

Mark William Lopes

**INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS NEUROQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM MODELOS ANIMAIS E
PACIENTES COM EPILEPSIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Bioquímica

Orientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal
Coorientador: Dr. Roger Walz

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Mark William

Investigação de aspectos neuroquímicos e comportamentais em modelos animais e pacientes com epilepsia / Mark William Lopes ; orientador, Rodrigo Bainy Leal ; coorientador, Roger Walz. - Florianópolis, SC, 2016. 201 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

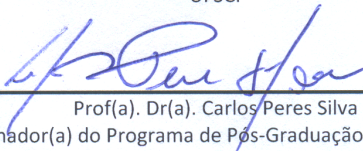
1. Bioquímica. 2. Epilepsia. 3. Aspectos neuroquímicos. 4. Alterações neurocomportamentais. I. Leal, Rodrigo Bainy . II. Walz, Roger. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

“Investigação de aspectos neuroquímicos e comportamentais em modelos animais e pacientes com epilepsia”

Por

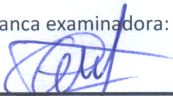
Mark William Lopes

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

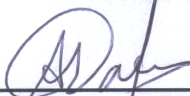


Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

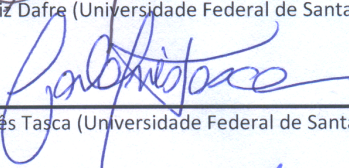
Banca examinadora:



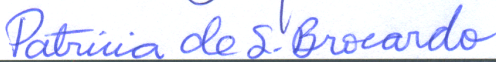
Dr(a) Rodrigo Bairy Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



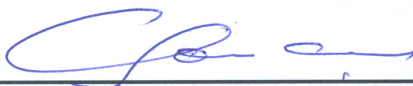
Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Patricia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carlos Alberto Saraiva Gonçalves (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)



Dr(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Mais árduo que realizar este trabalho, é encontrar palavras certas para agradecer às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, e sem as quais eu jamais teria chegado até aqui. Através destas páginas simbólicas, deixo registrado meu profundo agradecimento:

A Deus, pela vida e por proporcionar-me diferentes caminhos, dando-me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

Aos meus pais, Rose e Pedro, pela contribuição na formação do meu caráter, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e dedicação da vida toda.

À minha irmã Samantha por estar sempre ao meu lado, compartilhando alegrias e batalhando junto nos momentos difíceis.

À minha irmã Sula, cunhado Djony e meu sobrinho Theodoro, pela amizade, companhia e apoio durante a realização desse trabalho.

À minha noiva, Djulia, pela cumplicidade, amor, carinho, paciência, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

À minha querida família (tios, tias, primos, primas) pela companhia, carinho, apoio e atenção nesses anos de convivência.

A meu orientador prof. Dr. Rodrigo Bairy Leal por possibilitar a execução deste trabalho, pela amizade, incentivo, pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos durante todo o período em que trabalhamos juntos.

Ao meu coorientador prof. Dr. Roger Walz pela orientação e significativo aprendizado científico.

Ao Laboratório de Neuroquímica III-Transdução de Sinal no SNC, à nossa grande amizade... Ana Paula, Débora, Filipe, Helena, Igor, Ingrid, Isabella, Jhonatas, Tanara... E por toda a colaboração essencial no trabalho.

Ao meu supervisor de estágio no exterior (Albert Einstein College of Medicine - New York), o prof. Dr. Lloyd D. Fricker por abrir as portas do seu laboratório, possibilitando a execução de parte deste trabalho,

pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos durante este período.

A todos os membros do Laboratório 248, pelo acolhimento e apoio, em especial ao Dr. Matthew Sapio, por me guiar e acompanhar durante todo este período. À minha amiga inseparável de New York, Alessandra.

Ao professor Dr. Marcelo Farina e todos os membros do Laboratório de Experimentação em Neuropatologias (LEN) pela oportunidade de colaboração.

Ao professor Dr. Rui Daniel S. Prediger e todos os membros do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas pela oportunidade de colaboração.

A todos os demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À CAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudos que possibilitou a execução desse projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior que possibilitou a execução de parte desse projeto.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano.

Aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que me ajudaram de alguma maneira para a conquista de mais um sonho.

A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.

RESUMO

A epilepsia é uma doença crônica caracterizada por ataques epiléticos recorrentes. A maioria dos pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT), que é o tipo mais comum de epilepsia, além de apresentarem crises convulsivas são acometidos por transtornos neuropsiquiátricos. Estes distúrbios neurocomportamentais e os episódios de crise são provenientes de alterações nos circuitos neurais e maquinaria neuroquímica/celular utilizada para eventos fisiológicos. Além disso, sistemas de sinalização inter e intracelular que são fundamentais para a atividade sináptica são passíveis de regulação e podem estar envolvidos na fisiopatologia da epilepsia. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos: 1) caracterizar alterações específicas da transmissão glutamatérgica e vias de sinalização intracelular no hipocampo dorsal e ventral e córtex temporal de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina de epilepsia; 2) investigar a relação temporal entre a ELT e comorbidades psiquiátricas através de testes comportamentais realizados nas fases de maturação e epilepsia crônica de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina; 3) caracterizar alterações específicas da transmissão glutamatérgica e vias de sinalização intracelular em amostras de neocórtex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala, investigar os efeitos da administração de dexametasona; 4) através do uso de ferramentas de manipulação genética investigar o papel da enzima carboxipeptidase A6 (CPA6) e moléculas de sinalização celular no modelo de crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina em zebrafish. Os principais resultados incluem: 1) diminuição na fosforilação de PKA/GluA1-Ser845, aumento na expressão de GFAP e diminuição na expressão do transportador GLT1 no hipocampo dorsal na fase crônica do modelo da pilocarpina. Em contraste, no hipocampo ventral ocorreu diminuição na fosforilação de PKC/GluA1-Ser831. Estes resultados sugerem um desequilíbrio região específico da transmissão glutamatérgica e de vias de sinalização em resposta a Pilo-SE; 2) déficits na discriminação olfatória e memória social de curto prazo nos períodos de maturação e epilepsia crônica de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina; 3) diminuição na fosforilação de CaMKII/GluA1-Ser831 na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente após uma única dose de dexametasona; 4) larvas de zebrafish geneticamente modificadas (knockdown para CPA6), apresentaram resistência a crises convulsivas induzidas por PTZ e pilocarpina. Alterações na sinalização peptidérgica

e a supressão de inputs excitatórios após a perda de função da enzima CPA6 podem estar envolvidos no mecanismo de resistência. Em conjunto, as alterações neuroquímicas identificadas em regiões cerebrais específicas podem ser valiosas para a compreensão da fisiopatologia da epilepsia e podem ajudar a estabelecer alvos terapêuticos para o tratamento desta neuropatologia. Por fim, os modelos animais aplicados neste estudo reproduziram características específicas da doença, podendo assim ser utilizados como ferramenta para estudar estratégias neuroprotetoras, bem como os mecanismos neurobiológicos e psicopatológicos associados a epileptogênese.

Palavras-chave: Epilepsia, pilocarpina, receptor AMPA, transtornos neuropsiquiátricos, dexametasona, pentilenotetrazol, CPA6.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic disease characterized by recurrent seizures. The majority of patients with temporal lobe epilepsy (TLE), which is the most common type of epilepsy, have to live not only with epileptic episodes but also with neuropsychiatric disorders. These neurobehavioral disorders and seizures come from changes in neural circuitry and neurochemistry/cellular machinery used in physiological events. In addition, inter- and intracellular signaling systems that are critical to synaptic activity are subject to regulation and may be involved in the pathophysiology of epilepsy. Thus, this study aimed to: 1) characterize specific changes of glutamatergic transmission and intracellular signaling pathways in the dorsal and ventral hippocampus and temporal cortex of adult Wistar rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy; 2) investigate the temporal relationship between TLE and psychiatric comorbidities through behavioral tests performed in the maturation and chronic epilepsy phases of adult Wistar rats submitted to the pilocarpine model; 3) characterize specific changes of glutamatergic transmission and intracellular signaling pathways in the samples of neocortex, amygdala and hippocampus of TLE patients undergoing surgical process, and specifically at amygdala, investigate the effects of dexamethasone administration; 4) using tools of genetic engineering, investigate the role of enzyme carboxypeptidase A6 (CPA6) and cellular signaling molecules in the model of seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) and pilocarpine in zebrafish. The main results include: 1) decrease of PKA/GluA1-Ser845 phosphorylation, increase of GFAP expression and decrease in GLT1 transporter expression in the dorsal hippocampus in the chronic period of the pilocarpine model. In contrast, in the ventral hippocampus the phosphorylation of PKC/GluA1-Ser831 was decreased. These results suggest an imbalance region-specific of glutamatergic transmission and signaling pathways in response to Pilo-SE; 2) deficits in olfactory discrimination and short-term social memory during maturation and chronic epilepsy periods of rats submitted to the pilocarpine model; 3) decrease in phosphorylation of CaMKII/GluA1-Ser831 in the amygdala of TLE patients surgically treated after a single dose of dexamethasone; 4) zebrafish larvae genetically modified (knockdown to CPA6) showed resistance to seizures induced by PTZ and pilocarpine. Changes in peptidergic signaling and suppression of excitatory inputs following CPA6 loss of function may be involved in mechanisms of resistance. Taken together, the neurochemical changes identified in specific brain regions may be

valuable for understanding the pathophysiology of epilepsy and can help establish therapeutic targets for the treatment of neuropathology. Finally, the animal model used in this study reproduces specific characteristics of the disease, and thus can be used as a tool to study neuroprotective strategies as well as psychopathological and neurobiological mechanisms underlying to epileptogenesis.

Keywords: Epilepsy, pilocarpine, AMPA receptor, neuropsychiatric disorders, dexamethasone, pentylenetetrazol, CPA6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Famílias moleculares dos receptores glutamatérgicos.....	39
Figura 2. Mecanismos de plasticidade pós-sináptica.....	42
Figura 3. Regulação da fosforilação e tráfego da subunidade GluA1 do receptor AMPA nas sinapses durante a LTP e LTD.....	44
Figura 4. Neurotransmissão excitatória glutamatérgica.	46
Figura 5. Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos.....	49
Figura 6. Desenho experimental.....	51
Figura 7. Eletroforese, Eletrotransferência e Imunodeteção.....	54
Figura 8. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	57
Figura 9. Western blot das enzimas ERK, JNK e p38 ^{MAPK} no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	58
Figura 10. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	59
Figura 11. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	61
Figura 12. Western blot das enzimas ERK, JNK e p38 ^{MAPK} no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	62
Figura 13. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	63
Figura 14. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	65

Figura 15. Western blot das enzimas ERK, JNK e p38 ^{MAPK} no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	66
Figura 16. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	67
Figura 17. Representação esquemática das principais alterações neuroquímicas identificadas no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	71
Figura 18. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	73
Figura 19. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	74
Figura 20. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	75
Figura 21. Desenho experimental.	83
Figura 22. Atividade locomotora avaliada na arena de campo aberto 6 dias (fase de maturação epiléptica) e 54 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina.....	88
Figura 23. Capacidade de discriminação olfatória, avaliada aos 7 dias (fase de maturação epiléptica) e 55 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina.....	91
Figura 24. Efeito da administração de pilocarpina na memória de reconhecimento social avaliado aos 8 dias (fase de maturação epiléptica) e 56 dias (epilepsia crônica) após o tratamento.....	92
Figura 25. Efeito da administração de pilocarpina no comportamento tipo-ansioso de ratos avaliado aos 9 dias (fase de maturação epiléptica) e 57 dias (epilepsia crônica) após o tratamento.....	94
Figura 26. Efeitos sobre o comportamento do tipo-depressivo no teste do nado forçado em ratos avaliado aos 10 dias (fase de maturação	

epiléptica) e 58 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina.....96

Figura 27. Procedimentos realizados para obtenção do tecido cerebral.....108

Figura 28. Fosforilação e expressão de ERK 1/2 no córtex cerebral de ratos jovens..111

Figura 29. Western blot representativo da subunidade GluA1 do receptor AMPA (A) e das enzimas CaMKII (B), PKA (C), PKC e (D) no neocórtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELT tratados cirurgicamente.....112

Figura 30. Western blot representativo das enzimas ERK, JNK e p38^{MAPK} (A-C) dos transportadores gliais de glutamato (D-E) e das proteínas GFAP (F), PP1 (G) e β actina (H) no neocórtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELT tratados cirurgicamente.....113

Figura 31. Regressão linear simples indicando a existência de uma relação dose-efeito, (dexametasona vs fosforilação de GluA1-Ser831) na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente.....116

Figura 32. Regressão linear simples indicando a existência de uma relação dose-efeito, (dexametasona vs fosforilação de GluA1-Ser831) na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente que receberam o corticoide como terapia antiinflamatória adjuvante.....117

Figura 33. Ilustração representativa da enzima carboxipeptidase A6 (CPA6).....135

Figura 34. Morfolinos (MOs) projetados para bloquear o splicing do exon 2 (CPA6-MO2) ou exon 4 (CPA6-MO4).....140

Figura 35. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, expostas a concentração de 2,5 mM de PTZ.....146

Figura 36. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, expostas a concentração de 15 mM de PTZ.....148

Figura 37. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, 3 e 7 dpf expostas ao PTZ.....	149
Figura 38. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6 expostas a pilocarpina.....	152
Figura 39. Atividade locomotora de animais expostos a pilocarpina, uma comparação de resultados utilizando o número de cruzamentos (manual) e a distância total percorrida (software).....	153
Figura 40. Análise comportamental de larvas de zebrafish que superexpressam CPA6, frente a exposição ao PTZ e pilocarpina.....	155
Figura 41. Análise da capacidade de resposta a estímulos das larvas de zebrafish.....	157
Figura 42. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de CPA6-MO2.....	158
Figura 43. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type expostas a concentração de 15 mM de PTZ durante 1 h.....	159
Figura 44. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type expostas a concentração de 60 mM de pilocarpina durante 1 h.....	161
Figura 45. Análise comportamental de larvas de zebrafish pré-tratadas com pilocarpina 60 mM por 1h, re-expostas ao PTZ e a pilocarpina 23 h depois.....	163
Figura 46. Resumo das principais alterações a nível de mRNA encontradas nas larvas de zebrafish injetadas com CPA6-MO2 e larvas de zebrafish wild-type pré-tratadas por 1h com 60 mM + 23 h de washout.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para western blot.....	55
Tabela 2. Fosforilação da subunidade GluA1 e vias de sinalização celular analisadas no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	72
Tabela 3. Imunoconteúdo dos alvos analisados no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	72
Tabela 4. Alterações neurocomportamentais em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.....	100
Tabela 5. Níveis de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 no neocórtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELT tratados cirurgicamente, que receberam ou não dexametasona.....	115
Tabela 6. Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas e cirúrgicas de pacientes com ELT tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona.....	118
Tabela 7. Modelo para avaliar a associação de variáveis com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala de pacientes tratados cirurgicamente.....	122
Tabela 8. Modelo para avaliar a associação independente de variáveis com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala de pacientes tratados cirurgicamente.....	123
Tabela 9. Níveis de fosforilação (PKA, PKC, CaMKII, ERK, JNK, p38 ^{MAPK}) e expressão (GluA1, EAATs, GFAP, PP1) de alvos moleculares analisados na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente, que receberam ou não dexametasona.....	124
Tabela 10. Sequência dos morfolino-oligonucleotídeos.....	140
Tabela 11. Sequências dos primers utilizados para o ensaio de qRT-PCR.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico
AMPA: Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
BDZs: Benzodiazepínicos
BSA: Soro Albumina bovina
CaM: Cálcio calmodulina
CaMKII: Proteína cinase cálcio calmodulina-dependente II
CBZ: Carbamazepina
cdNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar
CF: Convulsões febris
CHGA: Cromogranina A
CPA6-MO2: Morfolino dirigido ao exon 2 da proteína CPA6
CPA6-MO4: Morfolino dirigido ao exon 4 da proteína CPA6
CPA6: Carboxipeptidase A6
CPE: Carboxipeptidase E
CPs: Carboxipeptidases
DAEs: Drogas antiepilépticas
dNTP's: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPH: Difenilhidantoina
EAATs: Transportadores de aminoácidos excitatórios
EAF: Estímulos de alta frequência
EBF: Estímulos de baixa frequência
EDN-1: Endotelina 1
ELT: Epilepsia do lobo temporal
ELTM-EH: Epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose do hipocampo
ELTM: Epilepsia do lobo temporal mesial
ERK: Cinase regulada por sinal extracelular
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GAL: Galanina
GFAP: Proteína glial fibrilar ácida
GLAST: Transportador de glutamato-aspartato
GLT1: Transportador de glutamato 1
GluA1-Ser818: Sítio serina 818 da subunidade GluA1
GluA1-Ser831: Sítio serina 831 da subunidade GluA1
GluA1-Ser845: Sítio serina 845 da subunidade GluA1
GluA1-Thr840: Sítio treonina 840 da subunidade GluA1
GluA1: Subunidade GluA1 do receptor AMPA
GluA2: Subunidade GluA2 do receptor AMPA

GluN1: Subunidade GluN1 do receptor NMDA
GluN2A: Subunidade GluN2A do receptor NMDA
GluN2B: Subunidade GluN2B do receptor NMDA
IPI: Insulto precipitante inicial
JNK: c-Jun cinase amino-terminal
KA: Ácido caínico
LMT: Lamotrigina
LTD: Despotenciação de longa duração
LTP: Potenciação de longa duração
M1: Receptores muscarínicos tipo 1
MAPKK: Cinase da MAP cinase
MAPKKK: Cinase da cinase das MAP cinases
MAPKs: Proteínas cinases ativadas por mitógenos
mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro
NMDA: N-metil-D-aspartato
NPY: Neuropeptídeo Y
NTS: Neurotensina
PAM: Pressão arterial média
PHT: Fenitoína
PILO-SE: *Status epilepticus* induzido por pilocarpina
PKA: Proteína cinase A
PKC: Proteína cinase C
PMSF: Fluoreto de sulfonilmetilfenil
PNB: Fenobarbital
PP1: Proteína fosfatase 1
PP2A: Proteína fosfatase 2A
PP2B: Proteína fosfatase 2B
PTZ: Pentilenotetrazol
qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RNA: Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SE: *Status epilepticus*
SNC: Sistema Nervoso Central
TAC1: Taquicinina 1
TBS-T: Solução Salina Tamponada com Tris e Tween
TBS: Solução Salina Tamponada com Tris
TPM: Topiramato
VA: Ácido valpróico

SUMÁRIO

1 EPILEPSIA	27
1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA	27
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE EPILEPSIA	28
1.2.1 Classificação das crises epiléticas	30
1.2.2 Epilepsia do lobo temporal (ELT)	31
1.2.3 Aspectos fisiopatológicos das crises convulsivas e epilepsias	32
1.3 JUSTIFICATIVA.....	34
1.4. OBJETIVOS.....	34
1.4.1 Objetivo geral	34
2 CAPÍTULO I: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS NEUROQUÍMICOS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (MODELO ANIMAL)	36
2.1 MODELOS ANIMAIS	36
2.1.1 Modelo da Pilocarpina	37
2.2 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	38
2.2.1 Potenciação e Depotenciação de longa duração, LTP e LTD	40
2.2.2 Regulação do receptor AMPA	42
2.2.3 Transportadores Gliais de Glutamato	44
2.3 EPILEPTOGÊNESE E TRANSDUÇÃO DE SINAL	46
2.3.1 Via das MAPKs	47
2.4 OBJETIVOS.....	49
2.4.1 Objetivos específicos	49
2.5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.5.1 Modelo animal	50
2.5.2 Análises Neuroquímicas	51
2.5.2.1 Preparação das amostras	51
2.5.3 Eletroforese e Eletrotransferência	52
2.5.4 Imunodeteção	52
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
2.7 RESULTADOS	55

2.7.1 Sinalização celular no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina	56
2.7.2 Sinalização celular no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina	60
2.7.3 Sinalização celular no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina	64
2.8 DISCUSSÃO	68
2.9 CONCLUSÃO	76
3 CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (MODELO ANIMAL)	77
3.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS	77
3.1.1 Ansiedade, Depressão e Comprometimento Cognitivo ...	78
3.3.1 Objetivos específicos	81
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	82
3.4.1 Modelo animal	82
3.4.2 Avaliação comportamental	83
3.4.2.1 Campo Aberto	84
3.4.2.2 Discriminação Olfatória	84
3.4.2.3 Reconhecimento Social	85
3.4.2.4 Labirinto em Cruz Elevado	85
3.4.2.5 Nado Forçado	86
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
3.6 RESULTADOS	87
3.6.1 Campo Aberto	87
3.6.2 Discriminação Olfatória	90
3.6.3 Reconhecimento Social	92
3.6.4 Labirinto em Cruz Elevado	93
3.6.5 Nado Forçado	95
3.7 DISCUSSÃO	97
3.8 CONCLUSÃO	100

4	CAPÍTULO III: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS NEUROQUÍMICOS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ANÁLISE EM PACIENTES REFRACTÁRIOS)	101
4.1	PROCESSO CURÚRGICO COMO OPÇÃO DE TRATAMENTO PARA PACIENTES EPILEPTICOS REFRACTÁRIOS.....	101
4.2	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E TRANSDUÇÃO DE SINAL	104
4.3	OBJETIVOS.....	104
4.3.1	Objetivos específicos	104
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	105
4.4.1	Pacientes.....	105
4.4.2	Protocolo de anestesia	106
4.4.3	Tratamento com dexametasona	107
4.4.4	Cirurgia, variáveis transoperatórias e amostras de tecido cerebral.....	107
4.4.5	Análises Neuroquímicas	108
4.4.5.1	Preparação das amostras	108
4.4.6	Eletroforese e eletrotransferência.....	109
4.4.7	Imunodeteção.....	109
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
4.6	RESULTADOS	112
4.6.1	Western blot representativo dos alvos neuroquímicos analisados no neocortex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH.....	112
4.6.2	Efeitos da administração de dexametasona sobre vias de sinalização intracelular: um estudo realizado em pacientes com ELTM-EH.....	114
4.7	DISCUSSÃO.....	125
4.8	CONCLUSÃO	129
5	CAPÍTULO IV: CARBOXIPEPTIDASE A6 E MOLÉCULAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR PTZ E PILOCARPINA EM ZEBRAFISH	130
5.1	ZEBRAFISH	130

5.1.1 Zebrafish: ferramenta para o estudo de crises convulsivas	131
5.1.1.1 Pentilenotetrazol (PTZ)	132
5.1.1.2 Pilocarpina	132
5.2 PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA E EPILEPSIA	133
5.2.1 Catálise em C-terminal: uma modificação realizada por carboxipeptidases	134
5.2.2.1 Carboxipeptidase A6 (CPA6)	135
5.3. OBJETIVOS	137
5.3.1 Objetivos específicos	137
5.4 MATERIAIS E MÉTODOS	137
5.4.1 Avaliação comportamental dos animais expostos ao PTZ	137
5.4.2 Avaliação comportamental dos animais expostos a pilocarpina	138
5.4.3 Ensaios de mobilidade e resposta a estímulos	139
5.4.4 Manipulação genética (knockdown, overexpression e rescue)	139
5.4.5 Determinação dos níveis de mRNA por qRT-PCR	140
5.4.5.1 Extração de RNA	140
5.4.5.2 Síntese de cDNA	141
5.4.5.3 qRT-PCR	141
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	142
5.6 RESULTADOS	143
5.6.1 Knockdown para CPA6 previne o comportamento natatório convulsivo induzido por PTZ	143
5.6.2 Knockdown para CPA6 previne o aumento da atividade locomotora induzido pela pilocarpina	151
5.6.3 Superexpressão de CPA6 não altera os parâmetros comportamentais induzidos por PTZ ou pilocarpina	154
5.6.4 Knockdown para CPA6 não altera a capacidade de resposta a estímulos das larvas de zebrafish	156
5.6.5 Knockdown para CPA6 altera a expressão de neuropeptídeos, moléculas de sinalização celular e subunidades de receptores neurais	157

5.6.6 Exposição ao PTZ altera a expressão de neuropeptídeos e moléculas de sinalização celular	158
5.6.7 Exposição a pilocarpina altera a expressão de neuropeptídeos e moléculas de sinalização celular	160
5.6.8 Pré-tratamento com 60 mM de pilocarpina reduz as crises convulsivas induzidas por PTZ 2,5 mM.....	161
5.7 DISCUSSÃO.....	164
5.8 CONCLUSÃO	168
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	170
7 REFERÊNCIAS	172
8 ANEXOS	200
8.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS A TESE (ABSTRACT)	200

Publicações durante o período de doutoramento (2012 - 2016)

Artigos científicos relacionados a tese

1. LOPES, M. W. et al. Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 87, p. 22-33, 2015.
2. LOPES, M. W. et al. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 55, p. 92-100, 2016.

