, California, USA), il1rn (SC-25444, Santa Cruz), -p- Ikbkb (SC-23470, Santa Cruz), Slc1a3 (4166S, Cell Signaling Technology, Inc, USA), b-actin (ab8227, Abcam plc, USA). Reagents for chemiluminescence labeling of proteins were from Amersham (Aylesbury, UK). Kaleidoscope protein standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to estimate molecular weight of bands. Relative quantification of proteins was obtained by measuring the intensity of bands in relation to Actb (beta-actin), using the UN-SCAN-IT gel software, version 6.1 (Silk Scientific Corporation, USA).

Assessment of blood-brain-barrier integrity by Magnetic Resonance Imaging

In order to determine whether siRNA::RVG-9R promotes blood-brain-barrier (BBB) lesions, magnetic resonance imaging (MRI) was performed using gadolinium (Gd-DTPA) as a paramagnetic contrast. If diffusion of the contrast was observed after

siRNA::peptide injection this would indicate evidence of damage to the BBB [96]. MRI was performed on a Bruker electronic (Advance III under Paravision 5) adapted to a 2 Tesla field superconducting magnet (Oxford Instruments 85310HR). Crossed saddle radiofrequency coil was used as a head probe for animals. For all animals, the image acquisition started 15 minutes after gadolinium (0.5 M Gd-DTPA, 1 ml/kg i.v.) injection. After deep anesthesia, induced by a mixture of ketamine (120 mg/kg, i.p.) and xilazine (9 mg/kg, i.p.), T1 weighted images were collected using a FLASH (Fast Low Angle Shot) sequence. The parameters used were: TE 5.0 ms, TR 200 ms, flip angle 90°, 192x192 points over field of view 4x4 cm², slice thickness 1 mm, interslice 1.3 mm and 16 coronal slices covering almost the entire brain.

Pilocarpine treatment

Rats were injected with methylscopolamine (0.5 mg/kg in saline intraperitoneally, i.p.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 30 minutes before pilocarpine hydrochloride (300 mg/kg in saline, i.p, Merck, Quimitra, Brazil) to prevent peripheral cholinergic side effects. Immediately after pilocarpine injection, animals were placed in a cage with paper-covered sawdust in order to avoid choking on sawdust during SE(The *status* was defined as a condition of continuous seizures lasting longer than 30 min). About 40 min after the pilocarpine injection, approximately 70% of rats developed SE consisting of generalized motor seizures which were interrupted 120 minutes after their onset by diazepam administration (10 mg/kg, i.p.) to reduce the mortality rate. Only rats developing SE were

used for subsequent analyses since previous experiments showed that these rats develop spontaneous recurrent seizures in the chronic phase [97,98].

Brain excision and tissue preparation for Nissl and Neo-Timm staining

Animals were sacrificed 90 days after pilocarpine-induced SE (chronic phase). For this, three animals/group were deeply anesthetized via an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine hydrochloride (120 mg/ml) and xylazine (9 mg/ml) and then rapidly perfused through the heart with four solutions in the following order: **i)** 25 mL of Millonig's buffer [99]; **ii)** 50 mL of sodium sulfide fixative 0.1% in Millonig's buffer; **iii)** 100 mL of glutaraldehyde 3%; and **iv)** 200 mL of sodium sulfide fixative 0.1% in Millonig's buffer. Millonig's buffer solution was prepared one day before perfusions using 3.88 g of sodium hydroxide, 16.56 g of sodium phosphate monobasic and 0.02 g of calcium chloride per liter of distilled water. The brains were cut on a cryostat (32 μ m thick sections), all sections corresponding to an interval between -2.8 to -5.8 mm from bregma [100] were collected, comprising a total sectioned extent of 3 mm per animal. Each one out of three consecutive sections was mounted onto gelatin-coated slides and then processed for neo-Timm staining [101] to detect abnormal growth of granule cells axons (mossy fiber sprouting). Adjacent series of sections were Nissl stained to assess the distribution and severity of neuronal damage.

The processing solutions for Neo-Timm consisted of 240 mL of 50% gum arabic with 10.25 g of citric acid, 9.45 g sodium citrate in 30 mL of ddH₂O, 3.73 g hydroquinone in 60 mL of ddH₂O, and 2 mL solution of 0.51 g silver nitrate in 3 mL ddH₂O. Two batches with different intensities of staining were processed with different developing

times: 30 to 35 minutes for light staining and 40 to 50 minutes for heavy staining. Slides were washed in distilled water twice for 5 minutes, dehydrated through alcohol to xylene, and coverslipped with Canada balsam.

Density of mossy fibers in the supragranular region and inner molecular layer was bilaterally analyzed from three hippocampal sections corresponding Paxinos's plates -2.8, -3.8 and -4.8 caudal to bregma [102]. Sprouting was assessed separately in two areas from the mid portion of the granular cell layer. The intensity of labeling was quantified on an image computer by measuring the gray value density (GV). Briefly, sections were imaged using a video monochrome charge-coupled device camera (Nikon, DXM1200) attached to a microscope (Nikon, Eclipse E600FN), captured, averaged and digitized. Luminance was uniformly maintained and regularly checked using optical density standards (Kodak, Rochester, NY, U.S.A.). Once captured, the image was analyzed using the image system software (NIH Image). The corpus callosum was used as an internal background reference to control for the potential bias of the specimen processing in different batches. Therefore, the intensity of neo-Timm labeling in each region was quantified as the calculated GV difference between the studied region and the corpus callosum.

For quantitative analysis of cell loss in Nissl, presented by the experimental groups, a series of sections were mounted on gelatin slides, hydrated and dipped sequentially in aqueous 1 M acetic acid, cresyl violet (0.38 g of cresyl violet in 100 mL distilled water) for about 5 minutes and then in distilled water. For the dehydration of the cuts, they were dipped in solutions of alcohol 50% and 70% and then the differentiator (1 mL of acetic acid in 100 mL of alcohol). Then they were passed in increasing ethanol solutions in xylene and covered with Enthelan ®. The number of cells was counted in the hippocampal subregions

(dentate gyrus, CA1, CA3 and hilus), bilaterally and in triplicate corresponding to the same coronal levels as did for neo-Timm analysis. This count was conducted by a researcher unaware of the treatment of experimental groups with the help of optical microscope (Nikon, Eclipse E600FN) with checkered grid. The established area ($625 \mu\text{m}^2$) used for cell counting, for each hippocampal subfield, had two counts of forbidden lines (exclusion) and two lines acceptable (inclusion). The cells that touched the forbidden lines were not counted, but cells that touched the lines that were acceptable and within the area were counted.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis test was used to assess differences between distinct groups. Mann-Whitney test was used to assess differences between brain regions, and gene expression changes within the same group. Gene silencing was confirmed in comparison to controls. ANOVA followed by Tukey test confirmed changes in protein levels at $p < 0.05$ (Real Time RT-PCR and Western blot data).

For phenotype analysis we used the one-way ANOVA followed by Tukey's test for seizure analysis, and T-test for the neuronal loss in CA1, CA3, hilar regions and dentate gyrus.

Statistical analyses were carried out with BioEstat 5.0 program (Ayres *et al.*, 2007).

REFERENCES:

1. Engel J, Donath E, Ermakov YA, Meyer HW, Richter W (1989) Hyperosmotic relaxation lysis of chromaffin granules is caused by interactions between the granular membrane and intragranular vesicles. *Biochim Biophys Acta* 985: 111-119.
 2. Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA (1996) Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 71: 576-586.
 3. Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, Yacubian EM, Cordeiro JA, et al. (2004) Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 62: 199-204.
 4. Sander JW (1993) Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 34: 1007-1016.
 5. Mattson RH (1994) Current challenges in the treatment of epilepsy. *Neurology* 44: S4-9; discussion S31-32.
 6. Avanzini G, Vergnes M, Spreafico R, Marescaux C (1993) Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats. *Epilepsia* 34: 1-7.
 7. Engel J, Jr. (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26: 141-150.
 8. Isokawa M, Levesque M, Fried I, Engel J, Jr. (1997) Glutamate currents in morphologically identified human dentate granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 77: 3355-3369.
 9. Lothman EW, Rempe DA, Mangan PS (1995) Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 74: 841-848.
 10. Bender RA, Dube C, Baram TZ (2004) Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv Exp Med Biol* 548: 213-225.
 11. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172: 143-157.
 12. Dudek FE, Sutula TP (2007) Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog Brain Res* 163: 755-773.
 13. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW (1980) Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5: 991-1014.
 14. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23: 953-968.
 15. Voutsinos-Porche B, Koning E, Kaplan H, Ferrandon A, Guenounou M, et al. (2004) Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 17: 385-402.
- Friedman A, Dingledine R. Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia*. 2011 May;52 Suppl 3:33-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03034.x.
- Damek DM. Cerebral edema, altered mental status, seizures, acute stroke, leptomeningeal metastases, and paraneoplastic syndrome. *Emerg Med Clin North Am*. 2009 May;27(2):209-29. Review.
16. Bernardino L, Ferreira R, Cristovao AJ, Sales F, Malva JO (2005) Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 349-360.

17. Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, et al. (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 29: 142-160.
18. John GR, Lee SC, Song X, Riviuccio M, Brosnan CF (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49: 161-176.
19. Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180-190.
20. de Lanerolle NC, Lee TS (2005) New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 7: 190-203.
21. Vezzani A, Balosso S, Maroso M, Zardoni D, Noe F, et al. (2010) ICE/caspase 1 inhibitors and IL-1beta receptor antagonists as potential therapeutics in epilepsy. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 43-50.
22. Rijkers K, Majoie HJ, Hoogland G, Kenis G, De Baets M, et al. (2009) The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Exp Neurol* 216: 258-271.
23. Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P, et al. (2002) Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. *Epileptic Disord* 4: 173-182.
24. Tschuch C, Schulz A, Pscherer A, Werft W, Benner A, et al. (2008) Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol Biol* 9: 60.
25. Li ZP, Zhang XY, Lu X, Zhong MK, Ji YH (2004) Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus. *Neurochem Int* 44: 263-270.
26. Soloff MS, Izban MG, Cook DL, Jr., Jeng YJ, Mifflin RC (2006) Interleukin-1-induced NF-kappaB recruitment to the oxytocin receptor gene inhibits RNA polymerase II-promoter interactions in cultured human myometrial cells. *Mol Hum Reprod* 12: 619-624.
27. Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, et al. (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48: 732-742.
28. Becker AJ, Chen J, Zien A, Sochivko D, Normann S, et al. (2003) Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 18: 2792-2802.
29. He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, et al. (2004) Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron* 43: 31-42.
30. Koyama R, Ikegaya Y (2005) To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist* 11: 282-287.
31. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 24: 47-53.
32. Gabel HW, Ruvkun G (2008) The exonuclease ERI-1 has a conserved dual role in 5.8S rRNA processing and RNAi. *Nat Struct Mol Biol* 15: 531-533.
33. Pereira TC, Pascoal VD, Marchesini RB, Maia IG, Magalhaes LA, et al. (2008) *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol* 118: 619-623.
34. Cheng GF, Lin JJ, Shi Y, Jin YX, Fu ZQ, et al. (2005) Dose-dependent inhibition of gynecophoral canal protein gene expression in vitro in the schistosome (*Schistosoma japonicum*) by RNA interference. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 386-390.
35. Marin TM, Clemente CF, Santos AM, Picardi PK, Pascoal VD, et al. (2008) Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103: 813-824.
36. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
37. Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
38. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.

