



Alexandre Hilário Berenguer de Matos

**Expressão gênica em larga escala em
modelos genéticos de epilepsia**

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Alexandre Hilário Berenguer de Matos

**Expressão gênica em larga escala em
modelos genéticos de epilepsia**

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius D Avila Bitencourt Pascoal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO ALEXANDRE
HILÁRIO BERENGUER DE MATOS E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ISCIA
TERESINHA LOPES CENDES.

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M428e

Matos, Alexandre Hilário Berenguer de, 1986-
Expressão gênica em larga escala em modelos
genéticos de epilepsia / Alexandre Hilário Berenguer de
Matos . – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes.
Coorientador : Vinicius D Avila Bitencourt Pascoal.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Análise em microsséries. 2. Epilepsia reflexa. 3.
Epilepsia tipo ausência. 4. Genes. I. Lopes-Cendes,
Íscia Teresinha, 1964-. II. Pascoal, Vinicius D Avila
Bitencourt. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Large-scale gene expression in genetic models of epilepsy.

Palavras-chave em inglês:

Microarray analysis

Epilepsy, Reflex

Epilepsy, Absence

Genes

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Títuloção: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Luciene Covolan

Licio Augusto Velloso

Data da defesa: 20-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

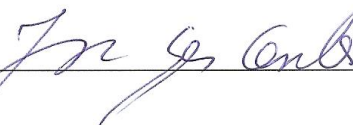
ALEXANDRE HILÁRIO BERENGUER DE MATOS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES

Co-Orientador(a) PROF(A). DR(A). VINICIUS D AVILA BITTENCOURT PASCOAL

MEMBROS:

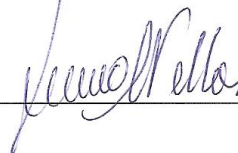
1. PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES



2. PROF(A). DR(A). LUCIENE COVOLAN



3. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 20 de fevereiro de 2013

Dedico este trabalho à minha família, Carmen, José e Victor pelas oportunidades que me proporcionaram, pelas orações sempre presentes, pela confiança na minha capacidade, pelo amor e carinho. Sem eles, com certeza, eu não chegaria aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pelas oportunidades colocadas no meu caminho.

À **Dra. Iscia Lopes Cendes**, por sua orientação. Agradeço por esses anos dividindo comigo seus valores, sua maneira de encarar a Ciência. Aprendi muito observando e desenvolvi uma admiração por sua competência, seriedade, dedicação, integridade e caráter. Levo comigo uma inspiração e um grande exemplo de profissional.

Ao **Vinicius Pascoal** pela co-orientação, ensinamentos, amizade e parte do conhecimento que tenho hoje, devo a ele.

Aos professores da UFMG **Almir e Ana Lúcia** por sempre terem me acolhido em seus laboratórios nas viagens a Belo Horizonte e aos amigos que fiz lá, Deborah, Sarah e Fabiana. E a professora **Ângela** da USP-SP por toda a colaboração e atenção durante o trabalho.

Ao Laboratório de Microarranjo do Laboratório Nacional de Biociências – LNLS.

À **Fapesp** pelo suporte financeiro durante o mestrado.

À minha namorada **Renata**, simplesmente um anjo, que teve paciência para me aguentar nos momentos de correria e estresse, a compreensão que teve pelos finais de semana e feriados que passei no laboratório, toda a ajuda, carinho e amor durante essa jornada! Por isso sou muito grato! As minhas conquistas também são suas.

À **Milena e Luciana Bonadia** agradeço por tudo, pelos conselhos acadêmicos e pessoais, pela amizade imensurável que sempre demonstraram, por serem anjos em minha vida. E é claro pelos vários cafezinhos!

Aos meus grandes amigos que tenho um carinho enorme: **Marília** pelas boas risadas, conselhos, uma amiga maravilhosa que mesmo sumindo sempre disposta a ajudar e aconselhar; **Karina, Marcella e Taty**, esse trio de amigas maravilhosas que compartilhei momentos incríveis; **Fernando Marson**, um grande amigo sempre presente em todos os momentos bons e ruins; **Marina**, uma grande amiga maravilhosa que sempre estava ao meu lado para ajudar, aconselhar, dar risadas em todos os momentos sendo eles bons ou ruins; **Renato (Zé Bola)**, outro grande amigo sempre disposto a ajudar; **Thiago**, além de um grande amigo, pessoa que me ajudou muito durante o mestrado não apenas em experimentos e com quem tenho a satisfação de dividir o apartamento; **Daniel**, parceiro de viagem, amigo para todas as horas sempre disposto a ajudar; **Aline**, pessoa maravilhosa e cativante que tive o prazer de dividir o laboratório aos finais de semana juntamente com a **Simone Tsuneda**, pessoa incrível que tivemos poucos meses de convivência, mas que foram suficientes para nascer uma amizade e admiração enorme que tenho por ela, não podia deixar de falar de outra amiga brasileira **Danizinha**, também tivemos pouco tempo de convivência e isso foi o suficiente para nascer uma grande amizade, **Camila**, uma grande amiga que ajudou muito corrigindo as referências. Aos demais amigos, **André, Fábio, Rodrigo, Dany, Simoni, Cris, Patrícia, Felipe, Ana Laura, Tânia, Miriam, Ana Paula, Ilária, Laiara, Fernanda, Rafael, Paula, Laís, Josélia, Clarisse, Dani, Amanda, Ju e Luciana**, pessoas maravilhosas que dividi momentos incríveis dentro e fora do ambiente de trabalho, se descrevesse o que cada um simboliza a mim seria uma nova dissertação.

Às técnicas do laboratório **Marilza e Madá** que ofereceram seu enorme apoio durante todo o período. Obrigado!

MUITO OBRIGADO

Alexandre Hilário

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	18
1. EPILEPSIA.....	19
2. MODELO EXPERIMENTAL.....	23
2.1. CRISE AUDIOGÊNICA.....	24
2.2. CRISE DE AUSÊNCIA.....	29
3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA.....	32
4. JUSTIFICATIVA.....	33
OBJETIVOS.....	34
1. OBJETIVO GERAL.....	35
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. ANIMAIS.....	37
2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	37
3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA.....	39
4. SISTEMA <i>AFFYMETRIX</i>	40
4.1. PREPARAÇÃO DOS ALVOS.....	41
4.2. HIBRIDIZAÇÃO E DETECÇÃO.....	41
4.3. AQUISIÇÃO DE IMAGEM E ANÁLISE DOS DADOS.....	43
5. VALIDAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	43
5.1. SÍNTESE DO CDNA.....	44
5.2. PROTOCOLO DE PCR EM TEMPO REAL.....	44
RESULTADOS.....	48
1. ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS ANIMAIS WAR E GEAS COMPARADOS COM CONTROLES WISTAR.....	49
1.1. NORMALIZAÇÃO.....	49
1.2. RESULTADOS WAR.....	60

1.3. RESULTADOS GEAS.....	65
1.4. VIAS METABÓLICAS.....	68
2. PCR EM TEMPO REAL.....	73
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXO.....	96

LISTA DE TABELAS

1-	Total de transcritos expressos em cada grupo.....	50
2 -	Genes diferencialmente expressos na placa quadrigêmea dos ratos WAR.....	60
3 -	Genes diferencialmente expressos no hipocampo dos ratos WAR.....	63
4 -	Genes diferencialmente expressos no córtex somestésico dos ratos GEAS.....	65
5 -	Genes diferencialmente expressos no hipocampo dos ratos GEAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

1 -	Recrutamento das estruturas cerebrais durante as crises agudas e abasamento audiogênico.....	27
2 -	Histograma dos chips dos ratos WAR.....	51
3 -	Box-plot dos <i>chips</i> dos ratos WAR.....	52
4 -	Box-plot dos <i>chips do hipocampo</i> dos ratos WAR.....	53
5 -	Box-plot dos <i>chips do córtex somestésico</i> dos ratos GEAS.....	54
6 -	Box-plot dos <i>chips do hipocampo</i> dos ratos GEAS.....	55
7 -	PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e placa quadrigêmea dos ratos WAR.....	56
8 -	PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e Hipocampo dos ratos WAR.....	57
9 -	PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e córtex somestésico dos ratos GEAS.....	58
10 -	PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e Hipocampo dos ratos GEAS.....	59
11 -	Neurotransmissão GABAérgica.....	68
12 -	Processo neurofisiológico NMDA-dependente de potencialização de longo prazo pós-sináptica em neurônios na camada CA1 do hipocampo.....	69
13 -	Neurotransmissão GABAérgica.....	70
14 -	Processo neurofisiológico NMDA-dependente de potencialização de longo prazo pós-sináptica em neurônios na camada CA1 do hipocampo.....	71
15 -	Curva de Padronização do PCR em Tempo Real.....	73
16 -	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>Grin1</i> , <i>Slc1a3</i> , <i>Nedd8</i> , <i>Il18</i> , por PCR em tempo real, tecido placa quadrigêmea de ratos WAR e controles Wistar	74
17 -	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>Grin1</i> , <i>Slc1a3</i> , <i>Nedd8</i> , <i>Il18</i> , por PCR em tempo real, tecido placa quadrigêmea de ratos WAR, placa quadrigêmea de ratos WAR <i>naïve</i> e controles Wistar.....	75
18 -	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>Grin1</i> , por PCR em tempo real, tecido córtex somestésico de ratos GEAS e controles Wistar.....	76

19-	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>Gabbr1</i> , <i>Grin1</i> , <i>Slc6a1</i> por PCR em tempo real, tecido hipocampo GEAS, e controles Wistar.....	76
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Abcb1a</i>	Gene, “ATP-binding cassette sub-family B member 1”
<i>Adcy2</i>	Gene, “ <i>Adenylate cyclase type 2</i> ”
<i>Adcy9</i>	Gene, “ <i>Adenylate cyclase type 9</i> ”
AMPA	<i>2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid</i>
Ank2	Gene, “ <i>ankyrin 2</i> ”
<i>Apbb3</i>	Gene, “ <i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3</i> ”
<i>Aqp4</i>	Gene, “Aquaporina 4”
<i>Atp6ap1l</i>	Gene, “ <i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1-like</i> ”
<i>Bdnf</i>	Gene, “Brain-derived neurotrophic factor”
cDNA	DNA complementar
CI	Colículo inferior
<i>Cldn11</i>	Gene, “ <i>claudin 11</i> ”
<i>Creg2</i>	Gene, “cellular repressor of E1A-stimulated genes 2”
cRNA	RNA complementar biotinilado
CS	Colículo superior
CT	Ciclo limiar (do inglês, <i>Threshold Cycle</i>)
<i>Dbndd1</i>	Gene, “ <i>dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1</i> ”
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleotídeos
<i>Egfr</i>	Gene, “ <i>epidermal growth factor receptor</i> ”
ELT	Epilepsia de lobo temporal
FC	Coeficiente de variação (do inglês, <i>Fold change</i>)
<i>Fos</i>	Gene, “ <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i> ”
GABA	Ácido gama-aminobutírico
<i>Gabbr1</i>	Gene, “ <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1</i> ”
<i>Gabbr2</i>	Gene, “ <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2</i> ”
<i>Gabra1</i>	Gene, “ <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1</i> ”

Gabra2	Gene, “ <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2</i> ”
GEAS	Epilepsia generalizada com crises de ausência (sigla do inglês,
Gria2/GluR2	Gene, “ <i>glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2</i> ”
Grin1	Gene, “ <i>glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1</i> ”
ID	Número de identificação da sonda
IFN- gama	interferon gama
Il18	Gene, interleucina-18
Il1b	interleucina-1 beta
IRAK1	<i>interleukin 1 receptor-associated kinase 1</i>
Kcnc2	Gene, “ <i>potassium voltage-gated channel subfamily C member 2</i> ”
LL	Lemnisco lateral
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nedd8	Gene, “ <i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i> ”
Nfkb	Gene, “nuclear factor kappa-B”
NMDA	N-methyl-D-aspartate
Ntrk2	Gene, “neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2”
Pb	Pares de base
PCA	Análise de Componente principal
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Peli1	Gene, “ <i>pellino 1</i> ”
Peli2	Gene, “ <i>pellino 2</i> ”
Pfp	Probabilidade de falso positivo
Plekhh1	Gene, “ <i>pleckstrin homology domain-containing family H member</i> ”
Prkcb	Gene, “ <i>protein kinase C, beta</i> ”
Pxmp4	Gene, “ <i>peroxisomal membrane protein 4</i> ”
Rab8b	Gene, “ <i>ras-related protein Rab-8B</i> ”
RefSeq	Reference sequence database
RMA	Média de intensidade da sonda (do inglês, <i>Robust Multichip Averaging</i>)

RT1-A2 /// RT1-A3 /// RT1-EC2	Gene, “ <i>RT1 class Ia, locus A2 /// RT1 class I, locus A3 /// RT1 class Ib, locus EC2</i> ”
RT1-S3	Gene, “ <i>RT1 class Ib, locus S3</i> ”
RT1-T24-3	Gene, “ <i>RT1 class I, locus T24, gene 3</i> ”
RT1-T24-4	Gene, “ <i>RT1 class I, locus T24, gene 4</i> ”
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i>
Scn1a	Gene, “ <i>sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit</i> ”
Scn2a1	Gene, “ <i>sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit 1</i> ”
SE	<i>Status epilepticus</i>
Slc1a3	Gene, “ <i>solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3</i> ”
Slc6a1	Gene, “ <i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1</i> ”
Slc6a17	Gene, “ <i>solute carrier family 6, member 17</i> ”
SNC	Sistema Nervoso Central
Snca	Gene, “ <i>synuclein, alpha</i> ”
TA	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Trak1	Gene, “ <i>trafficking protein, kinesin binding 1</i> ”
Ubl7	Gene, “ <i>ubiquitin-like 7</i> ”
Vdac1	Gene, “ <i>voltage-dependent anion channel 1</i> ”
Vdac2	Gene, “ <i>voltage-dependent anion channel 2</i> ”
WAR	Rato Wistar audiogênico (do ingles, Wistar audiogenic rat)



RESUMO

Wistar audiogenic rat (WAR) é um modelo genético de epilepsia de crises audiogênicas desencadeadas após alta intensidade de estimulação sonora. Outro modelo genético recentemente identificado é o da epilepsia generalizada com crises de ausência (GEAS). O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil de expressão gênica destas duas cepas através de uma análise em larga escala.

Para os estudos de expressão foi utilizada inicialmente a tecnologia de microarranjos seguida da validação dos resultados por técnica quantitativa de PCR em tempo real. Os resultados foram analisados em ambiente R, utilizando os pacotes *AFFY* e *RankProd* do bioconductor, utilizando o algoritmo MAS 5 os *array* foram normalizados e calculou-se a intensidade do sinal e a detecção (presença ou ausência de expressão). Após a detecção, os transcritos que estavam ausentes foram removidos. Para a análise estatística foi utilizado o teste *RankProd*, que é biologicamente projetado para testar e detectar genes diferencialmente expressos em experimentos de microarranjos. Foi utilizado um valor de $p \leq 0,01$ e $pfp \leq 0,05$, a fim de considerar os transcritos diferencialmente expressos.

No geral, nossos resultados mostram uma assinatura molecular similar nos dois modelos de ratos genéticos analisados. Houve uma sobreposição na lista de genes diferencialmente expressos encontrados em ambos os modelos, quando comparado com controles. Além disso, descobrimos que duas importantes vias moleculares para epileptogênese: neurotransmissão GABAérgica e potencialização de longo prazo pós-sináptica NMDA-dependente, foram encontrados em ambos os modelos, quando combinamos os dados dos animais WAR e GEAS. No entanto, algumas diferenças nas vias de sinalização expressas nos dois modelos também foram identificadas. Portanto os resultados mostram claramente a natureza heterogênea e complexa dos mecanismos moleculares envolvidos na epileptogênese.



ABSTRACT

Wistar audiogenic rat (WAR) is a genetic epilepsy model susceptible to audiogenic seizures, after high-intensity sound stimulation. Another genetic model we have recently identified is the generalized epilepsy with absence seizures (GEAS) rat. The aim of the present study was to characterize and compare the genetic profile of these two strains using gene expression analysis.

Experiments were performed initially using microarray technology followed by quantitative real-time PCR. Results were analyzed in R environment using the Affy and RankProd packages from Bioconductor, using the algorithm MAS 5 we normalized the arrays and calculated the signal intensity and the detection (presence or absence of expression), after the detection, transcripts which were absent in all samples were removed. For statistical analysis we used the Rank Product test, which is biologically motivated and designed to test and detect differentially expressed genes in replicated microarray experiments. This is a simple non-parametric statistical method based on ranks of fold changes. We used a $p\text{-value} \leq 0.01$ and a $\text{pfp} \leq 0.05$ in order to consider a given transcript to be differentially expressed

Overall, the results show a different molecular signature in the two genetic rat models analyzed, since different enriched gene ontology categories were found. However, there was some overlap in the list of genes differentially expressed found in both models when comparing to controls. In addition, we found that two important molecular pathways for epileptogenesis: GABAergic neurotransmission and: Neurophysiological process NMDA-dependent postsynaptic long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons, were found to be present in both models when combining data from WAR and GEAS animals.

In conclusion, our results clearly show the heterogeneous and intricate nature of the molecular mechanisms involved in epileptogenesis as well as the importance of studies looking at different regulatory pathways at once, in order to better appreciate this complexity.



INTRODUÇÃO

1. Epilepsia.

As epilepsias formam um grupo de doenças neurológicas crônicas decorrentes de alterações das funções cerebrais associadas ou não a outras doenças neurológicas. Devido a grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, gravidade e prognóstico sugere-se 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 epilépticas é a ocorrência de crises epilépticas, as quais são causadas por descargas neuronais anormais excessivas que ocorrem de forma passageira, sincrônica e desorganizada das células nervosas, resultantes da movimentação iônica através da membrana neuronal, levando a manifestações clínicas dependentes da região (ou regiões) do sistema nervoso central afetada(s) (1; 2). Múltiplas crises em um período de 24 horas ou um episódio de *status epilepticus* são considerados eventos isolados (3).

Há várias causas para a ocorrência de crises epilépticas, como distúrbios metabólicos, traumas cranioencefálicos, estados febris, defeitos genéticos, malformações corticais entre outras. Destacam-se as epilepsias estruturais/metabólicas e as malformações de desenvolvimento cortical que constituem as maiores causas de epilepsia na infância (4). Sendo que as epilepsias apresentam grande prevalência, afetando aproximadamente 1% da população geral (5), deste total, 25% de todos os pacientes não respondem a

nenhum tipo de terapia e apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (6).

Alguns pacientes apresentam tipos peculiares de crises epiléticas, sendo que estas podem ser causadas por fatores internos como, estresse, febre, ciclo menstrual e fadiga e fatores externos como, excesso de álcool, calor, *flash* de luzes e estímulo sonoro (música, melodia particular, toque do telefone e/ou sino) (7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17). Há muitos casos de pacientes que desenvolveram crises após ouvirem sinos de igreja (18). Este tipo peculiar de epilepsia causado por música é chamado de epilepsia musicogênica (19), é possível que as áreas cerebrais responsáveis pelo processamento musical possam estar envolvidas com a propagação das crises e as áreas corticais também podem estar relacionadas (17).

Epilepsia musicogênica tem a prevalência de 1:10000000 na população mundial, é classificada com uma forma complexa rara de epilepsia reflexa pela Liga Internacional contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy*, ILAE) (20). Existem pacientes que podem apresentar crises de acordo com o estilo musical (jazz, clássica, popular), instrumental (piano, flauta), melodias com conteúdo emocional (21). Estudos mostram que as áreas cerebrais afetadas são as regiões do lobo temporal, giro de Heschl, córtex insular e lobos frontais (22; 23; 24).

Crises de ausência são um dos tipos mais comuns de crises observadas em pacientes com epilepsia generalizada idiopática, ocorrendo em um número de diferentes síndromes, em especial as epilepsias de ausência infantil (EAI),

epilepsia ausência juvenil (EAJ) e epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) (25). As crises de ausência são caracterizadas por episódios recorrentes não convulsivos de perda da consciência e da capacidade de resposta, normalmente acompanhada por manifestações motoras sutis, mas sem perda do tônus postural (26).