Outros artigos científicos

3. COSTA, A. P. et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 420-7, 2012.
4. RUSSI, M. A. et al. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochem Res**, v. 37, n. 2, p. 288-97, 2012.
5. CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.
6. LOPES, M. W. et al. Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Res**, v. 37, n. 9, p. 1868-78, 2012.
7. FREITAS, A. E. et al. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res**, v. 237, p. 176-84, 2013a.
8. FREITAS, A. E. et al. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanadae* in the olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 3, p. 737-45, 2013b.
9. LOPES, M. W. et al. Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. **Exp Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 153-63, 2013.

10. CORDOVA, F. M. et al. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 7, p. 1231-44, 2013.
11. JACQUES, A. V. et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochem Int**, v. 62, n. 6, p. 836-42, 2013.
12. PERES, T. V. et al. In vitro manganese exposure disrupts MAPK signaling pathways in striatal and hippocampal slices from immature rats. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 769295, 2013.
13. CUNHA, M. P. et al. Involvement of PKA, PKC, CAMK-II and MEK1/2 in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 653-9, 2014.
14. RIEGER, D. K. et al. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **J Mol Recognit**, v. 27, n. 12, p. 746-54, 2014.
15. FREITAS, A. E. et al. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **J Psychiatr Res**, v. 58, p. 137-46, 2014.
16. NEIS, V. B. et al. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 130, p. 9-14, 2015.
17. BLANK, M. et al. Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. **Neurosci Lett**, v. 594, p. 76-81, 2015.
18. CUNHA, M. P. et al. Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, 2015.
19. PERES, T. V. et al. Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 28-37, 2015.
20. RONSONI, M. F. et al. Mitochondrial Respiration Chain Enzymatic Activities in the Human Brain: Methodological Implications for Tissue Sampling and Storage. **Neurochem Res**, 2015.

21. COSTA, A. P. et al. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases, ERK 1/2, p38 and JNK p54/p46 During Postnatal Development of Rat Hippocampus. **Neurochem Res**, 2015.
22. PERES, T. V. et al. Tyrosine hydroxylase regulation in adult rat striatum following short-term neonatal exposure to manganese. **Metallomics**, 2016.

Capítulos de Livro

1. LEAL, R.B. et al. Cadmium Neurotoxicity and Its Role in Brain Disorders. In: Y.V. Li; J.H. Zhang. (Org.). **Metal Ion in Stroke**. Springer. p. 751-766, 2012.
2. PERES, T.V. et al. Chapter 7. Effect of Manganese on Signaling Pathways. **Issues in Toxicology**. Royal Society of Chemistry, p. 182-198, 2015.

1 EPILEPSIA

1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

O termo epilepsia deriva do verbo grego *επιλαμβάνειν* (epilamvanein), que significa “ser agarrado”, “ser atacado” ou “ser tomado por” (ENGEL e PEDLEY, 1997). A história da humanidade evidencia desde tempos remotos uma ligação natural entre a religião e a doença (LONGRIGG, 2000), a qual ainda hoje se faz presente. Na Grécia Antiga existia a crença da origem sobrenatural das doenças, as quais eram entendidas como punições exercidas pelos deuses ou por espíritos malignos. A epilepsia, mais do que qualquer outra, também estava associada a atitudes supersticiosas, pois as crises epiléticas eram consideradas o exemplo visível das possessões demoníacas e, como tal, era designada de “doença sagrada” (ENGEL e PEDLEY, 1997; LONGRIGG, 2000).

A luta entre o preconceito e a aceitação, a ignorância e o conhecimento, o mito e a ciência, têm sido longa e difícil. No que diz respeito a epilepsia, o marco histórico mais importante remonta a 400 a.C., período em que Hipócrates a considerou como uma doença do cérebro de causa natural, susceptível de ser tratada com dietas e medicamentos e não mediante rituais ou práticas de caráter religioso (ENGEL e PEDLEY, 1997; LONGRIGG, 2000). No entanto, a era moderna da epilepsia apenas despontou em meados do século XIX com os trabalhos de John Hughlings Jackson, que contribuíram definitivamente para a aproximação ao entendimento atual da epileptologia. Jackson propôs a existência de diferentes categorias de crises epiléticas, cada uma com a sua própria fisiopatologia e semiologia, causadas por descargas ocasionais, excessivas, de início súbito e de origem na substância cinzenta (ENGEL e PEDLEY, 1997; MCNAMARA, 2006).

No início do século XX, mais precisamente em 1912, Hauptmann enquanto estudava o efeito ansiolítico de diversas substâncias constatou acidentalmente uma redução na frequência das crises em pacientes epiléticos medicados com fenobarbital (PNB). A experiência clínica subsequente comprovou a eficácia antiepilética do PNB e a ausência de toxicidade evidente, suprimindo a aplicação clínica do brometo de potássio, fármaco que vinha sendo utilizado até aquele momento, mas que apresentava alta toxicidade (KRALL *et al.*, 1978; PEARCE, 2002).

Ao contrário do brometo de potássio e do PNB, a ação anticonvulsivante da fenitoína (PHT) foi demonstrada primeiramente em animais de laboratório (1937), enquanto sua eficácia antiepiléptica foi estabelecida a nível clínico apenas no ano seguinte (1938). O sucesso destes procedimentos, além de ter proporcionado um novo fármaco para os pacientes epiléticos, constituiu um momento de destaque na investigação neurofarmacológica ao evidenciar que a experimentação animal poderia conduzir a descoberta de compostos com eficácia clínica e que a exposição ao homem se limitasse apenas as substâncias mais efetivas nos modelos experimentais. Depois disso, assistiu-se a incessante otimização da metodologia subjacente a indução de crises e a síntese química de novos fármacos associados a farmacologia anticonvulsivante (KRALL *et al.*, 1978).

Para o progresso marcante da epileptologia no século XX, contribuíram definitivamente nos anos 30 a descoberta da eletroencefalografia e da PHT. O registro eletroencefalográfico tornou-se decisivo na investigação dos aspectos básicos do fenômeno epilético nos laboratórios de neurofisiologia experimental e no apoio as práticas clínica e cirúrgica (VASCONCELOS-DUENAS, 2001). A PHT, por sua vez, como primeiro fármaco de ação anticonvulsivante específica, constituiu uma ferramenta única na investigação dos fenômenos neurofisiológicos, particularmente no estudo dos mecanismos de iniciação e de prevenção das crises convulsivas (KRALL *et al.*, 1978).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de técnicas de monitorização intracraniana para avaliar os pacientes com crises refratárias e a otimização dos procedimentos cirúrgicos permitiram a obtenção do tecido epilético humano, o qual constituiu uma importante ferramenta para investigação de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares nos pacientes epiléticos (ENGEL e PEDLEY, 1997). Contudo, ainda que os avanços no entendimento da patogênese das crises epiléticas tenham sido relevantes, as bases moleculares e celulares envolvidas na fisiopatologia da epilepsia são pouco compreendidas. Assim, perante a ausência de uma etiologia específica, a terapia farmacológica vem sendo dirigida ao controle dos sintomas, ou seja, a supressão das crises epiléticas através da administração crônica de fármacos (LOSCHER e SCHMIDT, 2002).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE EPILEPSIA

Os transtornos convulsivos são uma das condições neurológicas mais comuns em todo o mundo. Estima-se que aproximadamente 0,5 -

1% da população mundial seja acometida pela doença (GOLDENBERG, 2010), atingindo cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo (SANDER, 2003), sendo que, 80% destes encontram-se em países com baixo índice de desenvolvimento humano (NEWTON e GARCIA, 2012). Existem poucos estudos epidemiológicos disponíveis sobre epilepsia no Brasil, porém levando em conta a população brasileira de aproximadamente 206 milhões de habitantes (IBGE, 2016) e a prevalência de 1,2% da doença no país (GALLUCCI NETO e MARCHETTI, 2005), poderíamos estimar a existência de pelo menos 2,5 milhões de pacientes epiléticos no Brasil. Estes dados colocam a epilepsia como um problema de saúde relevante, justificando claramente a necessidade de investimentos na capacitação de recursos tanto na área de assistência como também de pesquisa básica deste processo.

Durante anos, mesmo entre os especialistas, a distinção entre epilepsia e crises epiléticas permaneceu pouco clara (SEINO, 2006). Com o intuito de facilitar a comunicação entre os profissionais de diversas áreas, a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) propôs as seguintes definições: *crise epilética* é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devidos a atividade neuronal anormal síncrona ou excessiva no cérebro; *epilepsia* é uma perturbação cerebral caracterizada pela predisposição continuada para gerar crises epiléticas e pelas respectivas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epilética (FISHER *et al.*, 2005).

As crises epiléticas podem ser consequência de fatores genéticos múltiplos, anormalidades estruturais, funcionais e metabólicas do tecido cerebral. Além disso, traumatismo craniano, interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, doenças infecciosas, tumores, uso abusivo de drogas, agentes tóxicos também podem funcionar como gatilho para o desenvolvimento de crises (BRODIE e FRENCH, 2000). As crises epiléticas representam episódios limitados e bem definidos no tempo, cujo início e término podem ser determinados com base em critérios comportamentais ou eletroencefalográficos. Enquanto a iniciação é facilmente identificável, o *terminus* é muitas vezes menos evidente, pois os sintomas do estado pós-ictal podem mascarar o final da crise epilética (FISHER *et al.*, 2005).

As manifestações clínicas das crises epiléticas são extremamente variáveis e, teoricamente, tão diversas quanto a própria função cerebral, ou seja, dependem das áreas corticais envolvidas (MOSEWICH e SO, 1996). O córtex cerebral é, efetivamente, o principal responsável pela iniciação das crises epiléticas, mas em determinadas circunstâncias as

crises também podem ter origem no sistema talâmico-cortical e no tronco cerebral. Em consequência, as crises podem afetar a função motora, sensorial e autonômica, a consciência, o estado emocional, a memória, a cognição ou o comportamento. A este respeito é de referir que nem todas as crises interferem com todas estas funções, porém pelo menos uma delas será afetada. Assim, torna-se evidente o porquê da diversidade na apresentação clínica do processo epiléptico, onde além da localização cerebral do foco epileptogênico outros fatores também estarão implicados, entre eles, a forma de propagação, a maturidade do próprio cérebro, os processos patológicos concomitantes, o ciclo sono-vigília e a medicação (FISHER *et al.*, 2005).

Dada a complexidade global que caracteriza a epilepsia, uma terminologia internacional comum como pré-condição para a comparação dos resultados sucessivamente obtidos na investigação e no tratamento da doença e, conseqüentemente, para o progresso científico da epileptologia é de grande importância (BERG e BLACKSTONE, 2006). Neste contexto, a ILAE tem contribuído ao estabelecer a terminologia para as crises epiléticas e as classificações padronizadas para as epilepsias e síndromes epiléticas (ENGEL e INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST, 2001). No entanto, tendo em vista a complexidade da classificação das síndromes epiléticas, e os objetivos deste trabalho, vamos nos restringir de forma sumária apenas a classificação das crises epiléticas e detalhes sobre a epilepsia do lobo temporal (ELT), doença abordada neste estudo.

1.2.1 Classificação das crises epiléticas

As crises epiléticas são classificadas de acordo com sua manifestação clínica e eletroencefalográfica. A classificação a seguir foi proposta pela ILAE:

- **Crises parciais ou focais:** São crises nas quais a manifestação clínica e eletroencefalográfica inicial indica ativação de uma região delimitada em um hemisfério cerebral. Dependendo da área comprometida surgirão sintomas positivos ou negativos relacionados a fisiologia da região comprometida. Quando a crise focal envolve estruturas do lobo temporal (hipocampo, córtex entorrinal, córtex perirrinal e temporal) ou frontal associadas aos processos de memória, pode ocorrer perda de consciência. Assim, as crises parciais são divididas em:

- Simples: Nas quais não ocorre perda de consciência.

- **Complexas:** Nas quais ocorre perda de consciência.

As crises parciais simples eventualmente podem evoluir para crises parciais complexas. Caso uma crise de início focal se propague para ambos os hemisférios tornando-se generalizada, é denominada como crise parcial (simples ou complexa) secundariamente generalizada.

- **Crises generalizadas:** São crises que iniciam simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais e manifestam-se eletroencefalograficamente em toda a superfície cortical. Quando a crise é generalizada, atingindo todo o cérebro, incluindo a formação reticular, em geral ocorre perda de consciência. As crises generalizadas podem ser do tipo:

- Convulsivas (tônicas, clônicas, tônico-clônicas);
- Não convulsivas (do tipo ausência e mioclônicas).

- **Crises não classificadas:** São crises que não preenchem critérios para a classificação descrita anteriormente.

1.2.2 Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A epilepsia é uma condição neurológica comum e frequentemente associada a dificuldades psicossociais, gerando impacto na qualidade de vida não só do paciente como também de sua família (FERNANDES *et al.*, 2007). A ELT é a forma de epilepsia mais prevalente no adulto, correspondendo a aproximadamente 60% das epilepsias focais e, pelo menos, a 40% de todos os casos de epilepsia (ENGEL, 2001).

A ELT pode ser subdividida em mesial (ou medial) e neocortical (ou lateral) segundo a origem e a semiologia das crises. A ELT mesial (ELTM) apresenta alto índice de associação com transtornos psiquiátricos, uma vez que envolve circuitos do sistema límbico, o principal integrador de processos emocionais. Esta síndrome corresponde à cerca de 60% de todos os casos de ELT e está associada a uma maior refratariedade ao tratamento medicamentoso, principalmente se há esclerose hipocampal. Cerca de 50 a 70% dos pacientes com ELTM refratária ao tratamento clínico apresentam esclerose hipocampal (GAITATZIS, TRIMBLE e SANDER, 2004; FISHER *et al.*, 2005; SWINKELS *et al.*, 2005). A esclerose hipocampal é caracterizada por extensa perda neuronal nas sub-regiões CA1, CA3 e hilo da formação hipocampal, gliose e dispersão de células granulares no giro denteado (BABB *et al.*, 1991; BABB, 1999). Este conjunto de alterações ocorre durante a epileptogênese, a partir de um dano ao sistema nervoso central

(SNC) ou insulto precipitante inicial. O termo epileptogênese refere-se ao processo dinâmico que progressivamente altera a excitabilidade neuronal, estabelece conexões críticas e induz alterações estruturais (PITKANEN *et al.*, 2002; SUTULA, 2004; PITKANEN, 2010).

Apesar da relação entre esclerose hipocampal e ELTM estar bem estabelecida na literatura, a etiologia e os mecanismos precisos pelos quais a esclerose hipocampal influencia as crises epilépticas ainda não foram completamente desvendados.

1.2.3 Aspectos fisiopatológicos das crises convulsivas e epilepsias

Ao considerar a semiologia clínica intrínseca aos vários tipos de crises e síndromes epilépticas, facilmente percebe-se que elas não partilham da mesma patogênese. Os diferentes tipos de epilepsias refletem diferentes distúrbios fisiopatológicos e, conseqüentemente, o conhecimento obtido a partir de uma determinada condição epiléptica não pode ser diretamente generalizado a outras (ENGEL, WILSON e BRAGIN, 2003). Contudo, apesar das diferenças existentes, as síndromes epilépticas partilham aparentemente características comuns relacionadas com a ictogênese, tais como a excitabilidade neuronal aumentada e hipsincronicidade (ENGELBORGHES, D'HOOGHE e DE DEYN, 2000; DELORENZO, SUN e DESHPANDE, 2005).

A regulação da excitabilidade no SNC é mediada por canais iônicos que, uma vez ativados, formam poros seletivos para os íons sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-). Estes ionóforos incluem canais dependentes de voltagem e canais dependentes de ligação como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato. De fato, o GABA e o glutamato constituem, respectivamente, o principal neurotransmissor inibitório e excitatório no cérebro dos mamíferos. O GABA exerce as suas ações inibitórias especialmente através dos receptores GABA_A e GABA_B . Em oposição, os efeitos excitatórios do glutamato são mediados pelos receptores ionotrópicos do ácido α -amino-3-hidróxido-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), ácido cáinico (KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), e por receptores metabotrópicos acoplados a sistemas de segundos mensageiros (SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011). Obviamente, eventuais alterações estruturais e/ou funcionais nos canais iônicos ou o desequilíbrio entre a neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica podem culminar com a hiperexcitabilidade neuronal característica da epilepsia.

Existem evidências indicando que a hiperexcitabilidade neuronal e a geração das crises epiléticas podem estar relacionadas com alterações funcionais e estruturais no microambiente neural. As primeiras compreendem alterações nas concentrações iônicas, na atividade metabólica e nos níveis de neurotransmissores, enquanto as alterações estruturais estão associadas a alterações nos neurônios e nas células gliais circundantes ao foco epilético (ENGELBORGHES, D'HOOGHE e DE DEYN, 2000). Em condições fisiológicas, as células da glia são responsáveis e capazes de recaptar o excesso de neurotransmissores do espaço sináptico (por exemplo, glutamato) e de promover a homeostase do K^+ , um cátion pró-ictogênico bem conhecido. Todavia, as lesões cerebrais, seguidas do processo inflamatório e de reparação tecidual provocam alterações nas membranas das células gliais, conseqüentemente promovendo a incapacidade de manter a homeostase do K^+ e os níveis fisiológicos dos neurotransmissores, conduzindo a excitabilidade neuronal aumentada (D'AMBROSIO, 2004).

Outra condição que pode promover a excitabilidade é a ocorrência de alterações fisiológicas e anatômicas nas redes neurais. Para isso, entre outros fatores, podemos citar a perda seletiva de neurônios inibitórios e/ou o desenvolvimento de *mossy fibers*. Pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose do hipocampo (ELTM-EH) tem demonstrado proliferação deste tipo de fibras, as quais talvez estejam implicadas na formação de sinapses excitatórias e no aumento da frequência das crises epiléticas (ENGELBORGHES, D'HOOGHE e DE DEYN, 2000).

Nos últimos tempos, a alteração funcional de canais iônicos vem sendo associada a fenômenos epileptogênicos, principalmente aqueles envolvidos no controle das correntes de Ca^{2+} (ARMIJO *et al.*, 2005). O *status epilepticus*, os acidentes vasculares cerebrais e os traumatismos cerebrais constituem três exemplos de lesões comuns do cérebro que partilham o mesmo mecanismo molecular na formação dos danos neuronais. Tal mecanismo envolve o aumento das concentrações extracelulares de glutamato que, por sua vez, induzem um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} nos neurônios, desencadeando a ativação de cascatas de sinalização intracelular que podem culminar com o dano e/ou morte neuronal. Os neurônios resistentes a exposição prolongada a elevados níveis de Ca^{2+} sofrem, provavelmente, alterações que podem desencadear o processo epileptogênico. Deste modo, modificações prolongadas na dinâmica do Ca^{2+} neuronal podem ser críticas e podem promover alterações permanentes de neuroplasticidade que conduzem a

epilepsia. Adicionalmente, é importante salientar que o Ca^{2+} , enquanto segundo mensageiro, pode estar envolvido em outros processos celulares que contribuam para a epileptogênese (DELORENZO, SUN e DESHPANDE, 2005).

Apesar de várias evidências e estudos abordando o tema, os mecanismos neuroquímicos envolvendo a fisiopatologia da epilepsia ainda não são totalmente compreendidos, permanecendo mais “sombras” que “luzes”, onde muitas questões estão sem resposta. Todavia, é esperado que o conhecimento crescente e o entendimento dos mecanismos subjacentes a epileptogênese possam constituir oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias.

1.3 JUSTIFICATIVA

A epilepsia é uma doença bastante prevalente cuja repercussão financeira e social é muito significativa para a população brasileira e mundial. O estudo de aspectos neuroquímicos e comportamentais relacionados à epilepsia em modelos animais e em pacientes epiléticos, abordados nesta tese, permitirá o desenvolvimento do tema por envolver a determinação de mecanismos moleculares adjacentes à fisiopatologia da epilepsia. As informações apresentadas até o momento mostram que a epilepsia é uma doença bastante complexa, envolvendo diversos fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos. Portanto, o entendimento das bases neuroquímicas envolvidas no processo de epileptogênese é de fundamental importância no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento dos pacientes com quadro de epilepsia.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Caracterizar alterações específicas da transmissão glutamatérgica e vias de sinalização intracelular no hipocampo dorsal e ventral e córtex temporal de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina de epilepsia. Investigar a relação temporal entre a ELT e comorbidades psiquiátricas através de testes comportamentais realizados nas fases de maturação e epilepsia crônica de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina. Caracterizar alterações específicas da transmissão glutamatérgica e vias de sinalização intracelular em amostras de neocórtex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT

submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala, investigar os efeitos da administração de dexametasona. Por fim, através do uso de ferramentas de manipulação genética investigar o papel da enzima carboxipeptidase A6 (CPA6) e moléculas de sinalização celular no modelo de crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina em zebrafish.

As metodologias, os resultados e discussões derivados dos estudos realizados serão apresentados na forma de 4 capítulos.

2 CAPÍTULO I: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS NEUROQUÍMICOS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (MODELO ANIMAL)

2.1 MODELOS ANIMAIS

No intuito de aprofundar o conhecimento sobre a epilepsia, durante o último século, diversos modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de mimetizar este transtorno. Apesar do frequente aparecimento de diferentes modelos experimentais, geralmente cada modelo está restrito a algumas das características desta ou daquela forma de epilepsia, sendo improvável estudar esta doença em um único modelo animal (LOSCHER, 2011). Neste sentido, a caracterização de múltiplos modelos experimentais de epilepsia ou de crises convulsivas permite uma compreensão mais ampla dos fenômenos relacionados com esta patologia (COPPOLA e MOSHE, 2012).

Inicialmente, os modelos foram classificados em genéticos e não genéticos. O primeiro consiste na geração de crises espontâneas geralmente relacionadas a alterações na formação e/ou no desenvolvimento do sistema nervoso (LOSCHER, 1984). Tal abordagem permite estudar esta patologia de forma crônica, tendo em vista que ao decorrer do desenvolvimento do animal ocorreram crises convulsivas recorrentes. Por outro lado, esta mesma abordagem torna difícil o estudo da crise convulsiva em si, já que é complicado estipular um controle do início da manifestação. O segundo consiste na submissão do animal a estímulos químicos ou elétricos, os quais culminam em crises convulsivas (STEWART *et al.*, 2012). Este tipo de abordagem permite precisar o momento exato do início da manifestação, tendo em vista que será resultado da aplicação pontual de um fármaco ou estímulo elétrico. Dependendo do fármaco testado, pode ainda haver a subdivisão em modelos agudos ou crônicos. Dentre os modelos crônicos destacam-se o modelo da pilocarpina (TANG, LOKE e LING, 2011; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013) e o modelo do ácido caínico (BLOSS e HUNTER, 2010). Para os modelos agudos, encontra-se em destaque o modelo do pentilenotetrazol (PTZ), o qual induz crises convulsivas rápidas com baixa mortalidade (RUBIO *et al.*, 2010).

Essa diversidade de modelos animais permite a pesquisadores estudarem desde alterações genéticas que levam a crises, como por exemplo, mutações em canais de K^+ (ROBBINS e TEMPEL, 2012), até crises convulsivas pontuais em decorrência de hipóxia-isquemia (BURNS *et al.*, 2012), gliomas (BUCKINGHAM e ROBEL, 2013),

episódios de febre (BYLER *et al.*, 2014) que levam ao quadro de epilepsia posteriormente.

2.1.1 Modelo da Pilocarpina

A capacidade de reproduzir as doenças humanas em modelos animais apresenta uma grande vantagem para a medicina moderna experimental. O modelo da pilocarpina é altamente isomórfico com a ELT em humanos, e tem sido amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa por todo o mundo (HAMILTON *et al.*, 1997; PRIEL e ALBUQUERQUE, 2002). A pilocarpina parece induzir o estado epiléptico de uma forma dependente da ativação dos receptores muscarínicos M1, pois camundongos knockout para o receptor M1 não desenvolvem crises em resposta a pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1984). Experimentos em neurônios hipocámpais mantidos em cultura têm demonstrado que a pilocarpina, por intermédio dos receptores muscarínicos, provoca um desequilíbrio entre excitação e a transmissão inibitória resultando na geração do estado epiléptico (TURSKI *et al.*, 1983).

Estudos experimentais *in vitro* também demonstraram que o efeito epileptogênico desse e de outros agentes colinérgicos possam ser resultado de descargas originadas em neurônios do hipocampo devido ao bloqueio das correntes de K^+ transmembranar. Esse mecanismo poderia explicar a maciça ativação dos neurônios do hipocampo durante o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina, status esse que conduz à morte celular e reorganização sináptica do circuito hipocámpal, provocando mudanças epileptogênicas permanentes. A lesão neuronal não parece ser, portanto, decorrente de efeito tóxico da pilocarpina, mas sim do efeito excitotóxico envolvendo receptores de glutamato e influxo de íons cálcio (FERNANDES, 2013).