39. Hassani Z, Lemkine GF, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, et al. (2005) Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med* 7: 198-207.
40. Pardridge WM (2007) Brain drug development and brain drug targeting. *Pharm Res* 24: 1729-1732.
41. Schlachetzki F, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM (2004) Gene therapy of the brain: the transvascular approach. *Neurology* 62: 1275-1281.
42. Jooss K, Chirmule N (2003) Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther* 10: 955-963.
43. Lowenstein PR, Castro MG (2003) Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences. *Gene Ther* 10: 946-954.
44. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, et al. (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448: 39-43.
45. Jackson AL, Linsley PS (2010) Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9: 57-67.
46. Jackson AL, Linsley PS (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20: 521-524.
47. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, et al. (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna-a Publication of the Rna Society* 12: 1197-1205.
48. Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D (2004) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 172: 6545-6549.
49. Sioud M, Sorensen DR (2003) Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1220-1225.
50. Jankowsky JL, Patterson PH (2001) The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 63: 125-149.
51. Panegyres PK, Hughes J (1998) The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene. *J Neurol Sci* 154: 123-132.
52. De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, et al. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 12: 2623-2633.
53. Eriksson C, Winblad B, Schultzberg M (1998) Kainic acid induced expression of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 58: 195-208.
54. Minami M, Kuraishi Y, Yamaguchi T, Nakai S, Hirai Y, et al. (1990) Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 832-837.
55. Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, Yamazaki A, Satoh M (1992) Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 58: 390-392.
56. Nishiyori A, Minami M, Takami S, Satoh M (1997) Type 2 interleukin-1 receptor mRNA is induced by kainic acid in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 50: 237-245.
57. Oprica M, Eriksson C, Schultzberg M (2003) Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J Cell Mol Med* 7: 127-140.
58. Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23: 618-625.

59. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, et al. (1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26: 676-680; discussion 681.
60. Pate GE, Tahir MN, Murphy RT, Foley JB (2003) Anti-inflammatory effects of statins in patients with aortic stenosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 8: 201-206.
61. Yang GY, Schielke GP, Gong C, Mao Y, Ge HL, et al. (1999) Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1beta converting enzyme deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1109-1117.
62. Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, et al. (1999) Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci* 19: 5054-5065.
63. Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, et al. (2000) Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11534-11539.
64. Meini A, Benocci A, Frosini M, Sgaragli G, Pessina G, et al. (2000) Nitric oxide modulation of interleukin-1[beta]-evoked intracellular Ca²⁺ release in human astrocytoma U-373 MG cells and brain striatal slices. *J Neurosci* 20: 8980-8986.
65. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, et al. (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23: 8692-8700.
66. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Ueno S, et al. (2006) Effects of interleukin-1beta on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing systems. *Epilepsy Res* 71: 107-116.
67. Fujikawa DG (2005) Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behav* 7 Suppl 3: S3-11.
68. Miller LG, Fahey JM (1994) Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. *Ann N Y Acad Sci* 739: 292-298.
69. Namekata K, Harada C, Kohyama K, Matsumoto Y, Harada T (2008) Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Mol Cell Biol* 28: 3273-3280.
70. Oprica M, Hjorth E, Spulber S, Popescu BO, Ankarcrona M, et al. (2007) Studies on brain volume, Alzheimer-related proteins and cytokines in mice with chronic overexpression of IL-1 receptor antagonist. *J Cell Mol Med* 11: 810-825.
71. Spulber S, Oprica M, Bartfai T, Winblad B, Schultzberg M (2008) Blunted neurogenesis and gliosis due to transgenic overexpression of human soluble IL-1ra in the mouse. *Eur J Neurosci* 27: 549-558.
72. Spulber G, Spulber S, Hagenas L, Amark P, Dahlin M (2009) Growth dependence on insulin-like growth factor-1 during the ketogenic diet. *Epilepsia* 50: 297-303.
73. Yuhas Y, Shulman L, Weizman A, Kaminsky E, Vanichkin A, et al. (1999) Involvement of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta in enhancement of pentylentetrazole-induced seizures caused by *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 67: 1455-1460.
74. Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, et al. (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 43 Suppl 5: 30-35.
75. Yi PL, Tsai CH, Lin JG, Lee CC, Chang FC (2004) Kindling stimuli delivered at different times in the sleep-wake cycle. *Sleep* 27: 203-212.
76. Dube C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57: 152-155.

77. Heida JG, Pittman QJ (2005) Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia* 46: 1906-1913.
78. Sayyah M, Beheshti S, Shokrgozar MA, Eslami-far A, Deljoo Z, et al. (2005) Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats. *Exp Neurol* 191: 145-153.
79. Ilyin SE, Gonzalez-Gomez I, Romanovicht A, Gayle D, Gilles FH, et al. (2000) Autoregulation of the interleukin-1 system and cytokine-cytokine interactions in primary human astrocytoma cells. *Brain Res Bull* 51: 29-34.
80. Marcus JS, Karackattu SL, Fleegal MA, Sumners C (2003) Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia* 41: 152-160.
81. Meeuwse S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM (2003) Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia* 43: 243-253.
82. Ye ZC, Sontheimer H (1996) Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport* 7: 2181-2185.
83. Basu A, Krady JK, Enterline JR, Levison SW (2002) Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia* 40: 109-120.
84. Tichauer J, Saud K, von Bernhardt R (2007) Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* 14: 168-174.
85. Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S, Peterson PK (1997) IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport* 8: 3163-3166.
86. Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S (1999) Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia* 25: 311-323.
87. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5: 629-640.
88. Strijbos PJ, Rothwell NJ (1995) Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *J Neurosci* 15: 3468-3474.
89. Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao ML, Kopp N, et al. (2006) IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol* 177: 5574-5584.
90. Kim SS, Ye C, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, et al. (2010) Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Mol Ther* 18: 993-1001.
91. Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997) Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res* 49: 681-697.
92. Taglialatela G, Robinson R, Perez-Polo JR (1997) Inhibition of nuclear factor kappa B (NFkappaB) activity induces nerve growth factor-resistant apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 47: 155-162.
93. Pereira TC, Bittencourt VDÁP, Secolin R, Rocha CdS, Maia IdG, et al. (2007) Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genetics and Molecular Biology* 30: 1206-1208.
94. Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S (2007) Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci* 32: 38-46.

95. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
96. Prior MJ, Brown AM, Mavroudis G, Lister T, Ray DE (2004) MRI characterisation of a novel rat model of focal astrocyte loss. *MAGMA* 17: 125-132.
97. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, et al. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.
98. Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA (1999) The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 34: 99-107.
99. Danscher G (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 71: 1-16.
100. Paxinos G, Watson C (2009) The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic. lxii, [340] p. p.
101. Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, et al. (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-995.
102. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates: Academic Press.

9. CAPÍTULO 4 - ESTUDOS ADICIONAIS DA EXPRESSÃO DO *Il1b* e *Il1rn*

A fim de avançar no estudo do comportamento da *Il1b* durante as diferentes fases do modelo da pilocarpina, foram realizados experimentos adicionais focados na expressão de outros genes durante o início da fase silenciosa e com 5 dias pós o SE. Os genes analisados nesses experimentos foram *Plat*, *TrkB*, *Il6*, *Il10*, *Tlr2* e *Tlr4*. Como controle, foram analisados animais injetados com PBS, e dos quais foram coletados somente hipocampo (h) ou cérebro total (c). Nos animais experimentais injetou-se siIl1rn em um grupo e siIl1b em outro grupo, sendo coletados hipocampo e cérebro total também. Abaixo seguem os resultados de acordo com cada gene e regiões específicas (figuras 28 à 39).

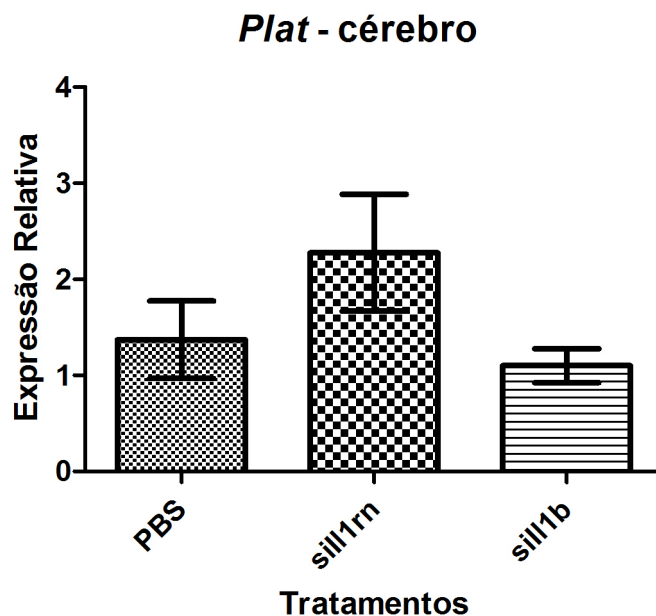


Figura 28. Análise da expressão do gene *Plat*, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.

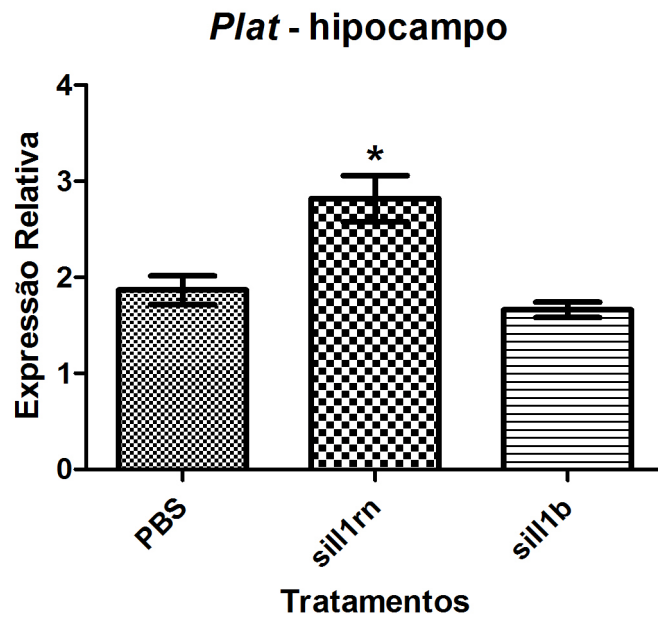


Figura 29. Análise da expressão do gene *Plat*, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.