A ausência infantil representa 8% das epilepsias em crianças na idade escolar; antecedentes familiares estão presentes em até 44% das descrições publicadas. Segundo Loiseau (27), esse grupo deveria estar associado à epilepsia com as seguintes características clínicas: 1) iniciar-se antes da puberdade, ocorrer em crianças até então normais; 2) predomínio no sexo feminino; 3) embora ausências típicas devem ser o primeiro tipo de crise, o diagnóstico também inclui convulsões febris; 4) crises de ausência rápidas, com duração de menos de 15 segundos; 5) muito frequentes, comprometendo a consciência; 6) abertura ocular; 7) interrupção de atividades acompanhadas em geral por alguns automatismos e discretas mioclônias palpebrais e dos membros superiores. Entretanto, em 40% dos casos a partir da adolescência ocorrem crises tônico-clônicas generalizadas, isoladas ou associadas às ausências. Wirrel *et al.* (28) analisaram o prognóstico ao longo de 6 a 22 anos em 81 crianças com esse tipo de epilepsia e concluíram que 65% dos pacientes apresentavam remissão. Nos demais pacientes ocorre dificuldade cognitiva por ocasião do diagnóstico, estado de mal de ausência antes ou durante o tratamento e desenvolvimento de crises tônico-clônicas generalizadas ou apenas mioclônicas após o início da terapêutica.

A epilepsia com ausência juvenil inicia-se entre 7 e 16 anos e acomete ambos os sexos, ocorrendo em geral ao despertar, comprometendo a consciência. Tais crises acompanham-se de mioclônias, mas são raras as crises tônico-clônicas generalizadas (29; 30). Essa forma de epilepsia não apresenta remissão, porém as ausências melhoram com a idade no que se refere ao comprometimento da consciência, duração e frequência (30).

A epilepsia mioclônica juvenil compreende 10% das epilepsias e cerca de 25% dos pacientes têm antecedentes familiares da síndrome (31; 27; 25). Essa forma de epilepsia caracteriza-se por mioclônias ao despertar, acompanhadas de crises tônico-clônicas generalizadas e ausências, surgindo por volta dos 12 aos 17 anos. Tais crises são tipicamente precedidas por mioclônias, intensas e bilaterais. As ausências são breves e apresentam-se como lapsos da consciência, podendo ocorrer fotossensibilidade clínica e eletrencefalográfica. Os fatores desencadeantes dessas crises incluem privação do sono, despertar, fadiga, álcool e fotossensibilidade.

2. Modelo experimental.

A utilização de modelos experimentais de epilepsia tem contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia das epilepsias seja *in vitro* quanto *in vivo*. Nos modelos animais, geralmente, são necessários pelo menos dois fatores combinados para a ocorrência de crise. O primeiro é uma predisposição genética

determinada, cuja origem pode estar relacionada a uma anormalidade dos neurotransmissores associados com os sistemas colinérgico, catecolaminérgico, serotoninérgico e/ou aminoácidos, o segundo fator, também chamado de iniciador, incluem estímulos do meio ambiente tais como: luz intermitente, som, hipertermia, infecções, alterações neuroquímicas endógenas ou um desequilíbrio hormonal (32).

Portanto, para o aparecimento de uma crise epiléptica, em modelos genéticos, é necessária uma predisposição inata à crise, em alguns casos essa predisposição é somada a um ou mais iniciadores exógenos ou endógenos. Dentro desse modelo é possível que um animal/indivíduo nunca venha a sofrer uma crise epiléptica devido i) a falta de predisposição (genética) ou ii) do(s) estímulo iniciador (es) (33).

2.1. Crise audiogênica.

A cepa de ratos WAR (*Wistar Audiogenic Rats*) descrita por Garcia-Cairasco e colaboradores, (34), teve sua linhagem estabelecida através de seleção genética para crises audiogênicas em uma colônia de ratos Wistar, que apresentaram ratos sensíveis aos estímulos sonoros, e tem sido amplamente

caracterizada comportamentalmente e eletrofisiologicamente tanto durante a ocorrência de crises convulsivas agudas quanto crônicas. Nesses animais, após um estímulo sonoro de alta intensidade (120 dB SPL) ocorre uma crise convulsiva do tipo tônico clônica generalizada seguida por espasmos clônicos (35; 36; 37; 38; 39). Entretanto, ainda pouco se conhece a respeito das alterações genético-moleculares envolvidas com a susceptibilidade (predisposição genética) à essas crises.

Além da linhagem WAR, existem outros modelos animais de crises audiogênicas desenvolvidas através de seleção genética descritos na literatura. A primeira descrição de modelos desse tipo foi estabelecida por um grupo de pesquisa soviético em 1920 onde desenvolveram a linhagem Krushinsky-Molodkina derivado da linhagem Wistar (40). Na década de 50 outra linhagem foi desenvolvida por um grupo americano (41) e em 1980 em Strasbourg, França, apresentou outra cepa de animais com crises audiogênicas (42).

Quando submetidos à estimulação sonora de alta intensidade os ratos WAR apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas, que se caracterizam por episódios de corridas, pulos e quedas atônicas, seguidas de convulsão tônica, convulsões clônicas parciais e generalizadas e espasmos clônicos, tais eventos fazem parte das crises audiogênicas agudas. Após a repetição contínua dos estímulos sonoros, novas áreas do cérebro começam a ser integradas e os animais passam a apresentar crises límbicas, (43). À indução de crises límbicas em animais normais mediante uso de estímulos elétricos sub-limbiares, administrados repetidamente por um período determinado de tempo denomina-se

abrasamento ou *kindling* (44). Portanto usa-se o termo abrasamento para se referir à evolução progressiva da gravidade das crises em resposta à administração periódica e constante de um estímulo qualquer, inicialmente sublimiar (45).

No caso das crises audiogênicas agudas caracterizam-se pela participação de estruturas do tronco encefálico, tais como, o colículo inferior (CI), colículo superior (CS), substância negra, formação reticular e substância cinzenta pariaquedutal (46; 47; 48; 49). Entre estas estruturas o CI desempenha um importante papel como ponto-chave para o início das crises (Fig. 1A), isto foi demonstrado através de lesões bilaterais no CI, no lemnisco lateral (LL) e lesões atingindo a transição entre o LL e CI, estas, bloquearam completamente as crises audiogênicas (49). Para corroborar essas hipóteses, Terra e Garcia-Cairasco, (50) administraram micro-injeções de NMDA (N-metil-D-aspartato) em animais resistentes a este tipo de crise e antagonista do receptor de NMDA em animais susceptíveis, ambas as micro-injeções foram administradas no subnúcleo do CI, o resultado desses experimentos demonstraram que os animais resistentes, os quais receberam doses de NMDA, apresentaram crises de características audiogênicas após estímulos sonoros e os animais susceptíveis que receberam doses do antagonista do receptor NMDA tiveram bloqueio das crises. McCown e colaboradores (51; 52) mostraram que estimulação elétrica no CI foi capaz de induzir crises de comportamento semelhante a animais com crises audiogênicas. Já o CS tem um importante papel na integração das áreas motoras e sensoriais na linhagem audiogênica, pois após transecções unilaterais no CS os WARs

apresentavam redução ou bloqueio de crises tônico-clônicas e já com transecções bilaterais, além disso, redução ou bloqueio das crises tônico-clônicas havia também redução dos episódios de corrida (36; 53; 54).

Após as várias repetições de estímulos sonoros, de acordo com protocolos específicos, se modificam a expressão motora e eletroencefalográfica das crises para um padrão de crises límbicas, também denominadas crises de lobo temporal (55; 56; 57). Esta modificação na expressão motora ocorre concomitantemente ao recrutamento de estruturas límbicas, como, amígdala, hipocampo e neocórtex, como mostra a Fig. 1B (36). Este recrutamento através de estimulações repetitivas tem sido denominado de abrasamento audiogênico, devido à semelhança de sua manifestação comportamental ao estímulo elétrico da amígdala. Além disso, observou-se que o recrutamento límbico foi reavaliado com um novo estímulo sonoro, após dois meses de intervalo, observa-se permanência da fenomenologia da crise límbica, dependente de rearranjos na amígdala, córtex piriforme e perihinal (neocórtex), assim, o abrasamento audiogênico constitui um modelo de crise parcial complexa (43).

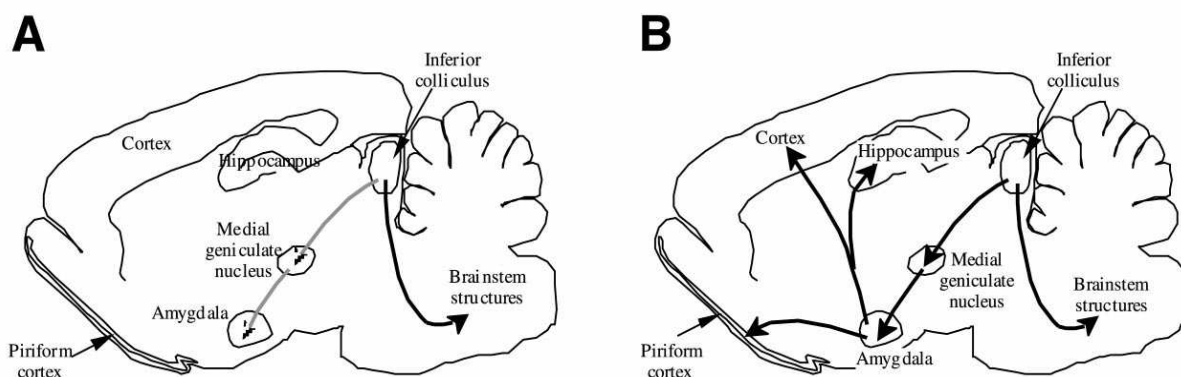


Figura 1. Recrutamento das estruturas cerebrais durante as crises agudas e abrasamento audiogênico. Durante uma simples crise audiogênica (A) inicia-se no CI e propaga para outras estruturas do tronco encefálico e as descargas propagam fracamente para a amígdala através do núcleo geniculado medial. Durante o abrasamento (B) mostra o recrutamento de outras estruturas límbicas (58).

As crises epiléticas podem ser geradas por um desequilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal, onde glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico) assumem um papel importante. Neste contexto, há a hipótese de que possa haver um aumento na ativação da via que utiliza o glutamato como neurotransmissor e/ou uma diminuição na via que utiliza o GABA como neurotransmissor (6). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório presente em estruturas cerebrais superiores e aproximadamente 40% de todas as sinapses cerebrais dos vertebrados são GABAérgicas (59; 60). O receptor GABAA possui além dos sítios de ligação para o GABA e seus agonistas e antagonistas diretos, sítios alostéricos para drogas GABAérgicas. Apesar deste receptor promover rápida e potente inibição dos neurônios pós-sinápticos, essa propriedade parece depender do sítio de ação e da fase do desenvolvimento e maturação do SNC. Assim, em certas situações, a ativação dos receptores GABAA pode levar à despolarização neuronal no lugar de promover hiperpolarização, mostrando que o GABA também pode ter atividade excitatória (61; 62).

Contudo uma diminuição na inibição mediada por GABA leva a um aumento da excitabilidade podendo levar ao aparecimento de uma atividade epilética, e

através de estudos eletrofisiológicos em cultura primária de neurônios de hipocampo, demonstrou-se uma redução nas correntes inibitórias GABAérgicas e os níveis de correntes excitatórias glutamatérgicas mantiveram-se normais nos neurônios de WARs, além disso o tempo de ativação é significativamente mais rápido, esse é um importante achado relacionado com a epileptogênese no modelo WAR, assim, essa redução pode estar relacionada tanto a uma modificação endógena pós-sináptica no receptor GABAA, ou uma redução na densidade de subunidades específicas deste receptor (38).

Através da análise dos transcritos de um dos receptores de glutamato, o AMPAR, Gitaí e colaboradores, (39), mostraram que os níveis de transcritos da subunidade *GluR2-flip*, deste receptor de glutamato, estão aumentados no hipocampo de WARs submetidos a crises audiogênicas agudas e crônicas quando comparados com WARs que não passaram por estímulo sonoro e Wistar resistentes, além disso, verificou-se que este aumento ocorre significativamente apenas na região CA1 da formação hipocampal, podendo contribuir para uma maior excitabilidade neuronal, sendo o glutamato um importante neurotransmissor excitatório.

2.2. Crise de ausência.

Dentre os modelos de epilepsia espontânea de crise de ausência destaca-se o modelo desenvolvido por Marescaux e Vergnes (63), ratos de Strasbourg ou

GAERS. Esses autores buscavam desenvolver um modelo experimental para crise epiléptica parcial quando verificaram que 30% dos ratos Wistar controles da cepa em estudo apresentavam espontaneamente complexo espícula-onda, síncronos e bilaterais, com frequência média de $9 \pm 0,5$ Hz (7-11 Hz) e duração de 17 ± 10 segundos (faixa de 0,5 a 75 segundos). Durante a crise os ratos permaneciam imóveis, com olhar fixo, apresentando frequentemente nistagmo e clonia facial. Segundo esses autores as crises se iniciam no tálamo lateral e posteriormente aparecem no córtex e, se bem que com menor amplitude, no estriado. Os fusos de sono e o complexo espícula-onda são recrutados no tálamo lateral e a sincronização do circuito tálamo-cortical no núcleo reticular talâmico, formando a base dessas oscilações rítmicas. Não foram registradas crises no núcleo mediano e no anterior, que estão conectados com estruturas límbicas e o hipotálamo e estão envolvidos nas emoções e em funções viscerais (63). O hipocampo, a área septal, a amígdala, o giro cíngulo e o córtex piriforme não participam da crise epiléptica desses animais (64). A origem da espícula-onda é uma herança autossômica dominante, o que possibilitou isolar e manter uma colônia com 100% de ratos com esse tipo de crise (63).

Além do modelo descrito acima, há a cepa de ratos WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk) (65; 66) que apresenta semelhanças com a epilepsia de ausência de humanos quanto aos paroxismos eletroscilográficos e correlatos clínicos (67; 68). Os animais adultos dessa linhagem apresentam surtos espontâneos de complexos espícula-onda com frequências de 7 a 9 Hz aproximadamente, duração

média de 5 segundos cada surto durante a vigília relaxada e sono sincronizado, além disso, esta cepa é obtida por cruzamento endogâmicos e a herança genética é determinada por gene autossômico recessivo (69; 70).

Outro modelo de crise de ausência é a cepa identificada pela Profa. Dra Angela Valle da Universidade de São Paulo-USP, nesses animais as crises espontâneas de caracterização fenomenológica sugestiva de crises de ausência são acompanhadas por completa imobilidade e duração, que varia de 2 a 30 segundo, em alguns casos tais crises duraram mais de 90 segundos (Valle, em preparação). Concomitantemente com esses aspectos comportamentais, os registros eletrencefalográficos apresentaram complexos espícula-onda que oscilam na faixa de 7 Hz em várias regiões do encéfalo, discrepando dos demais modelos conhecidos porque os surtos de espícula-onda ocorrem não só em áreas corticais e no tálamo como também no hipocampo, cerebelo e núcleo reticular oral da ponte (71; 72; 73). A similaridade dos aspectos comportamentais e eletrofisiológicos observados com os achados clínicos existentes leva a acreditar que se trata de animais com epilepsia generalizada do tipo ausência (*generalized epilepsy with absence seizures*, GEAS), muito embora existam algumas características espécie-específicas.

Esta cepa de ratos mantida no Departamento de Patologia da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, GEAS como referido acima, é espontaneamente epiléticos, com potenciais epileptógenos e complexos espícula-onda surgindo não somente no neocórtex e vários núcleos talâmicos mas também nos campos CA1 e CA3 do hipocampo, no córtex cerebelar e até no

núcleo reticular oral da ponte, fenômenos esses inteiramente novos em fisiologia da epilepsia, humana ou experimental (71; 72; 73).

3. Análise de Expressão em Larga Escala.

Há muitas maneiras de verificar os níveis de expressão gênica, incluindo *northern-blot*, análise serial da expressão gênica (SAGE) e RT-PCR, porém estas técnicas são inadequadas para os estudos de expressão de vários genes simultaneamente. O SAGE é baseado no sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA e apresenta algumas limitações como, necessidade de marcadores específicos de sequências de RNAm e de sequenciamento de um número elevado de tags (sequências pequenas do genoma) para o monitoramento de genes raramente expressos. O monitoramento dos perfis de expressão gênica usando microarranjos de DNA permite a análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo (74). Essa tecnologia tem sido aplicada com sucesso para avaliar diferentes processos celulares e teciduais em modelos animais e humanos, incluindo o sistema nervoso central (75; 76; 77; 78). A disponibilidade comercial de lâminas contendo microarranjos de alta-densidade permitiu um ganho significativo na qualidade, sensibilidade e reprodutibilidade dos dados obtidos permitindo a detecção de pequenas alterações na expressão gênica que se traduzem em significantes fenótipos celulares e teciduais.

4. Justificativa.

Diante dos poucos estudos moleculares da linhagem WAR e de não haver estudo de expressão da cepa GEAS, a análise do perfil global de expressão gênica é a melhor alternativa para caracterizá-los do ponto de vista molecular. Com esta análise é possível identificar genes e vias metabólicas mais ativadas e se existe vias comuns entre esses modelos distintos, assim auxiliando na elucidação dos mecanismos envolvidos na predisposição a epilepsia nesses dois modelos.



OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Caracterizar e comparar o perfil de expressão gênica em dois modelos animais genéticos de epilepsia: o modelo de crise audiogênica (WAR) e o modelo de crise generalizada do tipo ausência (GEAS).

2. Objetivos Específicos

- Realizar análise de expressão em larga escala utilizando a tecnologia de microarranjos, definindo assim o perfil de expressão nos dois modelos animais estudados.
- Validar os resultados obtidos por PCR em tempo real, identificando vias de sinalização relevantes, presentes nos modelos WAR e GEAS.



MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Os ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem WAR e os controles Wistar são mantidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB – UFMG - MG em condições controladas de iluminação com ciclos de 12hrs luz/escuro, com acesso a comida e água. Os ratos que apresentam crises espontâneas do tipo de ausência (GEAS) são mantidos no Departamento de Patologia da Escola de Medicina – USP - SP nas mesmas condições citadas acima. A cepa WAR está na geração F80 de cruzamentos endogênicos e a cepa GEAS está na F20. Todos os experimentos tiveram a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG e da USP (Anexo).

2. Avaliação comportamental

Os animais da linhagem WAR foram submetidos à estimulação sonora de alta intensidade (120 dB) com o início da crise até no máximo 1 minuto após o estímulo. O teste foi realizado 3 vezes, 1 vez por semana (*screening*), aos 70, 74 e 78 dias de idade. Para essa análise foi utilizado como controle ratos da linhagem Wistar que não apresentam crise audiogênica com mesma idade dos animais experimentais e estes foram submetidos exatamente aos mesmos testes que os animais WARs e foram selecionados os ratos Wistar que não apresentaram nenhuma resposta ao estímulo sonoro e os WARs $IS \geq 0.85$ em todos os três testes do *screening*.

As crises audiogênicas agudas se caracterizam por episódios de corridas, seguidos de convulsão tônica, convulsões clônicas parciais ou generalizadas e espasmos clônicos (43). A gravidade das crises foi avaliada pelo índice de severidade (IS), de acordo com a metodologia previamente descrita por Garcia-Cairasco e Sabbatini, (35) e posteriormente aprimorada por Garcia-Cairasco *et al.*, (57).

Os animais com crise de ausência (GEAS) foram identificados a partir de registros eletroscilográficos a partir dos cinco meses de idade. O registro foi realizado através da implantação de eletrodos bilateralmente nas áreas corticais frontais, parietais-somestésicas e occipitais, nos campos CA1 do hipocampo e núcleos talâmicos da linha média e intralaminares. A série de registros iniciou geralmente no sétimo dia após a implantação dos eletrodos. Os registros foram realizados com eletrencefalógrafos Nihon-Kohden de 21 canais, acoplados a um sistema digital de aquisição de dados LINX, com programa de conversão analógico-digital. Para o registro os ratos foram colocados em uma gaiola de Faraday metálica e por intermédio de um soquete macho os eletrodos foram conectados ao painel de entrada do eletrencefalógrafo. Os primeiros 30 minutos de permanência na gaiola foram destinados à sua adaptação ao novo ambiente. Os eletroscilogramas foram registrados com sensibilidade de 50 μ V e filtros na faixa de frequências entre 0,5 Hz e 70 Hz e amostragem de 256 pontos por segundo para aquisição digital. A duração do registro foi de 4 às 6h, o suficiente para se adquirir uma boa amostragem dos eletroscilogramas de todas as fases do ciclo vigília-sono. Os animais com crise de ausência apresentaram descargas em

cerca de 7 Hz. Os controles foram ratos da cepa Wistar e estes animais passaram pelos mesmos procedimentos dos animais GEAS comprovando que estes animais não apresentam crises de ausência.