Além do envolvimento em processos de morte celular, a administração de pilocarpina (evento precipitante inicial) parece provocar aumento da neurogênese hipocámpal e recrutamento anormal de neurônios recém-gerados no hipocampo. No entanto, as crises epilépticas (oriundas da administração de pilocarpina) interferem nos processos de migração, proliferação e desenvolvimento neuronal de células recém-geradas no hipocampo, possivelmente formando um circuito de amplificação de crises. Estudos revelam que a fase crônica da epilepsia está associada com uma diminuição substancial da neurogênese, demonstrada também em hipocampo de pacientes com

ELTM-EH. Análises sugerem que a diminuição da neurogênese e a diminuição dramática na diferenciação neuronal de células recém-geradas nesta fase são consequências do efeito prejudicial de crises espontâneas recorrentes, estando relacionadas com ativação de cascatas inflamatórias (PARENT *et al.*, 2006).

As crises epiléticas em geral iniciam no hipocampo com propagação para o córtex cerebral e manifestam-se clinicamente por movimentos mastigatórios, piscamentos seguidos, movimentos clônicos da cabeça e crise motora límbica. Histopatologicamente observa-se uma perda neuronal no hipocampo, amígdala, tálamo, córtex piriforme, córtex entorrinal, neocórtex e substância negra. Após o quarto dia identificam-se brotamentos supra granulares de fibras musgosas, que atingem a máxima intensidade em torno do 100º dia. A perda celular no hipocampo é mais significativa nas regiões CA1, CA3 e giro dentado (MELLO *et al.*, 1993). Os achados são bastante consistentes com a histopatologia da esclerose do hipocampo em pacientes com ELTM-EH (MATHERN *et al.*, 1995).

No modelo da pilocarpina, as crises convulsivas tornam-se rapidamente generalizadas e evoluem para o *status epilepticus* (Pilo-SE) que pode perdurar por algumas horas (24 horas; período agudo). Na descrição tradicional do processo epileptogênico e do modelo da pilocarpina, o SE é seguido por um período latente “seizure free” (4 - 44 dia após Pilo-SE) e pelo período crônico (após 45 dias), caracterizado pela presença de crises espontâneas e recorrentes que podem perdurar por toda a vida, semelhante aos seres humanos com quadro de epilepsia (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; MELLO *et al.*, 1993). No entanto, este conceito tem sido revisto recentemente por Loscher e colaboradores (LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015), sugerindo que o processo epileptogênico e muitas vezes a epilepsia subclínica possam iniciar imediatamente após o insulto cerebral, sem nenhum período de latência considerável. Este novo conceito será abordado e discutido detalhadamente mais a frente no capítulo II deste trabalho.

2.2 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos (ATTWELL, 2000; TZSCHENTKE, 2002). Muitos estudos realizados ao longo dos últimos anos têm comprovado o papel da transmissão glutamatérgica no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica fisiológica (fundamental nos processos de aprendizado e memória), bem como na neuroplasticidade patológica

(envolvendo reorganização sináptica e morte celular) observados em processos como: epilepsia, isquemia, hipoglicemia, doenças neurodegenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade e depressão (MELDRUM, 2000; OTTERSEN e MATHISEN, 2000).

As ações do glutamato são mediadas por duas classes de receptores: a) ionotrópicos, que formam os canais iônicos; b) metabotrópicos, acoplados às proteínas G. Os receptores metabotrópicos são subdivididos em 3 grupos e podem agir através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997). Os receptores ionotrópicos possuem propriedades farmacológicas e fisiológicas que os subdividem em três populações distintas farmacológica e funcionalmente: os ativados por NMDA, os que respondem ao KA, e os sensíveis ao AMPA (MICHAELIS, 1998). A figura 1 mostra as famílias moleculares dos receptores glutamatérgicos.

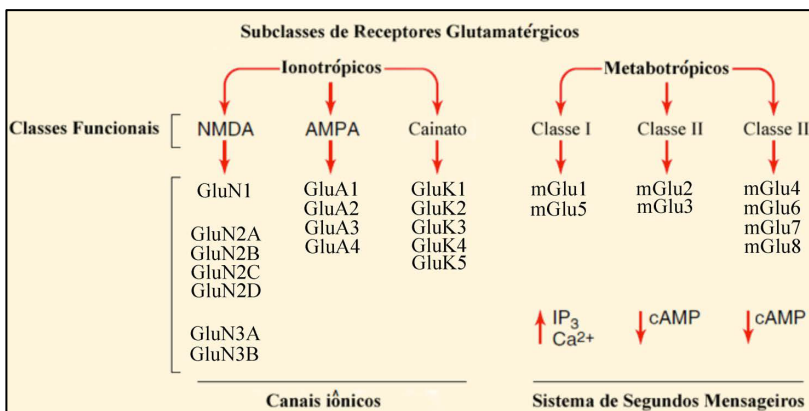


Figura 1. Famílias moleculares dos receptores glutamatérgicos. As duas divisões principais dos receptores glutamatérgicos compreendem três subgrupos funcionalmente definidos (classes) do receptor. Estes são compostos de várias subunidades individuais, sendo cada uma delas codificada por um gene diferente. Adaptado de Siegel e colaboradores (2006).

Aos receptores AMPA e cainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os receptores NMDA consistem de um canal iônico (permeável ao Ca^{2+}) e diversos sítios de modulação pelos quais neurotransmissores e drogas

podem interagir e alterar a atividade do receptor (MCBAIN e MAYER, 1994). Os receptores NMDA existem, primariamente, como complexos tetraméricos formados por duas subunidades GluN1 e duas subunidades regulatórias GluN2 ou GluN3. Existem pelo menos oito variantes de splicing da subunidade GluN1, quatro genes para a subunidade GluN2 (GluN2A, 2B, 2C e 2D) e dois genes para as subunidades GluN3 (GluN3A e 3B). A combinação entre as subunidades determina as propriedades funcionais e vias de sinalização moduladas pelos receptores NMDA (SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011). No cérebro a composição GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B são as mais abundantes. O sítio de união para o glutamato encontra-se na subunidade GluN2, enquanto o sítio para os co-agonistas glicina e D-serina encontram-se na subunidade GluN1 (SANACORA *et al.*, 2008).

No potencial de repouso, o canal do receptor NMDA é bloqueado pelo íon magnésio. Durante a transmissão sináptica, a ativação dos receptores NMDA requer a união de glutamato e seus co-agonistas em combinação com a despolarização do potencial de membrana para permitir a liberação do íon de magnésio para a abertura do canal (CULL-CANDY, BRICKLEY e FARRANT, 2001; WAXMAN e LYNCH, 2005). Portanto, os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias e sendo altamente permeáveis aos íons Ca^{2+} . Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória. Além disso, em situações patológicas em que o glutamato se acumula no espaço extracelular os receptores NMDA são implicados na neurotoxicidade glutamatérgica, conhecida como excitotoxicidade (MELDRUM, 2000). Alterações neuroquímicas, tais como o desequilíbrio entre a neurotransmissão inibitória (γ -aminobutírico, GABA) e excitatória (mediada pelo glutamato) foram identificados no tecido cerebral obtido a partir de modelos animais e humanos tratados cirurgicamente para ELTM-EH (LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015). No entanto, os eventos celulares e moleculares *in vivo* que ocorrem durante o processo epileptogênico ainda são pouco compreendidos.

2.2.1 Potenciação e Depotenciação de longa duração, LTP e LTD

Estímulos químicos ou elétricos em fatias hipocâmpais podem ser usados como ferramentas para indução de potenciação e depotenciação

de longa duração *in vitro*, LTP e LTD, respectivamente. Estímulos pré-sinápticos de alta frequência (EAF) induzem a LTP por um mecanismo dependente dos receptores NMDA, culminando com o aumento dos receptores AMPA no espaço sináptico. A estimulação de baixa frequência (EBF), também dependente dos receptores NMDA, induz a LTD, que provoca uma diminuição na atividade e número de receptores AMPA nas sinapses (SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011).

A LTP é uma modificação na potencia sináptica decorrente da estimulação tetânica neuronal e envolve a modulação de inúmeras proteínas sinalizadoras, entre elas a ativação de proteínas cinases como: proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), proteína cinase cálcio calmodulina-dependente II (CaMKII), proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fosforilação/ativação de alvos como receptores AMPA e NMDA (BARCO, BAILEY e KANDEL, 2006). Este fenômeno ocorre *in vivo*, como também pode ser induzido *in vitro*, envolvendo o estímulo excitatório através de receptores glutamatérgicos (AMPA e NMDA), aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , estimulação de cinases, formação de mensageiros retrógrados, fosforilação de substratos citoplasmáticos, de membrana e nucleares, expressão gênica precoce e tardia culminando com as modificações estruturais e funcionais de longa duração (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Outro aspecto importante a ser considerado é o fenômeno de LTD, que corresponde a uma diminuição no potencial excitatório pós-sináptico em decorrência da aplicação de estímulos de baixa frequência (*in vitro*) e que envolve uma série de elementos de sinalização, entre eles a ativação de proteínas fosfatases (WINDER e SWEATT, 2001). A figura 2 nos mostra a regulação coordenada dos receptores AMPA e NMDA nos fenômenos de LTD e LTP induzido por estímulos elétricos, mecanismos regulatórios que também ocorrem *in vivo*.

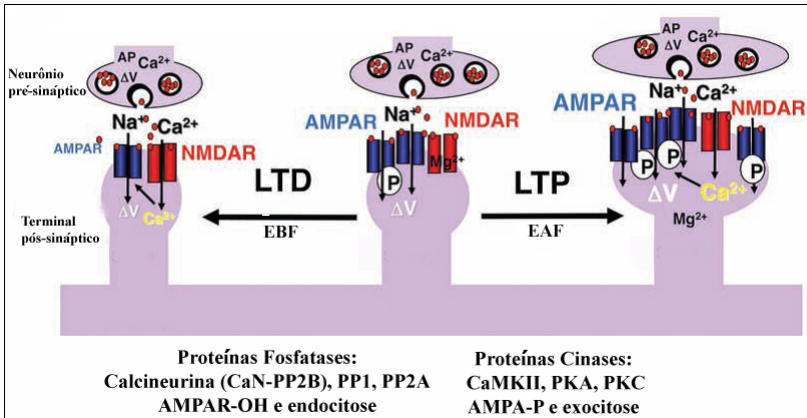


Figura 2. Mecanismos de plasticidade pós-sináptica. A regulação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) induzida pela potenciação de longa duração (LTP) e a depotenciação de longa duração (LTD) em espinhas dendríticas. LTD induz o encolhimento da coluna sináptica, defosforilação do receptor AMPA e remoção dos mesmos das espinhas dendríticas através de proteínas com atividade fosfatase. LTP induz o crescimento da coluna, fosforilação do receptor AMPA e recrutamento dos AMPAR nas espinhas através de proteínas com atividade cinase. Adaptado de Sanderson e colaboradores (2011).

2.2.2 Regulação do receptor AMPA

O receptor AMPA é um tetrâmero, formado por subunidades GluA1-4 (em várias combinações) permeando principalmente Na^+ e sendo responsável pela despolarização neuronal ao estímulo do neurotransmissor excitatório glutamato (SANTOS *et al.*, 2009). No processo de LTP ocorre a despolarização do neurônio pós-sináptico, liberação do magnésio do receptor NMDA que ativado pelo glutamato permite um intenso influxo de Ca^{2+} (COOKE e BLISS, 2006). O íon cálcio combinado a calmodulina (CaM) pode ativar a proteína cinase CaMKII. Além disso, CaM pode ativar algumas isoformas de adenilato ciclase o que induz aumento do cAMP com ativação de PKA. Essas cinases por sua vez podem fosforilar o receptor AMPA, evento importante na fase inicial da LTP (CARVALHO, DUARTE e CARVALHO, 2000; MEADOR, 2006).

A subunidade GluA1 do receptor AMPA pode ser fosforilada em 3 resíduos de serina e 1 resíduo de treonina localizados na porção intracelular C-terminal: serina 818 (Ser818) fosforilada por PKC; serina 831 (Ser831) fosforilada por PKC e/ou CaMKII; serina 845 (Ser845)

fosforilada por PKA (DIN *et al.*, 2010); treonina 840 (Thr840) fosforilada por PKC e/ou p70S6K (GRAY *et al.*, 2014). A fosforilação dos resíduos serina na subunidade GluA1 do receptor glutamatérgico AMPA é fundamental para inserção e manutenção do receptor AMPA na membrana sináptica bem como para aumento da sua condutância. No hipocampo a fosforilação destes sítios parece ser importante para indução/manutenção da LTP. Já a defosforilação individual ou combinada desses resíduos de fosfo-serina, pela proteína fosfatase 1 (PP1) e calcineurina, parece ser importante para a depotenciação sináptica (LTD). A regulação do sítio treonina (Thr840) é mais complexa, a fosforilação deste resíduo exerce efeito negativo na fosforilação do sítio Ser845, sugere-se que isso ocorra devido a proximidade dos sítios na porção C-terminal. A fosforilação do sítio Thr840 (inserção do grupo fosfato, carregado negativamente) parece prejudicar a atividade da enzima PKA sob o sítio Ser845, conferindo ao sítio Thr840 propriedades relacionadas a mecanismos de indução de LTD (GRAY *et al.*, 2014). Logo, modificações no estado de fosforilação da subunidade GluA1 de AMPA alteram dramaticamente a função do receptor contribuindo para a expressão da LTP ou LTD. Desta forma, pode-se postular que os padrões de fosforilação dos sítios regulatórios do receptor AMPA poderiam fornecer um mecanismo de codificação de informações sobre a recente história da atividade pré e/ou pós-sináptica e assim representar um index da ocorrência de LTP ou LTD (WHITLOCK *et al.*, 2006). A figura 3 detalha a regulação da fosforilação e tráfego da subunidade GluA1 do receptor AMPA nas sinapses durante a LTP e LTD.

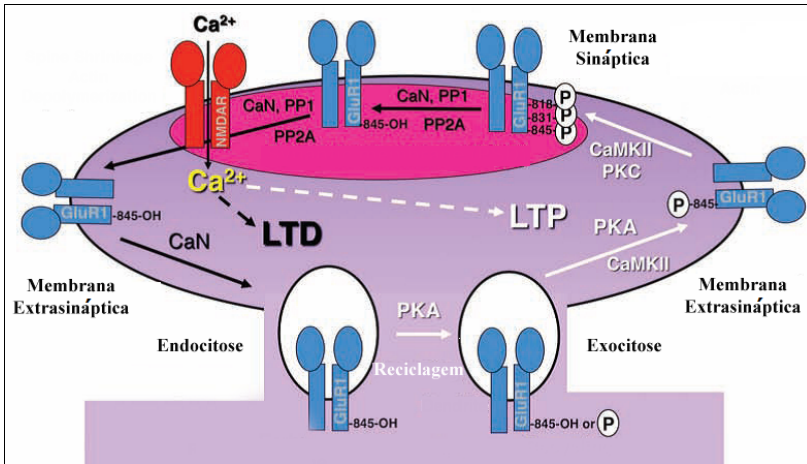


Figura 3. Regulação da fosforilação e tráfego da subunidade GluA1 do receptor AMPA nas sinapses durante a LTP e LTD. Durante a LTP, os receptores AMPA podem ser diretamente secretados para a membrana extrasináptica e sinapse das espinhas dendríticas, processo que envolve essencialmente proteínas com atividade cinase. Já durante a LTD, a endocitose dos receptores AMPA envolve a ativação de enzimas fosfatase. Adaptado de Sanderson e colaboradores (2011).

Estas evidências colocam a fosforilação dos sítios Ser831 e Ser845 da subunidade GluA1 de AMPA como evento chave para a inserção do receptor na membrana plasmática e seu deslocamento até a região sináptica (OH *et al.*, 2006). O aumento persistente da potenciação sináptica também pode ocorrer de forma patológica na epileptogênese ou como resultante do estado epilético, condição na qual o cérebro permanece em estado constante de crise convulsiva (CHEN e WASTERLAIN, 2006). O desequilíbrio entre os mecanismos de controle inibitórios e excitatórios responsáveis pela manutenção sustentada da crise envolve uma diversidade de elementos sinápticos e de sinalização celular que devem ser investigados.

2.2.3 Transportadores Gliais de Glutamato

O neurotransmissor glutamato liberado na fenda sináptica é recaptado por transportadores específicos. Atualmente, cinco subtipos de transportadores de glutamato foram caracterizados. Dentre os transportadores destacam-se os expressos predominantemente em astrócitos e incluem: 1) transportador glutamato-aspartato (glutamate-

aspartate transporter; GLAST em roedores) e seu equivalente em humanos transportador de aminoácido excitatórios (excitatory amino acid transporter; EAAT1); 2) transportador de glutamato 1 (glutamate transporter 1; GLT1 em roedores), EAAT2 em humanos. GLAST é o principal transportador presente durante o desenvolvimento do SNC (FURUTA, ROTHSTEIN e MARTIN, 1997), enquanto o GLT1 é responsável por 90% de todo o transporte nos tecidos adultos (TANAKA *et al.*, 1997). Estes dois transportadores são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, sendo responsáveis pela maior parte da sua remoção da fenda sináptica (POPOLI *et al.*, 2012).

Eles desempenham um papel crítico na manutenção de baixas concentrações extracelulares de glutamato, protegendo os neurônios de uma lesão excitotóxica (ver figura 4) (LEE e POW, 2010). Tem sido demonstrado que a perturbação da atividade dos transportadores de glutamato parece estar envolvido em distúrbios neurológicos, tais como epileptogênese (RAKHADE e LOEB, 2008). A redução na recaptação de glutamato pelos EAATs poderia explicar a hiperexcitabilidade neuronal em focos epilépticos (ROTHSTEIN *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 1997; SEPKUTY *et al.*, 2002). Estudos vêm demonstrando que o bloqueio da recaptação de glutamato provoca um aumento da excitabilidade da rede local, resultando em atividade epileptiforme espontânea (CAMPBELL e HABLITZ, 2004).

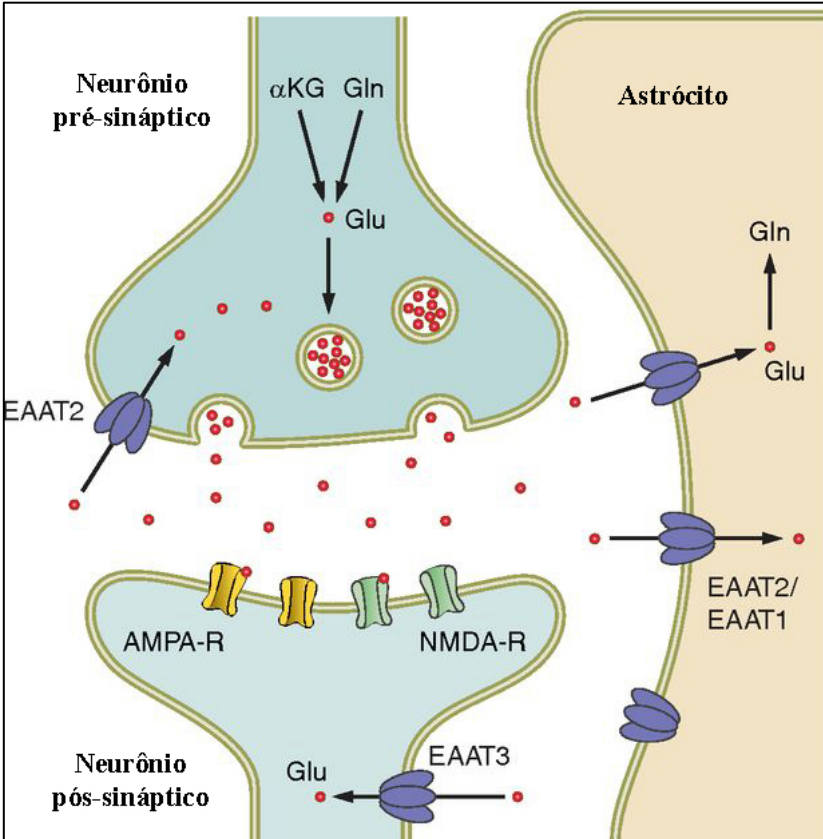


Figura 4. Neurotransmissão excitatória glutamatérgica. O influxo de íons Na^+ induz a despolarização da membrana e os íons Ca^{2+} participam da exocitose das vesículas de glutamato, que se liga a receptores e promove a abertura de canais iônicos. O glutamato é recaptado através de seus transportadores e convertido em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina é transportada da célula glial para o neurônio onde é convertida novamente em glutamato pela ação da enzima glutaminase.

2.3 EPILEPTOGÊNESE E TRANSDUÇÃO DE SINAL

Estudos demonstraram que neurônios do hipocampo de animais com epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina apresentam peculiaridades em sua fisiologia intrínseca (possivelmente dependente de receptores e canais iônicos) e/ou no circuito neural ao qual pertencem que os tornam propensos ao surgimento de atividade epileptiforme

(SANABRIA, SU e YAARI, 2001; SCORZA *et al.*, 2009). É provável que essas modificações sejam dependentes da modificação de mecanismos de transdução de sinal e potenciação sináptica (BRACEY *et al.*, 2009).

Já é conhecido o importante papel fisiológico de diferentes sistemas de neurotransmissores, especialmente o glutamatérgico envolvendo os receptores AMPA e NMDA e o sistema gabaérgico nos processos de neuroplasticidade especialmente no hipocampo e córtex, (WALZ *et al.*, 1999; SPERK, DREXEL e PIRKER, 2009; MCKINNEY, 2010). Além disso, a importância de uma série de proteínas cinases (ex. PKA, PKC, CaMKII e MAPKs), proteínas fosfatases (ex. PP1, calcineurina/PP2B) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem sido bem documentadas (WINDER e SWEATT, 2001; BARCO, BAILEY e KANDEL, 2006; FLAVELL e GREENBERG, 2008). Em conjunto essas proteínas participam de complexas vias de sinalização modulando a excitabilidade neuronal e expressão gênica, desta forma sendo a base neuroquímica de modificações funcionais e estruturais de longa duração envolvidas em fenômenos de neuroplasticidade como a LTP e LTD e o próprio aprendizado e memória.

Embora a sequência e combinações de eventos celulares provavelmente não sejam totalmente sobreponíveis, é bastante plausível que o processo epileptogênico envolva alterações de parte da maquinaria neuroquímica/celular utilizada para eventos fisiológicos, ou mesmo a potenciação sináptica (LEITE *et al.*, 2005).

2.3.1 Via das MAPKs

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) compõem um grupo de serina-treonina cinases cuja função e regulação têm sido conservadas ao longo da evolução desde organismos unicelulares como leveduras a organismos complexos como homem (NEBREDA e PORRAS, 2000; JOHNSON e LAPADAT, 2002). As MAPKs conduzem, amplificam e integram sinais originados de uma diversidade de estímulos extracelulares na superfície da célula. Entre estes sinais estão fatores de crescimento, toxinas, citocinas ou estresse ambiental (TIBBLES e WOODGETT, 1999). O resultado disto inclui a execução de respostas celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, inflamação e apoptose (DONG e BODE, 2003).

Nos mamíferos, as MAPKs são agrupadas em pelo menos quatro famílias com base na similaridade das sequências de aminoácidos, mecanismos de regulação por proteínas colocadas acima na via de sinalização e mecanismos de ativação (ROBINSON e COBB, 1997). Estas famílias compreendem as proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), uma das famílias de MAPKs mais estudadas no SNC; e as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) que incluem as c-Jun amino terminal cinases (JNKs), composta pelas isoformas JNK 1/2/3; p38^{MAPK} composta pelas isoformas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ . Todas as MAPKs são ativadas por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina (CARGNELLO e ROUX, 2011).

A cascata de sinalização das MAPKs (figura 5) é composta por 3 cinases a qual se inicia pela chamada cinase da cinase da MAP cinase (MAPKKK). Esta, por sua vez, ativa uma segunda cinase, a MAPKK (cinase da MAP cinase) através de resíduos de serina e treonina. A ativação desta é responsável pela subsequente fosforilação de MAPKs em resíduos de treonina e tirosina (ROBINSON e COBB, 1997; CARGNELLO e ROUX, 2011).