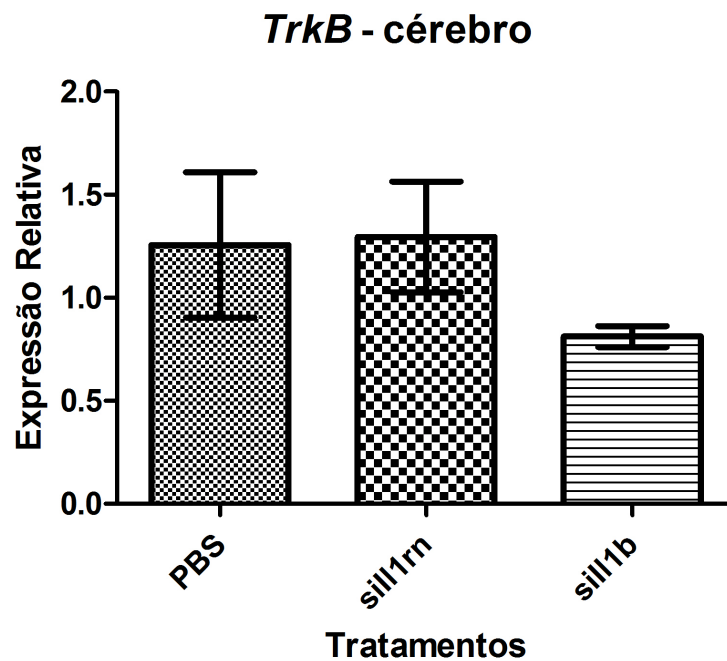


Figura 30. Análise da expressão do gene *TrkB*, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total

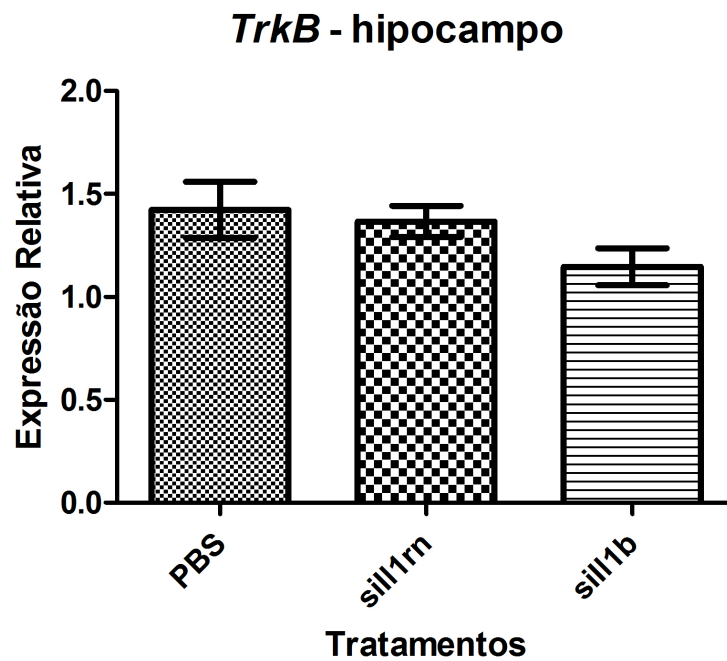


Figura 31. Análise da expressão do gene *TrkB*, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo

Nos experimentos acima a análise dos animais silenciados, tanto para *Il1b* quanto para *Il1rn*, não apresentaram diferenças significativas de expressão em relação aos controles para os genes *TrkB* e *Plat*. Abaixo seguem as expressões de genes relacionados à inflamação para os mesmos animais.

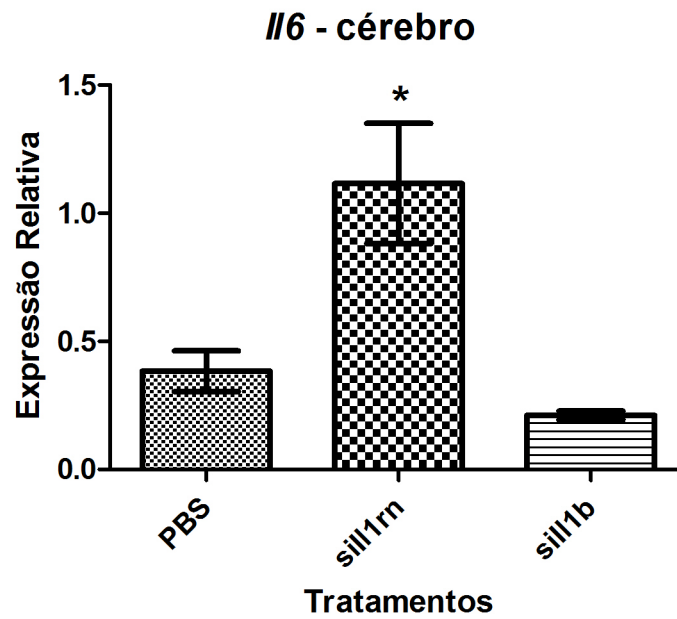


Figura 32. Análise da expressão do gene *I/6*, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.

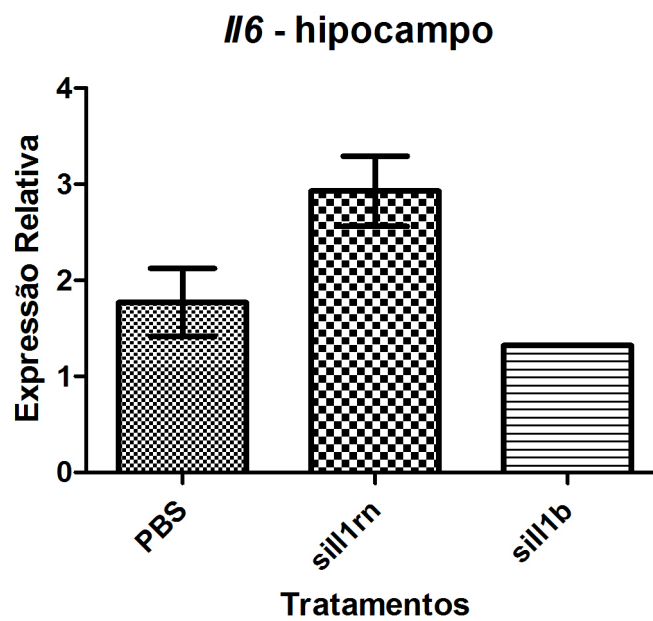


Figura 33. Análise da expressão do gene *I/6*, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.

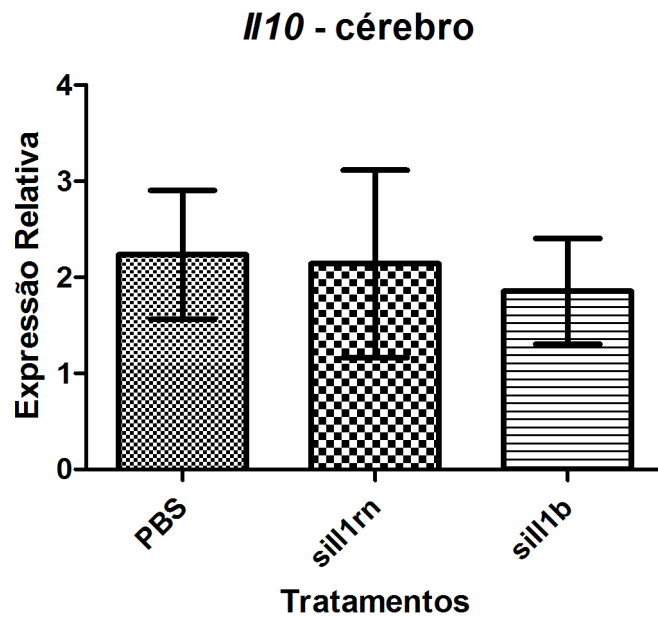


Figura 34. Análise da expressão do gene *I*10, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.

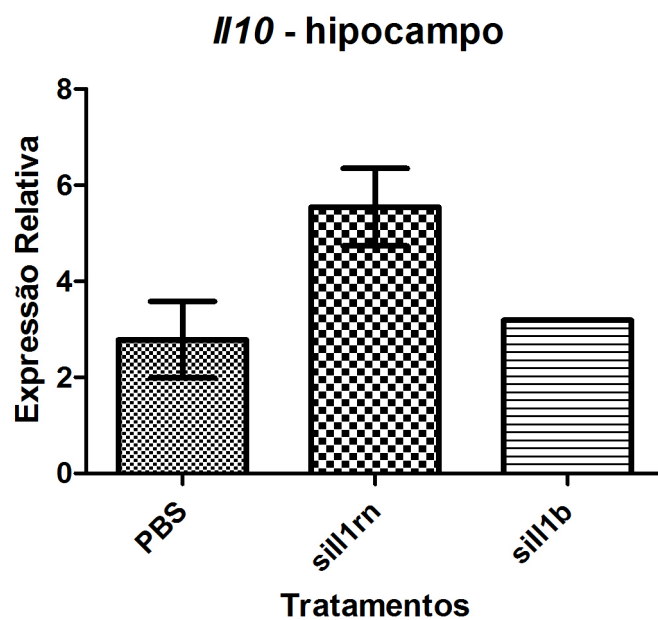


Figura 35. Análise da expressão do gene *I*10, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.

Com relação as análises dos genes *Il6* e *Il10*, verificou-se que para o gene *il6* os animais silenciados para *Il1rn* têm uma expressão maior do que os controles e em paralelo, os animais silenciados para *Il1b* apresentam uma expressão da *il6* menor do que os próprios controles. Esses dados ficam mais evidentes quando analisamos as amostras de cérebro total quando comparados com as amostras somente de hipocampo. Quanto partimos para as análises do gene *il10* não se verificou o mesmo comportamento do gene *Il6*, já que não foram observadas diferenças significativas.

Os últimos genes analisados foram os da família *Toll like receptors*, conforme demonstram os gráficos abaixo.

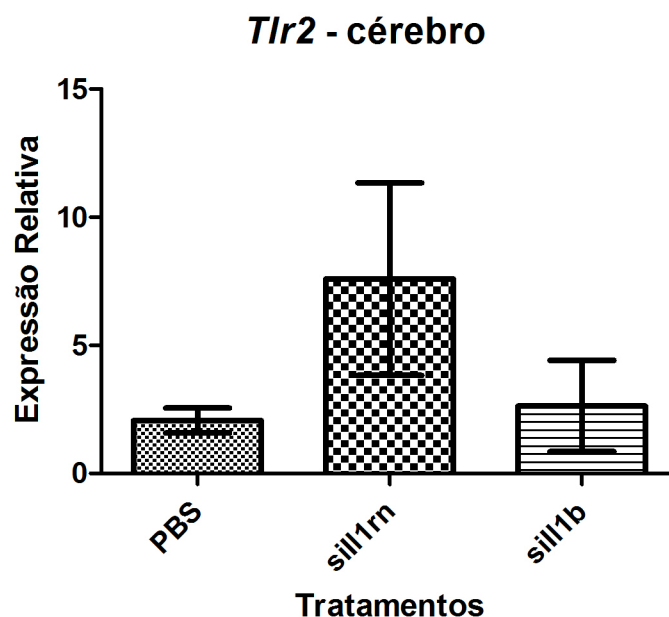


Figura 36. Análise da expressão do gene *Tlr2*, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.