3. Análise de Expressão em larga escala

Os animais após passarem pelos procedimentos de identificação da susceptibilidade às crises audiogênicas descritos acima, foram separados em dois grupos: Wistar controle (não suscetível), n=5 e grupo WAR (suscetível), n=5, os quais tiveram o cérebro dissecado e as seguintes regiões separadas para o procedimento de extração de RNA: hipocampo e placa quadrigêmea (CI e CS). Os animais com crises de ausência que passaram pelos procedimentos de identificação citados acima e apresentaram complexos espícula-onda com frequência de aproximadamente 7 Hz tiveram o cérebro dissecado e os tecidos separados foram: córtex somestésico e hipocampo de animais Wistar (controles) e GEAS (n=5). Os tecidos foram imediatamente imersos em *RNA later* (Ambion) e trazidos para o Laboratório de Genética Molecular da UNICAMP e armazenados a -80° C. Procedimento semelhante foi realizado para os ratos GEAS, que tiveram seus hipocampus e córtex somestésico retirados após a constatação da suscetibilidade espontânea a crises.

As amostras foram retiradas do *RNA later* (Ambion) e imediatamente maceradas em tubos de 1,5 ml com 500 ul de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA,

EUA) e depois foram acrescentados 500 μ l do reagente e a extração do RNA foi segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (1ml do reagente para cada 100mg de tecido). A concentração do RNA total extraído de cada amostra foi aferida por densidade óptica através da espectroscopia e a qualidade do RNA checada por eletroforese em gel de agarose.

Seguindo recomendação da fabricante *Affymetrix*TM as amostras de RNA total foram purificadas adicionando-se 1:10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2,5 vezes o volume de etanol 100%. Em seguida, foram homogeneizadas e incubadas a -20°C durante uma hora. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C a 12000 G, com posterior remoção do sobrenadante, acréscimo ao *pellet* de 1 mL etanol 80% e nova centrifugação por 10 minutos a 4°C a 12000 G, repetindo-se este procedimento duas vezes. Logo após retirou-se o sobrenadante deixando evaporar todo resíduo de etanol. Finalmente, ressuspendeu-se o pellet em 10 μ L água livre de *RNAse*

4. Sistema *Affymetrix*

Para este estudo foram utilizados os *chips GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array*, que contém 31042 transcritos de modo a cobrir todo o genoma. As sequências de cada *array* são derivadas dos bancos de dados GenBank®, dbEST e RefSeq. Os dados completos, incluindo anotações das sequências e dos genes podem ser adquiridos no NETAFFXTM (www.affymetrix.com/analysis/index.affx).

Além das lâminas mencionadas, foram usados os kits *3' IVT Express Kit Assay e Hybridization, Wash and Stain* para a obtenção do cDNA, aRNA, marcação, hibridização, detecção e lavagem. A leitura dos chips será através do GeneChip Scanner 3000.

4.1 Preparação dos Alvos

Síntese da primeira fita de cDNA: Prepara-se uma solução contendo RNA total (variável de 500 ng – 50 ng) e controle de Poly-A RNA (2 µL), ajusta-se para um volume final de 5 µL com água DEPC, após a preparação dessa solução acrescenta-se 4 µL de *First-Strand Buffer Mix* e 1 µL *First-Strand Enzyme Mix* e incubar por 2 horas a 42°C.

Síntese da segunda fita cDNA: Adiciona-se ao produto da primeira síntese, 5 µL de *Second-Strand Buffer Mix*, 2 µL *Second-Strand Enzyme Mix* e 13 µL água DEPC. Incuba-se por 1 hora a 16°C seguido por 10 minutos a 65°C.

Transcrição in vitro e síntese do aRNA: Adiciona-se ao cDNA os reagentes, IVT Biotin label (4 µL), IVT Labeling Buffer (20 µL) e IVT Enzyme Mix (6 µL). Incubar a 40°C por 16 horas.

Purificação do cRNA: Adiciona-se 10 µL de RNA Binding Beads e 50 µL de aRNA Binding Buffer Concentrate a solução de aRNA, transfere-se as amostras para uma placa e acrescenta-se 120 µL de etanol agitando-se por 2 minutos a 300-500 RPM, após isto move-se para uma placa magnética para a captura das beads magnéticas por 5 minutos. Retira-se o sobrenadante e acrescenta-se 100

µL de aRNA wash solution em cada amostra agitando por 1 minuto a 700-900 RPM, repete-se este passo duas vezes, logo após retira-se o sobrenadante agitando a placa por 1 minuto a 1000-1200 RPM para evaporar qualquer resíduo de etanol. Adiciona-se 50 µL pré-aquecido (50-60°C) de aRNA Elution Solution em cada amostra agitando por 3 minutos a 1000-1200 RPM, após esta etapa, incubase na placa magnética por 5 minutos para que haja a captura das beads transferindo o sobrenadante para novos tubos.

Após estes passos, deve-se fazer a mensuração da absorbância a 260nm e 280nm para se determinar a concentração e a razão A260:A280, que deverá ser maior que 1:8.

Fragmentação do cRNA: Prepara-se uma reação de 15 µg de aRNA, 5x tampão fragmentação (8 µL) e completa-se o volume com água livre de nucleotídeos para 40 µL. Incuba-se 94°C por 35 minutos.

4.2 Hibridização e Detecção

Hibridização: Prepara-se uma reação com volume final de 250 µl contendo: aRNA fragmentado (12,5 µg), oligonucleotídeo B2 (4,5 µL), controles de hibridização (20 µL), DMSO (25 µL), tampão de hibridização 2x (125 µL) e água DEPC (50 µL). Aquece-se por 5 minutos a 99°C. Incuba-se o array com o tampão de hibridização por 10 minutos 45°C. Transfere-se a reação incubada a 99°C para um bloco a 45°C por 5 minutos. Remove-se o tampão do array e hibridiza-se com a solução em forno de hibridização por 16 horas a 45°C em rotação de 60 rpm.

Lavagem e Detecção: Remove-se a solução do array e completa-se volume com tampão de lavagem. Prepara-se 600 µL de Stain Cocktail 1 e 2, e 800 µL de Stain Cocktail 3. Estas soluções devem ser colocadas na estação fluídica como indicado pelo manual do fabricante para lavagem e detecção.

4.3. Aquisição de imagem e análise dos dados

As imagens de cada array foram adquiridas com o GeneChip Scanner 3000. O processamento de dados foi feito usando o algoritmo MAS 5.0 da *Affymetrix*, após isto, foi feito em ambiente R com pacotes *Affy* e *RankProd* do *Bioconductor* a avaliação da diferença de expressão, foi considerado significativo valores de $p \leq 0,01$ e $p_{fp} \leq 0,05$. A correlação e a interação de vias foram identificadas com o programa MetaCore (Thomson Reuters®, New York, EUA) . Este programa baseia-se na identificação dos genes diferencialmente expressos e respectivos valores de *fold change* para gerar hipóteses das interações entre as moléculas e vias de sinalização ativas ou inativas, fornecendo informação do contexto biológico das amostras analisadas.

5. Validação dos resultados por PCR em Tempo Real

Para validar os resultados encontrados pela análise de expressão em larga escala, utilizamos a técnica de PCR em tempo real que esta descrita abaixo.

Foram escolhidos genes para os quais foi detectada uma expressão diferencial significativa e que, além disso, apresentam função biológica relevante no processo de epileptogênese. Para a validação foram utilizadas as mesmas amostras usadas nos experimentos de microarranjo. Além disso, foi utilizado para essa análise um grupo de cinco animais WAR que não passaram pela estimulação sonora.

5.1. Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando 3,5U da enzima *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Um micrograma de RNA total 250 ng de oligos randômicos, 2 µL de Tampão, 1 µL de dNTP mix (10 mM) e água para um volume de 14 µL, sendo as amostras incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 15 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C.

5.2. Protocolo de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas pelo sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizados ensaios otimizados e validados (Assays-on-DemandSM - Applied Biosystems) para os

genes de interesse presentes em vermelho da tabela 2-4, os quais a empresa mantém em sigilo a sequencia dos iniciadores. As sondas foram marcadas com o fluoróforo FAM. O gene escolhido como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes de interesses nas diferentes amostras foi o *Gdi2*, a escolha deste gene foi através de uma ferramenta desenvolvida pelo grupo de bioinformática do laboratório, que analisa o desvio padrão relativo de cada gene ou *probeset* em todo o experimento (79).

Antes de se iniciarem 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 são 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 de 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 são obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é 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 tem por

finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, são 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, obtém-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é 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 estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de PCR em tempo real estão sendo realizadas em triplicata 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 (concentração de acordo com o experimento de validação), sendo que no controle negativo, adicionará 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas serão: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa estão sendo 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 foi utilizado o teste Mann–Whitney–Wilcoxon, o qual é um teste não paramétrico, este foi realizado em ambiente R.



RESULTADOS

1. Análise do perfil de expressão gênica dos animais epiléticos comparados com controles Wistar

1.1. Normalização

A primeira etapa para análise dos dados de microarranjo para expressão diferencial é a realização do pré-processamento, após a aquisição dos dados brutos obtidos pelo escaneamento dos microarranjos, para isso foi utilizado o algoritmo MAS 5.0 (*Microarray Suite 5.0*), o qual é um algoritmo estatístico usado para avaliar a significância dos dados e calculando o sinal através da diferença dos sinais *perfect-match* e *mis-match*, assim eliminando as hibridizações inespecíficas (80).

Os objetivos da etapa de pré-processamento de dados são as correções do *background*, seguida da normalização dos valores de expressão dentro de cada microarranjo e entre os microarranjos (para ajustar os valores de expressão pelos microarranjos), removendo assim variantes da técnica e erros sistemáticos, sem alterar a variação biológica dentro dos dados, assegurando assim que os resultados apresentem altos níveis de acurácia. Para tanto são utilizados arquivos *.CEL, ou seja, arquivos brutos gerados pela leitura do *GeneChip Scanner 3000*. A tabela 1 apresenta o total de transcritos depois de realizada todas as etapas de processamento e normalização dos dados e excluídas as sondas que não foram detectadas pelo algoritmo como não expresso em todas as mostras. O algoritmo

de detecção considera a sonda como não expresso quando a diferença entre *perfect-match* e *mis-match* não é significativo.

Tabela 1: Total de transcritos expressos em pelo menos uma amostra de cada grupo: controle Wistar x WAR hipocampo; controle Wistar x WAR placa quadrigêmea; controle wistar x GEAS hipocampo; controle Wistar x GEAS córtex somestésico.

Grupos	Transcritos expressos
Controle Wistar x WAR Hipocampo	22259
Controle Wistar x WAR Placa quadrigêmea	22090
Controle Wistar x GEAS Hipocampo	22034
Controle Wistar x GEAS Córtex somestésico	22280

A figura 2 permite observar os gráficos de histograma para a placa quadrigêmea e hipocampo (A e B) e a figura 3 e 4 o box-plot para ambas as regiões (A e B) antes e pós normalização e correção de background, das amostras dos animais susceptíveis e dos controles, demonstrando o ajuste das intensidades dos sinais. Os dados dos microarranjos do modelo GEAS tiveram o mesmo tratamento descrito acima (figuras 5 e 6).

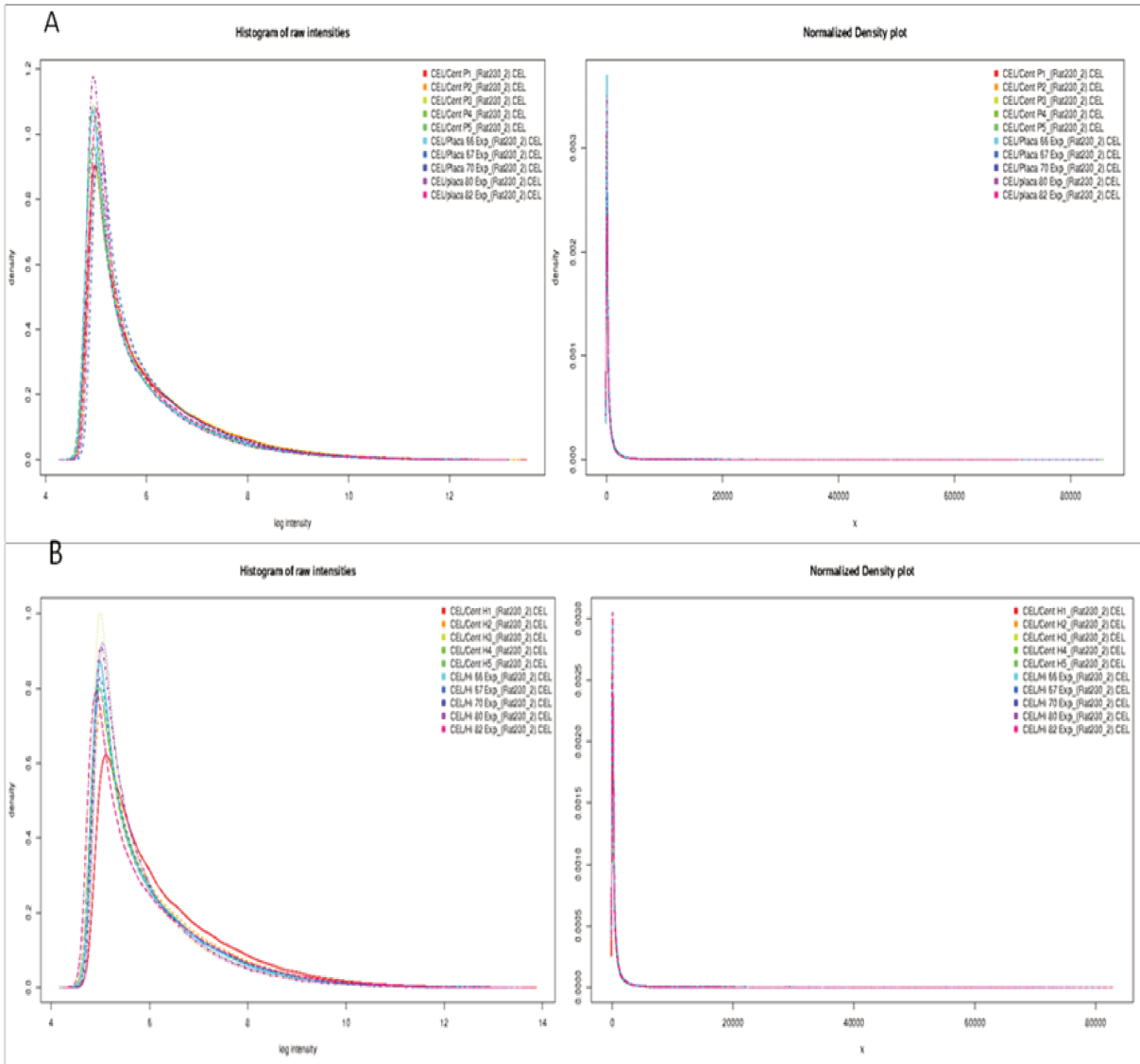


Figura 2: Histograma dos *arrays* dos ratos WAR. (A) placa quadrigêmea; (B) hipocampo, gráficos a esquerda: dados brutos e a direita: após normalização.

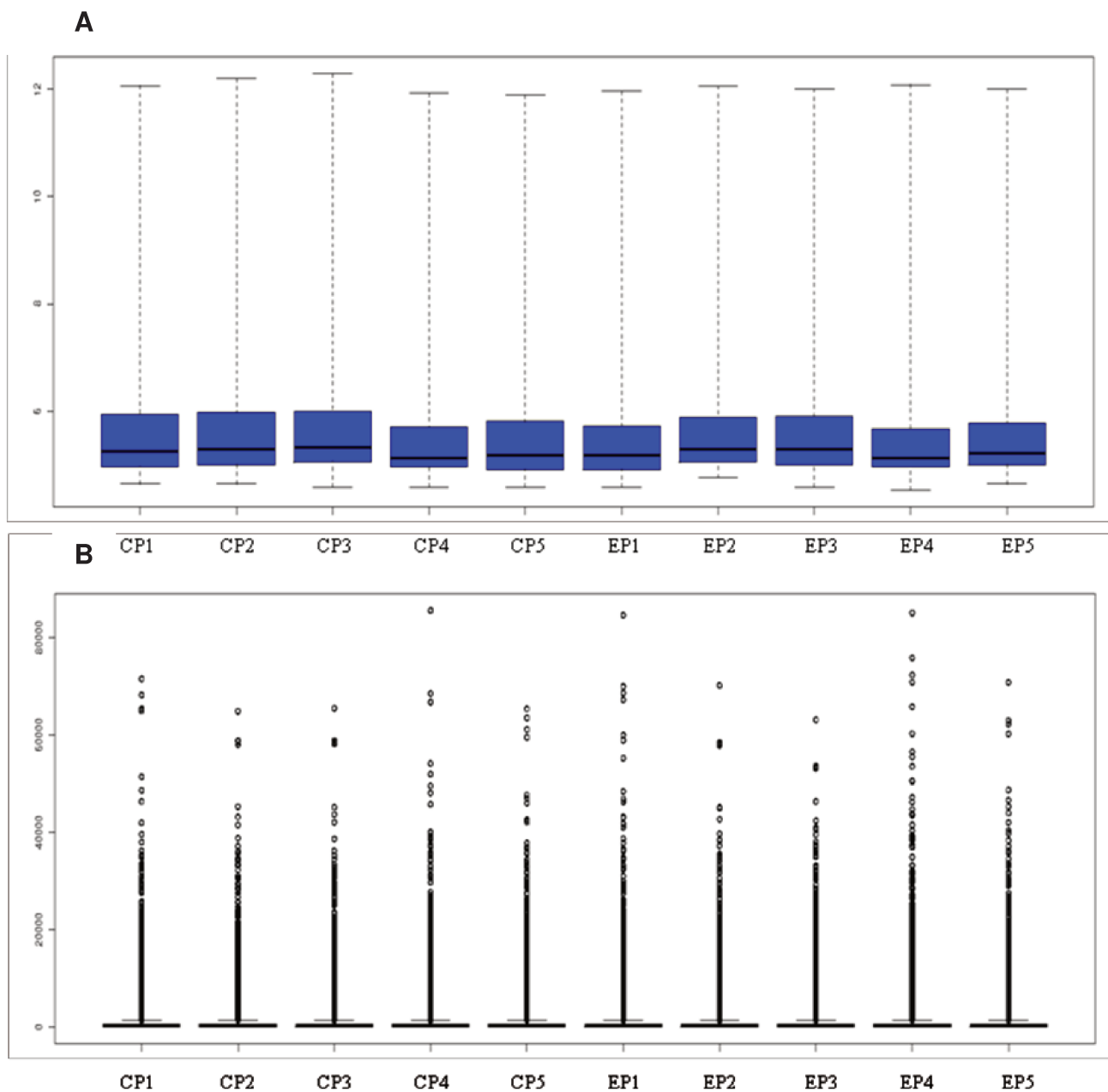


Figura 3: Box-plot dos *arrays* da placa quadrigêmea dos ratos WAR. (A) dados brutos e (B) após normalização. CP, controle wistar placa quadrigêmea; EP, animal experimental WAR placa quadrigêmea.