Os receptores glutamatérgicos também são conhecidos por estarem acoplados a ativação de MAPKs no hipocampo e no córtex cerebral (SWEATT, 2001). Estudos vêm demonstrando alterações na ativação de ERK e p38^{MAPK} imediatamente após a inserção das crises epiléticas em diferentes modelos animais, (BARABAN *et al.*, 1993; BERKELEY, DECKER e LEVEY, 2002). Jiang e colaboradores (2005) observaram que as crises agudas podem levar a uma rápida ativação da ERK e p38^{MAPK} na área CA3 do hipocampo, a região do cérebro mais suscetível aos efeitos letais do *status epilepticus* (JIANG *et al.*, 2005). Nosso grupo também demonstrou em trabalhos prévios que ratos submetidos ao modelo da pilocarpina apresentam alterações tempo dependentes em vias de sinalização celular no hipocampo total e córtex cerebral (LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). No entanto, a literatura carece de estudos sistemáticos que descrevam a modulação e relação entre essas vias de sinalização em áreas específicas do hipocampo e córtex cerebral.

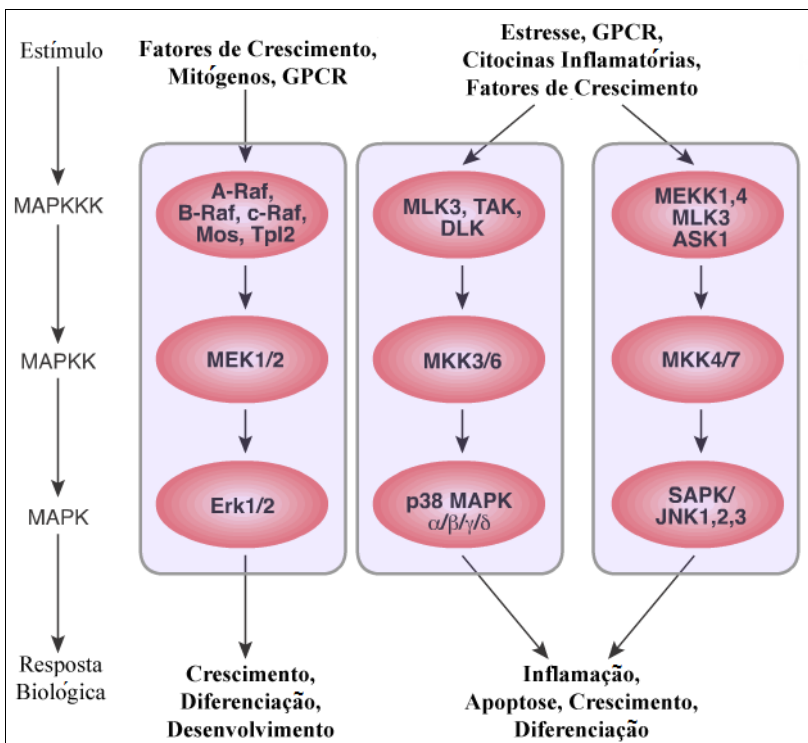


Figura 5. Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos. MAPKs medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. Todas as vias operam em forma de cascata. Adaptado de www.cellsignaling.com

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivos específicos

- Determinar o nível de fosforilação dos sítios Ser831 e Ser845 e o conteúdo total da subunidade GluA1 do receptor AMPA no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal na fase crônica de animais submetidos ao modelo da pilocarpina.
- Determinar o nível de fosforilação dos substratos de PKA e PKC no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal na fase crônica de animais submetidos ao modelo da pilocarpina.

- Determinar o nível de fosforilação e o conteúdo total da enzima CaMKII no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal na fase crônica de animais submetidos ao modelo da pilocarpina.
- Determinar o conteúdo total dos transportadores GLAST e GLT1, da proteína fosfatase 1 (PP1) e GFAP no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal na fase crônica de animais submetidos ao modelo da pilocarpina.
- Determinar o nível de fosforilação e o conteúdo total das MAPKs (ERK1/2, JNK p54/46 e p38^{MAPK}) no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal na fase crônica de animais submetidos ao modelo da pilocarpina.

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

2.5.1 Modelo animal

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (pesando entre 280-350g), provenientes do Biotério Central da UFSC. Os ratos foram mantidos em grupos de quatro animais por caixa, em uma sala com ar condicionado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ciclo 12h claro/escuro, com água e comida disponíveis *ad libitum*. Eles foram tratados, manipulados e eutanasiados de acordo com o “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH publication, 8th edition, 2011) aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC; www.ceua.ufsc.br) PP00772. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e número de animais utilizados. A indução do modelo experimental foi realizada em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC) da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Roger Walz. Os procedimentos foram realizados de acordo com a metodologia previamente publicada (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; MELLO *et al.*, 1993; BONAN *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). Os animais receberam uma dose intraperitoneal de pilocarpina (300 mg/kg, i.p.). Para minimizar os efeitos colinérgicos periféricos e a mortalidade, os animais foram tratados com metil nitrato de escopolamina (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração da pilocarpina e diazepam (5 mg/kg, i.p.) 2 horas após o início das crises. Após a administração de pilocarpina os animais apresentaram hipoatividade, estado que na maioria dos casos evoluiu para convulsões generalizadas dentro de 40-80 minutos após a injeção. Os animais também foram alimentados e

hidratados durante o período de recuperação com intuito de melhorar o estado clínico geral e reduzir a mortalidade. Nos 16 animais injetados com pilocarpina, a taxa de mortalidade foi de 18,75% (3 animais) e 6,25% (1 animal) não evoluiu para SE. Os animais sobreviventes que apresentaram crises generalizadas formaram o grupo crônico, os quais foram eutanasiados 60 dias após a indução do SE (n = 12). É importante mencionar que todos estes animais desenvolveram crises espontâneas, caracterizando o período crônico. Os animais controle (n = 12) foram eutanasiados 60 dias após a injeções de escopolamina, salina e diazepam. A figura 6 ilustra o desenho experimental utilizado no presente capítulo.

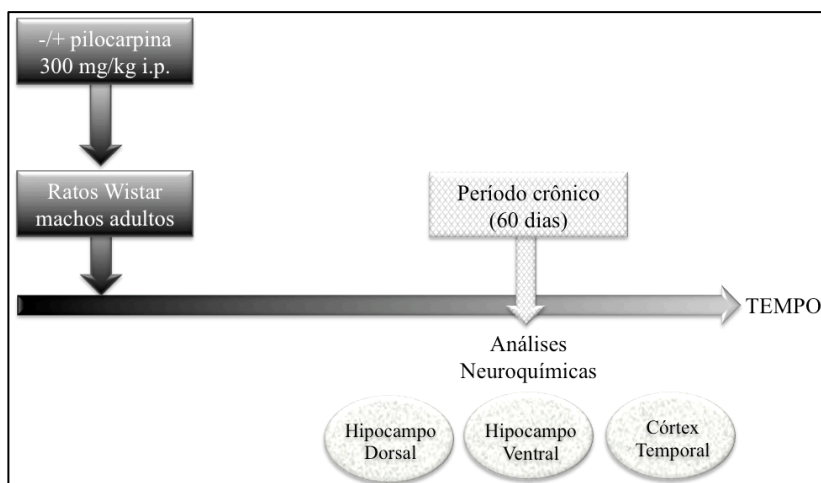


Figura 6. Desenho experimental.

2.5.2 Análises Neuroquímicas

2.5.2.1 Preparação das amostras

Para avaliar o nível de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845, das enzimas PKA, PKC, CaMKII e MAPKs, e o imunocnteúdo dos transportadores de glutamato, PP1 e GFAP, western blotting foi realizado como descrito por (LEAL *et al.*, 2002; CORDOVA *et al.*, 2004; POSSER *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). O hipocampo (dorsal e ventral) e o córtex temporal dos animais submetidos ao modelo experimental foram dissecados (4°C)

em “cutting solution” (sacarose 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, CaCl_2 0,5 mM, Mg_2SO_4 7 mM, glicose 5 mM, HEPES 25 mM pH 7,4) e colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -86°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito por (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 400 μL do tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na_3VO_4 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Cocktail inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para eliminar os restos celulares, e os sobrenadantes diluídos 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. A dosagem de proteínas foi determinada conforme metodologia descrita por Peterson (PETERSON, 1977). A seguir foram adicionados nas amostras o tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final 8%).

2.5.3 Eletroforese e Eletrotransferência

As proteínas (60 μg por poço) foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio/SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S. A figura 7 mostra resumidamente todo este processo aqui descrito.

2.5.4 Imunodeteção

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 hora e após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) incubadas overnight (4°C) com anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo BSA 2% nas diluições: 1:1000 (anti-fosfo-GluA1-Ser831, anti-fosfo-GluA1-Ser845, anti-total-GluA1, anti-fosfo-CaMKII

isoformas β e α , anti-total-CaMKII isoformas β e α , anti-GLAST, anti-GLT1, anti-PP1ca e anti-GFAP) 1:2000 (anti-fosfo-PKA e anti-fosfo-PKC substratos, e anti-fosfo-ERK1/2), 1:5000 (anti-fosfo e total-JNK p54/46) 1:10000 (anti-fosfo e total-p38MAPK) e 1:40000 (anti-total-ERK1/2). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-rabbit ou mouse (ligado à peroxidase) e reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose, de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. O nível de fosforilação foi determinado pela razão entre a D.O da banda fosforilada e a D.O da banda total. O imunocnteúdo foi determinado pela razão entre a D.O da banda da proteína alvo e a D.O da banda da β -actina (CALLONI *et al.*, 2005; POSSER *et al.*, 2007). As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image®.

Os anticorpos anti-fosfo-GluA1-Ser831, anti-fosfo-GluA1-Ser845 e anti-GluA1, detectam uma única banda de aproximadamente 100 kDa. Anti-fosfo-PKA substratos (medida indireta da ativação de PKA) detecta peptídeos e proteínas que contêm um resíduo fosfo-serina/treonina com arginina nas posições -3 e -2. Anti-fosfo-PKC substratos (medida indireta da ativação de PKC) detecta níveis endógenos de proteínas fosforiladas em resíduos de serina cercados por arginina ou lisina nas posições -2 e +2 e um resíduo hidrofóbico na posição +1. Anti-CaMKII isoformas β e α detecta duas bandas, uma com cerca de 60 kDa e a segunda de aproximadamente 50 kDa, correspondentes, respectivamente, às duas isoformas de CaMKII, CaMKII β e CaMKII α . Anti-GLAST e anti-GLT1 detectam uma única banda de aproximadamente 58 kDa e 65 kDa, respectivamente. Anti-PP1ca (subunidade catalítica) detecta uma única banda de aproximadamente 36 kDa, e anti-GFAP detecta uma única banda de aproximadamente 50 kDa. Anti-ERK1/2 detecta duas bandas, uma de aproximadamente 44kDa e a segunda com cerca de 42kDa, respectivamente para as isoformas ERK1 e ERK2. Anti-p38^{MAPK} detecta uma única banda de aproximadamente 38kDa, enquanto anti-JNK1/2/3 detecta duas bandas, uma de aproximadamente 54kDa (JNK2/3) e a segunda com aproximadamente 46kDa (JNK1). Anti- β -actina detecta uma única banda de aproximadamente 45kDa.

Com intuito de minimizar vieses intra-dia (queda na titulação e imunorreatividade dos anticorpos, tempo de exposição, uso repetitivo do líquido revelador) que possam ocorrer nas etapas do western blotting, criamos uma amostra chamada de balizador. O balizador é constituído de um pool de três amostras de hipocampo de ratos, homogeneizados da mesma forma que as amostras experimentais, entretanto esta mesma amostra foi aplicada em todas as eletroforeses realizadas. A D.O obtida para cada alvo na amostra balizador foi sempre considerada 100%, a partir daí, a D.O dos alvos em análise nas amostras experimentais presentes na eletroforese eram determinadas e relativizadas em porcentagem do balizador. Por exemplo, se a D.O para um determinado alvo na amostra balizador fosse 200 e a D.O do alvo na amostra experimental fosse 240, teríamos respectivamente os valores de 100 e 120% para o balizador e amostra experimental. Esta estratégia, além de diminuir o erro experimental entre as análises, permite fazer comparações e correlações entre os alvos analisados nas estruturas cerebrais.

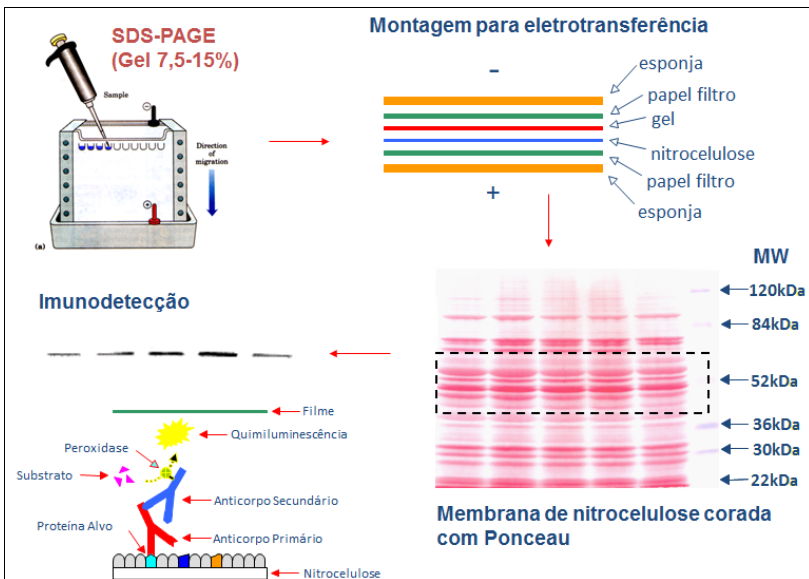


Figura 7. Eletroforese, Eletrotransferência e Imunodeteção.

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para western blot.

Anticorpo	Peso molecular (proteína alvo)	Fabricante (n° catálogo)	Diluição
Anti-fosfo-GluA1-Ser831	100 kDa	Sigma (A4352)	1:1000
Anti-fosfo-GluA1-Ser845	100 kDa	Sigma (A4477)	1:1000
Anti-total-GluA1	100 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-13152)	1:1000
Anti-fosfo-PKA substratos	-	Cell Signaling (#9624)	1:2000
Anti-fosfo-PKC substratos	-	Cell Signaling (#2261)	1:2000
Anti-fosfo-CaMKII β e α	60 e 50 kDa	Cell Signaling (#3361)	1:1000
Anti-total-CaMKII β e α	60 e 50 kDa	Cell Signaling (#3362)	1:1000
Anti-fosfo-ERK1/2	44/42 kDa	Sigma (M8159)	1:2000
Anti-total-ERK1/2	44/42 kDa	Sigma (M5670)	1:40000
Anti-fosfo-JNK p54/46	54/46 kDa	Sigma (J4750)	1:5000
Anti-total-JNK p54/46	54/46 kDa	Sigma (J4500)	1:5000
Anti-fosfo-p38 ^{MAPK}	38 kDa	Millipore (05-1059)	1:10000
Anti-total-p38 ^{MAPK}	38 kDa	Sigma (M0800)	1:10000
Anti-GLAST	58 kDa	Cell Signaling (#3838)	1:1000
Anti-GLT1	65 kDa	Cell Signaling (#5684)	1:1000
Anti-PP1	36 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-7482)	1:1000
Anti-GFAP	50 kDa	Cell Signaling (#3670)	1:1000
Anti- β -actina	45 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-47778)	1:2000
Goat anti-rabbit IgG HRP	-	Millipore (AP132P)	1:5000
Goat anti-mouse IgG HRP	-	Millipore (AP308P)	1:2500

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram verificados quanto à normalidade da distribuição de frequência com o teste de Kolmogorov-Smirnov e expressos como média \pm E.P.M. e a análise estatística foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes (controle vs. pilocarpina). O nível aceitável de significância para os testes foi de $p \leq 0,05$. Os testes paramétricos foram realizados usando o pacote de software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

2.7 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir representam o manuscrito publicado em 2015 no periódico *Neurochemistry International*, intitulado de “**Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy**”.

2.7.1 Sinalização celular no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina

Dentre os principais achados nos animais tratados com pilocarpina e analisados no período crônico, a avaliação da subunidade GluA1 no hipocampo dorsal revelou uma diminuição significativa na fosforilação do sítio GluA1-Ser845 ($14,59 \pm 5,62\%$ $p < 0,05$), em comparação com o grupo controle (Fig. 8D). Paralelo a esta diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser845, a fosforilação de ERK1 ($10,97 \pm 2,77\%$ $p < 0,05$) e substratos de PKA ($10,08 \pm 3,41\%$ $p < 0,05$) também foram reduzidas quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Fig. 9B e 8H, respectivamente).

Considerando a plausibilidade biológica de interação e os mecanismos regulatórios que envolvem estas moléculas (PKA, ERK1 e GluA1-Ser845) uma regressão linear simples foi realizada entre os alvos com intuito de verificar a correlação entre eles. A regressão linear simples (P-PKA X P-GluA1-Ser845) indicou que a diminuição de fosforilação dos substratos de PKA e GluA1-Ser845 no grupo tratado parecem estar estreitamente correlacionadas, sugerindo que a fosforilação do sítio GluA1-Ser845 ocorra de forma dependente de PKA ($r = 0,590$, $p = 0,044$). No entanto, a diminuição da fosforilação de ERK1 não parece estar diretamente envolvida com a taxa de fosforilação do sítio GluA1-Ser845 (P-ERK1 X P-GluA1Ser845; $p = 0,461$).

O imunocontéudo do transportador glial de glutamato (GLT1) foi significativamente reduzido no hipocampo dorsal ($11,27 \pm 4,15\%$ $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (Fig. 10D). Em contraste, o tratamento com pilocarpina aumentou o imunocontéudo de GFAP ($13,79 \pm 1,69\%$ $p < 0,05$; Fig. 10F).

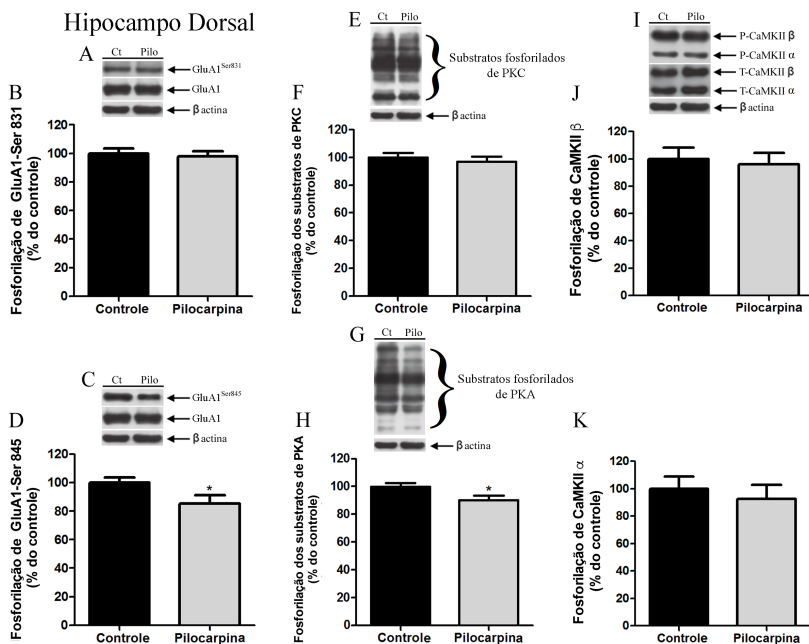


Figura 8. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de fosfo-GluA1-Ser-831 (A), fosfo-GluA1-Ser845 (C), total GluA1 e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de fosfo-GluA1-Ser831 (B) e fosfo-GluA1-Ser845 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-GluA1-Ser831 (E) e imunorreatividade de fosfo-GluA1-Ser845 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKC e imunorreatividade de β -actina. O painel (F) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKC. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKA e o imunorreatividade de β -actina. O painel (H) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKA. O painel (I) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-CaMKII β e α , total-CaMKII β e α , e β -actina. Os painéis (J, K) mostram a quantificação de fosfo-CaMKII β (J) e fosfo-CaMKII α (K). Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total (GluA1 e CaMKII) ou através da D.O. dos substratos fosforilados (PKA e PKC) sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * $p < 0,05$.

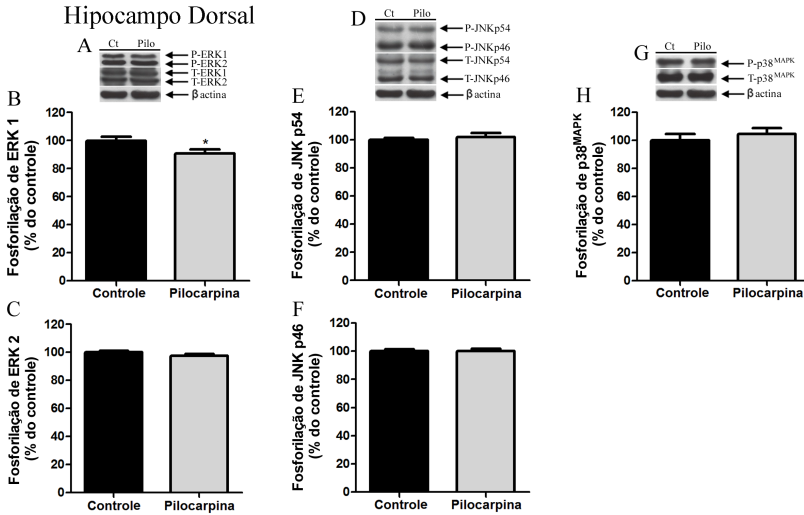


Figura 9. Western blot das enzimas ERK, JNK e p38^{MAPK} no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. O painel (A) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-ERK1, fosfo-ERK2, total-ERK1, total-ERK2 e β-actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B, C) mostram a quantificação de fosfo-ERK1 (B) e fosfo-ERK-2 (C). O painel (D) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-JNKp54, fosfo-JNKp46, total JNKp54, total-JNKp46 e β-actina. Os painéis (E, F) mostram a quantificação de fosfo-JNKp54 (E) e fosfo-JNKp46 (F). O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-p38^{MAPK}, total-p38^{MAPK} e β-actina. O painel (H) mostra a quantificação de fosfo-p38^{MAPK}. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. derivado de um n = 12. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * p < 0,05.

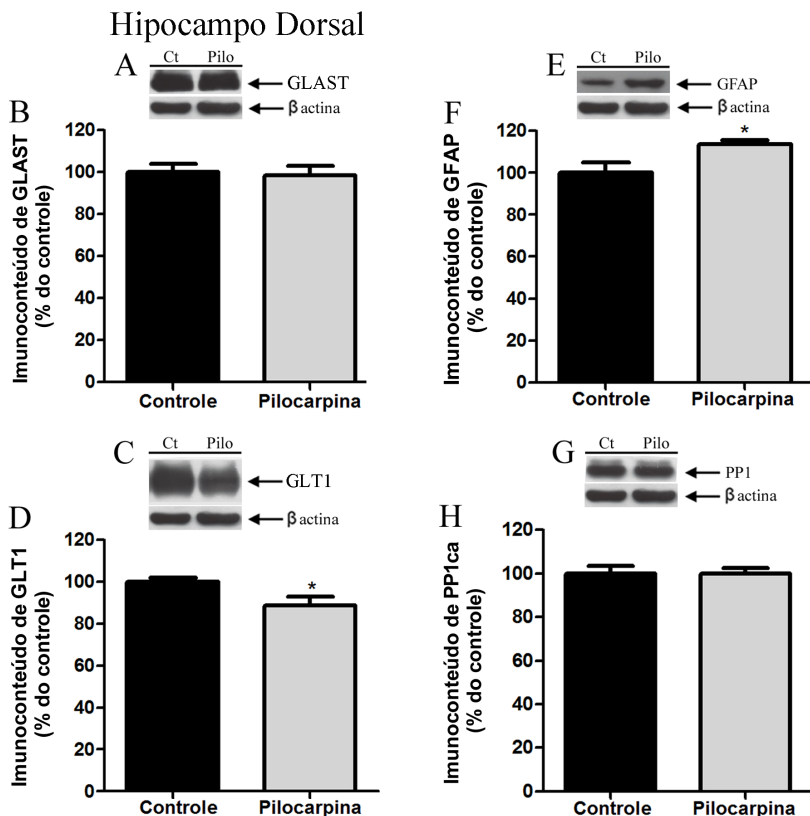


Figura 10. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de GLAST (A), GLT1 (C) e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de GLAST (B) e GLT1 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade de GFAP e β -actina. O painel (F) mostra a quantificação da GFAP. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de PP1 e β -actina. O painel (H) mostra a quantificação de PP1. O imunoconteúdo foi determinado por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da proteína alvo sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * $p < 0,05$.

2.7.2 Sinalização celular no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina

A fosforilação da subunidade GluA1 foi modulada de forma diferente quando comparado hipocampo ventral e dorsal. No hipocampo ventral, a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 foi diminuída ($10,16 \pm 3,60\%$ $p < 0,05$) após administração de pilocarpina (Fig. 11B). Em paralelo, a fosforilação de JNK_{p54} ($10,24 \pm 3,16\%$ $p < 0,05$) e substratos de PKC ($21,15 \pm 5,38\%$ $p < 0,001$) também foram reduzidas quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Fig. 12E e 11F, respectivamente).