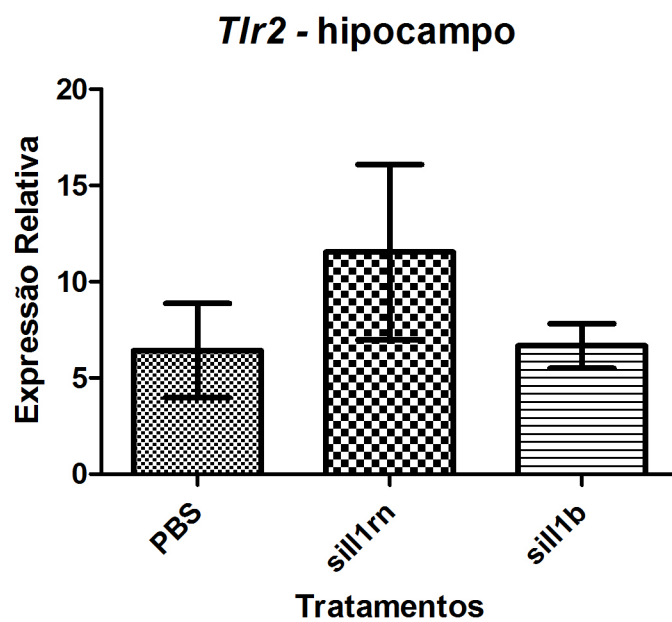


Figura 37. Análise da expressão do gene *Tlr2*, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.

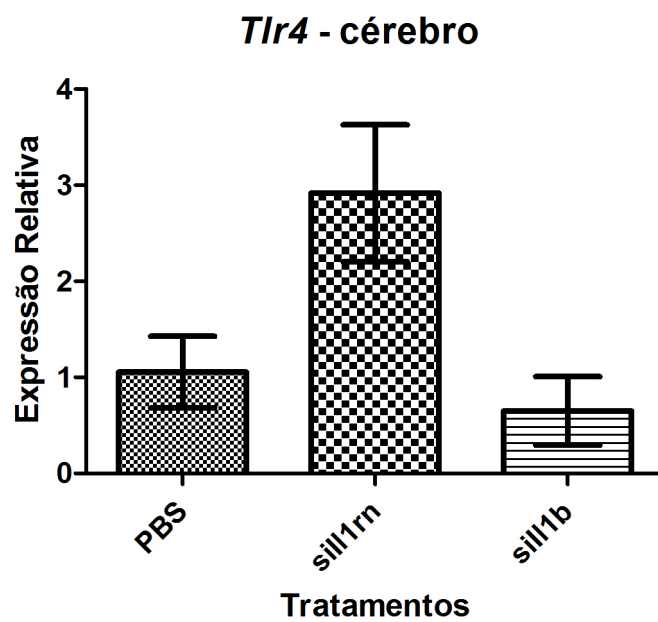


Figura 38. Análise da expressão do gene *Tlr4*, 5 dias pós SE para as amostras de cérebro total.

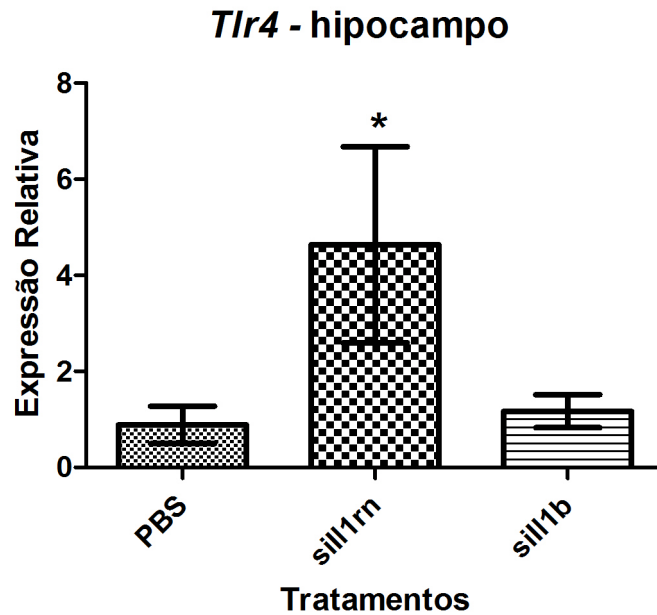


Figura 39. Análise da expressão do gene *Tlr4*, 5 dias pós SE para as amostras de hipocampo.

Da mesma maneira que o gene *Il6*, os genes *Tlr2* e *Tlr4*, demonstram uma expressão aumentada nos animais silenciados para *il1rn*, em contra partida a uma expressão diminuída para os animais silenciados para *Il1b*. Com relação à região analisada, no cérebro total os dados tornam-se mais evidentes do que simplesmente no hipocampo.

10. DISCUSSÃO

A estratégia experimental para o estudo dos genes foi baseada na interferência por RNA (iRNA) aplicada *in vivo*. Essa técnica se vale de um silenciamento gênico pós-transcricional endógeno presente em várias espécies, desde organismos unicelulares (Gabel and Ruvkun, 2008), parasitas (Pereira *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009), até mamíferos (Marin *et al.*, 2008). Apesar de existirem muitos registros do uso dessa técnica em vários órgãos, o sistema nervoso central continua sendo um alvo muito difícil de ser atingido, devido à barreira hemato encefálica e por conta do alto grau de diversidade celular (Hassani *et al.*, 2005; Pardridge *et al.*, 2007). Muitos protocolos para administração *in vivo* do siRNA no sistema nervoso central utilizam injeções intratecais associadas com cofatores para garantir acesso, sendo que em todos os casos a cirurgia estereotáxica é necessária (Miller *et al.*, 2002; reviewed in Schlachetzki *et al.*, 2004). Além de o procedimento ser extremamente invasivo, essas abordagens promovem um silenciamento restrito e limitado ao local da injeção.

Protocolos de transfecções com adeno- e retro-vírus promovem silenciamento gênico em uma variedade de tipos celulares no sistema nervoso central, no entanto, também é um procedimento limitado já que também é invasivo, considerando que uma injeção no parênquima cerebral é necessária. Assim, se o protocolo não é bem definido, respostas inflamatórias podem interferir em análises moleculares e fenotípicas (Jooss and Chirmule, 2003; Lowenstein and Castro, 2003).

Recentemente, uma técnica simples e menos invasiva foi proposta e testada em camundongos. Moléculas de siRNA são complexadas à um peptídeo derivado da glicoproteína do capsídeo do vírus da raiva (rabies virus glycoprotein - RVG). Essas

proteínas permitem que o transporte tranvascular do siRNA ao cérebro ocorra gerando o sucesso do silenciamento (Kumar *et al.*, 2007).

Estudos moleculares demonstram uma expressão aumentada de vários genes nas fases aguda e silenciosa, sendo que as vias sinalizadoras envolvidas estão relacionadas a processos inflamatórios e apoptóticos nas células gliais (astrócitos e micróglia) e neurônios (Voutsinos-Porche, 2004).

O complexo *BDNF/TrkB* tem sido implicado como um potencial alvo terapêutico para o tratamento das epilepsias de lobo temporal, no entanto, ainda é controverso se tal complexo exerce uma função epileptogênica ou anti-epileptogênica. Estudos realizados em cortes hipocampais indicam que o *BDNF* pode potencializar transmissões excitatórias, provavelmente através de um mecanismo pré-sináptico mediado pelo *TrkB* (Xiaohua Hou *et al*, 2010). No presente trabalho foi realizado um estudo do padrão de expressão não só do gene *TrkB*, mas também de genes relacionados à processos inflamatórios. Sabe-se que os genes relacionados à processos de plasticidade e remodelação sináptica estão super-regulados durante a fase silenciosa do modelo da pilocarpina, fase essa que torna-se crucial para a geração de crises espontâneas e recorrentes durante a fase crônica. Tal processo aparentemente é realizado de maneira desorganizada, sendo que a morte neuronal ocorrida durante a fase aguda do modelo leva a reconexões sinápticas no modelo da pilocarpina, que geram sistemas de retro-alimentação aberrantes e consequentemente as crises crônicas. Dessa maneira, decidimos estudar a expressão de genes relacionados a processos inflamatórios na fase silenciosa, além dos já tradicionais alvos para essa fase do modelo da pilocarpina.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que existe uma diferença significativa na expressão de genes da família de *Toll like receptors* (TLRs) no início da fase silenciosa quando comparado com a expressão no início da fase aguda (até 6h pós SE). Os diferentes tipos celulares, desde a própria microglia até os neurônios, podem atuar como fontes de inflamação, sendo que as recentes descobertas de relações entre a família dos TLRs e os receptores Il1r contribuem para mudanças na excitabilidade cerebral e as crises propriamente ditas (Vezzani A *et al*, 2011). Essas observações geram desafios para entender as reais alterações que a própria inflamação gera durante a fase aguda do modelo e de que maneira essas alterações contribuem para as remodelações durante a fase silenciosa.

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho fica claro que os TLRs estão super-expressos ainda durante o início da fase silenciosa, o que pode representar uma resposta do sistema nervoso central ao dano cerebral gerado pelo SE. A partir do momento em que as citokinas pró-inflamatórias como a Il1b são liberadas durante a resposta à inflamação, os receptores das mesmas, como o Il1r, passam a se tornar mais ativos até o momento em que a extensão e duração dessa ativação exceda o limite homeostático, o que levaria a um processo de hiper-excitabilidade neuronal com condições patológicas. Essa condição patológica está diretamente ligada ao início da fase silenciosa, quando o animal não apresenta crises visíveis, no entanto, sofre processos profundos de remodelações associados a alterações de expressões gênicas e proteicas como o *Trkb* e *Plat*, que levarão à situação de alteração irreversível do SNC. Fica evidente que eventos incidentes no SNC gerados pelas crises do SE são seguidos por processos inflamatórios que levam a ativação de diversas células, entre elas a microglia, astrócitos e os próprios neurônios. Tais células liberam citokinas pró-inflamatórias, como a própria Il1b, ativando uma cascata de

inflamação que resulta na ativação do complexo TLR/II1r, tendo como resultado uma hiper-excitabilidade neuronal. Dessa maneira, os efeitos da inflamação cerebral originados pela ativação do complexo TLR/II1r (comprovados pelos nossos resultados) contribuem para a geração de crises através da diminuição do limiar de excitabilidade neuronal. As crises, por sua vez, contribuem para ativar ainda mais inflamações, estabelecendo assim um ciclo vicioso que favorece o desenvolvimento da epilepsia.

Além dos resultados relacionados especificamente à fase silenciosa do modelo, dados muito relevantes ligados à *Il1b* e *Il1rn* estão descritos no artigo apresentado no capítulo 3, principalmente associados à fase aguda do modelo.

Existem algumas razões que tornam o gene *Il1b* um alvo potencial, além de se tratar de um alvo terapêutico para várias condições envolvendo o sistema nervoso central (Rothwell and Luheshi, 2000). Sua expressão gênica é sugerida como um importante fator na fisiopatologia das epilepsias (Jankowsky and Patterson, 2001; Panegyres and Hughes, 1998) e as proteínas codificadas por esse gene apresentam efeitos neurotóxicos e pró-convulsivantes nos modelos experimentais de SE (Vezzani *et al.*, 1999, 2000). A administração de anticorpos anti-Il1b reduz a quantidade de danos causados pela excitotoxicidade, traumas ou isquemias (Patê *et al.*, 2003; Yamasaki *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997), além de ser observada a indução da expressão gênica em modelos experimentais de ELT, gerados por estimulação elétrica ou injeção intrahipocampal de ácido kainico ou pilocarpina (De Simoni *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 1998; Minami *et al.*, 1990, 1992; Nishiyori *et al.*, 1997; Aprica *et al.*, 2003).

Assim, nossa abordagem abre novas alternativas sobre a caracterização desse gene *in vivo* através de seu papel em condições patológicas.