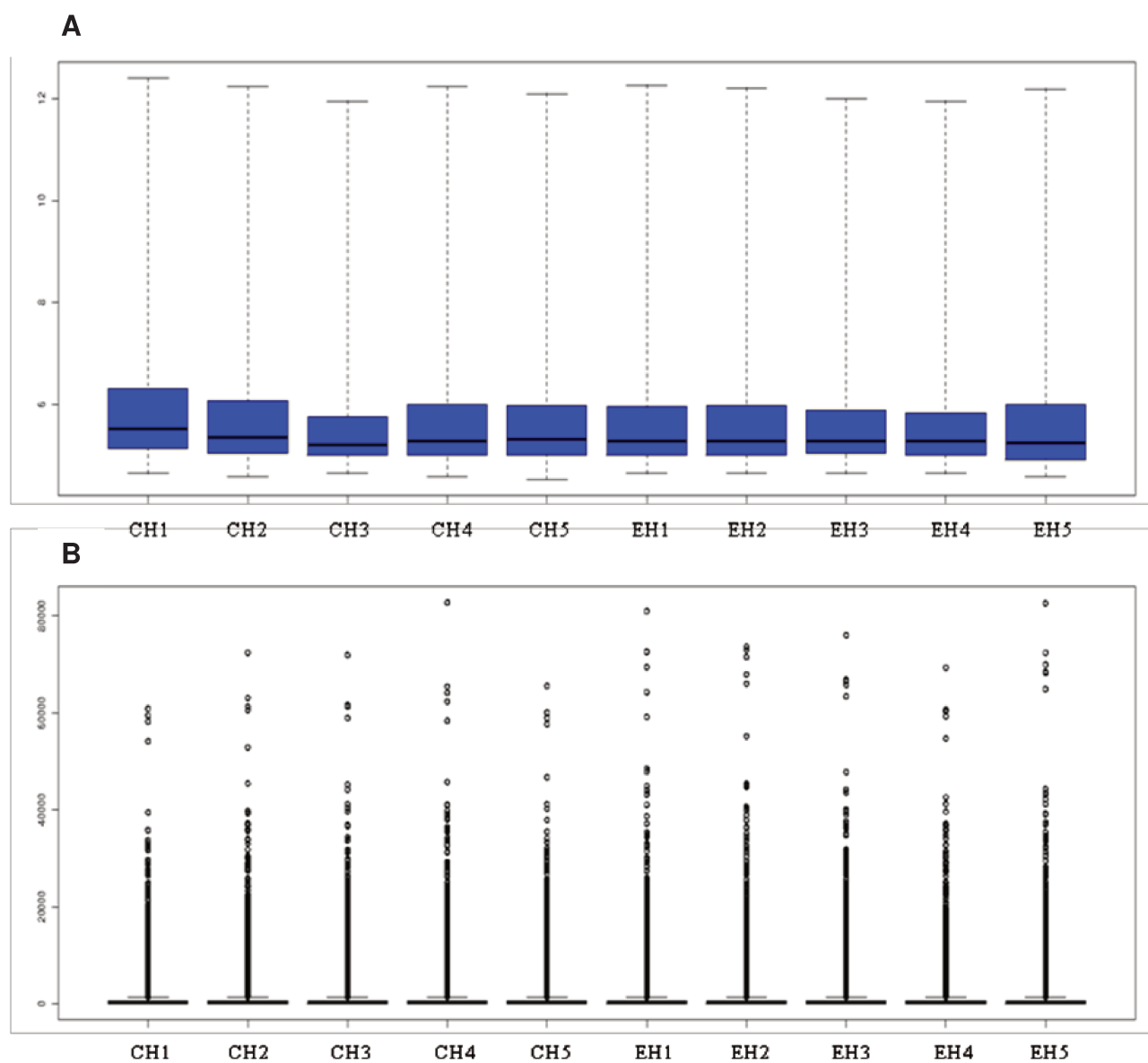


Figura 4: Box-plot dos *arrays do hipocampo* dos ratos WAR. (A) dados brutos e (B) após normalização. CH, controle wistar hipocampo; EH animal experimental WAR hipocampo.

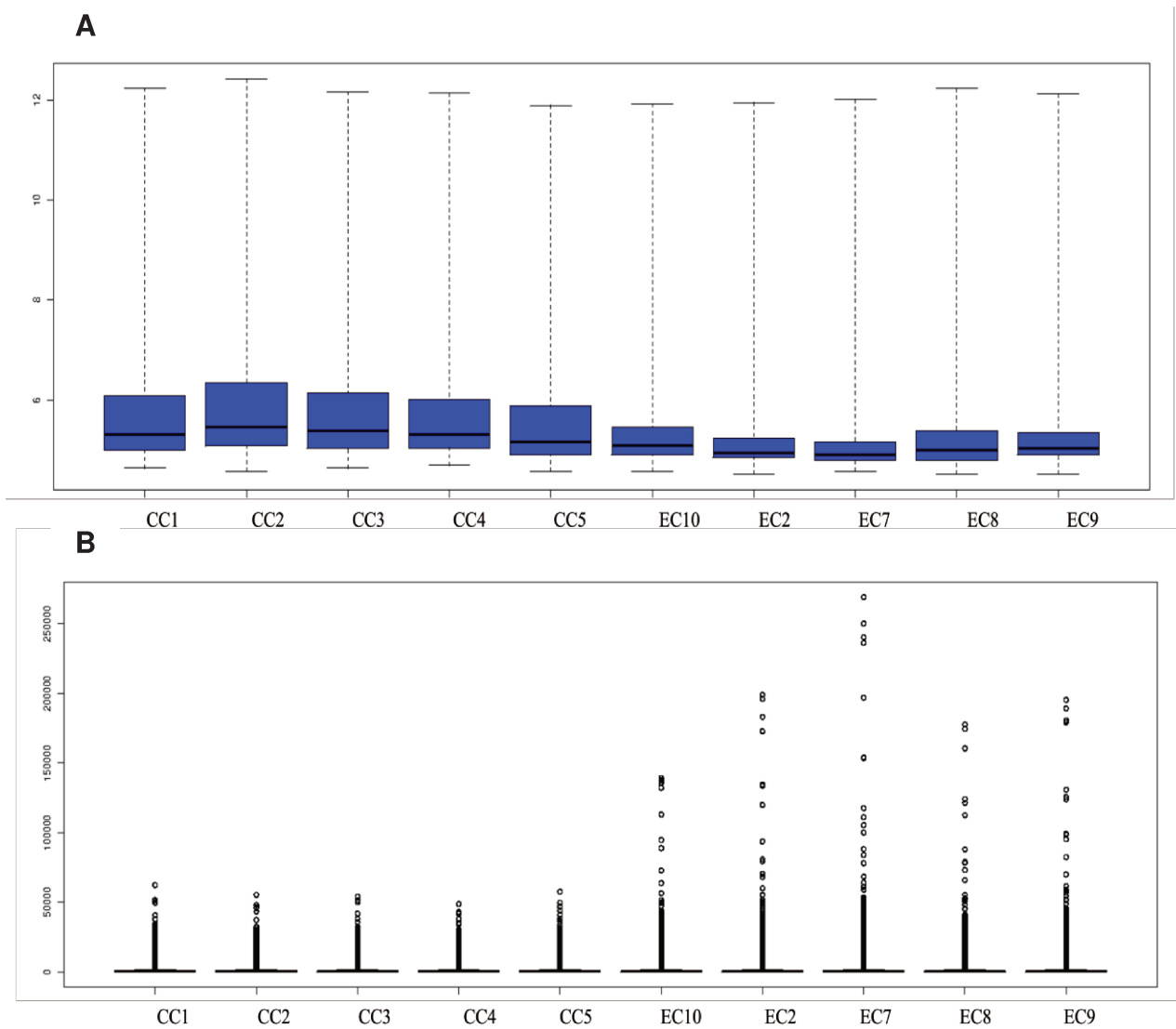


Figura 5: Box-plot dos *arrays do córtex somestésico* dos ratos GEAS. (A) dados brutos e (B) após normalização. CC, controle wistar córtex; EC animal experimental GEAS córtex.

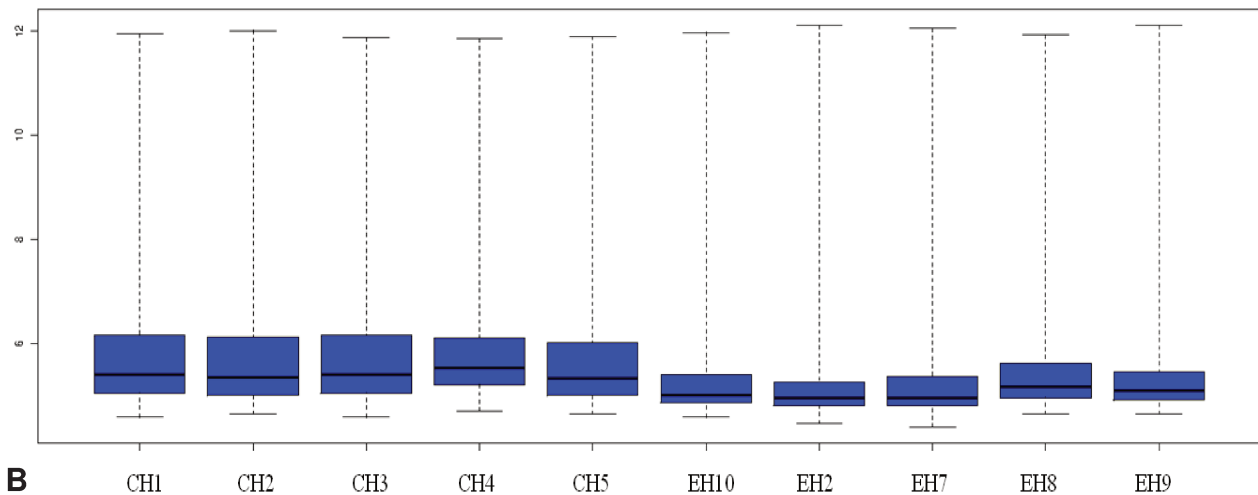
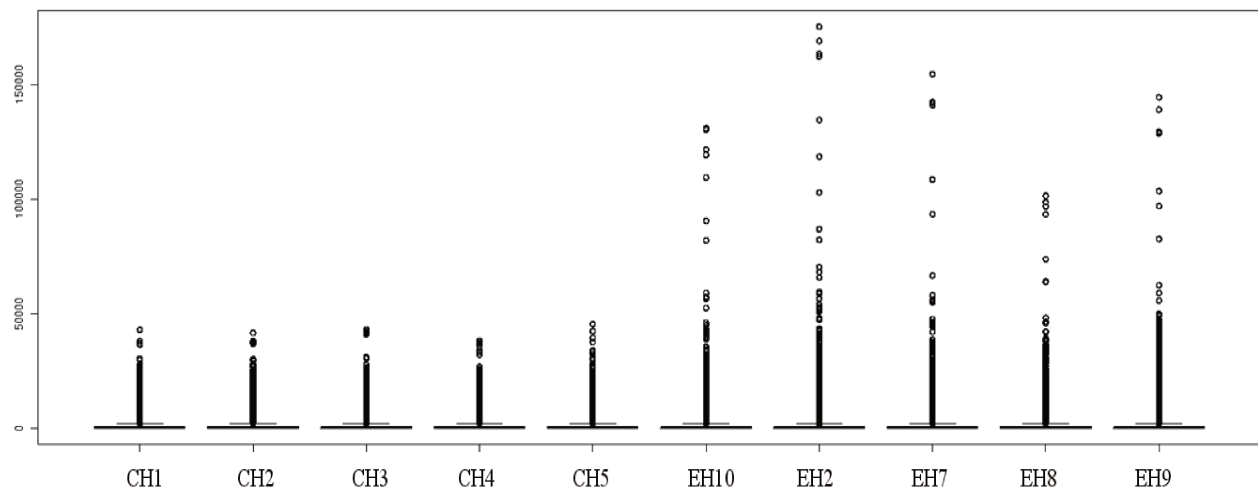
A**B**

Figura 6: Box-plot dos *arrays do hipocampo* dos ratos GEAS. (A) dados brutos e (B) após normalização. CH, controle wistar hipocampo; EH animal experimental GEAS hipocampo.

A partir dos dados normalizados foi realizada a clusterização das amostras, por meio da análise de componentes principais, PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), método que tem por finalidade básica a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha de formas

mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Com o uso do PCA pode-se observar o agrupamento das amostras de microarranjo, ou detectar algum problema nestes agrupamentos, pois é esperado que as amostras de um mesmo grupo apareçam próximas umas das outras no gráfico (81). As figuras 7-10 ilustram o gráfico de PCA com os dados normalizados

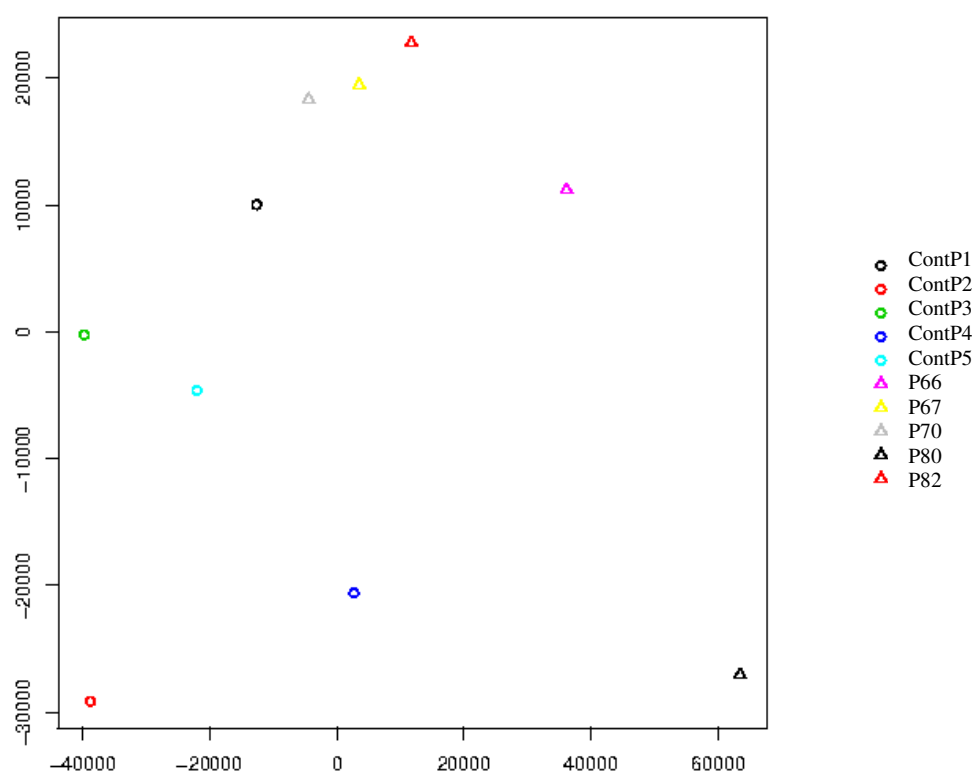


Figura 7: PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e placa quadrigêmea dos ratos WAR. Quanto mais próximos entre si, menor a variância da expressão gênica. ContP, placa quadrigêmea dos controle Wistar; P, placa quadrigêmea do animal experimental (WAR).

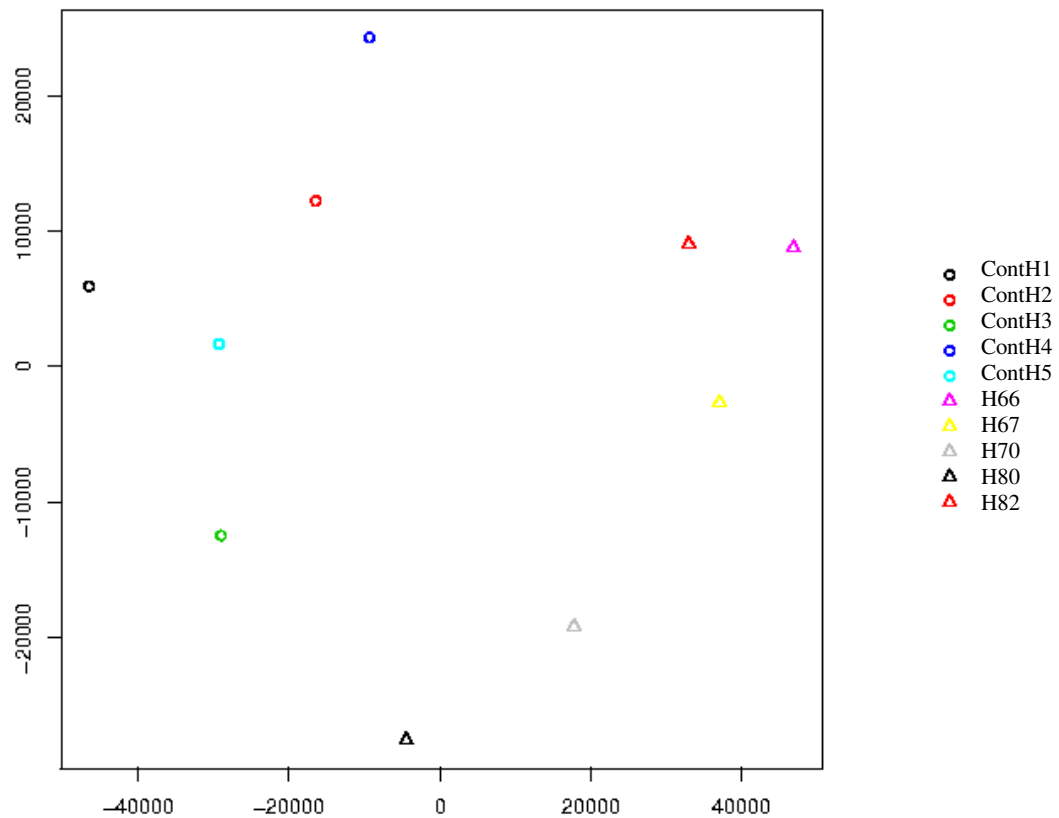


Figura 8: PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e Hipocampo dos ratos WAR. Quanto mais próximos entre si, menor a variância da expressão gênica. ContH, hipocampo do controle Wistar; Hi, hipocampo do animal experimental (WAR).

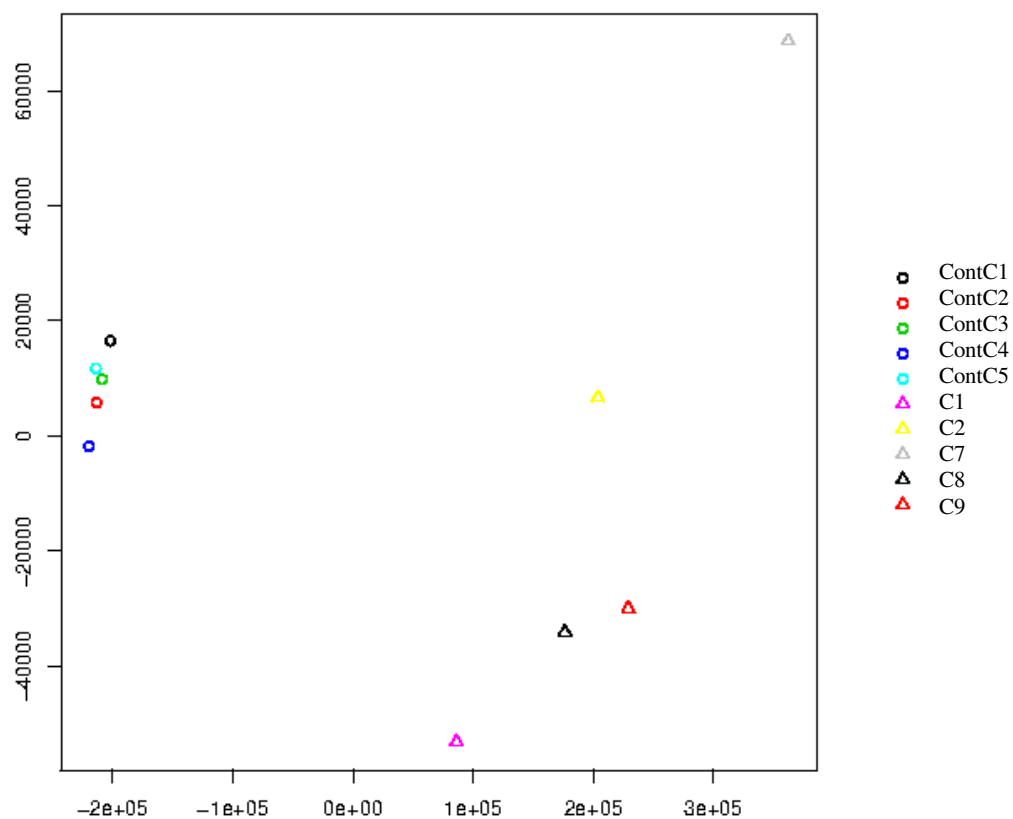


Figura 9: PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e córtex somestésico dos ratos GEAS. Quanto mais próximos entre si, menor a variância da expressão gênica. ContC, córtex somestésico do controle Wistar; C, córtex somestésico do animal experimental (GEAS).