Considerando a plausibilidade biológica de interação e os mecanismos regulatórios que envolvem estas moléculas (PKC, JNK_{p54} e GluA1-Ser831) uma regressão linear simples foi realizada entre os alvos com intuito de verificar a correlação entre eles. O declínio de fosforilação dos substratos de PKC e GluA1-Ser831 no grupo tratado com pilocarpina parecem estar correlacionados, indicando que a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 possa ser dependente de PKC (regressão linear simples, P-PKC X P-GluA1Ser831; $r = 0,556$, $p = 0,048$). No entanto, regressão linear simples indicou que a diminuição da fosforilação JNK_{p54} não está diretamente correlacionada a taxa de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 (P-JNK_{p54} x P-GluASer831; $p = 0,634$).

O imunoconteúdo dos transportadores gliais de glutamato, GFAP e PP1 não foram alterados no hipocampo ventral (Fig. 13).

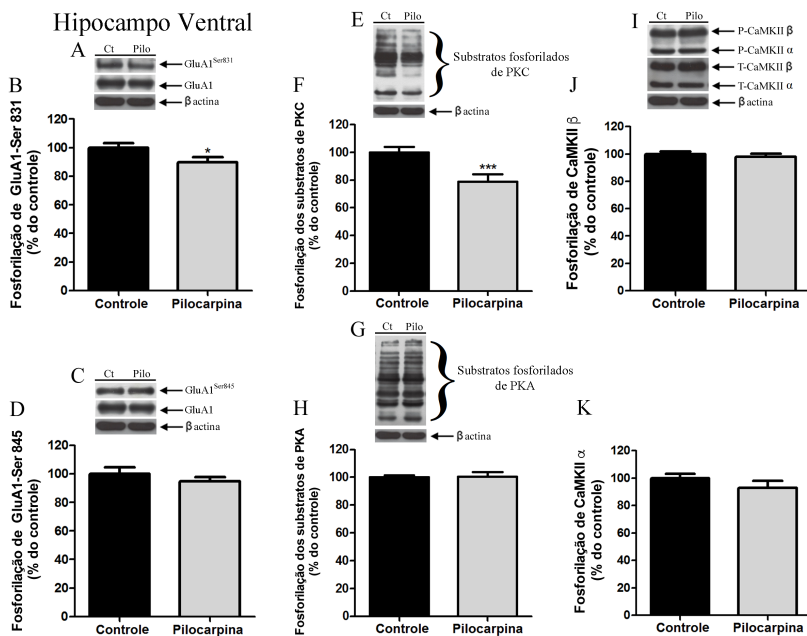


Figura 11. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de fosfo-GluA1-Ser-831 (A), fosfo-GluA1-Ser845 (C), total GluA1 e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de fosfo-GluA1-Ser831 (B) e fosfo-GluA1-Ser845 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKC e imunoconteúdo de β -actina. O painel (F) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKC. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKA e o imunoconteúdo de β -actina. O painel (H) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKA. O painel (I) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-CaMKII β e α , total-CaMKII β e α , e β -actina. Os painéis (J, K) mostram a quantificação de fosfo-CaMKII β (J) e fosfo-CaMKII α (K). Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total (GluA1 e CaMKII) ou através da D.O. dos substratos fosforilados (PKA e PKC) sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

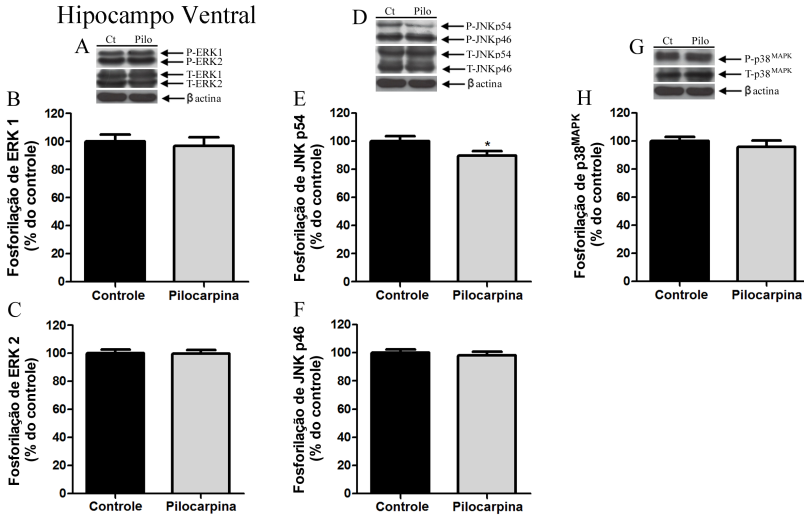


Figura 12. Western blot das enzimas ERK, JNK e p38^{MAPK} no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. O painel (A) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-ERK1, fosfo-ERK2, total-ERK1, total-ERK2 e β-actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B, C) mostram a quantificação de fosfo-ERK1 (B) e fosfo-ERK-2 (C). O painel (D) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-JNKp54, fosfo-JNKp46, total JNKp54, total-JNKp46 e β-actina. Os painéis (E, F) mostram a quantificação de fosfo-JNKp54 (E) e fosfo-JNKp46 (F). O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-p38^{MAPK}, total-p38^{MAPK} e β-actina. O painel (H) mostra a quantificação de fosfo-p38^{MAPK}. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. derivado de um n = 12. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * p < 0,05.

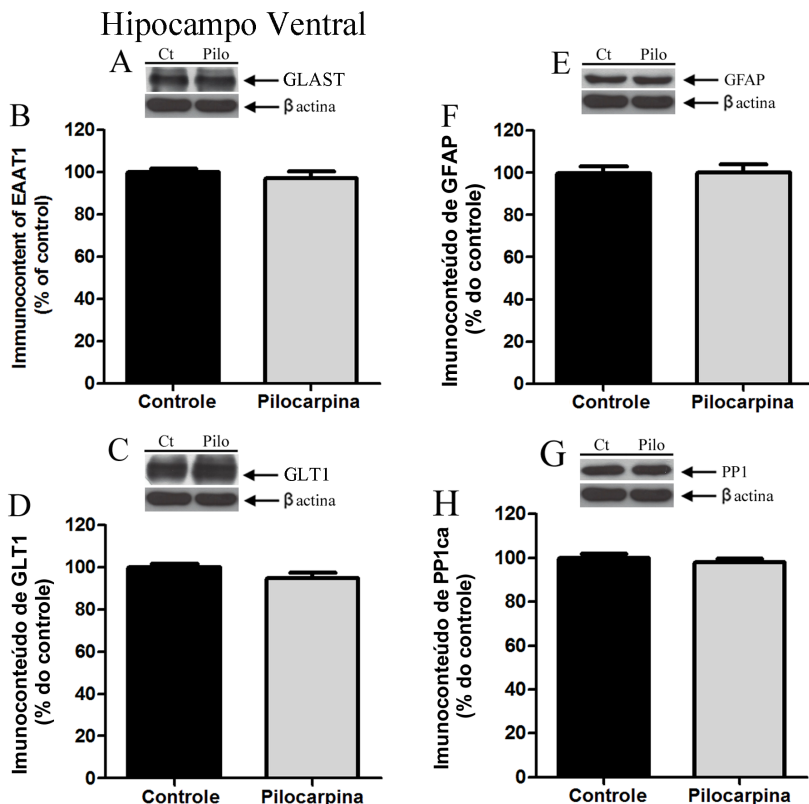


Figura 13. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de GLAST (A), GLT1 (C) e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de GLAST (B) e GLT1 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade de GFAP e β -actina. O painel (F) mostra a quantificação da GFAP. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de PP1 e β -actina. O painel (H) mostra a quantificação de PP1. O imunoconteúdo foi determinado por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da proteína alvo sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como percentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina.

2.7.3 Sinalização celular no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina

Em contraste com o hipocampo, apenas a fosforilação de ERK 1 foi diminuída no córtex temporal após a administração de pilocarpina ($10,21 \pm 3,18\%$ $p < 0,05$) (Fig. 15B). As outras vias de sinalização celular avaliadas não foram alteradas no córtex temporal, indicando que as alterações neuroquímicas provenientes da administração de pilocarpina possam estar ocorrendo em outras áreas cerebrais ou ainda sub-regiões corticais (Figs. 14 e 16).

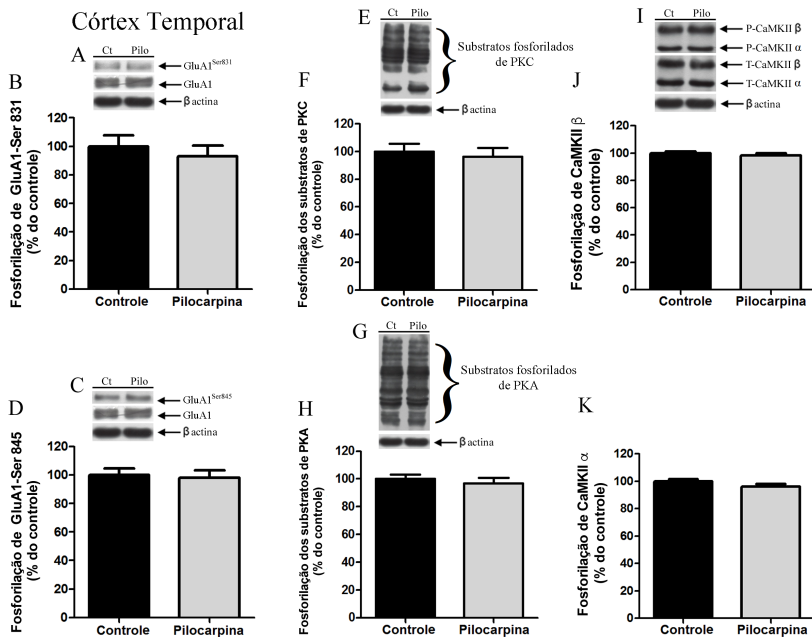


Figura 14. Western blot da subunidade GluA1 do receptor AMPA e das enzimas PKC, PKA e CaMKII no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de fosfo-GluA1-Ser-831 (A), fosfo-GluA1-Ser845 (C), total GluA1 e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de fosfo-GluA1-Ser831 (B) e fosfo-GluA1-Ser845 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKC e imunoc conteúdo de β -actina. O painel (F) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKC. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade dos substratos fosforilados de PKA e o imunoc conteúdo de β -actina. O painel (H) mostra a quantificação dos substratos fosforilados de PKA. O painel (I) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-CaMKII β e α , total-CaMKII β e α , e β -actina. Os painéis (J, K) mostram a quantificação de fosfo-CaMKII β (J) e fosfo-CaMKII α (K). Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total (GluA1 e CaMKII) ou através da D.O. dos substratos fosforilados (PKA e PKC) sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina.

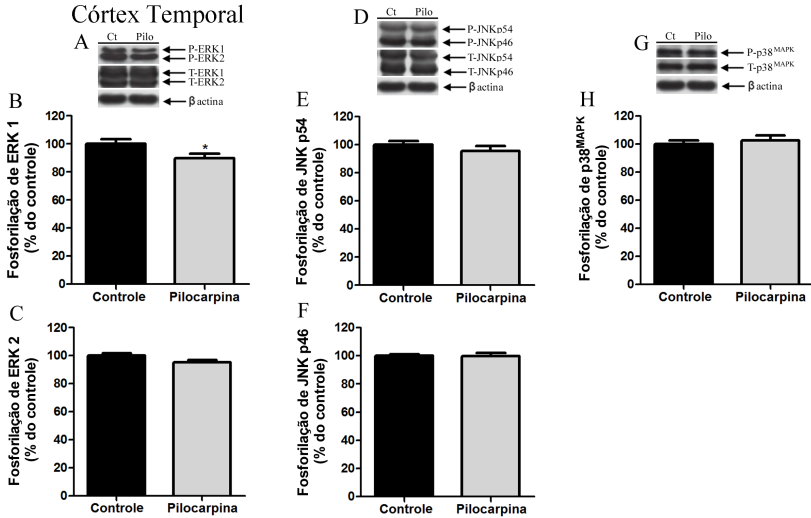


Figura 15. Western blot das enzimas ERK, JNK e $p38^{\text{MAPK}}$ no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. O painel (A) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-ERK1, fosfo-ERK2, total-ERK1, total-ERK2 e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B, C) mostram a quantificação de fosfo-ERK1 (B) e fosfo-ERK-2 (C). O painel (D) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-JNKp54, fosfo-JNKp46, total JNKp54, total-JNKp46 e β -actina. Os painéis (E, F) mostram a quantificação de fosfo-JNKp54 (E) e fosfo-JNKp46 (F). O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo- $p38^{\text{MAPK}}$, total- $p38^{\text{MAPK}}$ e β -actina. O painel (H) mostra a quantificação de fosfo- $p38^{\text{MAPK}}$. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M., derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina. * $p < 0,05$.

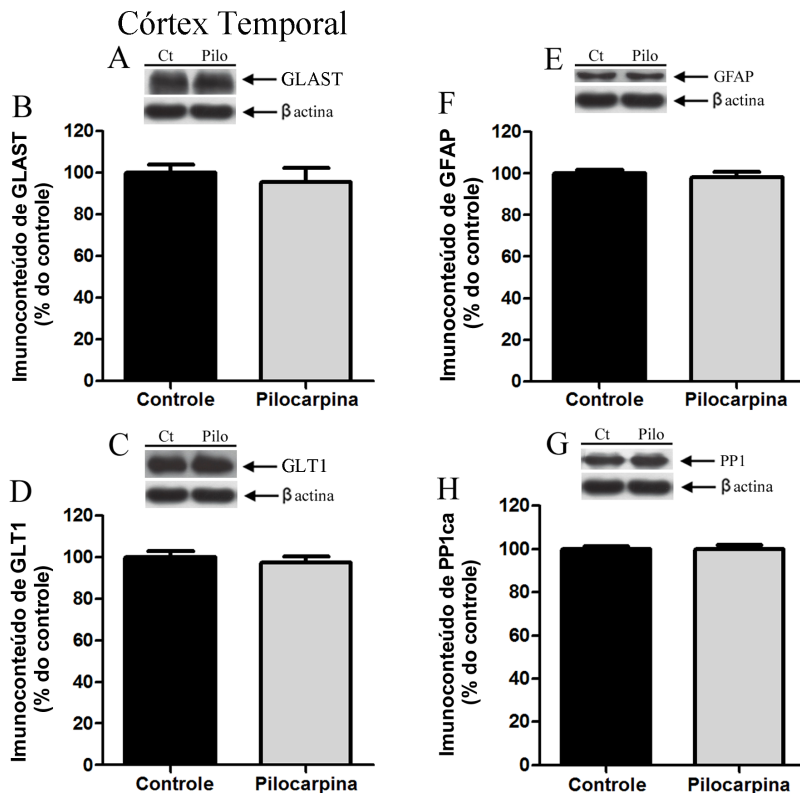


Figura 16. Western blot das proteínas GLAST, GLT1, GFAP e PP1 no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Os painéis (A, C) mostram os blots representativos da imunorreatividade de GLAST (A), GLT1 (C) e β -actina (utilizado como controle de carga). Os painéis (B-D) apresentam a quantificação de GLAST (B) e GLT1 (D). O painel (E) mostra blots representativos da imunorreatividade de GFAP e β -actina. O painel (F) mostra a quantificação da GFAP. O painel (G) mostra blots representativos da imunorreatividade de PP1 e β -actina. O painel (H) mostra a quantificação de PP1. O imunoconteúdo foi determinado por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da proteína alvo sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos como porcentagem do controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um $n = 12$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. Abreviaturas: (Ct) grupo controle; (Pilo) grupo pilocarpina.

2.8 DISCUSSÃO

O presente capítulo apresenta pela primeira vez o perfil de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845, das enzimas PKA, PKC, CaMKII β e α , ERK 1/2, JNK p54/46 e p38^{MAPK}, bem como o imunocontéudo das proteínas GLAST, GLT1, PP1 e GFAP, todos analisados no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina e avaliados no período crônico.

No hipocampo dorsal, o sítio GluA1-Ser845 apresentou uma queda na fosforilação após administração de pilocarpina (Fig. 8D). Este resultado corrobora com dados prévios do grupo onde já havíamos demonstrado uma redução da fosforilação do sítio GluA1-Ser845, entretanto a análise havia sido realizada no hipocampo total (LOPES *et al.*, 2013). Paralelo a esta diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser845, a fosforilação de ERK1 (Fig. 9B) e os substratos de PKA (Fig. 9H) também diminuíram. Conforme já indicado na seção de resultados, uma regressão linear simples (P-PKA X P-GluA1Ser845) feita no grupo tratado revelou uma estreita correlação entre os alvos, sugerindo que a fosforilação do sítio GluA1-Ser845 possa ocorrer de forma dependente de PKA. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios já publicados (ESTEBAN *et al.*, 2003; DERKACH *et al.*, 2007; BRACEY *et al.*, 2009; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011), os quais demonstram que a fosforilação do sítio GluA1-Ser845 é classicamente acoplada a ativação de PKA. Já a diminuição da fosforilação da enzima ERK1 não parece estar diretamente envolvida com a taxa de fosforilação do sítio GluA1-Ser845 (P-ERK1 X P-GluA1Ser845). Entretanto não pode ser descartada a interação entre estes alvos uma vez que ERK pode exercer efeitos regulatórios de forma indireta, já que a atividade desta enzima é essencial para a ocorrência do fenômeno de LTP (ARAKI *et al.*, 2015).

Levando em consideração a queda de fosforilação do sítio GluA1Ser845 no hipocampo dorsal, nós avaliamos o imunocontéudo da subunidade catalítica da proteína fosfatase 1 (PP1ca), enzima responsável por defosforilar o sítio GluA1-Ser845. No entanto, não encontramos alterações da sua expressão no hipocampo dorsal (Fig. 10H). Este achado não descarta possíveis alterações na atividade de PP1, uma vez que medimos apenas o imunocontéudo da subunidade catalítica da enzima. Além disso, outras proteínas fosfatases tais como a proteína fosfatase 2A (PP2A) e 2B (calcineurina; CaN) também pode defosforilar GluA1 (BANKE *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011).

No hipocampo dorsal, os níveis de GFAP e do transportador glial de glutamato GLT1 foram alterados em direções opostas após administração de pilocarpina. Estas alterações parecem ser específicas para a região dorsal do hipocampo, uma vez que não ocorrem no hipocampo ventral. A indução da expressão de GFAP (Fig. 10F) no período crônico pode refletir o primeiro passo de um processo em que convulsões induzem a hipertrofia astrocitária e pode também estar relacionada com dano cerebral. Alterações em astrócitos podem modificar a homeostase do microambiente extracelular e contribuir para o desenvolvimento de um estado epiléptico (STEWART *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2013). O declínio da expressão de GLT1 (Fig. 10D) observado no hipocampo dorsal corrobora com dados prévios, onde demonstramos diminuição na expressão de GLT1 no hipocampo total (LOPES *et al.*, 2013), suportando a ideia de que o glutamato possa estar aumentado na fenda sináptica no hipocampo após pilo-SE (COSTA *et al.*, 2004). Consistente com este achado, outro estudo realizado com pacientes com epilepsia neocortical demonstrou uma redução na expressão da proteína GLT1 em focos epilépticos (RAKHADE e LOEB, 2008). Além disso, ratos que não expressam GLT1 apresentam crises espontâneas letais e aumento na susceptibilidade à lesão cortical aguda (TANAKA *et al.*, 1997). Junto com esses estudos, nossos resultados sugerem que a deficiência na captação de glutamato no hipocampo dorsal pode participar das alterações de excitabilidade observadas no cérebro durante o período crônico do modelo da pilocarpina.

No hipocampo ventral a subunidade GluA1 do receptor AMPA foi modulada de forma diferente, uma vez que observamos uma diminuição na fosforilação do sítio GluA1-Ser831 após administração de pilocarpina (Fig. 11B). Em paralelo, encontramos um declínio na fosforilação/ativação de JNK p54 (Fig. 12E) e dos substratos de PKC (Fig. 11F). Através de uma regressão linear simples (P-PKC X P-GluASer831) identificamos uma correlação entre o index de atividade de PKC e a taxa de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 no grupo tratado, sugerindo que no hipocampo ventral a fosforilação deste sítio possa ser dependente de PKC. No entanto, a diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 não foi acompanhada por uma diminuição na ativação/fosforilação de CaMKII β (Fig. 11J) ou α (Fig. 11K). Estes achados estão parcialmente de acordo com trabalhos prévios (ESTEBAN *et al.*, 2003; DERKACH *et al.*, 2007; BRACEY *et al.*, 2009; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011), os quais demonstram que a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 é classicamente associada a

ativação de PKC e CaMKII. A diminuição da fosforilação de JNKp54 corrobora com dados anteriores que mostram uma diminuição na fosforilação de JNKp54 no hipocampo total (LOPES *et al.*, 2012). Além disso, a queda de fosforilação da enzima JNKp54 não está diretamente envolvida com a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 (P-JNKp54 X P-GluA1-Ser831). O sítio GluA1-Ser831 pode ser defosforilado por PP1, no entanto a expressão de PP1ca não foi alterada no hipocampo ventral (Fig. 13H).

Em contraste, em comparação com o hipocampo, o córtex temporal parece ser a região cerebral onde as vias de sinalização são menos afetadas no modelo da pilocarpina, uma vez que apenas a fosforilação de ERK1 foi diminuída (Fig. 15B). A fosforilação de p38^{MAPK} (Fig. 15H), JNK (Fig. 15E e F), subunidade GluA1 e as cinases PKA, PKC e CaMKII (Fig. 14) não foram moduladas no córtex temporal. Além disso, a expressão dos transportadores gliais de glutamato, GFAP e PP1ca não foram alteradas na região e período analisado (Fig. 16).

Os receptores AMPA medeiam e participam da neurotransmissão excitatória rápida no SNC, sendo criticamente importantes para os processos de aprendizado, memória e cognição (HENLEY e WILKINSON, 2013). Em geral, os nossos resultados indicam que o perfil de fosforilação da subunidade GluA1 do receptor AMPA em resposta ao tratamento com pilocarpina foi diferente no hipocampo dorsal e ventral. Os achados sugerem que no hipocampo dorsal existe um “dowregulation” da atividade de PKA, o que conduz a uma diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser845. No hipocampo ventral uma regulação negativa sobre a atividade de PKC pode levar a uma diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser831. Trabalhos prévios indicam que alterações nos mecanismos regulatórios de sistemas de neurotransmissão podem estar envolvidos com distúrbios comportamentais já observados em modelos animais de epilepsia (GROTICKE, HOFFMANN e LOSCHER, 2007; 2008; MULLER *et al.*, 2009a; MULLER *et al.*, 2009b). Além disso, as descobertas neuroquímicas do presente estudo reforçam a ideia de que o hipocampo não é uma estrutura homogênea em relação a modulação da subunidade GluA1 do receptor AMPA. Portanto, os achados corroboram com observações anteriores, indicando que o hipocampo dorsal e o hipocampo ventral apresentam diferentes entradas e saídas nas suas conexões (SWANSON, 2000), desempenhando diferentes papéis na memória espacial, e na resposta ao estresse e comportamento emocional (HENKE, 1990; FANSELOW e DONG, 2009). A figura 17 e as tabelas

2 e 3 ilustram resumidamente os alvos moleculares alterados no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal dos ratos submetidos ao modelo de pilocarpina. As figuras esquemáticas 18, 19 e 20 trazem uma hipótese mecânica das alterações neuroquímicas encontradas nos ratos submetidos ao modelo da pilocarpina nas diferentes regiões cerebrais.

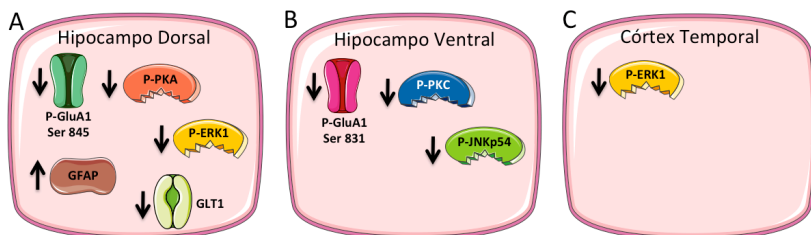


Figura 17. Representação esquemática das principais alterações neuroquímicas identificadas no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. (A) Hipocampo dorsal, os principais resultados incluem uma redução na fosforilação de GluA1-Ser845, PKA e ERK1. Também encontramos um aumento na expressão de GFAP e uma diminuição de GLT1. (B) No hipocampo ventral evidenciamos uma diminuição na fosforilação GluA-Ser831, PKC e JNKp54. (C) No córtex temporal, apenas queda de fosforilação da enzima ERK1.