Alterações na expressão gênica em células gliais parecem ter muita importância, já que tais células são responsáveis pela homeostase neuronal, excitabilidade elétrica, concentrações de cálcio e liberação de glutamato. A associação entre IL1B aumentada e células gliais podem estar relacionadas ao aumento de liberação de glutamato (Namekata *et al.*, 2005), um importante neurotransmissor excitatório.

Os experimentos de silenciamento tiveram como alvo os genes *Il1b*, *Il1rn*, *Trkb* e *Plat* no SNC de ratos utilizando o RVG-9R peptídeo. O uso desse complexo e de estratégias relacionadas para a entrega de siRNAs mostrou-se eficaz, além de muito prático.

Nós demonstramos pela primeira vez a utilização do peptídeo RVG-9R em ratos (*Rattus norvegicus*), mostrando sua versatilidade e potencial para ser utilizado em outras espécies de mamíferos. Os resultados são a base para investigações mais profundas sobre aspectos moleculares de neuroinflamações em cérebro de ratos, que podem ser estendidos para o entendimento da inflamação cerebral humana e sua terapia.

O rato é uma das espécies mais utilizadas em pesquisas biomédicas por diversas razões, entre elas estão sua fisiologia e genética muito próximas do ser humano, além do seu genoma estar completamente sequenciado. A partir do momento que muitos laboratórios ao redor do mundo se utilizam do rato, ao invés do camundongo, e alguns modelos específicos são observados somente em ratos, é de extrema importância e interesse testar e adaptar as mais modernas tecnologias a esse modelo animal.

Considerando que 25 e 50 µg de siRNA levaram a efeitos de silenciamento semelhantes, decidimos utilizar a menor quantidade para reduzir as possibilidades de alvos indesejados e efeitos inesperados. Testamos também a possibilidade de redução no número de injeções de três, para duas (com um intervalo de 8h). Essas alterações se mostraram tão

eficientes quanto o modelo original, reduzindo os custos totais e abrindo possibilidades para métodos mais simples, vislumbrando sempre aplicações médicas. É importante citar também que somente com duas injeções os efeitos do silenciamento foram detectados após 24h e duraram cerca de três dias.

Adicionalmente, nós utilizamos duas estratégias diferentes para verificar possíveis problemas gerados pelo complexo siRNA::RVG-9R. A especificidade do siRNA foi checada pela análise da expressão de dois genes não relacionados: *Ntrk2* and *Plat* (além do *Ptgs2* e do próprio *Il1b*). Os ratos foram injetados com siGFP ou siIl1b e a expressão gênica foi verificada através de PCR em tempo real para os quatro genes. Assim, nossos dados mostram que o siGFP não promove efeitos na expressão gênica, como esperado. Além disso, o siIl1b promoveu a diminuição da expressão do *Il1b* e do *Ptgs2* (como esperado, já que são biologicamente relacionados) mas não do *Ntrk2* ou *Plat*. Finalmente, nossas análises moleculares demonstram que a iRNA é sequência específica quando injetamos pequenas quantidades de siRNA (2 X 25µg), tanto para o siGFP quanto para o siIl1b.

A segunda análise foi realizada para verificar se o complexo siRNA::RVG-9R era capaz de danificar a barreira hemato encefálica. Para isso utilizamos a ressonância magnética, analisando a entrada de Gd-DTPA (contraste) nos três grupos. Verificamos que, independente do tratamento, o complexo siRNA::RVG-9R (peso molecular aproximadamente 6200 g/mol) não alterava a permeabilidade da barreira hemato encefálica para moléculas de mesmo tamanho (ou maiores) do que o Gd-DTPA (peso molecular aproximado 550 g/mol), garantindo as menores interferências possíveis.

O tempo de silenciamento foi analisado e demonstrado para RNAs e níveis protéicos, que diminuíram consistentemente depois das injeções, chegando ao maior silenciamento (60%) 72h depois das injeções. Os níveis de RNAm e proteínas recuperaram seus status normais 96 e 120h respectivamente depois das injeções.

Notavelmente, apesar do silenciamento no cérebro ter sido de 60% no geral, quando regiões distintas foram analisadas individualmente esse valor variou em torno de 30%. Isso pode indicar que silenciamentos mais efetivos em outras regiões, devido a taxas de captação celular diferentes, acabaram não sendo analisados nesse experimento. Ainda mais importante, verificamos que o hipocampo, uma estrutura crucial para a epileptogênese, teve sucesso no silenciamento.

Esse primeiro registro de silenciamento do *Il1b* no cérebro demonstra a viabilidade através da iRNA e abre novos horizontes para caracterizar esse gene *in vivo* assim como seu papel em diferentes condições patológicas. Existem muitas dúvidas com relação ao real papel do *Il1b* na epilepsia, alguns estudos relacionam a uma ação pró-convulsivante, enquanto outros a uma ação anti-convulsivante, resultados contraditórios que utilizam estratégias semelhantes (Rijkers *et al.*, 2009). O *Il1b* e *Il1rn* participam de diversas ações no sistema nervoso central, que variam de acordo com a célula alvo, onde eles podem apresentar resultados neuroprotetores ou efeitos neurotóxicos (Allan *et al.*, 2005).

Existem poucos estudos relacionando o *Il1b* com crises e epilepsias, assim, decidimos utilizar uma técnica mais específica e seletiva para entender melhor a ação desse gene e de seu antagonista endógeno nas células gliais.

É possível que a superexpressão do *Il1b* nas estruturas que são severamente afetadas pelas crises seja um epifenômeno, uma consequência da excitotoxicidade relacionada com a liberação massiva de glutamato, influxo de cálcio e morte celular (Fujikawa *et al.*, 2005).

Uma explicação hipotética da ação da *Il1b* na excitabilidade de neurônios é que a *Il1b* aumenta a função do NMDA-R e do influxo de cálcio, inibindo o efluxo de potássio, tudo isso contribuindo para aumentar a excitabilidade neuronal e assim a susceptibilidade às crises (Meini *et al.*, 2000; Viviani *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006).

É importante notar que apesar do silenciamento temporário do *Il1b/Il1rn* ter alterado os tempos de intervalos para as primeiras crises e para o SE, isso não impediu a epileptogênese nem a morte celular, demonstrando que tais eventos devam ser muito mais complexos. Para esses objetivos (análise dos tempos de intervalos para as primeiras crises e para o SE) analisamos as diferenças de excitabilidades no modelo animal de ELT. Os efeitos da pilocarpina em ratos silenciados com si*Il1b* foram mais rápidos (intervalos para a primeira crise e para o SE mais curtos), e o efeito oposto foi observado para os animais silenciados com si*Il1rn*.

Esses resultados nos levaram para análises dos níveis protéicos do *S1lac3* e outros genes (*Nfkb*, *p-Ikbk* e *Il1b/Il1rn*) durante a fisiologia normal, ou seja, animais que não receberam pilocarpina. Assim, esses animais foram injetados com si*Il1b* ou si*Il1rn* e pudemos observar que tanto um quanto outro tratamento modulam a expressão de todos os genes citados, demonstrando a relação entre os alvos.

O silenciamento do *Il1b* diminui a expressão do *S1lac3*, um dos mais importantes transportadores de proteínas envolvido na recaptação de glutamato na fenda sináptica,

explicando possivelmente os resultados que obtivemos. O silenciamento do *Il1rn* demonstrou resultados opostos.

Com o objetivo de tentar explicar essa diferença de susceptibilidade ao efeito excitotóxico do acúmulo de glutamato nos dois grupos experimentais, decidimos analisar a abundância das proteínas por Western Blot de alguns genes candidatos. Focou-se principalmente na via de resposta da *Il1b* ao estimular o fator de transcrição *RelA* (*nfkb* e *p65*, Perkins, *et al.*, 2007), possivelmente por modular a expressão do *Tnf*, e no gene *Slc1a3*, um importante re-captador de glutamato, o qual já tinha sido descrito na literatura como induzido pelos níveis de *Il1b* em cultura de neurônios de retina.

Trabalhos posteriores demonstraram que alguns genes (*Plat*, *Ntrk2*, *Npy*) são super expressos naturalmente durante a fase silenciosa. Assim, os resultados do silenciamento do *Il1rn*, que tiveram início 48h antes da injeção da pilocarpina, persistiram e aumentaram essa super regulação gênica durante a fase silenciosa. Para verificarmos se essas diferenças de expressão gênica detectadas podem promover morte neuronal e reorganizações no giro dentato, cortes histológicos foram preparados a partir dos animais silenciados para *il1rn* e seus respectivos controles. Podemos detectar diferenças entre a morte neuronal pela coloração de Nissl, sendo que os animais silenciados apresentam menor morte neuronal. Diferenças nas reorganizações entre os grupos não se mostraram significativas.

Os dados evidenciam que o *Il1b* tem um papel crucial na homeostasia neuronal e consequentemente na recuperação do sistema nervoso central depois de algum insulto, como uma crise, assim como na habilidade em evitar efeitos citotóxicos modulando o *Nfkb* (Soloff *et al.*, 2006) e o *Slc1a3*.

Além dos resultados gerados para a *Il1b*, que resultaram na produção do artigo, foram gerados mais dados referentes ao silenciamento tanto da *Il1b* quanto do *Il1rn*, conforme figuras 28 à 45. Nessas análises foram estudadas as expressões dos genes *Plat*, *TrkB*, *Il6*, *Il0*, *Tlr2* e *Tlr4* nos animais silenciados, os quais estavam no período de 5 dias pós SE, ou seja, na interface entre a fase aguda e início de fase silenciosa. Para os genes *Plat* e *TrkB* não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controles e os próprios animais silenciados, o que comprova que as alterações para os genes envolvidos diretamente com remodelações sinápticas ocorrem principalmente entre os dias 10 e 14 pós SE, quando tais genes estão super-expressos.

Quanto às análises dos genes relacionados à inflamação, a *Il6*, *Tlr2* e *Tlr4* apresentaram expressões aumentadas para os animais silenciados para *Il1rn*, quando comparados com os controles, enquanto que para os animais silenciados para *Il1b* os mesmos genes estavam com a expressão diminuída com relação aos controles. Dessa maneira, é suposto que o aumento de *Il6* quando a *Il1ra* está silenciada, é relacionado com o fato da própria *Il6* ser um dos fatores que ativam a *Ilra*, levando a um processo anti-inflamatório. Assim, com a diminuição da molécula de *Il1ra* existe um acúmulo e posterior aumento da expressão da *Il6* para compensar o silenciamento e ativar um papel protetor.

Com relação as moléculas de *Toll like receptors* observou-se o mesmo comportamento com relação às amostras silenciadas para o *Ilra*. Com esse silenciamento houve um aumento das expressões de TLR, o que pode estar associado à mudanças para suportar e continuar o fluxo e ciclo de ligações com as interleucinas, modulando assim o complexo TLR/*Il1r*, conforme descrito acima.

Finalmente, esses efeitos parecem estar relacionados não somente à fase aguda, já que os animais silenciados para o *Il1rn* apresentaram menos crises, maiores intervalos até atingir o SE e o mais importante, menor morte neuronal no hipocampo, já que associado a esses eventos tiveram genes super regulados durante a fase silenciosa (*Nfkb*, *Tnf*, *Ntrk2* e *Plat*).