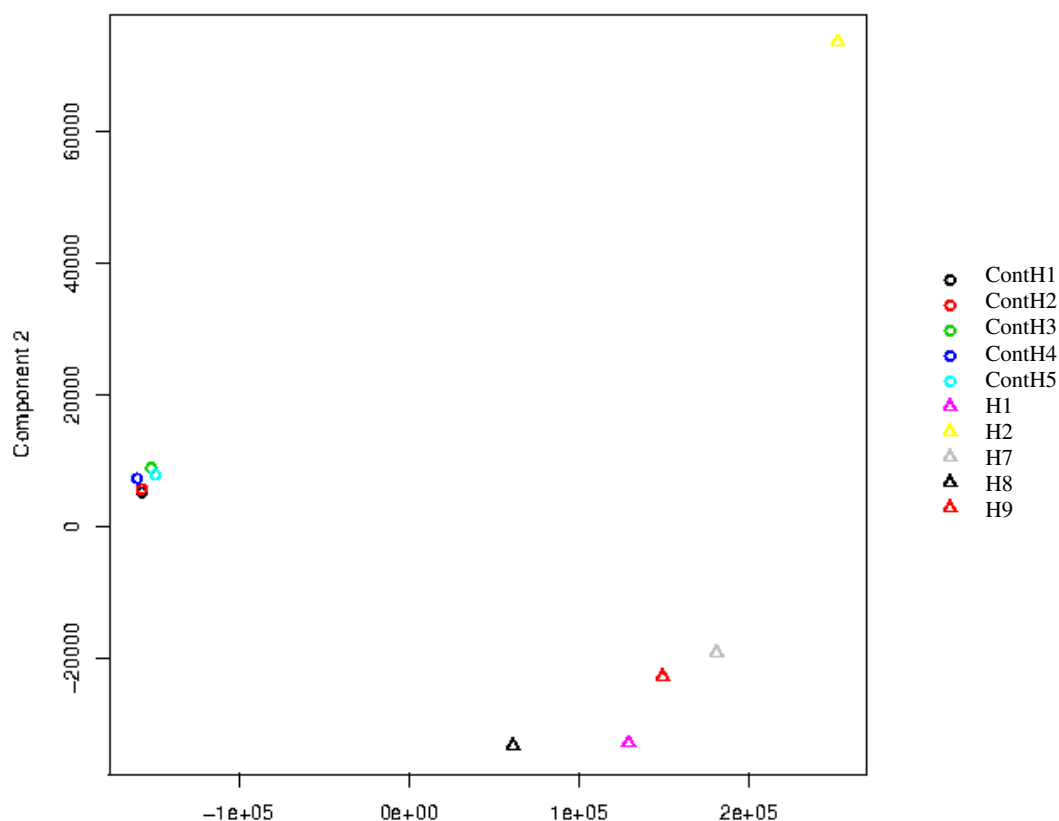


Figura 10: PCA demonstrando a estimativa da variância da expressão gênica entre ratos controles Wistar e Hipocampo dos ratos GEAS. Quanto mais próximos entre si, menor a variância da expressão gênica. ContH, hipocampo do controle Wistar; H, hipocampo do animal experimental (GEAS).

Após a detecção dos dados, os transcritos que estavam ausentes foram removidos e as correções estatísticas para valores de $p \leq 0,01$ e $p_{fp} \leq 0,05$, tivemos nos microarranjos dos animais WAR 1624 genes diferencialmente expressos na placa quadrigêmea e 1351 em comparação com os controles, nos microarranjos dos animais GEAS foram 2282 genes diferencialmente expressos no córtex somestésico e 2307 no hipocampo em comparação com os controles. As tabelas a

seguir mostram os genes com maior e menor expressão nos animais WAR e nos animais GEAS, e os genes candidatos potencialmente envolvidos com o processo de epileptogênese nestes modelos (em vermelho). Os valores de expressão de cada gene gerado após normalização foram analisados utilizando o teste não-paramétrico *Rank Product* (*RankProd*) que possui um algoritmo para identificar genes diferencialmente expressos ao basear-se no raciocínio biológico e usar o *fold change* das replicatas para o ranqueamento dos genes. Esta abordagem tem se mostrado consistente e confiável, mesmo em casos com altos ruídos de fundo é uma ferramenta poderosa para identificar mudanças de expressão (82).

1.2. Resultados WAR

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos: Wistar controle X WAR placa quadrigêmea de ratos WAR. A tabela mostra na primeira coluna o ID *Affymetrix*, segunda coluna é o *fold change* absoluto, o qual é a diferença de expressão entre o controle e o experimental, a terceira coluna é o *fold change* relativo, o qual é a relação entre os espécimes analisados, quarta coluna é o símbolo do gene e tecido, $p \leq 0,01$ e $p_{fp} \leq 0,05$. Em vermelho são os genes que foram selecionados para serem testados por PCR em tempo real.

ID	<i>Fold change absoluto</i>	<i>Fold change relativo</i>	Gene	Tecido
1388694_at	354,4848	4,907753125	<i>RT1-T24-3</i>	Placa
1396060_at	166,9726	3,509129854	<i>Creg2</i>	Placa
1395020_at	492,9976	3,174510335	<i>Plekhh1</i>	Placa
1391347_at	675,8321	3,01466906	<i>Rab8b</i>	Placa
1371123_x_at	486,7101	2,603710297	<i>RT1-S3</i>	Placa
1396176_at	183,5179	2,513476275	<i>Dbndd1</i>	Placa
1369609_at	371,6622	2,391971628	<i>Cldn11</i>	Placa
1388213_a_at	368,4855	2,339964171	<i>RT1-S3</i>	Placa
1370465_at	607,4756	2,337315948	<i>Abcb1a</i>	Placa
1386909_a_at	1007,7105	1,826207203	<i>Vdac1</i>	Placa
1370559_at	452,3182	1,607381648	<i>Kcnc2</i>	Placa
1387185_at	184,9255	1,367711955	<i>Apbb3</i>	Placa
1371452_at	188,2269	1,337324665	<i>Ubl7</i>	Placa
1369371_a_at	155,4658	1,32573713	<i>Gabbr1</i>	Placa
1369662_at	314,4649	1,31187967	<i>Scn2a1</i>	Placa

Continua

1368572_a_at	156,8894	1,29199291	Grin1	Placa
1398860_at	1959,6906	1,25110323	Nedd8	Placa
1380828_at	2334,7124	1,212309733	<i>Gabra1</i>	Placa
1369933_at	1818,3768	1,21229025	<i>Vdac2</i>	Placa
1368565_at	1986,8809	1,20900484	Slc1a3	Placa
1368401_at	715,1885	1,14578985	Gria2	Placa
1373351_at	-675,127	-1,095978141	<i>Ank2</i>	Placa
1373605_at	-214,2451	-1,097186574	<i>Trak1</i>	Placa
1387383_at	-400,8431	-1,124122959	<i>Gabbr2</i>	Placa
1390814_at	-385,2621	-1,340977464	<i>Pel1</i>	Placa
1368981_at	-1385,9867	-1,690424344	Aqp4	Placa
1369665_a_at	-125,6952	-1,601114616	Il18	Placa
1390942_at	-215,146	-2,124119865	Pel2	Placa
1381382_at	-129,6344	-5,634671314	<i>Atp6ap1l</i>	Placa
1383117_at	-394,3858	-5,815543095	<i>Pxmp4</i>	Placa
1370830_at	-149,6514	-6,948610861	<i>Egfr</i>	Placa

Continua

1370428_x_at	-417,0706	-11,7343333	<i>RT1-A2 /// RT1-A3 /// RT1-EC2</i>	Placa
1389734_x_at	-298,0107	-30,18086744	<i>RT1-T24-4</i>	Placa

Tabela 3: Genes diferencialmente expressos: Wistar controle X hipocampo de ratos WAR. A tabela mostra na primeira coluna o ID *Affymetrix*, segunda coluna é o *fold change* absoluto, o qual é a diferença de expressão entre o controle e o experimental, a terceira coluna é o *fold change* relativo, o qual é a relação entres os espécimes analisados, quarta coluna é o símbolo do gene e tecido, $p \leq 0,01$ e $pfp \leq 0,05$. Em vermelho são os genes que foram selecionados para serem testados por PCR em tempo real.

ID	<i>Fold change</i> absoluto	<i>Fold change</i> relativo	Gene	Tecido
1391347_at	1467,3412	4,621109218	<i>Rab8b</i>	Hipocampo
1388694_at	275,5134	4,529879307	<i>RT1-T24-3</i>	Hipocampo
1395020_at	260,5809	3,236285148	<i>Plekhh1</i>	Hipocampo
1392965_a_at	122,9916	3,150074606	<i>Smoc2</i>	Hipocampo
1393795_at	1813,7213	2,806937848	<i>Zeb2</i>	Hipocampo
1396060_at	209,7053	2,45469122	<i>Creg2</i>	Hipocampo

Continua

1370465_at	389,844	2,255712416	<i>Abcb1a</i>	Hipocampo
1388213_a_at	195,8921	1,94561694	<i>RT1-S3</i>	Hipocampo
1376211_a_at	295,1705	1,456980965	<i>Kctd6</i>	Hipocampo
1386728_at	338,777	1,298334005	<i>Kcnd2</i>	Hipocampo
1368565_at	4146,5734	1,297978319	<i>Slc1a3</i>	Hipocampo
1367706_at	870,2579	1,187930218	<i>Vdac1</i>	Hipocampo
1369662_at	349,1376	1,138814136	<i>Scn2a1</i>	Hipocampo
1376892_at	534,5958	1,118772979	<i>Gria3</i>	Hipocampo
1387171_at	791,5656	1,111697241	<i>Gria2</i>	Hipocampo
1398860_at	738,0108	1,098009123	<i>Nedd8</i>	Hipocampo
1387288_at	-389,145	-1,144681711	<i>Neurod1</i>	Hipocampo
1397614_at	-664,4033	-1,231295566	<i>Gabra2</i>	Hipocampo
1368981_at	-383,014	-1,243554243	<i>Aqp4</i>	Hipocampo
1368677_at	-326,6514	-1,29312111	<i>Bdnf</i>	Hipocampo
1388030_a_at	-185,6646	-4,274398064	<i>Gabbr1</i>	Hipocampo
1378518_at	-124,8461	-4,715320373	<i>Ewsr1</i>	Hipocampo
1373266_at	-9234,7032	-4,747007798	<i>Fam107a</i> /// <i>LOC10036483</i> 1	Hipocampo
1383117_at	-439,1626	-4,963960261	<i>Pxmp4</i>	Hipocampo

Continua

1370428_x_at	-204,6533	-5,592639412	RT1-A2 /// RT1-A3 /// RT1-EC2	Hipocampo
1369415_at	-197,8356	-5,819597305	<i>Bhlhe40</i>	Hipocampo
1390399_at	-692,9615	-6,144245867	<i>Crebl2</i>	Hipocampo
1395419_at	-112,9168	-7,670103786	<i>Mll1</i>	Hipocampo
1389734_x_at	-177,7485	-26,58418379	RT1-T24-4	Hipocampo

1.3. Resultados GEAS

Tabela 4: Genes diferencialmente expressos: Wistar controle X córtex somestésico de ratos GEAS. A tabela mostra na primeira coluna o ID Affymetrix, segunda coluna é o *fold change* absoluto, o qual é a diferença de expressão entre o controle e o experimental, a terceira coluna é o *fold change* relativo, o qual é a relação entre os espécimes analisados, quarta coluna é o símbolo do gene e tecido, $p \leq 0,01$ e $pfp \leq 0,05$. Em vermelho são os genes que foram selecionados para serem testados por PCR em tempo real.

ID	<i>Fold change absoluto</i>	<i>Fold change relativo</i>	Gene	Tecido
1395630_at	-2553,2721	32,22677495	<i>Adcy9</i>	Córtex somestésico
1389900_at	889,2605	10,34756675	<i>Grin1</i>	Córtex somestésico
1370652_at	716,9581	10,27165008	<i>Ntrk2</i>	Córtex somestésico
1384302_at	2392,587	1,379969977	<i>Slc6a17</i>	Córtex somestésico
1368401_at	-2274,3916	-1,199846135	<i>Gria2</i>	Córtex somestésico
1380828_at	-5131,5921	-1,600600789	<i>Gabra1</i>	Córtex somestésico
1369210_at	-1548,9316	-1,643998741	<i>Scn1a</i>	Córtex somestésico
1397614_at	-733,3606	-1,5198189	<i>Gabra2</i>	Córtex somestésico
1368170_at	-3255,0472	-2,060588156	<i>Slc6a1</i>	Córtex somestésico
1367978_at	-1941,9676	-2,578590351	<i>Adcy2</i>	Córtex somestésico
1367977_at	-9132,6646	-8,675889886	<i>Snca</i>	Córtex somestésico
1368240_a_at	2309,8242	76,91889838	<i>Prkcb</i>	Córtex somestésico

Tabela 5: Genes diferencialmente expressos: Wistar controle X hipocampo de ratos GEAS. A tabela mostra na primeira coluna o ID *Affymetrix*, segunda coluna é o *fold change* absoluto, o qual é a diferença de expressão entre o controle e o experimental, a terceira coluna é o *fold change* relativo, o qual é a relação entre os espécimes analisados, quarta coluna é o símbolo do gene e tecido, $p \leq 0,01$ e $pfp \leq 0,05$. Em vermelho são os genes que foram selecionados para serem testados por PCR em tempo real.

ID	<i>Fold change</i> absolute	<i>Fold change</i> relative	Gene	Tissue
1395630_at	656,4344	9,206744092	Adcy9	hipocampo
1368572_a_at	952,9836	2,187432035	Grin1	hipocampo
1368401_at	4593,9276	1,334179334	Gria2	hipocampo
1384302_at	1778,8151	1,375473181	Slc6a17	hipocampo
1397246_at	1689,1731	1,402249041	Ntrk2	hipocampo
1388039_a_at	-2512,9813	-1,461319997	Gabbr1	hipocampo
1368170_at	-2447,0217	-1,642616516	Slc6a1	hipocampo
1380828_at	-1060,6897	-1,139875608	Gabra1	hipocampo
1367978_at	-1114,0264	-1,825012305	Adcy2	hipocampo
1367977_at	-9454,1677	-4,159127263	<i>Snca</i>	hipocampo
1368240_a_at	-1456,5539	-65,1924276	<i>Prkcb</i>	hipocampo

1.4. Vias metabólicas

Depois de gerada a lista dos genes diferencialmente expressos foi utilizado o programa MetaCore® para analisar as vias metabólicas mais ativadas nos animais WAR. Verificamos que as vias que utilizam a transmissão gabérgicas e glutamatérgica foram as mais ativas.

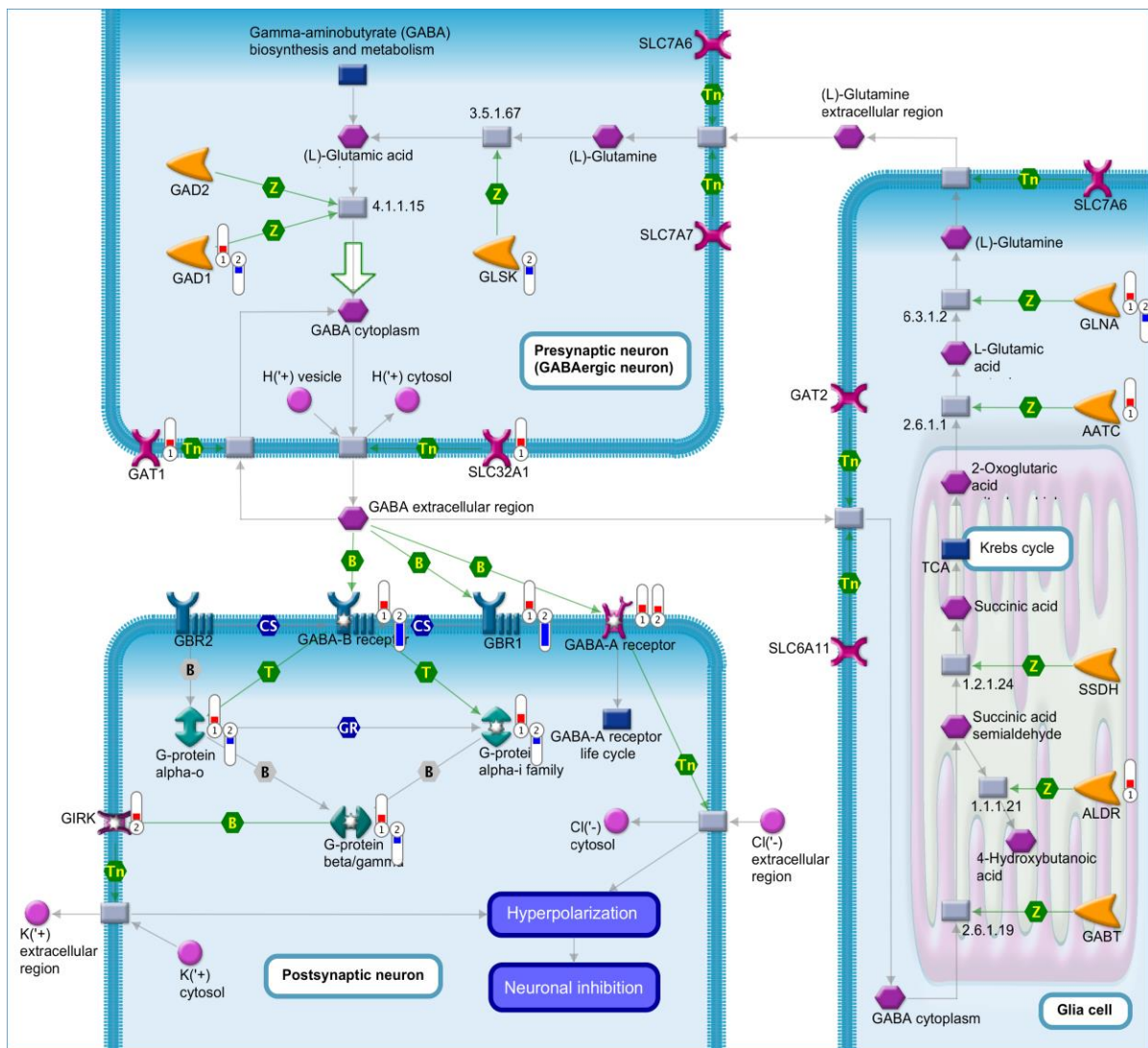


Figura 11: Neurotransmissão GABAérgica: Figura gerada pelo Metacore® usando os dados dos microarranjos do hipocampo dos animais WAR. A figura mostra as conexões entre os genes diferencialmente expressos no modelo. Setas verdes: ativação; setas vermelhas: inibição; setas cinza: efeito inespecífico; setas verdes-largas: início da via. B= Binding (ligação), -P= desfosforilação, +P= fosforilação, T= Transformação, Tn= Transporte, TR= regulação da transcrição, Z= Catálise. Termômetros em vermelho indicam hiper-expressão e em azul hipo-expressão; 1=WAR placa quadrigêmea ; 2= WAR hipocampo.