Tabela 2. Fosforilação da subunidade GluA1 e vias de sinalização celular analisadas no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

	GluA1 Ser ⁸³¹	GluA1 Ser ⁸⁴⁵	PKA	PKC	CaMK II β	CaMK II α	ERK1	ERK2	p38 MAPK	JNK p54	JNK p46
HD	-	↓	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-
HV	↓	-	-	↓↓	-	-	-	-	-	↓	-
Ctx	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-

As setas indicam as alterações significativas encontradas nos grupos experimentais (10 - 20% seta simples; 20 - 40% seta dupla; - sem alterações).

Tabela 3. Imunoconteúdo dos alvos analisados no hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

	GLAST	GLT1	PP1	GFAP
HD	-	↓	-	↑
HV	-	-	-	-
Ctx	-	-	-	-

As setas indicam as alterações significativas encontradas nos grupos experimentais (10 - 20% seta simples; - sem alterações).

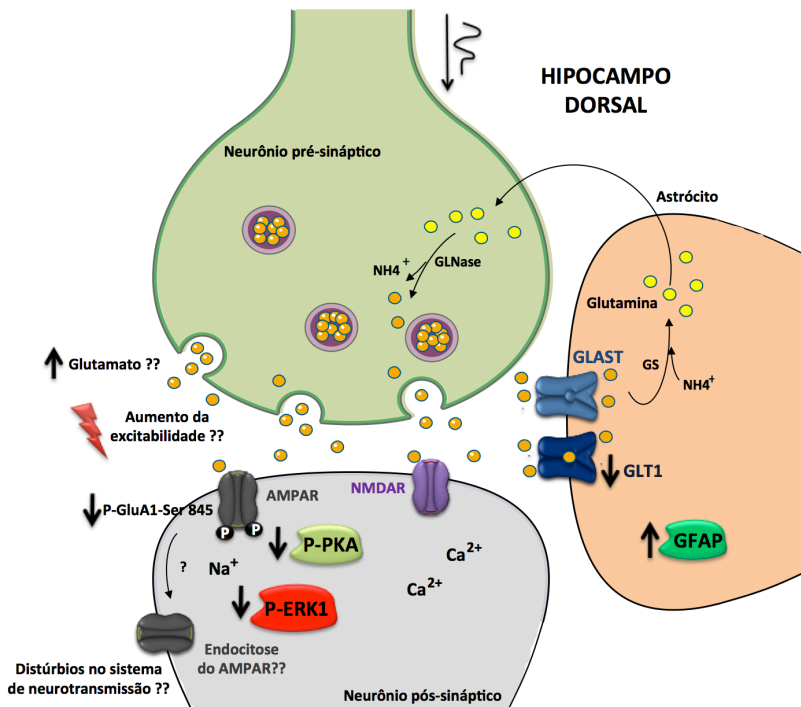


Figura 18. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Observa-se que P-ERK1 é uma proteína ubíqua e apesar de ter sido representada apenas no neurônio pós-sináptico, pode estar presente em qualquer outro tipo celular do SNC.

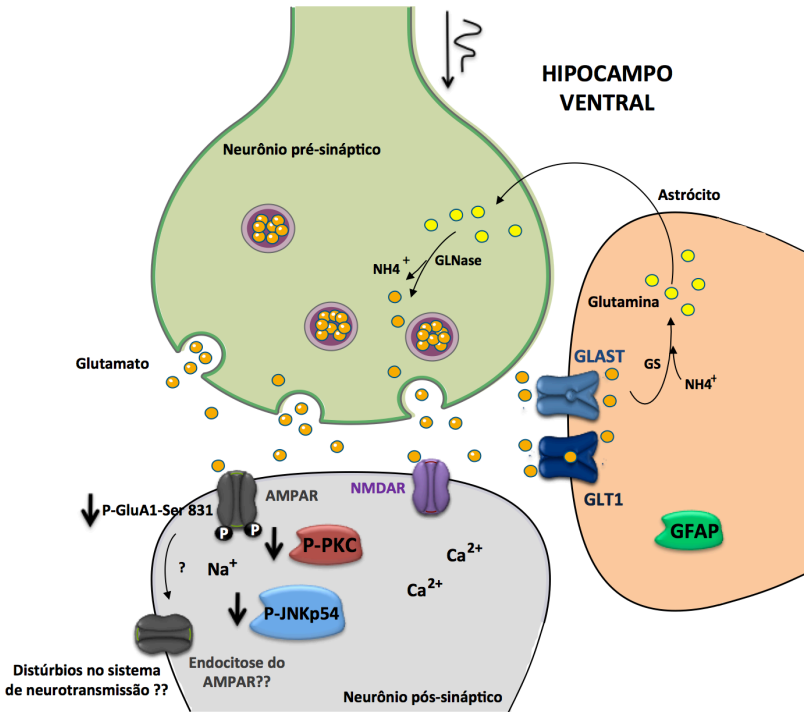


Figura 19. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no hipocampo ventral de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Observa-se que P-JNKp54 é uma proteína ubíqua e apesar de ter sido representada apenas no neurônio pós-sináptico, pode estar presente em qualquer outro tipo celular do SNC.

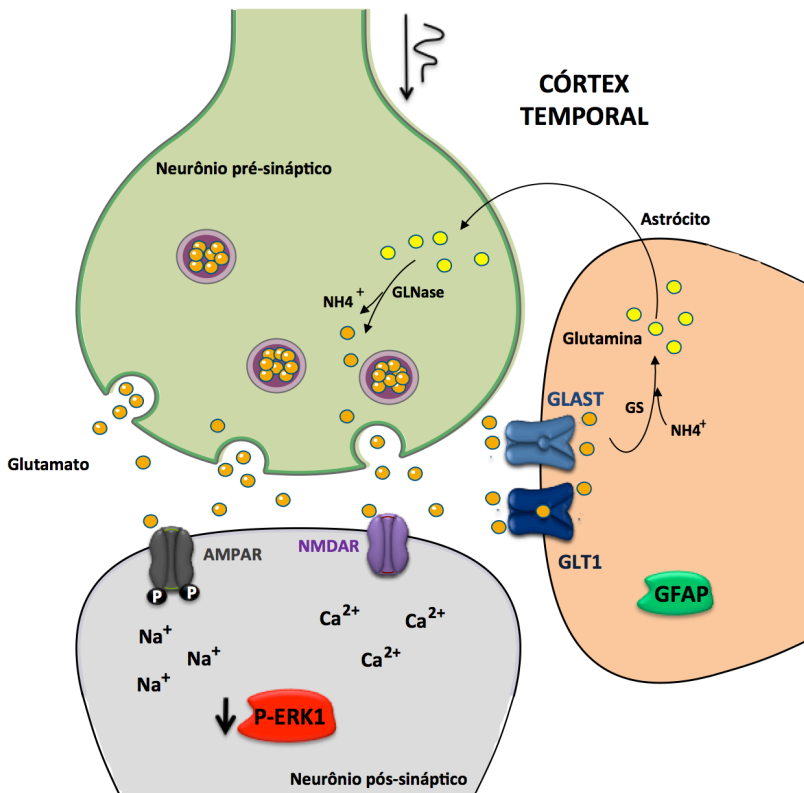


Figura 20. Hipótese dos mecanismos regulatórios envolvendo as alterações neuroquímicas observadas no córtex temporal de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Observa-se que P-ERK1 é uma proteína ubíqua e apesar de ter sido representada apenas no neurônio pós-sináptico, pode estar presente em qualquer outro tipo celular do SNC.

2.9 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho sugere um desequilíbrio na fosforilação do receptor AMPA e vias de sinalização celular em regiões específicas do hipocampo frente ao modelo da pilocarpina. Além disso, os resultados sugerem que o hipocampo dorsal é provavelmente mais suscetível a um prejuízo na captação de glutamato e aparecimento de gliose, uma vez que apenas nesta área encontramos uma diminuição significativa de GLUT1 e incremento na expressão de GFAP. A identificação de alterações neuroquímicas em regiões cerebrais específicas pode ser valiosa para a compreensão da fisiopatologia da epilepsia e podem ajudar a estabelecer alvos terapêuticos para o tratamento desta neuropatologia. Além disso, este trabalho abre caminho para futuras análises, encorajando a utilização de outras abordagens metodológicas para determinar a localização subcelular das proteínas envolvidas nas alterações neuroquímicas.

3 CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (MODELO ANIMAL)

3.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

Há mais de 3.000 anos, escritos babilônicos já relatavam a ocorrência de sintomas psicóticos, instabilidade emocional e impulsividade, além de alterações no comportamento em pacientes com epilepsia (REYNOLDS e KINNIER WILSON, 2008). Em torno de 400 a.C., Hipócrates observou que o estado mental dos pacientes epiléticos deteriorava entre as crises (FEDDERSEN *et al.*, 2005). De fato, pesquisas têm demonstrado uma elevada prevalência de epilepsia entre indivíduos com transtornos mentais, sugerindo uma associação entre os dois problemas (GALLUCCI NETO e MARCHETTI, 2005; KUMMER *et al.*, 2005). Estima-se que exista no Brasil algo entre 530 mil e 890 mil pessoas com epilepsia e algum transtorno mental associado (MARCHETTI, 2004).

Estudos apontam que a prevalência de transtornos psiquiátricos na ELT varie entre 60 - 80%, sendo superior àquela encontrada na epilepsia generalizada idiopática (20 - 30%) e nos transtornos somáticos crônicos (10 - 20%). Os transtornos do humor são os mais comuns, particularmente depressão, seguida por ansiedade, psicose e transtornos de personalidade, além disso, boa parte dos pacientes portadores de ELT apresenta algum tipo de comprometimento cognitivo. Paradoxalmente, os transtornos psiquiátricos, apesar de prevalentes, são subdiagnosticados e subtratados na maioria dos portadores de epilepsia (GAITATZIS, TRIMBLE e SANDER, 2004). Um levantamento epidemiológico realizado no Brasil em 2007 por Li e colaboradores, demonstrou também que há uma lacuna no tratamento da epilepsia, já que uma parcela significativa dos pacientes estava sendo tratada inadequadamente e que a grande maioria dos médicos não se considerava preparado para o manejo da enfermidade (LI *et al.*, 2007). Assim, os pacientes com epilepsia e transtornos mentais parecem sofrer um duplo estigma, provavelmente relacionado à falta de capacitação e conhecimento, tanto dos profissionais de saúde como dos próprios pacientes e familiares, sendo necessárias mudanças urgentes neste panorama (MARCHETTI, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007).

Estudos vêm demonstrando que portadores de ELT apresentariam uma maior propensão a transtornos psiquiátricos comparativamente aos

portadores de outros tipos de epilepsia extratemporais devido ao papel do sistema límbico na regulação das emoções e comportamento (SHUKLA *et al.*, 1979; GAITATZIS, TRIMBLE e SANDER, 2004; KALININ e POLYANSKIY, 2005). Outros estudos, no entanto, não encontraram essa associação (ADAMS *et al.*, 2008). Ressalta-se que é tarefa complexa estabelecer a real frequência de transtornos psiquiátricos na ELT já que as alterações psiquiátricas sofrem influência direta de diversos fatores como a gravidade das crises, o dano cerebral global, efeitos colaterais das drogas antiepilépticas (DAE) e suporte psicossocial (GALLUCCI NETO e MARCHETTI, 2005).

É importante salientar também que não existe uma relação causa-efeito unidirecional entre epilepsia e transtornos psiquiátricos, ou seja, não só a condição epiléptica pode preceder a instalação dos sintomas psiquiátricos em um determinado paciente, mas também o diagnóstico de transtornos afetivos e comportamentais podem ocorrer previamente a uma primeira crise epiléptica de um paciente. Esta bidirecionalidade sugere que alterações estruturais e funcionais de uma doença aumentam o risco para o desenvolvimento da outra (HESDORFFER *et al.*, 2006).

São crescentes as evidências que, na epilepsia e nos transtornos psiquiátricos, alterações dos mecanismos de interação entre neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos com sistemas glutamatérgicos estão associadas a circuitos neuronais anormais e hiperexcitabilidade. Esta hiperexcitabilidade poderia evocar tanto atividade de crise convulsiva como alterações emocionais (KANNER, 2008).

3.1.1 Ansiedade, Depressão e Comprometimento Cognitivo

Os transtornos do humor são as comorbidades psiquiátricas mais frequentes na epilepsia, com prevalência em torno de 20-50%, principalmente nas crises de difícil controle. A heterogeneidade dos transtornos do humor é demonstrada pelas diversas expressões clínicas e abordagens terapêuticas. Muitas vezes, os sintomas apresentados podem mimetizar transtornos do humor, enquanto outras vezes, o quadro clínico pode não preencher os critérios diagnósticos para nenhum transtorno primário do humor (KANNER, 2007).

Uma associação bidirecional entre as crises epilépticas e depressão é sustentada por mecanismos patogênicos comuns a ambas as condições que facilitariam o aparecimento de uma na presença da outra (ALPER *et al.*, 2007; KANNER, 2008). Estudos empregando técnicas de neuroimagem funcional identificaram menor densidade de receptores

serotoninérgicos 5HT1A tanto na ELT, como na depressão maior. Além disso, atrofia em determinadas regiões cerebrais, como os lobos frontais e temporais, foi demonstrada em pacientes com epilepsia e naqueles com depressão uni e bipolares. Cabe destacar que reduções volumétricas no hipocampo são encontradas nas duas condições, especialmente na ELT (KANNER, 2007).

Como os lobos temporais estão envolvidos na formação da memória, não é nenhuma surpresa o achado de comprometimentos mnêmicos na ELT. Aproximadamente 70% dos pacientes com ELT apresentam problemas na memória declarativa, que representa a disfunção cognitiva mais comum nesse grupo. Quadros graves, como amnésia global, podem ocorrer em pacientes com ELT após *status epilepticus*. Ademais, comprometimentos em funções executivas e baixos níveis de inteligência (QI < 85) são observados em cerca de 30% dos casos de ELT (HELMSTAEDTER e KOCKELMANN, 2006).

As alterações cognitivas na epilepsia possuem etiologia multifatorial, contribuindo a própria epilepsia, o tratamento (cirurgia ou DAE), as reações à epilepsia (estigma, marginalização e dinâmica familiar) e os danos ou disfunções cerebrais. Cabe ressaltar que DAEs como o fenobarbital e benzodiazepínicos podem ter efeitos prejudiciais sobre a cognição (CORNAGGIA *et al.*, 2006), o que acontece também com o uso de fármacos mais modernos como o topiramato (ZACCARA, GANGEMI e CINCOTTA, 2008). Apesar da alta prevalência dos transtornos neuropsiquiátricos em pacientes com epilepsia, os mecanismos neurais subjacentes às alterações comportamentais não são completamente compreendidos e devem ser investigados.

3.2 MODELO DA PILOCARPINA E ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS

Os modelos animais de epilepsia são amplamente utilizados como ferramenta de estudo, e podem nos ajudar a enriquecer a compreensão dos mecanismos envolvendo a epilepsia e alterações neurocomportamentais (MAJAK e PITKANEN, 2004; POST, 2004; HEINRICHS e SEYFRIED, 2006). A administração sistêmica de pilocarpina em roedores reproduz as principais características da ELT em humanos (CAVALHEIRO *et al.*, 1991). A pilocarpina induz crises límbicas que se tornam secundariamente generalizadas, evoluindo para SE, que pode perdurar por algumas horas (24 horas) (período agudo). Na descrição tradicional do processo epileptogênico e do modelo da pilocarpina, o SE é seguido por um período latente “seizure free” (4 - 44

dia após Pilo-SE) e pelo período crônico (após 45 dias), caracterizado pela presença de crises espontâneas e recorrentes que podem perdurar por toda a vida, semelhante aos seres humanos com quadro de epilepsia (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; MELLO *et al.*, 1993). Esta hipótese amplamente aceita sustenta que existe um estado pré-epiléptico livre de crises (denominado de período latente), entre uma lesão cerebral e o aparecimento da epilepsia sintomática, durante o qual uma cascata de alterações estruturais, moleculares e funcionais medeia gradualmente o processo de epileptogênese. No entanto, este conceito tem sido revisto recentemente por Loscher e colaboradores (LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015), sugerindo que o processo epileptogênico e muitas vezes a epilepsia subclínica possam iniciar imediatamente após o insulto cerebral, sem nenhum período de latência considerável. De fato, estudos aplicando EEG indicam que o período de latência após insultos cerebrais, se existir, é menor do que se acreditava inicialmente. Além disso, trabalhos demonstram que as primeiras convulsões são tipicamente observadas em uma determinada porcentagem de animais durante os primeiros 5 dias após o SE (LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015). Sloviter e colaboradores (SLOVITER *et al.*, 2012; SLOVITER e BUMANGLAG, 2013) sugerem que a epilepsia crônica envolva um processo de dois estágios. Na primeira etapa (epileptogênese), uma lesão ou insulto provoca alterações que resultam em descargas epileptiformes espontâneas, as quais são subclínicas na maioria dos casos. Na segunda fase ("maturação epiléptica"), descargas subclínicas aumentam gradualmente em duração, invadindo e recrutando outras populações neuronais que contribuirão para a epilepsia clínica. Portanto, o período de latência não seria uma fase pré-epiléptica da epileptogênese, mas um período variável de "maturação epiléptica", o qual estabelece uma desordem focal com crises convulsivas subclínicas. Este processo evolui gradualmente, apresentando crises convulsivas clinicamente evidentes, alcançando a fase de epilepsia crônica.

O modelo da pilocarpina vem sendo utilizado em todo o mundo para estudar os mecanismos que envolvam a ELT e as alterações neurocomportamentais. Prejuízos cognitivos, déficits de memória espacial, alteração na atividade locomotora, e comportamento tipansioso são algumas das alterações neurocomportamentais relatadas por pacientes com ELT, que foram observadas em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina (HOLMES *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2004; DETOUR *et al.*, 2005; BRANDT *et al.*, 2010; FAURE *et al.*, 2013; FAURE *et al.*, 2014; KALEMENEV *et al.*, 2015). Além disso, estudos que empregaram camundongos tratados com pilocarpina também

demonstraram déficits na aprendizagem e memória, aumento do comportamento tipo-ansioso e curiosamente, diminuição do comportamento tipo-depressivo (GROTICKE, HOFFMANN e LOSCHER, 2007; 2008; MULLER *et al.*, 2009b).

Além dos transtornos do humor e o comprometimento cognitivo, Hummel e colaboradores (HUMMEL *et al.*, 2013) demonstraram que a função olfatória de pacientes com ELT era significativamente prejudicada, apresentando prejuízos na identificação de odores característicos. Além disso, o volume do bulbo olfatório destes pacientes era menor em comparação com controles (HUMMEL *et al.*, 2013). Contudo, a presença de prejuízo olfatório (descrito nos pacientes com ELT), a relação temporal dos transtornos neurocomportamentais e os mecanismos envolvendo estas alterações ainda são pouco investigados em modelos animais (modelo da pilocarpina).

Considerando a existência de um período de maturação epiléptica, decidimos investigar se as alterações neurocomportamentais observadas tanto em pacientes com epilepsia como em modelos animais de ELT, poderiam ocorrer em um estágio anterior a epilepsia crônica. Além disso, investigar se ratos tratados com pilocarpina apresentariam danos olfatórios, bem como prejuízos na memória social de curto prazo. Estudos abordando o perfil comportamental e sua relação temporal no modelo da pilocarpina, particularmente na fase de maturação epiléptica, podem ser importantes para caracterizar elementos potenciais chave para o processo epileptogênico. Desta forma, nosso estudo teve como objetivo principal identificar alterações neurocomportamentais em ratos durante a fase de maturação e epilepsia crônica no modelo de ELT.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivos específicos

- Investigar a relação temporal entre ELT e comorbidades psiquiátricas através de testes comportamentais (campo aberto, discriminação olfatória, reconhecimento social, labirinto em cruz elevado e nado forçado) realizados na fase de maturação e epilepsia crônica no modelo animal de ELT.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Modelo animal

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (pesando entre 280 - 350g) e ratos Wistar machos jovens (25 - 30 dias de vida), provenientes do Biotério Central da UFSC. Os ratos adultos foram mantidos em grupos de quatro animais por caixa, enquanto os jovens divididos em caixas com dez animais, e mais tarde utilizados como estímulo para os ratos adultos no teste de reconhecimento social. Foram condicionados em sala com ar condicionado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ciclo 12h claro/escuro, com água e comida disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH publication, 8th edition, 2011) aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC; www.ceua.ufsc.br) PP00772. As análises experimentais foram sempre realizadas entre as 09:00 e 14:00h de cada dia (CASTRO *et al.*, 2012). A indução do modelo experimental foi realizada em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC) da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Roger Walz. Os procedimentos foram realizados de acordo com a metodologia previamente publicada (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; MELLO *et al.*, 1993; BONAN *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). Os animais receberam uma dose intraperitoneal de pilocarpina (300 mg/kg, i.p.). Para minimizar os efeitos colinérgicos periféricos e a mortalidade, os animais foram tratados com metil nitrato de escopolamina (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração da pilocarpina e diazepam (5 mg/kg, i.p.) 2 horas após o início das crises. Após a administração de pilocarpina os animais apresentaram hipoatividade, estado que na maioria dos casos evoluiu para convulsões generalizadas dentro de 40-80 minutos após a injeção. Os animais também foram alimentados e hidratados durante o período de recuperação com intuito de melhorar o estado clínico geral e reduzir a mortalidade. No presente modelo, 96,67% dos animais (29/30) desenvolveram SE. A taxa de mortalidade foi de 16,67% (5 animais). Desta forma, apenas os animais que desenvolveram SE e sobreviveram (80,00%, 24 animais), foram utilizados na análise comportamental. Os animais foram divididos em 2 grupos: (1) maturação epiléptica (n = 12), e (2) epilepsia crônica (n = 12). Os animais foram monitorados entre os dias 3 e 5 após

administração de pilocarpina, durante 6 h por dia (08:00 - 14:00h), e crises convulsivas clinicamente visíveis não foram documentadas. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que crises focais ou eletrográficas possam ter ocorrido durante estas 6 h, nas 18 h/dia restantes (período não monitorado) ou ainda nos dias subsequentes, uma vez que não foi utilizado nenhum monitoramento contínuo via eletroencefalograma. Os animais controle foram divididos em 2 grupos após a injeções de escopolamina, salina e diazepam: (1) maturação epiléptica (n = 12), e (2) epilepsia crônica (n = 12). A figura 21 ilustra o desenho experimental utilizado no presente capítulo.

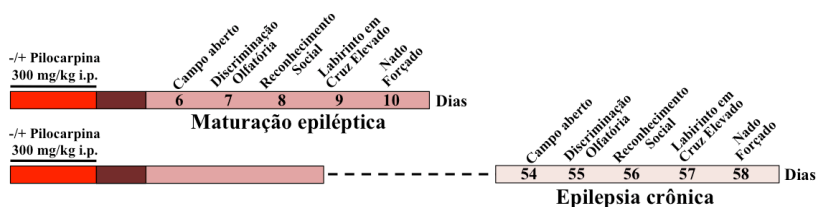


Figura 21. Desenho experimental.

3.4.2 Avaliação comportamental

Os testes comportamentais foram realizadas após a administração intraperitoneal de pilocarpina ou veículo em dois grupos experimentais independentes: um durante o período de 6 - 10 dias (fase de maturação epiléptica) e o outro durante o período de 54 - 58 dias (epilepsia crônica) após o tratamento (ver Fig. 21). A sequência dos testes foi organizada no sentido do menos para o mais aversivo, com um intervalo entre os testes de pelo menos 1 dia. Os testes incluíram: campo aberto, discriminação olfatória, reconhecimento social, labirinto em cruz elevado e nado forçado. Os testes foram analisados pelo mesmo avaliador, em uma sala de observação, na qual os ratos foram habituados por pelo menos 1 h antes do início de cada teste. A análise comportamental foi monitorada por uma câmara de vídeo posicionada acima dos aparelhos, e as imagens foram analisadas em uma sala adjacente, por um pesquisador experiente, que não sabia a qual grupo experimental pertenciam os animais avaliados. Os parâmetros do teste do campo aberto foram analisados utilizando o software ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

3.4.2.1 Campo Aberto

A fim de avaliar os efeitos do tratamento sobre a atividade locomotora, os animais foram colocados durante 15 minutos em uma arena de campo aberto aos 6 dias (fase de maturação epiléptica) e 54 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina. O aparelho, feito de madeira coberta com formica impermeável, tem piso branco (100 cm x 100 cm) e paredes brancas, com 40 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do aparato e a distância total percorrida (m), a velocidade média (m/s), o tempo gasto em áreas centrais e periféricas, e número de rearings e groomings foram registrados por 15 min utilizando o sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze® (CASTRO *et al.*, 2012). Após o final de cada avaliação e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, a arena foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha.