Tão importante quanto os resultados sobre o modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina, conseguimos padronizar o método de transfecção no SNC de ratos, com o mínimo de efeitos inespecíficos, sendo esses efeitos verificados pelas técnicas de ressonância magnética e pela análise de expressão de genes não relacionados diretamente aos genes silenciados. Tudo isso abre uma grande possibilidade nas pesquisas no SNC, permitindo estudos funcionais de genes e possibilidades terapêuticas em animais modelos de doenças humanas.

11. CONCLUSÕES

Foi definido um padrão de expressão gênica não só para os genes *TrkB* e *Plat*, que sabidamente estão envolvidos com a fase silenciosa, mas também para os genes da família dos *Toll like receptors*, durante o início da fase silenciosa, demonstrando suas expressões alteradas. Tais alterações parecem participar dos processos críticos que ocorrem na fase silenciosa, processos inflamatórios que associadas à remodelação sináptica geradas pelos genes estruturais (*TrkB* e *Plat*), culminam na fase crônica do modelo.

Durante a execução do projeto foram desenhados e confirmados a eficiência de siRNAs contra os genes *Il1b* e *Il1rn*, os quais proporcionaram um silenciamento acima de 60%.

Os silenciamentos foram confirmados por PCR em Tempo Real e Western blot, verificando quais regiões no SNC foram silenciadas pela técnica.

Garantiu-se a segurança do método de silenciamento através de imagens por ressonância magnética dos animais, com o intuito de detectar quebra da barreira hematoencefálica.

O silenciamento da *Il1b* e *Il1ra* na fase aguda do modelo da pilocarpina levou a alterações fenotípicas detectáveis nos animais silenciados.

Os resultados obtidos contribuem para uma melhor compreensão das interações gênicas e dos papéis de cada gene no processo de epileptogênese do modelo da pilocarpina, o que nos dá uma base mais adequada para confrontar e entender de maneira mais profunda a fisiopatologia da epilepsia nos humanos.

12. REFERÊNCIAS

- Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A, Quesney LF. **Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment.** *Epilepsia*. 1993, Sep-Oct; 34(5): 878-83.
- Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H. **Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP+ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons.** *Exp Neurol*. 1995 Nov;136(1):44-52.;
- Allan S. **The neurovascular unit and the key role of astrocytes in the regulation of cerebral blood flow.** *Cerebrovasc Dis*. 2006;21(1-2):137-8. Epub 2005 Dec 21.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW. **Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes.** *J Neurosci*. 2000 Apr 1; 20 (7): 2427-38.
- Avanzini G, Vergnes M, Spreafico R, Marescaux C. **Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats.** *Epilepsia*. 1993 Jan-Feb; 34(1):1-7.
- Ayres M., Ayres Jr. M., Ayres D. L., Santos A. S. (2003). **BioEstat 3.0.** Mamirauá Civil Society, Mamirauá.
- Babb TL, Brown WJ. **Pathological findings in epilepsy.** In: Engel J Jr, editor. *Surgical treatment of the epilepsies*. New York: Raven Press; 1987: 511–40.
- Bai J, Rammos LR, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. **RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex.** *Nat Neurosci*. 2003; 6 (12): 1277-83.
- Beck H, Blumcke I, Kral T, Clusmann H, Schramm J, Wiestler OD, Heinemann U, Elger CE. **Properties of a delayed rectifier potassium current in dentate cells isolated from the hippocampus of patients with chronical lobe epilepsy.** *Epilepsia*, 1996, 37(9): 892-910.
- Becker AJ, Chen J, Zien A, Sochivko D, Normann S, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blumcke I. **Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy.** *Eur J Neurosci*. 2003 Nov;18 (10): 2792-802.
- Ben-Ari Y. **Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures.** *Epilepsia*. 2001; 42 Suppl 3: 5-7. Review.
- Bertram E H, Williamson J M., Cornett J F , Spradlin S., Chen Z. F. **Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals.** *Brain Research Protocols* 1997, 997.85–97

Betz AL, Yang GY, Davidson BL. **Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain.** J Cereb Blood Flow Metab. 1995 Jul;15(4):547-51.

Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. **BDNF and epilepsy: too much of a good thing?** Trends Neurosci. 2001 Jan; 24 (1): 47-53. Review.

Blumcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. **Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy.** Epilepsy Res. 1999, 36(2-3): 205-23.

Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. **Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy.** Brain Pathol. 2002 Apr; 12(2): 199-211. Review.

Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, Yacubian EM, Cordeiro JA, Tognola WA, Borges AP, Zanetta DM. **Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil.** Arq Neuropsiquiatr [S.I.], v. 62, n. 2A, p. 199-204, Jun 2004.

Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I. **Cytokine regulation of neuronal survival.** J Neurochem. 1992 Feb;58(2):454-60.

Butterfield DA, Poon HF. **The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease.** Exp Gerontol. 2005 Oct;40(10):774-83. Epub 2005 Jul 18. Review.

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ. **A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease.** Exp Neurol. 2001 Sep;171(1):98-108.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. **Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures.** Epilepsia. 1991, Nov-Dec; 32(6): 778-82.

Cavalheiro EA. **The pilocarpine model of epilepsy.** Ital J Neurol Sci. 1995 Feb-Mar;16 (1-2): 33-7. Review.

Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Mello LE & Leite JP – **The pilocarpine model of Seizures.** In.: Models of Seizures and Epilepsy edited by Pitkänen, Schwartzkroin & Moshé, 2005, 433-448.

Coulter DA. **Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties.** Int Rev Neurobiol. 2001; 45: 237-52. Review.

Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 30: 389-399, 1989.

Contreras D, Curró Dossi R, Steriade M. **Electrophysiological properties of rat reticular thalamic neurones in vivo.** J Physiol. 1993 Oct;470:273-94.

Cornish SM, Wheal HV. **Long-term loss of paired pulse inhibition in the kainic acid-lesioned hippocampus of the rat.** Neuroscience. 1989;28(3):563-71.

Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. **Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex.** Neuroscience. 1999; 93(4): 1491-506.

Dantzer R, Kalin N. **Salivary biomarkers of stress: cortisol and alpha-amylase.** Psychoneuroendocrinology. 2009 Jan;34(1):1. Epub 2008 Dec 6.

Dantzer R, Kelley KW. **Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior.** Brain Behav Immun. 2007 Feb;21(2):153-60. Epub 2006 Nov 7.

de Lanerolle NC, Lee TS. **New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy.** *Epilepsy Behav.* Sep;7(2):190-203. Review. (2005)

Dilger RN, Johnson RW. **Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system.** J Leukoc Biol. 2008 Oct;84(4):932-9.

Dinarello CA. **Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme.** Ann N Y Acad Sci. 1998 Sep 29;856:1-11. Review.

Dong Y, Benveniste EN. **Immune function of astrocytes.** Glia. 2001 Nov;36(2):180-90. Review.

Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ, *et al.* **siRNA relieves chronic neuropathic pain.** Nucleic Acids Res. 2004; 32(5):e49.

Dunn AJ. **Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry.** Clin Neurosci Res. 2006 Aug;6(1-2):52-68.

Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, O'Neill LA. **Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family.** Trends Immunol. 2001 Oct;22(10):533-6. No abstract available.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** Nature. 2001; 411: 494-8.

Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DH. **Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth.** J Neurosci. 2003 Mar 15; 23(6): 2218-27.

Endo A, Nagai N, Urano T, Takada Y, Hashimoto K, Takada A. **Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus.** Neurosci Res. 1999 Jan; 33(1): 1-8.

Engel JJ. **Epileptic syndromes.** In: Seizures and Epilepsy. Philadelphia: FA. Davis Company, 1989: 195-201.

Engel J Jr. **Introduction to temporal lobe epilepsy.** Epilepsy Res. 1996 Dec; 26(1): 141-50. Review.

Engström G, Hedblad B, Tydén P, Lindgärde F. **Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study.** Atherosclerosis. 2009 Feb;202(2):617-22. Epub 2008 Jul 3.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** Nature. 1998; 391: 806-11.

Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. **Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference.** Nature. 2000; 408 (6810): 325-30.

García E, Calvo R, Rodríguez-Sasiaín JM, Jiménez R, Trocóniz IF, Suárez E. **Resistance to atracurium in rats with experimental inflammation: role of protein binding.** Acta Anaesthesiol Scand. 1995 Nov;39(8):1019-23.

Gayatri N, Ferrie CD, Cross HHJ. **Corticosteroids including ACTH for childhood epilepsy other than epileptic spasms.** Cochrane Database of Systematic Reviews 2007, Issue 1. Art. No.: CD005222. DOI: 10.1002/14651858.CD005222.pub2

Giulian D, Vaca K, Johnson B. **Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system.** J Neurosci Res. 1988 Oct-Dec;21(2-4):487-500.

Gloor P. **Mesial temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective.** In: Luders H, (Ed.) Epilepsy surgery. New York: Raven press, 1991: 689-703.

Gonczy P, Echeverri G, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, et al. **Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III.** Nature. 2000; 408 (6810): 331-6.

Grippo MC, Pereira TC, Pascoal VDB, Ribeiro PAO, Gilioli R, Maia IG, Lopes-Cendes I. **5' triphosphate of in vitro transcribed siRNAs induce an antiviral response.** Molecular Genetics, 2006. Submetido.

Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Considerações Gerais. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I (eds). **Epilepsia**, segunda edição, Lemos Editorial, São Paulo, 2000: 1-10.

Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T. **Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes.** J Neurosci. 1999 Nov 15; 19 (22): 9953-63.

Hannon GJ. **RNA interference.** Nature. 2002 Jul 11;418 (6894): 244-51. Review.

Haspolat S, Mihçi E, Coşkun M, Gümüşlü S, Ozben T, Yeğin O. **Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and nitrite levels in febrile seizures.** J Child Neurol. 2002 Oct;17(10):749-51. Erratum in: J Child Neurol. 2003 Feb;18(2):118.

Hassani Z, Lemkine GF, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, Behr JP, Demeneix BA. **Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels.** J Gene Med. 2005 Feb;7(2):198-207.

Hauser, W. A. *et al.* **Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota.** *Mayo Clin Proc* [S.I.], v. 71, n. 6, p. 576-86, Jun 1996.

He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, McNamara JO. **Conditional Deletion of TrkB but Not BDNF Prevents Epileptogenesis in the Kindling Model.** Neuron. 2004, 55: 241-247.

Heck N, Garwood J, Loeffler JP, Larmer Y, Faissner A. **Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy.** Neuroscience. 2004; 129 (2): 309-24.

Houser CR, Esclapez M. **Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures.** Epilepsy Res. 1996 Dec;26(1):207-18.

Isokawa M. **Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy.** Brain Res. 1997 Jan 9;744(2):339-43. Erratum in: Brain Res 1997 May 30;758(1-2):263.

Isokawa et. al. **Decreased time constant in hippocampal dentate granule cells in pilocarpine-treated rats with progressive seizure frequencies.** Brain Res. 1996 Apr 29; 718(1-2): 169-75.

John, G.R., Lee, S.C., Song, X., Rivieccio, M., Brosnan, C.F.,. **IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery.** *Glia* **49**, 161–176. (2005)

Johansson S, Strömberg I. **Guidance of dopaminergic neuritic growth by immature astrocytes in organotypic cultures of rat fetal ventral mesencephalon.** J Comp Neurol. 2002 Feb 11;443(3):237-49.