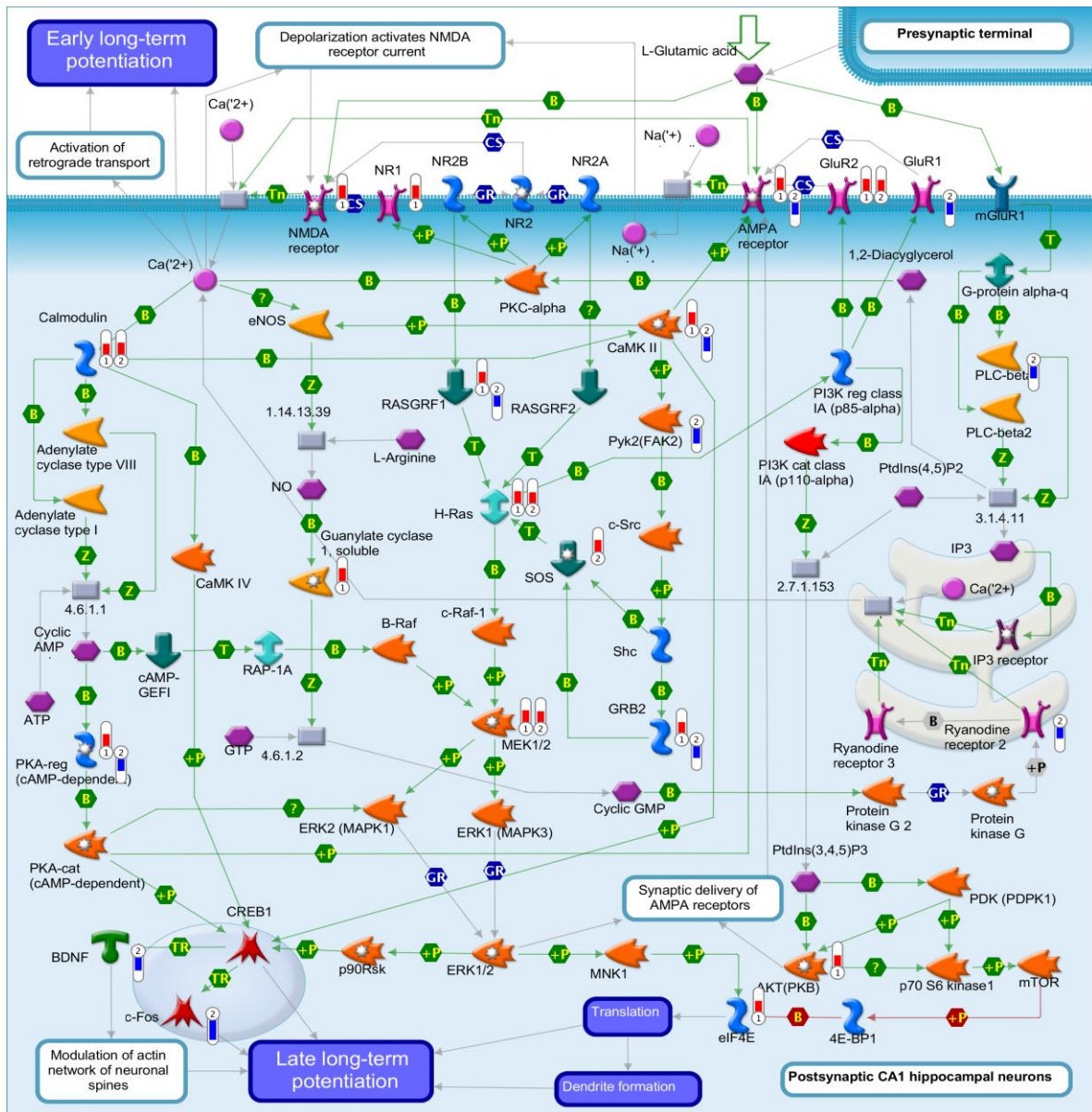


Figura 12: Processo neurofisiológico NMDA-dependente de potencialização de longo prazo pós-sináptica em neurônios na camada CA1 do hipocampo: Figura gerada pelo Metacore® usando os dados dos microarranjos do hipocampo dos animais GEAS. A figura mostra as conexões entre os genes diferencialmente expressos no modelo. Setas verdes: ativação; setas vermelhas: inibição; setas cinza: efeito inespecífico; setas verdes-largas: início da via. B= Binding (ligação), -P= desfosforilação, +P= fosforilação, T= Transformação, Tn= Transporte, TR= regulação da transcrição, Z= Catálise. Termômetros em vermelho indicam hiper-expressão e em azul hipo-expressão; 1=WAR placa quadrigêmea; 2= WAR hipocampo.

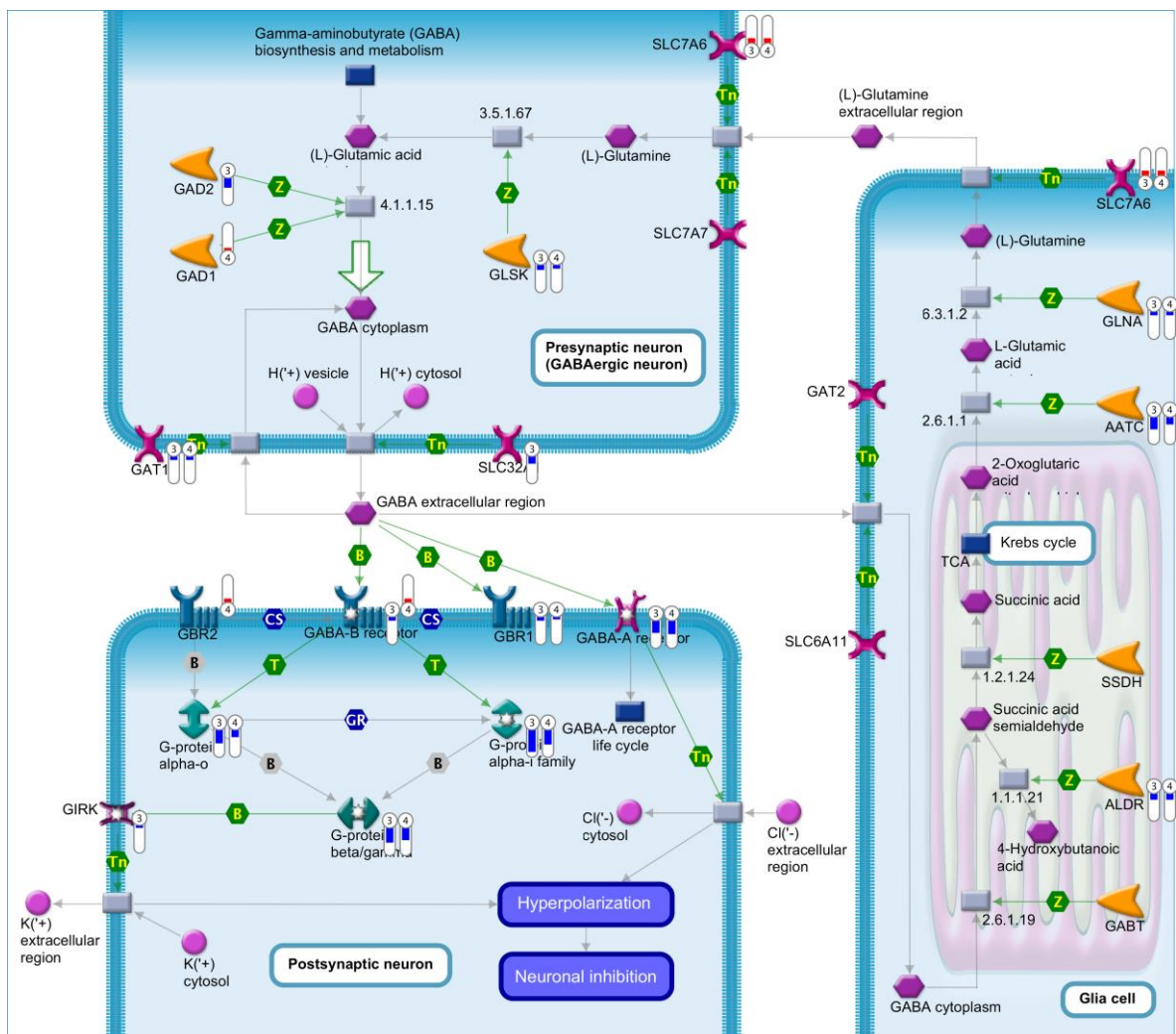


Figura 13: Neurotransmissão GABAérgica: Figura gerada pelo Metacore® usando os dados dos microarranjos do hipocampo dos animais GEAS. . A figura mostra as conexões entre os genes diferencialmente expressos no modelo. Setas verdes: ativação; setas vermelhas: inibição; setas cinza: efeito inespecífico; setas verdes-largas: início da via. B= Binding (ligação), -P= desfosforilação, +P= fosforilação, T= Transformação, Tn= Transporte, TR= regulação da transcrição, Z= Catálise. Termômetros em vermelho indicam hiper-expressão e em azul hipo-expressão; 1=GEAS cortex somestésico; 2= GEAS hipocampo.

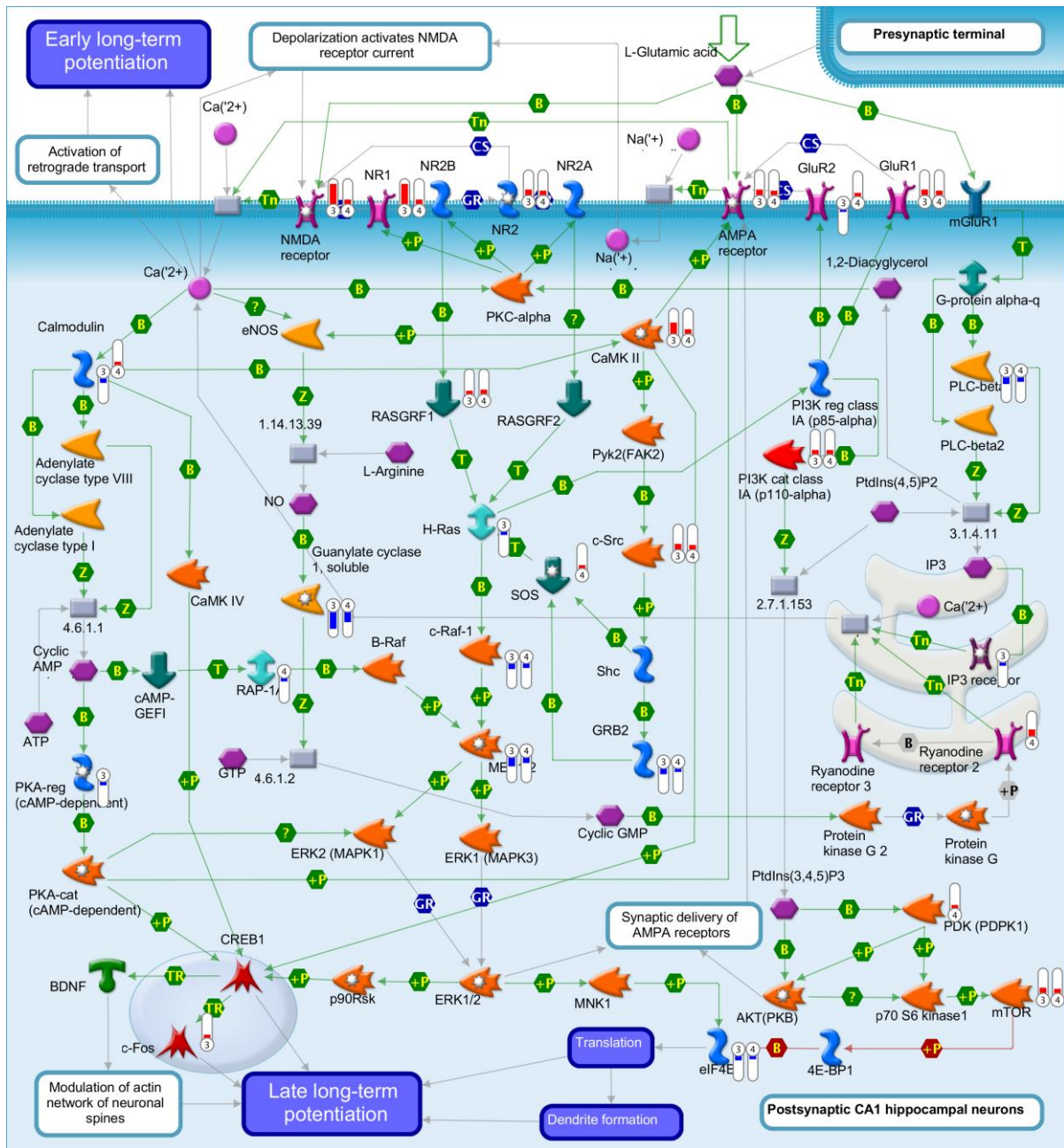


Figura 14: Processo neurofisiológico NMDA-dependente de potencialização de longo prazo pós-sináptica em neurônios na camada CA1 do hipocampo: Figura gerada pelo Metacore® usando os dados dos microarranjos do hipocampo dos animais GEAS. . A figura mostra as conexões entre os genes diferencialmente expressos no modelo. Setas verdes: ativação; setas vermelhas: inibição; setas cinza: efeito inespecífico; setas verdes-largas: início da via. B= Binding (ligação), -P= desfosforilação, +P= fosforilação, T= Transformação, Tn= Transporte, TR= regulação da transcrição, Z= Catálise. Termômetros em vermelho indicam hiper-expressão e em azul hipo-expressão; 1=GEAS cortex somestesico; 2= GEAS hipocampo.

2. PCR em tempo real

A validação do sistema foi realizada utilizando sete concentrações diferentes de cDNA, iniciando as diluições com 200 ng (diluições seriadas de cinco vezes). Com os dados da cinética de amplificação das amostras e utilizando o programa 7500 System SDS Software, construiu-se uma curva padrão para cada gene. Importante ressaltar que para esse experimento foram utilizadas as mesmas amostras do microarranjos.

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 de cada um dos genes de interesse obtidas para cada concentração (eixo Y). Na figura 12, está exemplificada a curva de eficiência para o sistema *Il18/Gdi2* e a equação da reta correspondente à linha de tendência, mostrando que o ΔC_t das amostras não está variando significativamente entre as diferentes diluições.

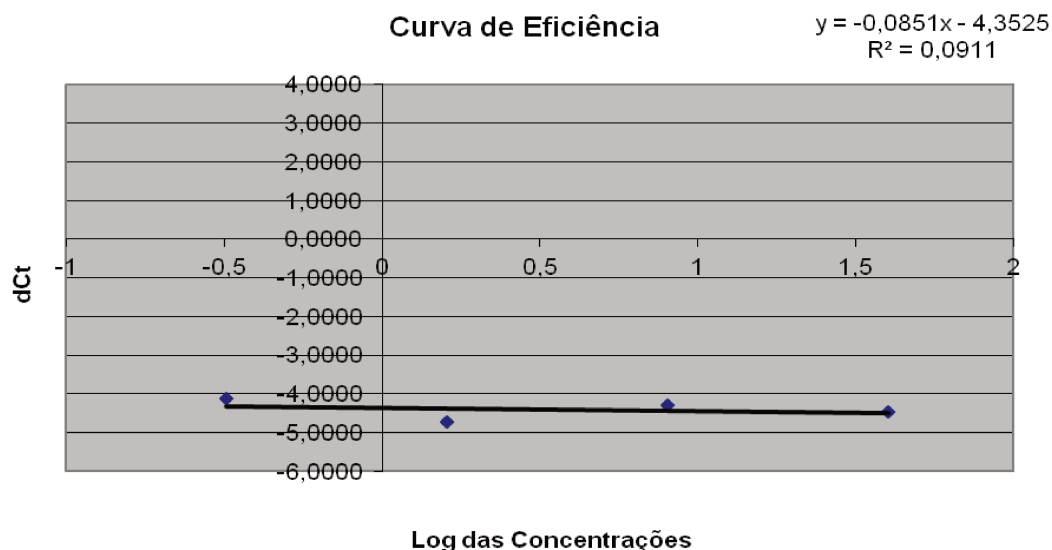


Figura 15: Curva de Padronização do PCR em Tempo Real. Podemos analisar a linha de tendência obtida após construção do gráfico, a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Dessa forma, prosseguiu-se com os experimentos utilizando 1,6 ng de cDNA para todas as reações de PCR em tempo real. Os experimentos de quantificação foram realizados em triplicatas e, após análise dos RQ para cada um dos genes de interesse em relação ao controle endógeno. Dos 11 genes selecionados para a validação 4 genes dos modelo WAR foram validados e 3 genes do modelo GEAS foram validados, os resultados analisados são mostrados nas figuras abaixo.

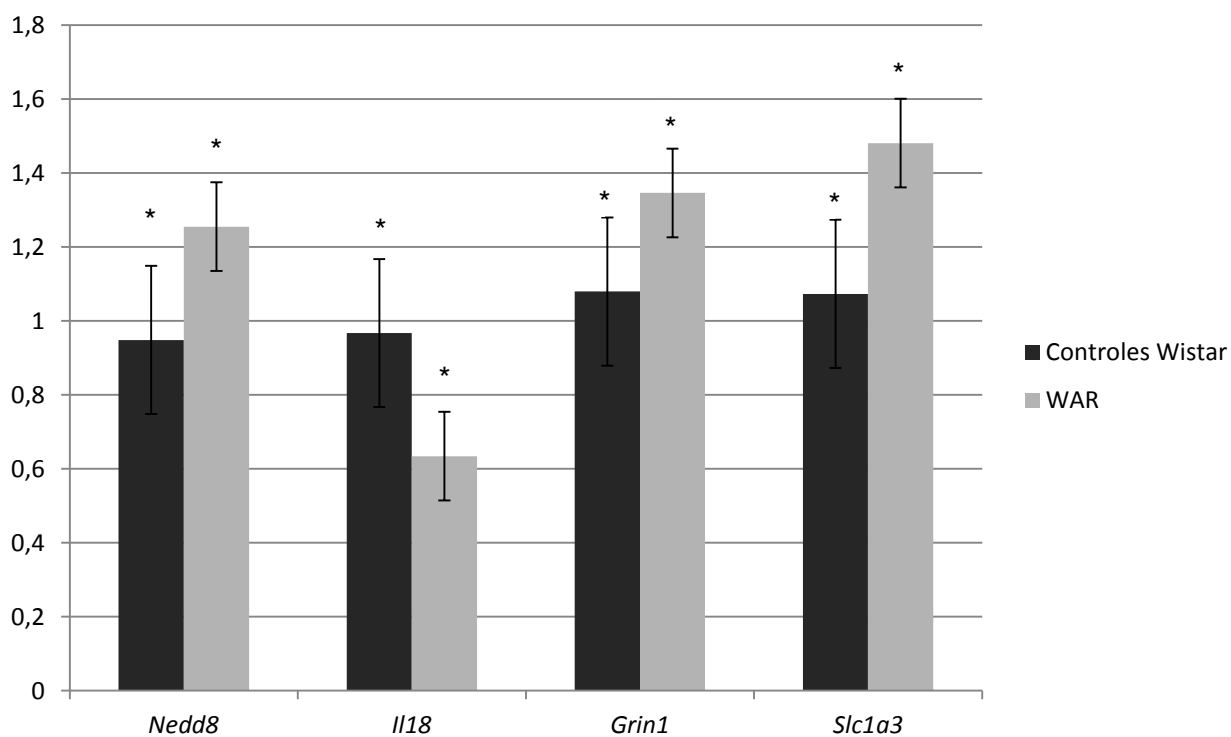


Figura 16: Quantificação relativa da expressão dos genes *Grin1*, *Slc1a3*, *Nedd8*, *Il18*, por PCR em tempo real, tecido placa quadrigêmea de ratos WAR (cinza) e controles Wistar (cinza escuro). Barras verticais indicam o desvio padrão. * $p < 0,05$, confirmado por Mann–Whitney–Wilcoxon.

Depois de concluída a validação no modelo WAR comparamos os genes validados com o grupo de ratos WAR *naive* (animais WAR sem estimulação sonora) para verificar a expressão dos genes validados nesse grupo.