3.4.2.2 Discriminação Olfatória

A capacidade de discriminação olfatória dos ratos foi avaliada aos 7 dias (fase de maturação epiléptica) e 55 dias (epilepsia crônica) após a administração de pilocarpina, com uma tarefa de discriminação olfatória previamente utilizada por Prediger e colaboradores (PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005). Esta tarefa consistia na colocação de cada rato durante 5 minutos em uma caixa, que era dividida em dois compartimentos idênticos (30 cm × 30 cm × 20 cm), separados por uma porta aberta, onde o animal poderia escolher entre um compartimento com serragem fresca (compartimento não familiar) e outro com a serragem que o animal estava previamente acondicionado por pelo menos 48 h antes do teste (compartimento familiar). Os animais foram inicialmente colocados no centro do compartimento não familiar e o tempo gasto (s) pelos animais em ambos os compartimentos (familiar vs. não familiar) foram registrados. Normalmente, os ratos Wistar machos adultos são capazes de discriminar entre os compartimentos familiar e não familiar, gastando muito mais tempo no compartimento familiar, uma vez que preferem significativamente ambientes com o seu próprio odor (CARR *et al.*, 1976; PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005; PREDIGER *et al.*, 2006). Utilizou-se o número de cruzamentos entre os compartimentos como uma medida de atividade locomotora.

3.4.2.3 Reconhecimento Social

A memória social de curto prazo foi avaliada aos 8 dias (fase de maturação epiléptica) e 56 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina, conforme metodologia de reconhecimento social descrita por Dantzer e colaboradores (DANTZER *et al.*, 1987) e previamente avaliada por Prediger e colaboradores (PREDIGER *et al.*, 2004; PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005; PREDIGER, DA CUNHA e TAKAHASHI, 2005). Os ratos jovens foram isolados em caixas individuais 20 minutos antes do início do experimento. A tarefa de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um curto período de tempo (30 min), onde o rato jovem foi colocado na caixa do rato adulto e o tempo gasto pelo adulto na investigação do jovem (“nosing, sniffing, grooming, or pawing”) foi registrado. No final da primeira apresentação, o animal jovem foi retirado e mantido em uma caixa individual e após 30 min reexposto ao mesmo rato adulto. Nesta tarefa, como o intervalo entre a primeira e segunda exposição é inferior a 40 minutos, os ratos machos adultos devem exibir reconhecimento do animal jovem, como indicado por uma redução significativa no tempo de investigação social durante a segunda exposição (DANTZER *et al.*, 1987; PREDIGER *et al.*, 2004; PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005; PREDIGER, DA CUNHA e TAKAHASHI, 2005). O tempo gasto na investigação social por parte dos ratos adultos foi medido e, em seguida, para cada animal expresso como a razão entre a segunda e primeira exposição [taxa de duração da investigação, do inglês “ratio of investigation duration (RID)”]. Uma redução nesta taxa (RID) reflete uma diminuição do comportamento investigativo durante o segundo encontro, demonstrando a capacidade de reconhecimento do rato adulto. Esta transformação foi escolhida a fim de minimizar variações intra-dia e com o objetivo de equalizar os desvios entre os diferentes grupos (DANTZER *et al.*, 1987; PREDIGER *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2012).

3.4.2.4 Labirinto em Cruz Elevado

Os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado aos 9 dias (fase de maturação epiléptica) e 57 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina, teste comportamental reconhecido para a avaliação do efeito tipo ansiolítico e ansiogênico de procedimentos e drogas em roedores (LISTER, 1987). O aparato feito de madeira

consistia em dois braços abertos opostos (50 cm × 10 cm) rodeado por uma borda de 1 cm de altura, e dois braços fechados (50 cm x 10 cm x 40 cm). O aparato estava posicionado 50 cm acima do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) media 10 cm x 10 cm (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Os experimentos foram realizados em uma sala silenciosa e com baixa intensidade de luz (12 lx). O animais foram colocados individualmente na zona central do labirinto de frente para um braço fechado e observados durante 5 min. Após o final de cada avaliação e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, o aparato foi cuidadosamente limpo com solução de etanol 10% e seco com papel toalha. O número de entradas (definido pela colocação das quatro patas em um braço) e o tempo gasto nos braços abertos e fechados foram monitorados. A porcentagem de entradas nos braços abertos, foi calculada pelo número de entradas nos braços abertos dividido pelo número total de entradas nos braços (DOS SANTOS *et al.*, 2013). A porcentagem do tempo gasto nos braços abertos foi calculada pelo tempo gasto nos braços abertos dividido pelo tempo total gasto no braços. Qualquer diminuição destes parâmetros representam um comportamento tipo-ansioso, e o número total de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida de atividade locomotora (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010).

3.4.2.5 Nado Forçado

O efeito tipo-depressivo foi avaliado aos 10 dias (fase de maturação epiléptica) e 58 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina, com o teste do nado forçado descrito por Porsolt e colaboradores (PORSOLT, LE PICHON e JALFRE, 1977). Os ratos foram colocados em cilindros individuais (40 cm de altura e 17 cm de diâmetro) contendo água (a profundidade da água era de 30 cm, $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Duas sessões de natação foram realizadas (um pré-teste inicial de 15 min, seguido pelo teste, realizado 24 horas depois pelo período de 5 min). Dois parâmetros comportamentais foram monitorados de forma cumulativa na sessão teste (i) tempo de imobilidade (isto é, o tempo gasto para flutuar na água, sem dificuldades, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água), e (ii) tempo de escalada (ou seja, o tempo gasto fazendo movimentos ativos com as suas patas dianteiras dentro e para fora da água, dirigido especificamente para a parede do cilindro). O aumento do tempo de

imobilidade é considerado um indicador de comportamento tipo-depressivo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram verificados quanto à normalidade da distribuição de frequência com o teste de Kolmogorov-Smirnov e expressos como média \pm E.P.M. e a análise estatística foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes (controle vs. pilocarpina). O nível aceitável de significância para os testes foi de $p \leq 0,05$. Os testes paramétricos foram realizados usando o pacote de software Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

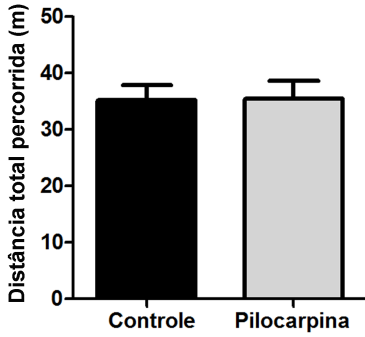
3.6 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir representam o manuscrito publicado em 2016 no periódico *Epilepsy & Behavior*, intitulado de **“Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy”**.

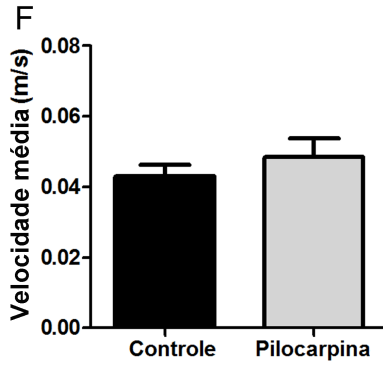
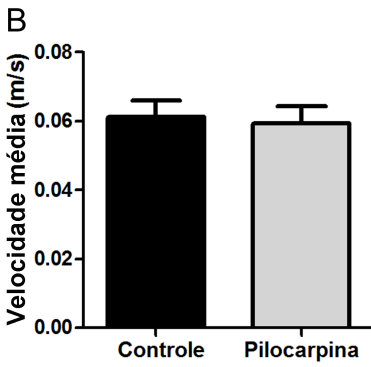
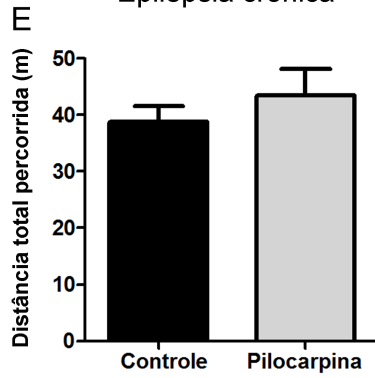
3.6.1 Campo Aberto

Os resultados da atividade locomotora avaliada na arena de campo aberto 6 dias (fase de maturação epiléptica) e 54 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina estão resumidos na Fig. 22. A análise estatística revelou que a atividade locomotora dos animais em ambos os grupos experimentais (maturação e epilepsia crônica) não foi alterada, considerando a avaliação de parâmetros como a distância total percorrida (m) (Fig. 22A e E), a velocidade média (m/s) (Fig. 22B e F), o tempo gasto na zona central e periférica (dados não apresentados), o número de rearings (levantamentos) (Fig. 22C e G), e o número de groomings (auto-limpeza) (Fig. 22D e H). Estes resultados indicam claramente que o tratamento com pilocarpina não altera a atividade e desempenho locomotor dos animais no período avaliado (15 min), seja na fase de maturação ou epilepsia crônica.

A Maturação epiléptica



Epilepsia crônica



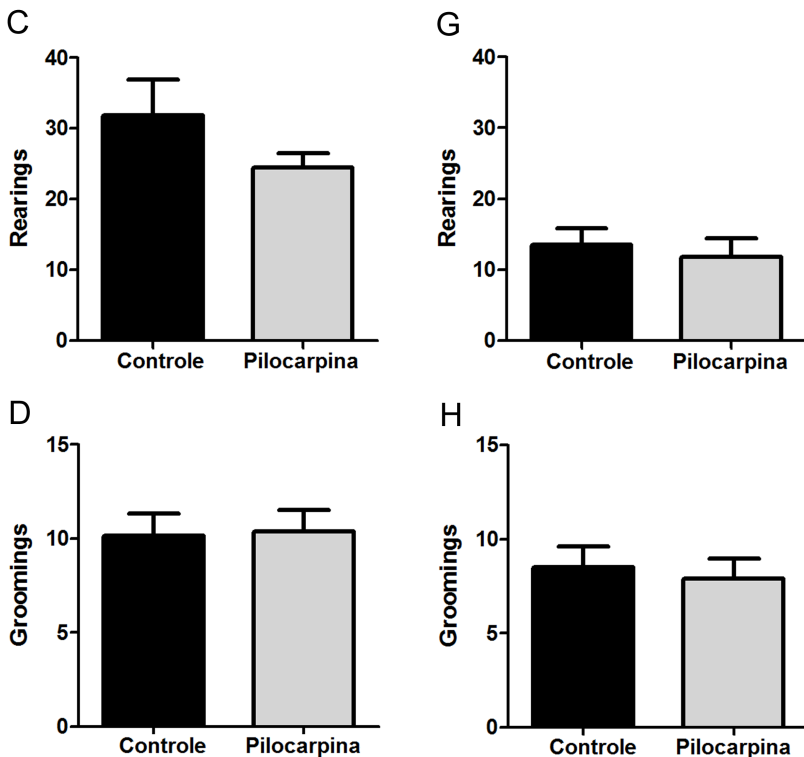


Figura 22. Atividade locomotora avaliada na arena de campo aberto 6 dias (fase de maturação epiléptica) e 54 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. (A e E) da distância total percorrida (m), (B e F) velocidade média (m/s), rearings (C e G) e groomings (D e H) durante 15 min, ($n = 12$ animais em cada grupo), controle vs pilocarpina, teste t de Student para amostras independentes.

3.6.2 Discriminação Olfatória

Os resultados da capacidade de discriminação olfatória, avaliada aos 7 dias (fase de maturação epiléptica) e 55 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina são ilustrados na Fig. 23. A análise estatística indicou um efeito significativo em relação ao tempo gasto pelos animais controle no compartimento familiar nas fases de maturação (Fig. 23A, $p \leq 0,001$) e epilepsia crônica (Fig. 23C, $p \leq 0,001$). Os resultados mostraram que os ratos com injeção intraperitoneal de solução veículo foram hábeis em discriminar o compartimento familiar e o compartimento não familiar, gastando muito mais tempo no compartimento familiar. No entanto, os ratos tratados com pilocarpina apresentaram prejuízo na capacidade de discriminação olfatória, uma vez que gastaram o mesmo tempo nos compartimentos familiar e não familiar, situação identificada aos 7 dias (fase de maturação epiléptica) e aos 55 dias (epilepsia crônica) após o tratamento com pilocarpina. Estes efeitos no teste de discriminação olfatória não parecem estar relacionados com alterações motoras (não foram observadas alterações significativas no número de cruzamentos entre os compartimentos, tanto na fase de maturação como epilepsia crônica) (Fig. 23B e D, respectivamente).

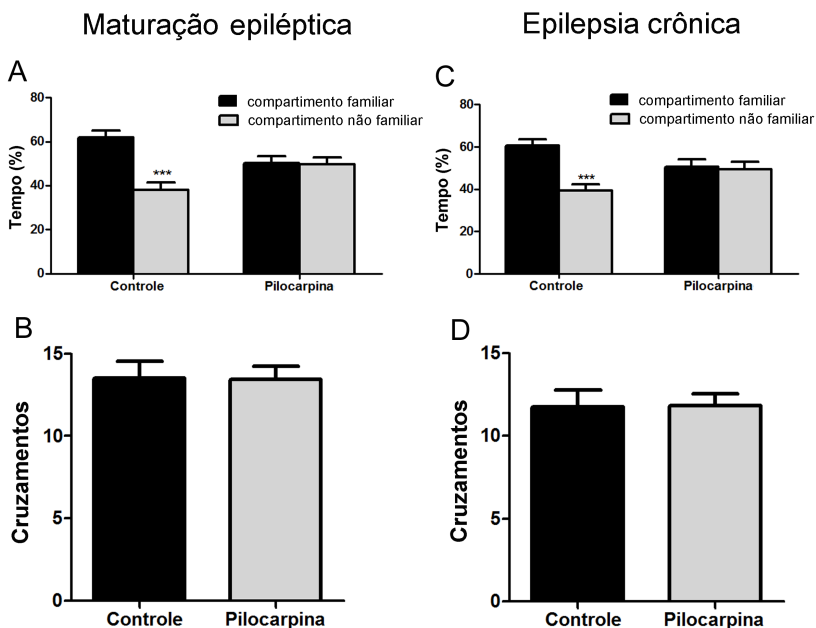


Figura 23. Capacidade de discriminação olfatória, avaliada aos 7 dias (fase de maturação epiléptica) e 55 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina. Os animais foram colocados em uma caixa, que era dividida em dois compartimentos idênticos, separados por uma porta aberta, onde o animal poderia escolher entre um compartimento com serragem fresca (compartimento não familiar, cinza) e outro com a serragem que o animal estava previamente acondicionado por pelo menos 48 h antes do teste (compartimento familiar, preto). Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. (A e C) da porcentagem do tempo gasto em cada compartimento e (B e D) o número de cruzamentos entre os compartimentos durante os 5 min, ($n = 12$ animais em cada grupo). *** $p \leq 0,001$ comparando a porcentagem de tempo gasto no compartimento familiar, teste t de Student para amostras dependentes.

3.6.3 Reconhecimento Social

Os resultados do efeito da administração de pilocarpina na memória social de curto prazo, avaliados aos 8 dias (fase de maturação epiléptica) e 56 dias (epilepsia crônica) após o tratamento estão ilustrados na Fig. 24. A análise estatística revelou um efeito significativo do tratamento com pilocarpina na taxa RID, tanto na fase de maturação epiléptica (Fig. 24A) ($p \leq 0,05$) como nos animais com epilepsia crônica (Fig. 24B) ($p \leq 0,05$). O tratamento com pilocarpina induziu um aumento significativo na taxa de duração da investigação (RID), quando o mesmo animal jovem foi reexposto 30 min após o primeiro encontro. Estes resultados indicam um comprometimento da capacidade de reconhecimento social de curto prazo em ratos adultos.

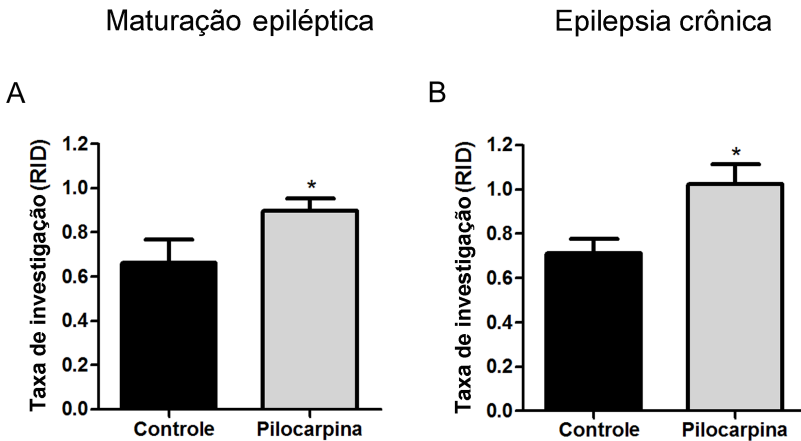


Figura 24. Efeito da administração de pilocarpina na memória de reconhecimento social avaliado aos 8 dias (fase de maturação epiléptica) e 56 dias (epilepsia crônica) após o tratamento. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. (A-B) da RID (isto é, a razão entre a segunda e a primeira exposição) quando o mesmo animal jovem foi exposto durante 5 min, com um intervalo de 30 min ($n = 12$ animais em cada grupo). * $p \leq 0,05$, controle vs pilocarpina, teste t de Student para amostras independentes.

3.6.4 Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados do efeito da administração de pilocarpina no comportamento tipo-ansioso de ratos foram avaliados aos 9 dias (fase de maturação epiléptica) e 57 dias (epilepsia crônica) após o tratamento e estão representados na Fig. 25. A análise estatística demonstrou uma diminuição significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos, (Fig. 25A) ($p \leq 0,001$) e no tempo gasto nos braços abertos (Fig. 25B) ($p \leq 0,001$) nos animais tratados com pilocarpina na fase de maturação epiléptica, o que é compatível com um aumento do comportamento tipo-ansioso. Em contraste, no grupo de animais com epilepsia crônica, não foram identificadas alterações significativas frente ao tratamento com pilocarpina (Fig. 25D e E). Estes efeitos encontrados no labirinto em cruz elevado não parecem estar relacionados com alterações motoras, uma vez que não foram evidenciadas diferenças significativas no número de entradas nos braços fechados nas fases de maturação e epilepsia crônica (Fig. 25C e F, respectivamente).

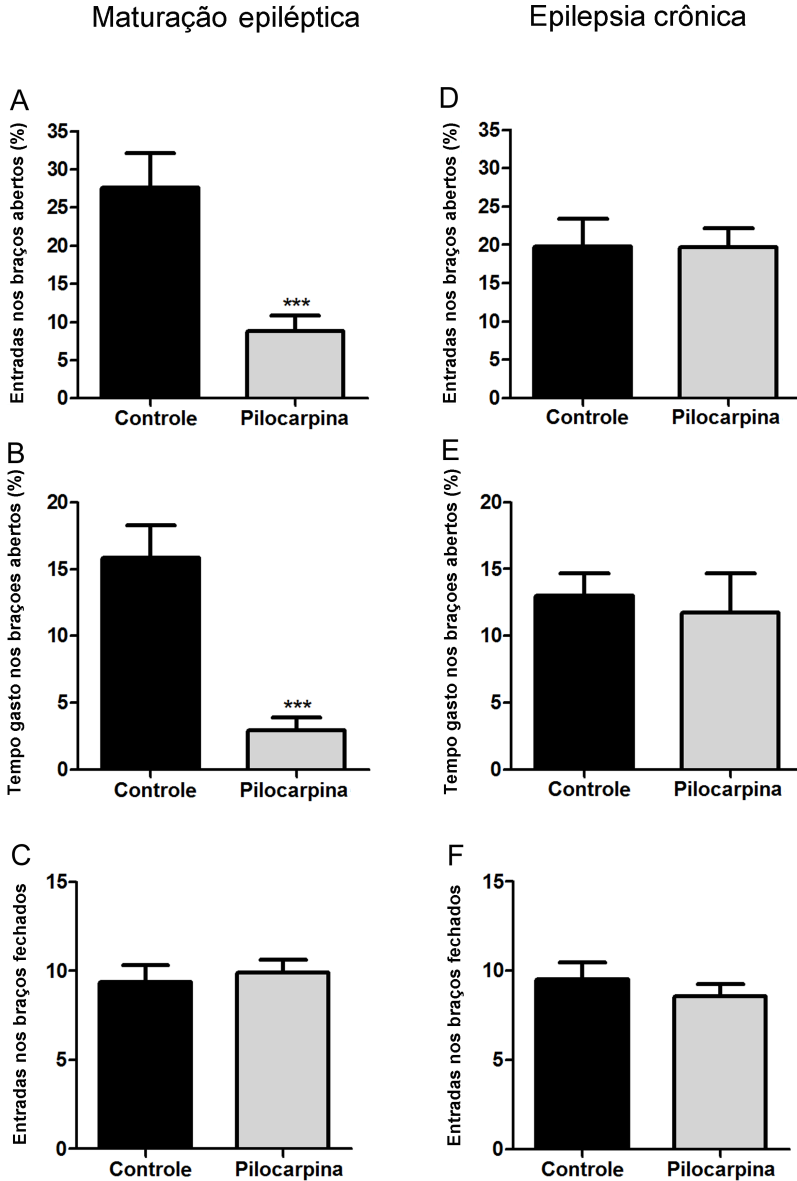


Figura 25. Efeito da administração de pilocarpina no comportamento tipo-ansioso de ratos avaliados aos 9 dias (fase de maturação epiléptica) e 57 dias (epilepsia crônica) após o tratamento. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. (A e D) da porcentagem de entradas nos braços abertos, (B e E) tempo

gasto nos braços abertos, e (C e F) o número de entradas nos braços fechados. A porcentagem de entrada nos braços abertos foi calculada pelo número de entradas nos braços abertos dividido pelo número total de entradas nos braços. A porcentagem de tempo gasto nos braços abertos foi calculada pelo tempo gasto nos braços abertos dividido pelo tempo total gasto nos braços. O número total de entradas nos braços fechados foi usado para medir a atividade locomotora ($n = 12$ animais em cada grupo). *** $p \leq 0,001$, controle vs pilocarpina, teste t de Student para amostras independentes.

3.6.5 Nado Forçado

Os resultados para os efeitos sobre o comportamento do tipo-depressivo no teste do nado forçado em ratos foi avaliado aos 10 dias (fase de maturação epiléptica) e 58 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina e estão resumidos na Fig. 26. A análise estatística indicou uma diminuição significativa no tempo de imobilidade (Fig. 26A) ($p \leq 0,001$) e um aumento no tempo de escalada (Fig. 26B) ($p \leq 0,05$) nos animais tratados com pilocarpina na fase de maturação epiléptica. Da mesma forma, o grupo de animais com epilepsia crônica também apresentaram uma significativa diminuição no tempo de imobilidade (Fig. 26C) ($p \leq 0,001$) e aumento no tempo de escalada (Fig. 26D) ($p \leq 0,01$). Estes resultados são consistentes com um perfil do tipo-antidepressivo dos animais em resposta a pilocarpina.

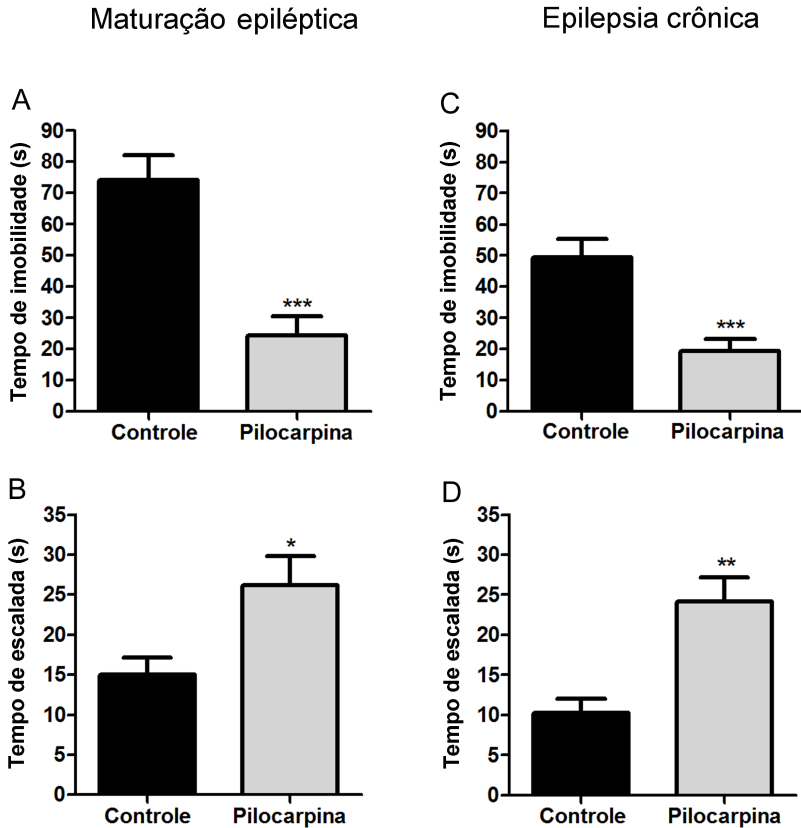


Figura 26. Efeitos sobre o comportamento do tipo-depressivo no teste do nado forçado em ratos avaliados aos 10 dias (fase de maturação epiléptica) e 58 dias (epilepsia crônica) após administração de pilocarpina. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. (A e C) do tempo de imobilidade (B e D) e tempo de escalada ($n = 12$ animais em cada grupo). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, controle vs pilocarpina, teste t de Student para amostras independentes.