Jooss K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. Gene Ther. 2003 Jun;10(11):955-63.

Kabiersch A, del Rey A, Honegger CG, Besedovsky HO. **Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain.** Brain Behav Immun. 1988 Sep;2(3):267-74.

Kandel ER. **The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses.** Science. 2001 Nov 2; 294(5544): 1030-8. Review.

- Kim SS, Ye C, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, Wu H, Shankar P, Manjunath N. **Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment.** Mol Ther. 2010 May;18(5):993-1001. Epub 2010 Mar 9.
- Kinoshita MO, Furuya S, Ito S, Shinoda Y, Yamazaki Y, Greimel P, Ito Y, Hashikawa T, Machida T, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y. **Lipid rafts enriched in phosphatidylglucoside direct astroglial differentiation by regulating tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptors.** Biochem J. 2009 May 1;419(3):565-75.
- Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Andermann E, Dubeau F, Guerreiro CA, Schenka AA, Queiroz LS, Olivier A, Cendes F, Andermann F. **Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy.** Epilepsia. 2003, 44(8):1080-4.
- Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CA, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F. **Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy.** Neurology. 2001 Jan 23; 56(2): 166-72.
- Koyama R, Ikegaya Y. **To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus.** Neuroscientist. 2005 Aug; 11 (4): 282-7. Review.
- Krystosek A, Seeds NW. **Plasminogen activator release at the neuronal growth cone.** Science. 1981a Sep 25; 213 (4515): 1532-4.
- Krystosek A, Seeds NW. **Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum.** Proc Natl Acad Sci USA. 1981b Dec; 78 (12): 7810-4.
- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. **Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system.** Nature. 2007 Jul 5;448(7149):39-43. Epub 2007 Jun 17.
- Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Nakata Y, Fukuoka J, Amano S, Oohira A, Matsui H. **Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats.** Brain Res. 2001, Apr 13; 898 (1): 36-48.
- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. **Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy.** Neurosci Biobehav Rev. 1990, Winter; 14(4): 511-7.
- Ling ZD, Tong CW, Carvey PM. **Partial purification of a pramipexole-induced trophic activity directed at dopamine neurons in ventral mesencephalic cultures.** Brain Res. 1998 Apr 27;791(1-2):137-45.
- Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA. **Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells.** Eur J Immunol. 1989 Sep;19(9):1531-6.
- Lothman EW, Rempe DA, Mangan PS. **Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy.** J Neurophysiol. 1995 Aug; 74(2): 841-8.

Lowenstein PR, Castro MG **Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences.** *Gene Ther.* 2003 Jun;10(11):946-54. Review. No abstract available.

Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. **The role of inflammation in CNS injury and disease.** *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S232-40. Review.

Mano A, Gato A, Alonso MI, Carnicero E, Martín C, Moro JA. **Role of interleukin-1beta in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development.** *Cytokine.* 2007 Feb;37(2):128-37. Epub 2007 Apr 20.

Massa PT, Aleyasin H, Park DS, Mao X, Barger SW (2006). "NFκB in neurons? The uncertainty principle in neurobiology". *J. Neurochem.* **97**: 607–618. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03810.x.

Marcinkiewicz M, Nagao T, Day R, Seidah NG, Chretien M, Avoli M. **Pilocarpine-induced seizures are accompanied by a transient elevation in the messenger RNA expression of the prohormone convertase PC1 in rat hippocampus: comparison with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor expression.** *Neuroscience.* 1997 Jan;76(2):425-39.

Mattson, R. H. Current **challenges in the treatment of epilepsy.** *Neurology* [S.I.], v. 44, n. 6 Suppl 5, p. S4-9; discussion S31-2, Jun 1994.

Mathern, G.W., Babb TL, Armstrong DL. **Hippocampal Sclerosis. In: Epilepsy: A Comprehensive Textbook**, edited by J. Engel, Jr and T A Pedley. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997: 133-55.

Mathern, GW, Pretorius, JK , Babb, TL. **Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neurondensities in hippocampal and lesional seizures.** *J Neurosurg*, 1995, 82: 211–219.

McCaffrey AP, Kay MA. **A story of mice and men.** *Gene Ther.* 2002; 9 (23): 1563.

McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. **The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar.** *J Neurosci.* 1999 Dec 15; 19 (24): 10778-88.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. **Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy.** *Epilepsy Res Suppl.* 1992; 9: 51-9; discussion 59-60.

Mello LE, *et al.* **Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting.** *Epilepsia.* Nov-Dec;34(6):985-95. (1993)

Melo et.al.. **Lack of Fos-like immunoreactivity after spontaneous seizures or reinduction of status epilepticus by pilocarpine in rats.** *Neurosci Lett.* 1996 Apr 19;208(2):133-7.

Miller VM, *et al.* **Allele-specific silencing of dominant disease genes.** *Proc Natl Acad Sci*, Jun 10;100(12):7195-200. (2003).

Naffah-Mazzacoratti MG, Arganaraz GA, Porcionatto MA, Scorza FA, Amado D, Silva R, Bellissimo MI, Nader HB, Cavalheiro EA. **Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy.** Brain Res Bull. 1999, Nov 1;50 (4): 229-39.

Nissinen *et al.*, J. Nissinen, T. Halonen, E. Koivisto and A. Pitkänen, **A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat,** Epilepsy Res. 38 (2000), pp. 177–205.

Okamoto M, Sakiyama J, Kurazono S, Mori S, Nakata Y, Nakaya N, Oohira A. **Developmentally regulated expression of brain-specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the postnatal rat hippocampus.** Cell Tissue Res. 2001 Nov; 306 (2): 217-29.

Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Kurazono S, Usui S, Hasegawa M, Oohira A. **Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures.** Exp Neurol. 2003 Nov; 184(1): 179-95.

Olney et.al. **Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats.** Brain Res. 1979 Oct 26;176(1):91-100.

Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S. **Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development.** Arch Biochem Biophys. 2000 Feb 1; 374 (1): 24-34. Review.

Oprica M, Zhu S, Gojny M, Pham TM, Mohammed AH, Winblad B, Bartfai T, Schultzberg M. **Transgenic overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the CNS influences behaviour, serum corticosterone and brain monoamines.** Brain Behav Immun. 2005 May;19(3):223-34.

Pardridge WM. **Brain drug development and brain drug targeting.** Pharm Res. 2007 Sep;24(9):1729-32. Epub 2007 Jul 13.

Parish CL, Finkelstein DI, Tripanichkul W, Satoskar AR, Drago J, Horne MK. **The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice.** J Neurosci. 2002 Sep 15;22(18):8034-41.

Pereira TC, Pascoal VDB, Marchesini RB, Maia IG, Magalhães LA, Magalhães E, Lopes-Cendes I. **Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene.** Exp Parasitol. 2008 Apr;118(4):619-23. Epub 2008 Jan 30.

Pereira TC, Pascoal VDB, Secolin R, Rocha CS, Maia IG, Lopes-Cendes I. **Computational identification of best RNAi targets based on free energy features.** Molecular Genetics, 2006. Submetido.

Perkins ND. **"Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function".** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 (1): 49–62. (2007).

Primrose DC, Ojemann GA. **Outcome of resective surgery for temporal lobe epilepsy.** In: Lüders HO, editor. Epilepsy surgery. New York: Raven Press; 1991, p. 601-11.

Proper EA, Oestreicher AB, Jansen GH, Veelen CWMv, van Rijen PC, Gispen WH, Graan PNE. **Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy.** *Brain*, 2000, 123: 19-30.

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. **Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation.** *Nature*. 1993, Feb 4; 361 (6411): 453-7.

Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. **The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro.** *Brain Res Dev Brain Res*. 2004 Oct 15;153(1):39-51.

Rothwell NJ, Luheshi GN. **Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target.** *Trends Neurosci*. Dec;23(12):618-25. Review. (2000)

Sander, J. W. **Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review.** *Epilepsia* [S.I.], v. 34, n. 6, p. 1007-16, Nov-Dec 1993.

Schmidtcastner et.al. **Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus.** *Exp Brain Res*. 1996;107(3):331-47.

Schlachetzki F, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. **Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach.** *Neurology*. 2004 Apr 27;62(8):1275-81. Review.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. **IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.** *Immunity*. 2005 Nov;23(5):479-90.

Scorza CA, Arida RM, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Scorza FA. **Expression of nestin in the hippocampal formation of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy.** *Neurosci Res*. 2005, Mar; 51(3): 285-91. Epub 2005 Jan 19.

Silva JM, Sachidanandam R & Hannon GJ. **Free energy lights the path towards more effective RNAi.** *Nature Genetics*. 2003, 35: 303-305.

Soloff MS, Izban MG, Cook DL Jr, Jeng YJ, Mifflin RC. **Interleukin-1-induced NF-kappaB recruitment to the oxytocin receptor gene inhibits RNA polymerase II-promoter interactions in cultured human myometrial cells.** *Mol Hum Reprod*. 2006 Oct;12(10):619-24. Epub 2006 Aug 3.

Sparkman NL, Johnson RW. **Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress.** *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4-6):323-30. Epub 2008 Nov 26. Review.

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J. **Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells.** *Exp Neurol*. 2001 Aug;170(2):317-25. Stroemer e Rothwell, 1997

Sutula TP. - **Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization.** *Epilepsia* 31: 45-54, 1990.

Swanson, L.W. (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, 240 pp., Elsevier, Amsterdam.

Tehrani R, Andell-Jonsson S, Beni SM, Yatsiv I, Shohami E, Bartfai T, Lundkvist J, Iverfeldt K. **Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist.** *J Neurotrauma*. 2002 Aug;19(8):939-51.

Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, *et al.* **Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(49):17270-5.

Thornton LM, Andersen BL. **Psychoneuroimmunology examined: The role of subjective stress.** *Cellscience*. 2006 Apr 30;2(4):nihpa49913.

Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG. **Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase.** *Nature*. 2004 May 27;429(6990):417-23.

Tsai S-J. **TrkB partial agonists: Potential treatment strategy for epilepsy, mania, and autism.** *Medical Hypothesis*. 2006, 66(1): 173-175.

Tschuch C, *et al.* **Off-target effects of siRNA specific for GFP.** *BMC Mol Biol*. Jun 24;9:60. (2008)

Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. **Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator.** *Nature*. 1995, Sep 8; 377 (6547): 340-4.

Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S. **Neuronal cell death and tPA.** *Nature* 1996, Nov 14; 384(6605): 123-4.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwars M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. **Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study.** *Behav Brain Res*. 1983, Sep; 9(3): 315-35.

Vawter MP, Basaric-Keys J, Li Y, Lester DS, Lebovics RS, Lesch KP, Kulaga H, Freed WJ, Sunderland T, Wolozin B. **Human olfactory neuroepithelial cells: tyrosine phosphorylation and process extension are increased by the combination of IL-1beta, IL-6, NGF, and bFGF.** *Exp Neurol*. 1996 Nov;142(1):179-94.

Veronique A, Dubé C, François J, Leroy C, Rigoulot MA, Roch C, Namer IJ, Nehlig A. **Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model.** *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:41-7. Erratum in: *Epilepsia*. Dec;48(12):2379. (2007).