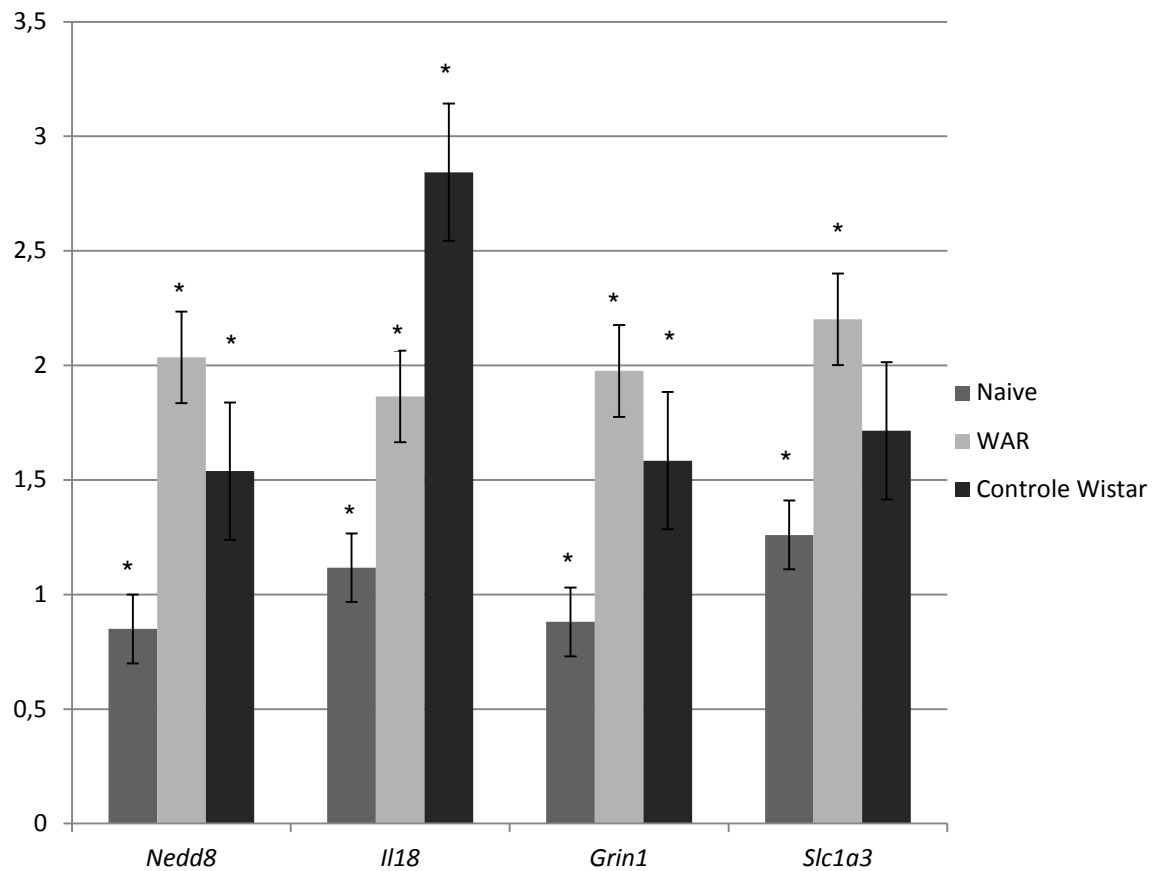


Figura 17: Quantificação relativa da expressão dos genes *Grin1*, *Slc1a3*, *Nedd8*, *Il18*, por PCR em tempo real, tecido placa quadrigêmea de ratos WAR (cinza claro), placa quadrigêmea de ratos WAR *naive* (cinza) e controles Wistar (cinza escuro). Barras verticais indicam o desvio padrão. * $p < 0,05$, confirmado por Mann–Whitney–Wilcoxon.

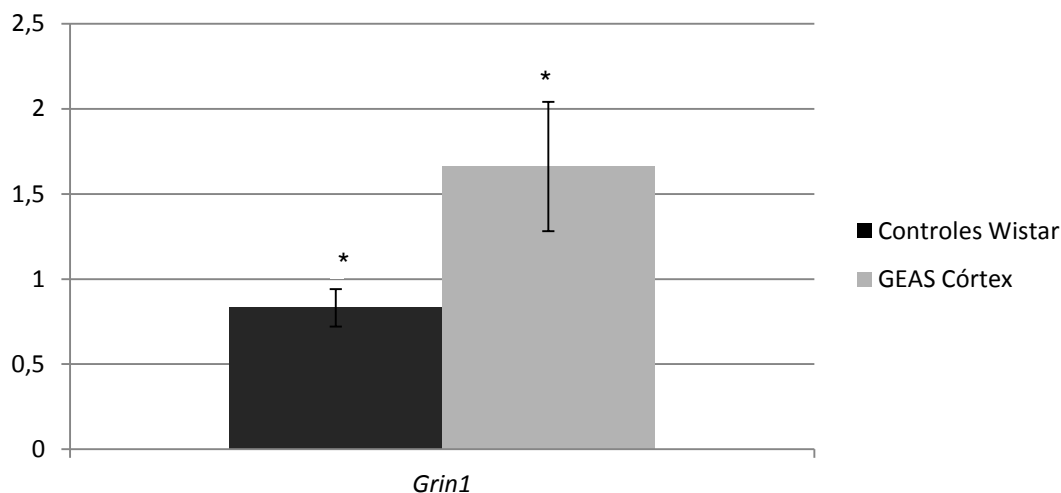


Figura 18: Quantificação relativa da expressão dos genes *Grin1*, por PCR em tempo real, tecido córtex somestésico de ratos GEAS (cinza claro) e controles Wistar (preto). Barras verticais indicam o desvio padrão. * $p < 0,05$, confirmado por Mann–Whitney–Wilcoxon.

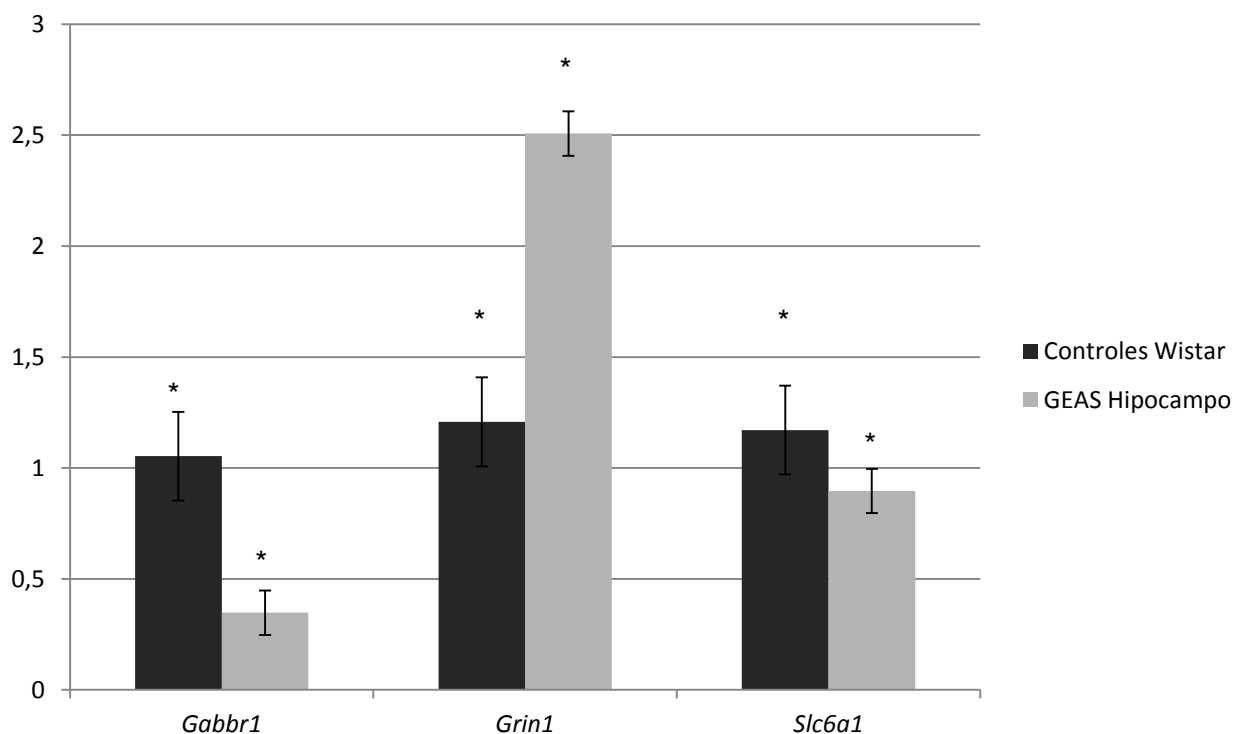


Figura 19: Quantificação relativa da expressão dos genes *Gabbr1*, *Grin1*, *Slc6a1* por PCR em tempo real, tecido hipocampo GEAS (cinza claro), e controles Wistar (cinza escuro). Barras verticais indicam o desvio padrão. * $p < 0,05$, confirmado por Mann–Whitney–Wilcoxon.



DISCUSSÃO

Na análise inicial feita com a tecnologia de microarranjos de DNA obtivemos nos animais WAR na placa quadrigêmea e no hipocampo um total de 1624 e 1351 genes diferencialmente expressos respectivamente quando comparados com os controles, nos animais GEAS obtivemos no córtex somestésico e no hipocampo um total de 2282 e 2307 genes diferencialmente expressos respectivamente quando comparados com os controles. Desses, selecionamos 11 genes em ambas as linhagens para a validação pela segunda técnica quantitativa, sendo que 4 genes apresentaram nas duas cepas. No modelo WAR foram validados 4 genes na placa quadrigêmea (*Grin1*, *Slc1a3*, *Nedd8* e *Il18*). No modelo de crise de ausência dos 11 genes foram validados 3, córtex somestésico (*Grin1*) e no hipocampo (*Gabbr1*, *Grin1*, *Slc6a1*).

Depois de concluída a validação foi comparada a expressão dos genes validados com o grupo de animais WAR naive. Na figura 14 podemos observar que a linhagem de ratos WAR apresenta uma menor expressão dos genes *Grin1*, *Nedd8*, *Il18* e *Slc1a3* naturalmente e quando ocorre a estimulação audiogênica há o aumento da expressão.

Dos genes selecionados três deles são receptores de *GABA*, o qual é o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Observa-se que o receptor *Gabbr1* está com a expressão aumentada na placa quadrigêmea e hipoexpresso no hipocampo dos animais com crise audiogênica e este gene em questão também apresenta expressão diminuída no hipocampo dos animais com crise de ausência. A literatura descreve que polimorfismos desse gene como o G1465A tem sido considerado como um fator de risco potencial para o desenvolvimento da epilepsia

do lobo temporal (83; 84). O gene que codifica o receptor *GABBR1* em humanos foi mapeado no cromossomo humano 6p21.3, região que abriga um locus de susceptibilidade para epilepsia generalizada idiopática. Nesse estudo, a análise de mutação em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil revelou vários polimorfismos de DNA de sequência, dois dos quais resultam em mudanças de aminoácidos que ocorrem em todos os membros afetados com epilepsia generalizada idiopática, nas famílias estudadas (85). Como descrito anteriormente, no modelo WAR há uma redução nas correntes inibitórias GABAérgicas, essa redução pode estar relacionada tanto a uma modificação endógena pós-sináptica no receptor *GABAA*, ou uma redução na densidade de subunidades específicas deste receptor (38). Vimos nos nossos resultados que no hipocampo os ratos WARs há uma diminuição da expressão nos receptores de GABA, como, *Gabbr1* e o *Gabra2*, além disso, ambos *Gabra1* e o 2 apresentam expressão diminuída no córtex somestésico dos ratos GEAS e o *Gabra1* está diminuído no hipocampo. Devido à diminuição gabérgica no modelo de crise de ausência estudado podemos sugerir que a diminuição de *Slc6a1*, também conhecido como *Gat-1* (transportador de GABA), seja uma consequência dessa diminuição. A figura 10 mostra a via de neurotransmissão gabérgica e deixa clara a diminuição desta via.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor/Bdnf*), um membro da família de neurotrofinas, está com a expressão diminuída nos animais WAR. Este gene tem recebido muita atenção como um alvo terapêutico potencial para a epilepsia de lobo temporal (ELT). Nas áreas cerebrais onde se dão os insultos epileptogênicos, incluindo o hipocampo, o *Bdnf* é supra-

regulado à medida que o desenvolvimento da epilepsia ocorre, induzindo um colapso balanceado de excitação e inibição, eventualmente resultando em efeitos epiléticos (86). O *Bdnf* tem um papel modulador na epilepsia, e evidências de que ele é supra-regulado por crises e modula positivamente a excitabilidade neuronal no hipocampo. Camundongos transgênicos que super-expressam *Bdnf* apresentam crises mais severas em resposta ao ácido kaínico (87). Nos animais WAR, aparentemente o *Bdnf* não demonstra estar participando no aumento da excitabilidade no hipocampo desses animais, que talvez, esta região ainda não está participando maciçamente no desenvolvimento da crise no modelo. No caso dos animais WAR o gene em questão aparentemente não está participando no desenvolvimento das crises agudas desses animais, sendo assim, o aparecimento de crises pelo estímulo sonoro não aumenta a sua expressão e talvez isso explique a não participação do aumento da excitabilidade nesses animais. Apesar deste gene não ter apresentado diferença de expressão pela a técnica de microarranjo nos animais GEAS, nota-se um aumento de expressão de seu receptor, *Ntrk2* (*neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2*), no córtex somestésico e no hipocampo desses animais, indicando um possível aumento da ligação do *Bdnf* com o seu receptor.

O receptor de glutamato ionotrópico, AMPA 2, *Gria2*, também conhecido com GluR2 encontra-se com a expressão aumentada no hipocampo e na placa quadrigêmea dos ratos WAR e a mesma expressão foi encontrada nos ratos com crise de ausência, porém no córtex somestésico foi visto o oposto. De acordo com Gitaí *et al.* (39), em seu trabalho mostrou que este gene está com a expressão

alterada apenas no hipocampo desses animais. Dentre os receptores de glutamato tem o gene *Grin1* (sigla do inglês, *glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1*) que também foi encontrado com a expressão alterada no modelo audiogênico com super expressão na placa quadrigêmea desses animais e também encontra-se com a expressão aumentada em ambas regiões estudadas no modelo de crise de ausência, interessante ressaltar para ambos os modelos este resultado é inédito. Devido este aumento da neurotransmissão nos animais GEAS o gene *Slc6a17* encontra-se com a expressão elevada em ambos os tecidos analisados, sendo este gene responsável pelo transporte de aminoácidos neurotransmissores (88; 89). Outro gene encontrado com a expressão aumenta é o *Slc1a3* [sigla do inglês, *Solute carrier family 1 (glial high-affinity glutamate transporter), member 3*], o qual, é um importante re-captador de glutamato, o qual já tinha sido descrito na literatura como induzido pelos níveis de interleucina-1 beta (*Il1b*) em cultura de neurônios de retina (90). Pascoal em sua tese de doutorado, em 2010 mostrou que este gene é modulado pelos níveis de *Il1b* na fase aguda do modelo de epilepsia. O aumento de expressão desse gene pode ser uma consequência do acúmulo de glutamato na fenda sináptica ocasionada pelas crises audiogênicas.

Canais de sódio, potássio e cálcio estão relacionados com diversos tipos de epilepsia de causa genética, na literatura, temos dados de mutações nas regiões desses genes, porém há poucos estudos de expressão sobre esses eles (91, 92, 93). Os resultados obtidos nessa análise mostrou que o gene para o canal de sódio *Scn2a1* está com a expressão aumentada tanto na placa como no

hipocampo dos animais audiogênicos do estudo. Além deste, a subunidade alfa 1 (*Scn1a*) apresentou uma baixa expressão no hipocampo do animais GEAS. Em estudos genéticos recentes em um grupo de pacientes epiléticos mostrou que mutações no *Scn2a1* são importantes em tipos epiléticos mais severos, como síndrome de Dravet (94; 95) e mutações na subunidade alfa 1 deste canal de sódio está relacionado com epilepsia generalizada febril .

Outro canal selecionado para validação foi o *Vdac1* (sigla do inglês, *voltage-dependent anion channel 1*), este está hiperexpresso em ambas as regiões estudadas. Este é um canal de voltagem mitocondrial que está envolvido na liberação de proteínas apoptóticas com possível associação com a doença de Alzheimer e pela técnica de *western-blot* foi mostrado que a proteína desse gene esta com maior quantidade no hipocampo de pacientes com Alzheimer (96).

As aquaporinas (*AQP*) são uma família de proteínas de membrana que conduzem seletivamente água para dentro e fora da célula (97; 98; 99). *AQP4* tem um interesse particular em neurociência, porque é expressa no cérebro e na espinha cortical pelas células da glia (100; 101; 102; 103). No nosso estudo esta aquaporina foi encontrada com a expressão reduzida em ambos os tecidos analisados. Estudos em humanos mostra um aumento na expressão e alteração da distribuição da *AQP4* em tecido esclerótico de pacientes com ELT (104; 105), porém ainda não está claro na literatura da participação da *Aqp4* na epileptogênese, se é causa ou consequência devido a morte celular, inflamação ou gliose (106). Em camundongos transgênicos com falta de *Aqp4* apresentam um aumento do tempo da crise (107).

Crises epilépticas induzem resposta inflamatória no cérebro (108; 109). Em modelos animais induzidos que apresentam *status epilepticus* (SE) há um aumento rápido das citocinas pró-inflamatórias no cérebro desses animais após a primeira crise e durante o SE (110; 111; 112; 113; 114; 115). A *Il18* é uma interleucina pró-inflamatória e induz a produção de interferon gama (IFN- gama) (116) e segundo Jung *et al.* (117) a *mesma* está aumentada no córtex piriforme de ratos após SE induzidos por pilocarpina, estudo anterior desse mesmo grupo mostrou que esta interleucina juntamente com IFN- gama apresenta efeito protetor sobre danos neuronais causados pelas crises após SE (118). Nos resultados apresentados não foi encontrado alteração de expressão de nenhuma interleucina no hipocampo, porém na placa quadrigêmea a *Il18* está com a baixa expressão em relação aos controles. Isso mostra claramente a diferença da fase aguda do modelo WAR em relação a modelos de *kindling*.

O gene *pellino 2* (*Peli 2*) encontrado hipo-expresso na placa quadrigêmea ratos WAR, quando expressa sua proteína promove a ubiquitinação do IRAK1 (sigla em inglês, *interleukin 1 receptor-associated kinase 1*), porém a baixa expressão desse gene não altera a ativação do fator de transcrição Nfkb (119). *Nedd8* (sigla do inglês, *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) atua promovendo ubiquitinação (120), algumas vias de sinalização apoptótica podem ser através de ubiquitinas (121). Nossos resultados apontaram que o *Nedd8* está hiper-expresso em ambos os tecidos estudados dos animais com crise audiogênica. Portanto, é possível correlacionarmos esses genes com a epileptogênese, no caso do *Nedd8* estando com a expressão elevada pode

aumentar as vias apoptóticas levando a uma morte neuronal maior nesses animais.

As adenilato ciclases desempenham um papel importante catalisando a conversão de ATP a cAMP, o qual tem uma importante função na transdução de sinal e influência na função de múltiplos canais de íons (122). Duas dessas ciclases estão com a expressão alterada no modelo GEAS, *Adcy9* e *Adcy2*, sendo que a primeira está com maior expressão nas duas regiões cerebrais estudadas e a última apresenta expressão diminuída nos dois tecidos. Um mau funcionamento na regulação dos canais de íons dependentes de cAMP nos neurônios tálamo-cortical contribui para o desenvolvimento de crises de ausência no cepa de ratos WAG/Rij (123). Importante ressaltar que este gene apresenta a maior expressão nos dois tecidos, podendo este gene ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo de epilepsia de ausência desses animais, mas para confirmarmos isso este gene deve ser primeiramente validado por PCR em tempo real e são necessários testes funcionais para comprovarmos a predisposição a crises nesses animais.

A validação pela técnica de PCR em tempo real para os genes selecionados nas tabelas 2, 3, 4 e 5 foi capaz de confirmar a expressão diferencial identificada inicialmente nos experimentos de microarranjo de DNA para apenas quatro genes (*Grin1*, *Slc1a3*, *Nedd8* e *Il18*) no modelo WAR e três genes no modelo GEAS (*Gabbr1*, *Grin1* e *Slc1a6*). As possíveis explicações para esse fato podem estar relacionadas principalmente com a observação do não agrupamento das amostras dos controles e dos animais WAR já identificada na análise do PCA

(figuras 7 e 8), indicando uma grande variância/variabilidade dentro dos grupos. Esse tipo de situação poderia talvez ser minimizada aumentando o número de animais estudados.



CONCLUSÃO

- Foi identificado um perfil de expressão gênica diferencial nos animais WAR em relação aos controles Wistar, sendo que foram validados como diferencialmente expressos por PCR em tempo real os genes *Grin1*, *Slc1a3*, *Nedd8* e *Il18*.
- Os genes validados nos animais WAR têm como função: receptor de glutamato, re-captador de glutamato, ubiquitinação e proteção sobre danos neuronais , respectivamente.
- Os animais WAR Naive, apresentam menor expressão gênica que os animais WAR e Wistar
- Foi identificado um perfil de expressão diferencial nos animais GEAS, em relação aos controles Wistar, pendendo ainda a validação por PCR em tempo real.
- Foram identificadas vias GABAérgicas e glutamatérgicas comuns nos dois modelos genéticos de epilepsia estudados.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- 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; pp: 2148.
- 2- Beghi E. The concept of the epilepsy syndrome: How useful is it in clinical practice?. *Epilepsia* 2009; 50(Suppl. 5): 4–10.
- 3- Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsya review. *Epilepsy Res.* 2009; 85(1): 31–45
- 4- Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin BG and Pfanner P. Dysplasias of cerebral córtex and epilepsy, Philadelphia, New York, LippincottRaven, 1996, p461.
- 5- 5. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42 (2001), pp. 796–803
- 6- Morimoto K, Fahnstock M, Racine R (2004) Kindling and *status epilepticus* models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology* 73: 1– 60
- 7- Gastaut H, Tassinari CA. Triggering mechanisms in epilepsy. The electroclinical point of view. *Epilepsia* 1966 7:85–138.
- 8- Goossens LAZ, Andermann F, Andermann E, Remillard GM. Reflex seizures induced by calculation, card or board games, and spatial tasks: a review of 25 patients and delineation of the epileptic syndrome. *Neurology* 1990 40:1171–1176.
- 9- Lebrun Y, Leleux C. (1991) Reflex epilepsy induced by verbal activities. *J Neurolinguistics*, 6:371–379
- 10- Wieser HG. (1998) Seizure induction in reflex seizures and reflex epilepsy. *Adv Neurol* 75:69–85.
- 11- Kasteleijn-Nolst Trenite DG, Guerrini R, Binnie CD, Genton P. (2001) Visual sensitivity and epilepsy: a proposed terminology and classification for clinical and EEG phenomenology. *Epilepsia* 42:692–701.
- 12- Zifkin BG, Inoue Y. (2004) Visual reflex seizures induced by complex stimuli. *Epilepsia* 45(Suppl. 1):27–29.
- 13- Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA. (2006) Startle syndromes. *Lancet Neurol* 5:513–524. Review
- 14- Pittau F, Tinuper P, Bisulli F, Naldi I, Cortelli P, Bisulli A, Stipa C, Cevolani D. (2008) Videopolygraphic and functional MRI study of musicogenic epilepsy. A case report and literature review. *Epilepsy Behav* 13:685–692.
- 15- Striano S, Coppola A, del Gaudio L, Striano P. (2012) Reflex seizures and reflex epilepsies: old models for understanding mechanisms of epileptogenesis
Epilepsy Res 100:1–11.
- 16- Kasteleijn-Nolst Trenite DG. (2012) Provoked and reflex seizures: Surprising or common? *Epilepsia*, 53:105–113
- 17- Maguire, MJ. (2012) Music and epilepsy: A critical review. *Epilepsia*, 53(6):947–961.
- 18- Poskanzer DC, Brown AE, Miller H. (1962) Musicogenic epilepsy caused only by a discrete frequency band of church bells. *Brain* 85:77.
- 19- Critchley M. (1937) Musicogenic epilepsy. *Brain* 60:13–27
- 20- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Mosh SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. (2010) Revised terminology

and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51:676–685.

21- Vizioli R. (1989) Musicogenic epilepsy. *Int J Neurosci* 47:159–164.

22- Trevathan E, Gewirtz RJ, Cibula JE. (1999) Musicogenic seizures of the right superior temporal gyrus origin precipitated by the theme song from “The X Files”. *Epilepsia* 40:23.

23- Tayah TF, Abou-Khalil B, Gilliam FG, Knowlton RC, Wushensky CA, Gallagher MJ. (2006) Musicogenic seizures can arise from multiple temporal lobe foci: intracranial EEG analyses of three patients. *Epilepsia* 47:1402–1406.

24- Mehta AD, Ettinger AB, Perrine K, Dhawan V, Patil A, Jain SK, Klein G, Schneider SJ, Eidelberg D. (2009) Seizure propagation in a patient with musicogenic epilepsy. *Epilepsy Behav* 14:421–424.

25- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1989, 25:326-331.

26- van Raay L, Jovanovska V, Morris MJ, O'Brien TJ. Focal administration of neuropeptide Y into the S2 somatosensory cortex maximally suppresses absence seizures in a genetic rat model. *Epilepsia*. 2012 53(3):477-84

27- Loiseau, P. – L'épilepsie-absences de l'enfant. Em: *Les Syndromes Épileptiques*. Eds. J. Roger, C. Dravet, M. Bureau, E. F. Dreifuss & P. Wolf. John Libbey, London 1984:108-122.

28- Wirrel, E. C.; Camfield, C. S.; Camfield, P. R.; Gordon, K. E. & Dooley, J. M. – Long-term prognosis of typical childhood absence epilepsy. *Neurology* 1996, 47:912-918.

29- Addie, W.J. – Picnolepsy: a form of epilepsy occurring in children with a good prognosis. *Brain* 1924, 47:96-117

30- Panayiotopoulos, C. P. – Idiopathic generalized epilepsies. Em: *Lecture Notes, British Branch of the ILAE, 5th Epilepsy Teaching Weekend*. Eds. J. S. Duncan & J. Q. Jills, London, 1995:63-69.

31- Stefan, H. – *Epileptische Absenzen*. Georg Thieme, Stuttgart 1982:1-269.

32- Jobe PC, Brown RD, Dailey JW(1981) Effect of Ro 41284 on audiogenic seizure susceptibility and intensity in epilepsyp prone rats. *Life Sci*. 28(18):20318.

33- Aicard J (1980). Course and prognosis of certain childhood epilepsies with predominantly myoclonic seizures. WADA, JA., PENRY, J.K. e cols *Advances in epileptology. The Xth Epilepsy International Symposim*. New York; Raven, p. 159-63.

34- GarciaCairasco, N., Doretto, M.C., Lobo, R., 1990. Genetic selection of a strain of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures. A quantitative analysis. *Epilepsia* 31, 815.

35- GarciaCairasco N, Sabbatini R (1983) Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 16(2):17183.

36- GarciaCairasco N. 2002. A critical review on the participation of inferior colliculus in acousticmotor and acousticlimbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res* 168:208–222.

37- Doretto, M.C., Fonseca, C.G., Lobo, R.B., Terra, V.C., Oliveira, J.A., GarciaCairasco, N., Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WAR). *Behav Genet*. 2003; 33(1): 3342.

38- Mesquita F, Aguiar JF, Oliveira JA, GarciaCairasco N, Varanda WA. 2005. Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic rats. *Brain Res Bul* 65:177–183.

- 39- Gitaí DL, Martinelli HN, Valente V, Pereira MG, Oliveira JA, Elias CF, Bittencourt JC, Leite JP, CostaNeto CM, GarciaCairasco N, PaçóLarson ML. Increased expression of GluR2flip in the hippocampus of the Wistar audiogenic rat strain after acute and kindled seizures. *Hippocampus*, 2010. v. 20:125–133.
- 40- Krushinsky I, Molodkina I, Fless D, Dobrokhotova I, Steshenko A, Semiokhina A, Zorina Z, Romanova I (1970) The functional state of the brain during sonic stimulation. In: *Physiological effects of noise*. Eds Welch, B. e Welch, A. New York; Plenum Press: 151.
- 41- Dailey J, Reigel C, Mishra P, Jobe PC (1989). Neurobiology of seizures predisposition in genetically epilepsyprone rats. *Epilepsy Res*. 3: 317.
- 42- Vergnes M, Kiesmann M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter (1987) Kindling of audiogenic seizures in the rat. *Int J Neurosci*. 36(3 4):16776.
- 43- Moraes MF, Galvis Alonso OY, GarciaCairasco N (2000) Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Research* 39: 251259.
- 44- Goddard G. (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214: 10201021.
- 45- Carvalho, L.E.D. Participação dos receptores gabaa no potencial excitatório pós sináptico em hipocampo e amígdala de ratos wistar audiogênicos (WAR). 2007. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- 46- GarciaCairasco N, Terra VC, Doretto MC (1993) Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behavioural Brain Research* 58: 5767.
- 47- Faingold, C.L., 1999. Neuronal networks in the genetically epilepsyprone rats. In: DelgadoEscueta, A.V., Wilson, W.A., Olsen, R.W., Porter, R.J. (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 3rd edn. *Advances in Neurology*, Vol. 79. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 311321.
- 48- Ross, K.C., Coleman, J.R., 2000a. Audiogenic seizures in the developmentally primed LongEvans rat. *Dev. Psychobiol*. 34, 303 313.
- 49- Ross, K.C., Coleman, J.R., 2000b. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 24, 639653.
- 50- Garcia-Cairasco N, Sabbatini RM. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. *Physiol Behav*. 1991 Aug;50(2):421-7.
- 51- Terra VC, Garcia-Cairasco N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. *Behav Brain Res*. 1994 May 30;62(1):29-39.
- 52- McCown TJ, Greenwood RS, Frye GD, Breese GR. Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: a potential site for the genesis of epilepsy? *Exp Neurol*. 1984 Dec;86(3):527-42.
- 53- McCown TJ, Greenwood RS, Breese GR. Inferior collicular interactions with limbic seizure activity. *Epilepsia*. 1987 May-Jun;28(3):234-41.
- 54- Rossetti F, Rodrigues MC, Oliveira JAC, GarciaCairasco N. EEG wavelet analyses of the striatumsubstantia nigra pars reticulata superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res* 2006;72:192–208.
- 55- Doretto MC, Cortes-de-Oliveira JA, Rossetti F, Garcia-Cairasco N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia*. 2009 Dec;50(12):2563-74.

- 56- Kiesmann, M; Marescaux, C.; Vergnes, M. e cols. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological and electroencephalographic studies. *J. Neural Transm* 1988 72:235244.
- 57- GarciaCairasco N, Wakamatsu H, oliveira JAC, Gomes ELT, Del Bel EA, Mello LEAM. Neuroethological and morphological (Neo –Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996 26: 177192.
- 58- Deransart, C., LêPham, B.T., Hirsch, E., Marescaux, C., Depaulis, A., 2001. Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizure speci city of the nigral control. *Neuroscience* 105, 203211.
- 59- Naritoku DK, Mecozzi LB, Aiello MT, Faingold CL. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsyprone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp Neurol*. 1992 115(3):31724.
- 60- Nicholls DG (1994) *Proteins, Transmitters and Synapses*. Blackwell Science Ltd; Oxford.
- 61- Ure JA, Perassolo M, (2000) Update on the pathophysiology of the epilepsies. *Journal of Neurological Sciences* 177, p.117.
- 62- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, BenAri Y, Khazipov R (1997) Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABAA and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18, 243255.
- 63- Sperber EF, Wong BY, Wurlpel JN, Moshe SL (1987) Nigra infusions for muscinol or bicuculine facilitate seizure in developing rats. *Brain Res*; 465:24350.
- 64- Marescaux, C.; Micheletti, G. C.; Vergnes, M.; Depaulis, A.; Lumbach, L. & Warter, J. M. – A model of chronic spontaneous petit-mal like seizures in the rat: comparison with penthylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 1984, 25:326-331.
- 65- Marescaux, C.; Vergnes, M. & Depaulis, A. – Genetic absence epilepsy in rats from Strtasbourg, a review. *J. Neural Transm. Suppl.*) 1992, 35:37-69.
- 66- Coenen AML, van Luijtelaar ELM. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res*. 1987;1:297-301
- 67- Schridde U, van Luijtelaar G. Corticosterone increases spike-wave discharges in a dose- and time-dependent manner in WAG/Rij rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 Jun;78(2):369-75.
- 68- Coenen, A.M., van Luijtelaar, E.L., 1987. TheWAG/Rij rat model for absence epilepsy:age and sex factors. *Epilepsy Res*. 1, 297e301.
- 69- van Luijtelaar, G., Sitnikova, E., 2006. Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci. Biobehav Rev*. 30, 983e1003.
- 70- van Luijtelaar, E.L., Coenen, A.M., 1986. Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci. Lett*. 70, 393e397.
- 71- van Luijtelaar, E.L., Coenen, A.M., 1988. Circadian rhythmicity in absence epilepsy in rats. *Epilepsy Res*. 2, 331e336.
- 72- BrunoNeto, R.; André, E.S.; Pellarin, L.; Hilário, F.K.; Valle, A.C. & Timolaria, C. – Electrophysiological characterization of a new form of spontaneous epilepsy in Wistar rats. 23rd. International Epilepsy Congress, Prague, Czech Republic 1999.
- 73- Nunes, P. V.; Valle, Angela Cristina & Timolaria, Cesar: Epileptogenic potentials recorded from the cerebellar córtex in rats. In 23th International Epilepsy Congress, 1999, Prague, Czech Republic. *Epilepsia*, 1999, v.40, p.132.

- 74- Jayapal, M., Melendez, A.J. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2006) 33, 496–503.
- 75- Matzilevich DA, Rall JM, Moore AN, Grill RJ, Dash PK: Highdensity microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *J Neurosci Res* 2002, 67:646663.
- 76- Barlow C and Lockhart DJ. DNA arrays and neurobiology – what’s new and whay’s next? *Curr Opin Neurol.* 2002; 12: 554561.
- 77- Zirlinger M, Kreiman G, Anderson DJ: Amygdalaenriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:52705275.
- 78- Zhao X, Lein ES, He A, Smith SC, Aston C, Gage FH. Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J Comp Neurol* 2001, 441:187196.
- 79-. Rocha,C.S; Maurer-Morelli,C.V.; Lopes-Cendes, I.; Artiguenave, F.M. A Tool for selecting endogenous control for qRT-PCR using high throughput expression data. American Society of Human Genetics. ASHG. San Francisco 2012.
- 80- Hubbell E, et al. (2002) Robust estimators for expression analysis *Bioinformatics.* 18(12):1585-92.
- 81- Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*, Series: Springer Series in Statistics, 2nd ed., Springer, NY, XXIX, 487 p. 28, 2002.
- 82- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank Products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters.* 2004;573:8392
- 83- Xi B. *et al.* GABBR1 gene polymorphism(G1465A)is associated with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*; 96(12):5863. 2011.
- 84- HerreraPeco I. *et al.* Genetics components in patients with temporal lobe epilepsy. *Rev Neurol.* 1630; 49(10):5416. 2009.
- 85- Peters, H.C. et al. Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. *Neurogenetics.* 2(1):4754. 1998.
- 86- Koyama R, Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist.* 2005 Aug; 11 (4): 282-7..
- 87- 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.
- 88- Zaia KA, Reimer RJ. Synaptic Vesicle Protein NTT4/XT1 (SLC6A17) Catalyzes Na⁺-coupled Neutral Amino Acid Transport. *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8439-48
- 89- Parra LA, Baust T, El Mestikawy S, Quiroz M, Hoffman B, Haflett JM, Yao JK, Torres GE. The orphan transporter Rxt1/NTT4 (SLC6A17) functions as a synaptic vesicle amino acid transporter selective for proline, glycine, leucine, and alanine. *Mol Pharmacol.* 2008 Dec;74(6):1521-32
- 90- Namekata K, Harada C, Kohyama K, Matsumoto Y, Harada T. Interleukin1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺ATPase via actin depolymerization. *Mol Cell Biol.* 2008. May;28(10):327380
- 91- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18:53–55.

- 92- Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, Davies NP, Herd C, Robertson R, Kullmann DM, Hanna MG. (2004) Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. *Brain* 127:2682–2692.
- 93- Freilich ER, Jones JM, Gaillard WD, Conry JA, Tsuchida TN, Reyes C, Dib-Hajj S, Waxman SG, Meisler MH, Pearl PL. Novel SCN1A mutation in a proband with malignant migrating partial seizures of infancy. *Arch Neurol.* 2011 May;68(5):665-71.
- 94- Shi, X., *et al.*, 2009. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev.* 31, 758–762.
- 95- Lossin, C. *et al.* Compromised function in the Nav1.2 Dravet syndrome mutation R1312T. *Neurobiology of Disease*; 47, 378–384. 2012.
- 96- CuadradoTejedor, M. *et al.* Enhanced Expression of the Voltage Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's Disease Transgenic Mice: An Insight into the Pathogenic Effects of Amyloid β . *Journal of Alzheimer's Disease*; 23 (2011) 195–206.
- 97- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels—From atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542:3–16.]
- 98- AmiryMoghaddam M, Ottersen OP. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4:991–1001.
- 99- Verkman AS. 2005. More than just water channels: Unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118:3225–3232.
- 100- Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. 2004. Aquaporin4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1. *Neuroscience* 129:905–913.
- 101- Nielsen S, Nagelhus EA, AmiryMoghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: highresolution immunogold cytochemistry of aquaporin4 in rat brain. *J Neurosci* 17:171–180.
- 102- Oshio K, Binder DK, Yang B, Schechter S, Verkman AS, Manley GT. 2004. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* 127:685–693.
- 103- Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11981–11986.
- 104- Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiry-Moghaddam M, Bjornsen LP, Spencer DD, Agre P, Ottersen OP, de Lanerolle NC. 2005. Loss of perivascular aquaporin-4 may underlie deficient water and K1 homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1193–1198.
- 105- Lee TS, Eid T, Mane S, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC. 2004. Aquaporin4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol (Berl)* 108:493–502.
- 106- Binder DK, *et al.* Aquaporin4 and Epilepsy. *GLIA* 60:1203–1214 (2012)
- 107- Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Manley GT. 2004a. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin4 water channels. *Neuroreport* 15:259–262.
- 108- Mathern, G.W., Babb, T.L., Pretorius, J.K., Melendez, M., Lévesque, M.F., 1995. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 21, 133–147.
- 109- Wittner, L., Maglóczy, Z., Borhegyi, Z., Halász, P., Tóth, S., Eross, L., Szabó, Z., Freund, T.F., 2001. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108, 587–600.

- 110- De Simoni, M.G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., Vezzani, A., 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic *status epilepticus*. Eur. J. Neurosci. 12, 2623–2633.
- 111- Eriksson, C., Van Dam, A.M., Lucassen, P.J., Bol, J.G., Winblad, B., Schultzberg, M., 1999. Immunohistochemical localization of interleukin1beta, interleukin1 receptor antagonist and interleukin1beta converting enzyme/caspase1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. Neuroscience 93, 915–930.
- 112- Minami, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., 1991. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL1 beta, IL6, TNF alpha and LIF in the rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 593–598.
- 113- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., Vezzani, A., 2008. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. 29, 142–160.
- 114- Turrin, N.P., Rivest, S., 2004. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. Neurobiol. Dis. 16, 321–334.
- 115- Vezzani, A., Balosso, S., Ravizza, T., 2008. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. Brain Behav. Immun. 22, 797–803.
- 116- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFNgamma production by T cells. Nature 378, 88–91.
- 117- Jung, HK, *et al.* Interleukin18 attenuates disruption of brain–blood barrier induced by *status epilepticus* within the rat piriform cortex in interferon independent pathway. BRAIN RESEARCH (2012) 126 – 134.
- 118- Ryu, H.J., Kim, J.E., Kim, M.J., Kwon, H.J., Suh, S.W., Song, H.K., Kang, T.C., 2010. The protective effects of interleukin18 and interferon on neuronal damages in the rat hippocampus following *status epilepticus*. Neuroscience 170, 711–721.
- 119- Kim TW, Yu M, Zhou H, Cui W, Wang J, DiCorleto P, Fox P, Xiao H, Li X. Pellino 2 is critical for Toll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R)-mediated post-transcriptional control. J Biol Chem. 2012 Jul 20;287(30):25686-95.
- 120- Neish AS, Naumann M. Microbial-induced immunomodulation by targeting the NF-kB system. Trends Microbiol. 2011 Dec;19(12):596-605.
- 121- Lee JC, Peter ME. Regulation of apoptosis by ubiquitination. Immunol Rev. 2003 Jun;193:39-47.
- 122- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J (2000) Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. Am J Physiol Renal Physiol 279:F400–F416
- 123- Ehling P, Kanyshkova T, Baumann A, Landgraf P, Meuth SG, Pape HC, Budde T. Adenylyl cyclases: expression in the developing rat thalamus and their role in absence epilepsy. J Mol Neurosci. 2012 Sep;48(1):45-52.



ANEXOS



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

CERTIFICADO

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

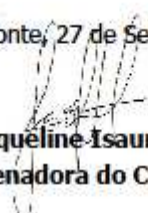
Este certificado expira-se em **26/09/ 2017**.

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 27 de Setembro de 2012.


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

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 26.10.2010 **APROVOU *ad-referendum***, o Protocolo de Pesquisa nº 038/10 intitulado: "Estudo da prevalência e distribuição de crises epiléticas espontâneas do tipo ausência ao longo do desenvolvimento em um novo modelo experimental", apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Angela Cristina do Valle

Pesquisador (a) Executante: Elton Pallone de Oliveira

CEP-FMUSP, 26 de outubro de 2010.



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnnet.usp.br