Vezzani A, Maroso M, Balosso S, Sanchez MA, Bartfai T. **IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures.** Brain Behav Immun. 2011 Oct;25(7):1281-9. Epub 2011 Apr 5.

Voutsinos-Porche, B. *et al.* **Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.** *Neurobiol. Dis.* **17**, 385–402. (2004).

Wang T, Kang CS, Wang BM, Zhang QY. **The effect of siRNA on inhibiting cyclooxygenase-2 gene expression in gastric adenocarcinoma cell.** *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2008 Feb;47(2):129-32

Watson C, Cendes F, Fuerst D, Dubeau F, Williamson B, Evans A, Andermann F. **Specificity of volumetric magnetic resonance imaging in detecting hippocampal sclerosis.** *Arch Neurol.* 1997 Jan; 54(1): 67-73.

Watson PL, Weiner JL, Carlen PL. **Effects of variations in hippocampal slice preparation protocol on the electrophysiological stability, epileptogenicity and graded hypoxia responses of CA1 neurons.** *Brain Res.* 1997 Nov 14;775(1-2):134-43.

Wieser, H. G. **ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.** *Epilepsia* [S.I.], v. 45, n. 6, p. 695-714, Jun 2004.

Yang GY, Liu XH, Kadoya C, Zhao YJ, Mao Y, Davidson BL, Betz AL. **Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist.** *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Aug;18(8):840-7.

Ye, S.M., Johnson, R.W. **An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice.** *Neuroimmunomodulation* 9, 183–192. 2001.

Ye, S.M., Johnson, R.W. **Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice.** *J. Neuroimmunol.* 1999 93, 139–148.

Zielinski JJ. **Epidemiology of epilepsy.** In: Laidlaw J, Richens A e Oxley J (eds). *A textbook of epilepsy*, Third edition, Churchill livingstone, New York, 1988: 21-48.

Zuker M. **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(13): 3406-15.

ANEXO 1

**Laboratório de Controle de Qualidade Animal – CEMIB –
UNICAMP**



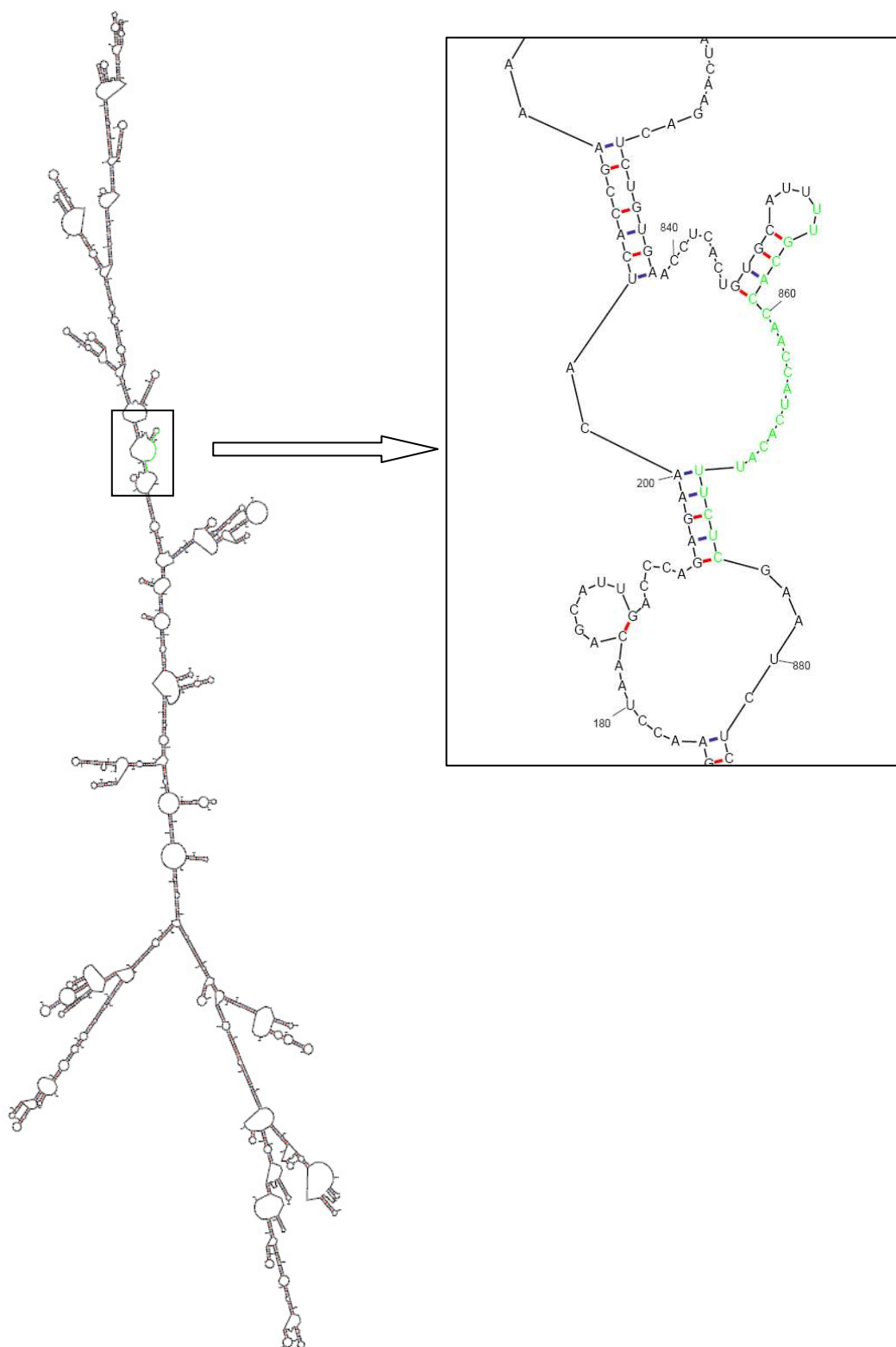
Estante ventilada localizada no Laboratório de Controle de Qualidade Animal – CEMIB, UNICAMP. Dentro de cada isolador o fluxo de ar é constantemente renovado, individualmente, garantindo que os animais não tenham contato com o meio externo.



Detalhes dos isoladores, os quais permitem que seja realizada a monitoração dos animais sem qualquer interferência.

ANEXO 2

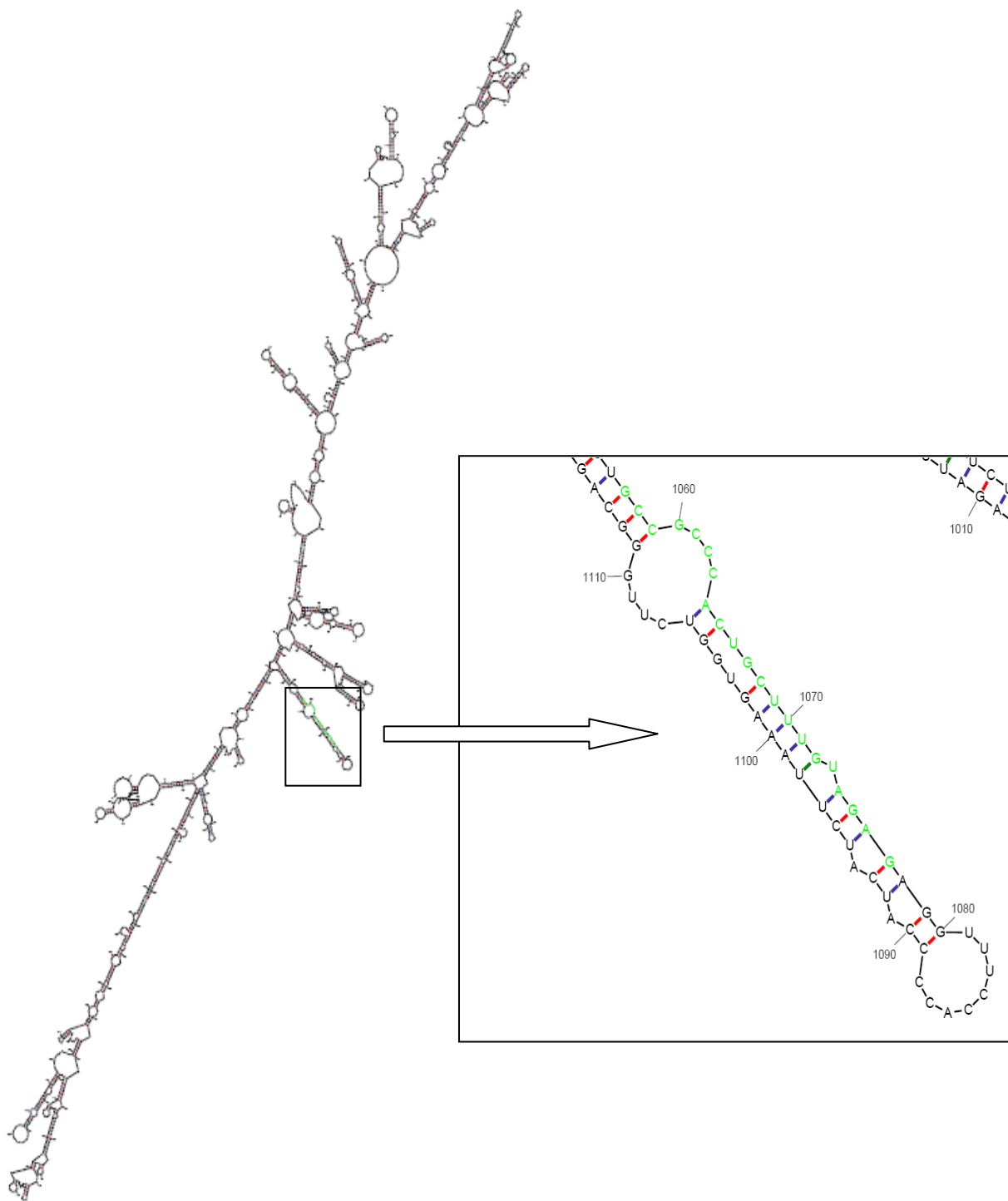
Estruturas Secundárias do RNAm do Gene Alvo – *TrkB*



Estrutura secundária do RNAm do gene *TrkB* predita pelo programa *MFold* (Zuker 2003). No detalhe observa-se em verde a região de complementaridade do siRNA. Essa região apresenta uma boa acessibilidade, não o prejudicando.

ANEXO 3

Estruturas Secundárias do RNAm do Gene Alvo – *PLAT*



Estrutura secundária do RNAm do gene *PLAT* predita pelo programa *MFold* (Zuker 2003). No detalhe observa-se em verde a região de complementaridade do siRNA. Essa região apresenta uma boa acessibilidade, não prejudicando o acoplamento do complexo RISC, que cliva o RNAm alvo.

ANEXO 4

Certificado Comissão de Ética na Experimentação Animal



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1374-1, sobre "**Estudo funcional de genes da fase latente do modelo da epilepsia de lobo temporal induzido pela pilocarpina através da interferência por RNA**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes / Rafael Breglio Marchesini**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de outubro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1374-1, entitled "**Functional study of the latent fase genes from the temporal lobe epilepsy model induced by pilocarpine throught RNA interference**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 31, 2007.

Campinas, 31 de outubro de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>