3.7 DISCUSSÃO

Nossos resultados trazem um perfil comportamental através dos testes de campo aberto, discriminação olfatória, reconhecimento social, labirinto em cruz elevado e nado forçado nas fases de maturação e epilepsia crônica no modelo da pilocarpina de ELT. A epileptogênese é um processo gradual pelo qual um cérebro normal desenvolve epilepsia, após a ocorrência de uma lesão ou insulto cerebral. Nesse processo são identificadas as fases de maturação e epilepsia crônica, na qual crises recorrentes e espontâneas são evidenciadas. Durante a epileptogênese, múltiplas alterações cerebrais ocorrem, incluindo a hiperexcitabilidade de neurônios e/ou circuitos neurais, alterações na expressão e função de receptores e canais iônicos, perda de neurônios, neurogênese, brotamento axonal e dendrítico, gliose, processos inflamatórios entre outras modificações (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; CAVALHEIRO *et al.*, 1994; DUDEK *et al.*, 2002; HERMAN, 2002; PITKANEN *et al.*, 2002; SCHARFMAN, 2007; SLOVITER, 2008; LOSCHER e BRANDT, 2010; DI MAIO *et al.*, 2011; PITKANEN e LUKASIUK, 2011; LOPES *et al.*, 2013; LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015). Algumas destas alterações estão relacionadas com processos de reparação pós-injúria e não são seriam consideradas modificações passíveis de intervenção com objetivo de impedir a evolução do processo epileptogênico. Além disso, é provável que cascatas de alterações estruturais, moleculares e funcionais nos circuitos neurais durante as fases de maturação e epilepsia crônica possam ser suficientes e capazes de induzir transtornos neurocomportamentais na ELT (FRITSCHY, 2008; SEO *et al.*, 2013).

O teste do campo aberto é bem aceito como metodologia para avaliar o comportamento do tipo exploratório e ansioso de roedores (PRUT e BELZUNG, 2003). O método consiste em submeter um animal a um ambiente desconhecido a partir do qual a fuga é impedida por paredes circundantes. Nestas condições, os roedores preferem espontaneamente a segurança da periferia mais escura do aparelho do que as partes brilhantes centrais do campo aberto. Os resultados sobre a atividade locomotora, avaliada na arena de campo aberto nas fases de maturação e epilepsia crônica (Fig. 22) não revelaram efeitos significativos do tratamento, considerando os parâmetros de distância total percorrida (m), velocidade média (m/s), número de rearings e groomings durante os 15 min analisados. Estes resultados concordam com estudos anteriores que também não encontraram alterações na atividade locomotora de ratos (BRANDT *et al.*, 2010) e camundongos

(GROTICKE, HOFFMANN e LOSCHER, 2007) submetidos ao modelo da pilocarpina de ELT. No entanto, não podemos descartar mudanças na atividade locomotora, uma vez que os animais foram monitorados por apenas 15 minutos, um período não representativo e insuficiente para detectar mudanças sutis na atividade motora em alguns casos. Além disso, em contraste com os nossos resultados, estudos anteriores realizados em ratos demonstraram que a pilocarpina altera a amplitude e aumenta a atividade exploratória horizontal no campo aberto (STEWART e LEUNG, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2005).

No presente capítulo, foi demonstrado que a administração de pilocarpina foi capaz de promover uma perturbação da capacidade de discriminação olfatória tanto em ratos que se encontravam na fase de maturação epiléptica como animais com epilepsia crônica. Os animais tratados com pilocarpina passaram o mesmo tempo em ambos os compartimentos (Fig. 23). Esta incapacidade de discriminar os compartimentos familiar e não familiar parece refletir um déficit na discriminação olfatória, descartando uma deficiência locomotora simples, uma vez que nenhuma alteração no número de cruzamentos entre os compartimentos foi identificada após o tratamento com pilocarpina. Os mecanismos que envolvem o déficit olfatório observados no nosso estudo não foram investigados, no entanto, alterações neuropatológicas dentro do córtex olfatório após a injeção intraperitoneal de pilocarpina em ratos já foram relatadas (TURSKI *et al.*, 1983). Além disso, o tratamento com pilocarpina (1-2 semanas após convulsões prolongadas em ratos) pode alterar a migração de neuroblastos para o bulbo olfatório e migração de precursores neuronais nas regiões anteriores do cérebro (PARENT, VALENTIN e LOWENSTEIN, 2002). Portanto, sugere-se que o déficit na discriminação olfatória possa estar correlacionado com estas alterações induzidas pela pilocarpina. Através deste trabalho demonstramos também pela primeira vez, que os danos olfatórios encontrados em pacientes com ELT (HUMMEL *et al.*, 2013) são reproduzidos no modelo animal da pilocarpina. Hummel e colaboradores já haviam demonstrado que a função olfatória de pacientes com ELT era significativamente prejudicada em comparação com pacientes controle, apresentando prejuízos na identificação de odores característicos. Além disso, o volume do bulbo olfatório destes pacientes era menor em comparação com controles (HUMMEL *et al.*, 2013).

Nós também investigamos o impacto da administração de pilocarpina na memória de reconhecimento social de ratos adultos nas fases de maturação e epilepsia crônica (Fig. 24). O teste é um modelo

particular de memória olfatória (SAWYER, HENGELHOLD e PEREZ, 1984) e pode envolver uma forma de memória não procedural de curto prazo com base na capacidade de discriminação olfatória de ratos. Os resultados mostraram que em ambas fases, os ratos, administrados com pilocarpina passaram significativamente mais tempo investigando o rato jovem durante a segunda apresentação do que no primeiro encontro, indicando um déficit na memória social de curto prazo. Seguindo a linha dos nossos achados, foi demonstrado em estudos anteriores que ratos tratados com pilocarpina exibiam também déficits no aprendizado e memória visual-espacial (HOLMES *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2004; KALEMENEV *et al.*, 2015).

No teste do labirinto em cruz elevado, a administração de pilocarpina promoveu na fase de maturação epiléptica um aumento do comportamento tipo-ansioso, fato evidenciado pela diminuição de exploração dos braços abertos (Fig. 25). Curiosamente, os animais tratados com pilocarpina, que se encontravam na fase crônica, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao seu respectivo grupo controle. Em contraste com nossos resultados, um estudo anterior realizado em camundongos demonstrou um incremento do comportamento tipo-ansioso na fase crônica utilizando o teste “hole-board” (GROTICKE, HOFFMANN e LOSCHER, 2007). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com pilocarpina diminuiu o comportamento tipo-ansioso em ratos observados 5 meses após a administração de pilocarpina (DETOUR *et al.*, 2005).

No teste do nado forçado, os ratos de ambos os grupos tratados com pilocarpina (maturação e epilepsia crônica) exibiram aumento na atividade de natação (Fig. 26). O teste do nado forçado é amplamente utilizado como um procedimento pré-clínico para identificação de compostos com atividade antidepressiva (CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005), uma vez que todos os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade no teste, sem alteração na atividade locomotora. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores que também observaram um decréscimo no tempo de imobilidade dos ratos submetidos ao modelo da pilocarpina de ELT na fase crônica (GROTICKE, HOFFMANN e LOSCHER, 2007; MULLER *et al.*, 2009b), dados estes compatíveis com uma ação do tipo-antidepressiva da pilocarpina. A explicação para este achado é complexa, já que pacientes portadores de ELT apresentam altos índices de transtornos do humor, como a depressão. Uma possibilidade é que a diminuição do tempo de imobilidade observada no teste poderia estar associada com um aumento do medo nestes animais, como observado em outros

trabalhos (MULLER *et al.*, 2009b). No entanto, estudos adicionais devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo desta alteração. As principais alterações neurocomportamentais evidenciadas neste trabalho estão resumidas na tabela 4.

Tabela 4. Alterações neurocomportamentais em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

Teste comportamental	Maturação epiléptica	Epilepsia crônica
Campo aberto	Sem alterações	Sem alterações
Discriminação olfatória	Dano olfatório	Dano olfatório
Reconhecimento social	Prejuízo da memória social de curto prazo	Prejuízo da memória social de curto prazo
Labirinto em cruz elevado	Comportamento tipo-ansioso	Sem alterações
Nado forçado	Comportamento tipo-antidepressivo	Comportamento tipo-antidepressivo

3.8 CONCLUSÃO

Em conclusão, nós demonstramos pela primeira vez que alterações neurocomportamentais específicas induzidas pela administração i.p. de pilocarpina podem ocorrer em um estágio inicial (fase de maturação epiléptica), antes da epilepsia crônica, possivelmente relacionada e associada com as alterações estruturais, moleculares e funcionais de circuitos neurais. Além disso, considerando que na fase de maturação epiléptica o cérebro esteja passando por um processo de reorganização e remodelagem, este período poderia nos oferecer uma janela para intervenção e tratamento, modificando ou interrompendo o processo epileptogênico induzido pelo insulto cerebral inicial. Por fim, o modelo da pilocarpina parece reproduzir vários dos transtornos psiquiátricos que estão associados com a ELT em seres humanos, podendo assim ser utilizado como ferramenta para estudar estratégias neuroprotetoras, bem como os mecanismos neurobiológicos e psicopatológicos associados à epileptogênese.

4 CAPÍTULO III: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS NEUROQUÍMICOS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ANÁLISE EM PACIENTES REFRACTÁRIOS)

4.1 PROCESSO CIRÚRGICO COMO OPÇÃO DE TRATAMENTO PARA PACIENTES EPILÉPTICOS REFRACTÁRIOS

Apesar da busca incessante por uma terapia farmacológica eficaz para a epilepsia, 20-30% dos pacientes são refratários. Este grupo apresenta um controle inadequado das crises, mesmo mediante o tratamento apropriado com os fármacos antiepilépticos disponíveis, ou ainda pode ocorrer um controle adequado das crises epiléticas pelo tratamento, porém com efeitos colaterais intoleráveis (COSTA, 2002; BELEZA, 2009). Considerando as alternativas terapêuticas existentes, o tratamento cirúrgico é de longe a melhor opção para os casos de epilepsia fármaco resistente (VAN OIJEN *et al.*, 2006).

Estima-se que 70-80% das séries cirúrgicas dos casos intratáveis farmacologicamente sejam de ELTM-EH (ENGEL, 2001). Esta síndrome é frequentemente associada à história de um insulto precipitante inicial (IPI) na infância, podendo este ser uma crise epilética prolongada associada ou não a febre, ou outro insulto neurológico (ex. traumatismo crânio-encefálico, meningite). Após um período variável, em geral anos, surgem crises recorrentes as quais podem tornar-se intratáveis farmacologicamente. Histopatologicamente observa-se uma perda de neurônios hipocampais associada à reorganização sináptica característica e brotamento de fibras musgosas no giro denteado (MATHERN *et al.*, 1998). Entretanto, é bem reconhecido que outras estruturas cerebrais, além do hipocampo, sofrerão plasticidade neuronal e glial como a amígdala, neocortex e outras áreas (SPERK, DREXEL e PIRKER, 2009).

Em alguns pacientes acometidos com a doença, a cirurgia pode ser extremamente efetiva, reduzindo substancialmente a frequência ou ainda proporcionando um controle completo das crises epiléticas. Um estudo realizado por Wiebe e colaboradores (2001), demonstrou claramente a eficácia do processo cirúrgico comparado à intervenção farmacológica em pacientes portadores de ELT. Este estudo revelou que 58% dos pacientes sujeitos a ressecção cirúrgica do foco epilético permaneceram livres de crises, enquanto tal resultado apenas foi observado em 8% dos pacientes sob tratamento clínico apropriado. Paralelamente, os pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico apresentaram uma menor frequência de crises epiléticas e melhor

qualidade de vida (WIEBE *et al.*, 2001). Nos adultos, a relação entre a supressão completa ou a redução da frequência das crises e o aumento da qualidade de vida tem sido claramente estabelecida, porém esta condição tem-se mostrado menos evidente em crianças (VAN OIJEN *et al.*, 2006).

O tratamento cirúrgico da epilepsia é hoje largamente aceito e reconhecido, mas pelos riscos que esta opção terapêutica envolve só deve ser considerada para os pacientes cuja ausência de resposta ao tratamento farmacológico tenha sido cuidadosamente demonstrada (SHETH, 2000; COSTA, 2002). Para isso, um período de tempo suficiente com terapia farmacológica convencional terá que ser dispendido de modo a ensaiar de forma metódica a eficácia de múltiplos antiepilépticos, em monoterapia ou em associação, documentando a presença de concentrações séricas adequadas e de sinais clínicos de toxicidade (SHETH, 2000; SHETH *et al.*, 2000). A identificação de crises epilépticas fármaco resistentes é o passo inicial mais importante na avaliação pré-cirúrgica (SHETH, 2000), contudo outros requisitos terão que ser considerados na triagem dos pacientes epilépticos candidatos a cirurgia, como as perspectivas de um resultado satisfatório quanto ao controle das crises, melhoria na qualidade de vida e possibilidade de um tratamento cirúrgico sem danos funcionais significativos (COSTA, 2002).

A avaliação pré-cirúrgica é complexa e multidisciplinar e inclui a avaliação clínica, a monitorização por vídeo-EEG, testes neuropsicológicos e a avaliação por neuroimagem estrutural e funcional (COSTA, 2002). O objetivo primário da investigação pré-cirúrgica é a identificação da área epileptogênica e a avaliação da existência de eventuais processos patológicos subjacentes ao tecido cerebral epiléptico (SHETH, 2000; CASCINO, 2004). Além disso, após a identificação de uma lesão específica é necessário confirmar a existência da relação atual entre a lesão e as crises epilépticas. Também é essencial assegurar que as crises não são susceptíveis de remissão espontânea e que o local de ocorrência das descargas epilépticas não varia ao longo do tempo. Além disso, é necessário demonstrar claramente que a região onde a ressecção cirúrgica será feita não interferirá com áreas motoras e sensoriais nem com zonas associadas com funções fundamentais, como a linguagem, memória ou outras funções neuropsicológicas essenciais, cuja remoção poderia acarretar danos mais sérios para o paciente (COSTA, 2002).

Entre os vários procedimentos cirúrgicos disponíveis para o tratamento das epilepsias, a metodologia mais usada e de potencial curativo é a excisão do foco epileptogênico. Contudo, em determinados

transtornos epiléticos em que a zona epileptogênica não é facilmente identificável ou em que possam existir múltiplos focos, o tratamento cirúrgico terá um caráter fundamentalmente paliativo e consistirá no isolamento da área responsável pela iniciação das crises ou na interrupção da propagação da atividade da crise epilética (COSTA, 2002; KEMENY, 2002; SHAEFI e HARKNESS, 2003; VAN OIJEN *et al.*, 2006).

Alguns autores sugerem que o principal objetivo do tratamento cirúrgico das epilepsias é permitir que o paciente se mantenha num estado de completa ausência de crises epiléticas, sem o uso de qualquer medicação antiepilética (KIM *et al.*, 2005). Contudo, de acordo com os dados publicados por Schmidt e colaboradores (2004), este objetivo parece ser alcançado apenas em dois terços dos pacientes. De fato, um em cada três pacientes que permaneceram livres de crises após cirurgia, apresentaram crises recorrentes associadas ao uso dos fármacos antiepiléticos instituídos (SCHMIDT, BAUMGARTNER e LOSCHER, 2004). Tais achados podem sugerir que para cada caso em particular existam alterações neuroquímicas, histopatológicas e de circuitos neurofisiológicos próximos e distantes da zona epileptogênica que contribuam para as diferentes características clínico-neurofisiológicas de epileptogênese, propagação das crises e possivelmente, resposta ao tratamento, seja este cirúrgico ou farmacológico.

O tratamento cirúrgico das epilepsias parece ser particularmente mais complexo nas crianças do que nos adultos. Na verdade, nos pacientes pediátricos a intervenção cirúrgica é executada num cérebro em desenvolvimento e por isso com constantes alterações nas características neurobiológicas. As intervenções em idades precoces apresentam um maior potencial de repercussão no desenvolvimento da criança e, nessas idades, existe também uma grande plasticidade neural, constituindo o período mais intenso de adaptação ou reorganização pós-cirúrgica (COSTA, 2002). Naturalmente, ao considerar a terapia cirúrgica em crianças e adultos, os objetivos e expectativas não são exatamente os mesmos. Nas crianças pretende-se controlar as crises epiléticas sem provocar sequelas neurológicas, preservar o desenvolvimento psicomotor, melhorar o comportamento, promover o desenvolvimento cognitivo e a aprendizagem escolar. Por outro lado, nos adultos, além do controle das crises epiléticas outros aspectos são importantes como a independência e integração no mercado de trabalho (COSTA, 2002). Assim, independentemente da idade, procura-se não

apenas o controle das crises epilépticas, mas também a integração social e a melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

4.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E TRANSDUÇÃO DE SINAL

O estudo dos aspectos neuroquímicos, sistemas de sinalização inter e intracelular relacionados à epilepsia visam determinar os mecanismos moleculares envolvidos na neuroplasticidade e podem participar da fisiopatologia da doença. A investigação destes aspectos no tecido cerebral de pacientes com ELT é fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento dos pacientes com epilepsias refratárias. Entre os diversos alvos de importância podemos destacar: a) sistema glutamatérgico, via receptores NMDA, AMPA e transportadores glia de glutamato; b) proteínas cinases (ex. PKA, PKC, CaMKII, MAPKs); c) proteínas fosfatases (proteínas fosfatase 1-PP1 e calcineurina-PP2B). Neste sentido, o presente capítulo tem como objetivo principal avaliar vias de sinalização intracelular no neocórtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELT submetidos a lobectomia temporal anterior-mesial. Além disso, investigar os efeitos da administração de dexametasona sobre estas vias de sinalização intracelular na amígdala. Cabe ressaltar que as variáveis clínicas e transoperatórias dos pacientes foram controladas em todos os pacientes submetidos ao processo cirúrgico. O embasamento teórico neuroquímico que justifica o estudo destes alvos moleculares no tecido cerebral de pacientes com ELT já foi descrito no capítulo I deste trabalho.

4.3 OBJETIVOS

4.3.1 Objetivos específicos

- Determinar o nível de fosforilação dos sítios Ser831 e Ser845 e o conteúdo total da subunidade GluA1 do receptor AMPA no neocórtex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala investigar os efeitos da administração de dexametasona.
- Determinar o nível de fosforilação dos substratos de PKA e PKC no neocórtex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala investigar os efeitos da administração de dexametasona.

- Determinar o nível de fosforilação e o conteúdo total da enzima CaMKII no neocortex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala investigar os efeitos da administração de dexametasona.
- Determinar o nível de fosforilação e o conteúdo total das MAPKs (ERK1/2, JNK p54/46 e p38^{MAPK}) no neocortex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala investigar os efeitos da administração de dexametasona.
- Determinar o conteúdo total dos transportadores EAAT1 e EAAT2, da proteína fosfatase 1 (PP1) e GFAP no neocortex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT submetidos ao processo cirúrgico, e especificamente na amígdala investigar os efeitos da administração de dexametasona.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo 31 pacientes adultos com ELTM-EH fármaco resistentes, tratados cirurgicamente entre fevereiro de 2009 e dezembro de 2011 no Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC). Todos os pacientes apresentavam crises convulsivas com perda de consciência pelo menos uma vez por mês, mesmo fazendo o tratamento adequado com pelo menos 2 medicamentos antiepilépticos.

Todos os pacientes tinham histórico médico completo, semiologia das crises, exames neurológicos, avaliação neuropsicológica e psiquiátrica, análise dos picos interictal e ictal através de vídeo-EEG, e os resultados de imagem de ressonância magnética consistentes com ELTM-EH (SHETH, 2000). Os critérios de exclusão foram (1) diagnóstico de uma outra síndrome epiléptica diferente da ELTM-EH unilateral; (2) anormalidades neurológicas focais no exame físico; (3) atraso mental expresso como disfunção cognitiva considerada pela avaliação neuropsicológica e avaliação psiquiátrica; e (4) picos interictais extra-temporais ou generalizados identificados no EEG (ARAUJO *et al.*, 2006; GUARNIERI *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011; PAULI *et al.*, 2012).

As variáveis clínicas controladas foram sexo, raça, lado da esclerose hipocampal, idade, duração da doença (em anos), idade de início da epilepsia (convulsões recorrentes), comorbidades psiquiátricas

e qualidade de vida. Os pacientes foram considerados sob monoterapia se estivessem utilizando apenas uma DAE. As DAEs foram carbamazepina (CBZ), fenobarbital (PNB), difenilhidantoina (DPH), ácido valpróico (VA), lamotrigina (LMT) ou topiramato (TPM). Os pacientes que usavam duas ou mais DAEs (associada ou não com benzodiazepínicos (BDZs) foram classificados como tratamento politerápico. Os BDZs utilizados foram clobazam ou clonazepam.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) para experimentos envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC) também aprovou o estudo e o consentimento dos pacientes foi coletado antes da submissão ao protocolo experimental.

4.4.2 Protocolo de anestesia

O protocolo anestésico utilizado, com exceção do tratamento com dexametasona, foi o mesmo para todos os pacientes. A anestesia foi iniciada com propofol (2 mg/kg, bolus i.v.), fentanil (2 ug/kg, bolus i.v.) e rocurônio (0,9 mg/kg, bolus i.v.) seguido pela infusão de remifentanil (0,1 a 0,2 ug/kg, i.v. por 7 min) e inalação de isoflurano (0,5 a 0,6 de concentração mínima alveolar). A hidratação foi realizada de forma contínua com infusão i.v. de solução salina isotônica, a uma taxa de 1,2 ml/kg/hora, mais metade do volume de diurese. A profilaxia antibiótica com cefalotina (30 mg/kg) foi feita 30 minutos antes da anestesia e repetida 4 horas mais tarde, depois das amostras de tecido cerebral serem coletadas. A analgesia foi suplementada com morfina 0,1 mg/kg 30 minutos antes do final da cirurgia, após as amostras de tecido cerebral serem obtidas. Todas as drogas antiepilépticas foram mantidas até o dia da cirurgia (dose via oral as 6 h da manhã) e reintroduzidas o mais rápido possível após a recuperação do paciente da anestesia. Os pacientes que ainda não estavam sendo tratados com fenitoína receberam 20 mg/kg de fenitoína i.v. 8 a 10 horas antes da indução da anestesia e uma dose adicional de 5 mg/kg i.v. e depois disso foram colhidas as amostras de tecido cerebral. Os pacientes que já eram tratados com fenitoína receberam a respectiva dose oral as 6 h da manhã e a dose suplementar transoperatória após as amostras cerebrais serem coletadas.

4.4.3 Tratamento com dexametasona

Por opção da equipe de anestesiologia após os 11 primeiros pacientes submetidos ao processo cirúrgico incluídos neste estudo, o protocolo de anestesia foi modificado, incluindo a administração de 10 mg de dexametasona bolus i.v. imediatamente após a intubação, como uma terapia antiinflamatória adjuvante aos 20 pacientes subsequentes tratados cirurgicamente. A dose administrada em mg/kg para cada paciente foi calculada dividindo-se 10 mg pelo respectivo peso. Desta forma, temos os dois grupos experimentais deste trabalho: pacientes que não receberam dexametasona (n = 11) e os pacientes que receberam o corticoide (n = 20).

4.4.4 Cirurgia, variáveis transoperatórias e amostras de tecido cerebral

O tecido cerebral foi obtido através da técnica padrão de lobectomia temporal anterior-mesial. O procedimento consiste essencialmente na ressecção limitada da porção anterior e neocortical do lobo temporal e a ressecção mais extensa das estruturas temporais mesiais (amígdala, hipocampo e giro parahipocampal) (WIEBE *et al.*, 2001). No presente trabalho, o neurocirurgião fez a ressecção do lobo temporal que se estende até 4 cm posteriormente ao polo temporal, incluindo o giro temporal médio e inferior. Antes da ressecção neocortical temporal ser feita, 0,5 a 1 cm² de amostra neocortical (CTX) localizada 3 cm posterior ao polo temporal foi delicadamente dissecada da substância branca utilizando um bisturi sem termocoagulação prévia. A ressecção mesial incluiu a amígdala (AMG, 2/3) e a cabeça e corpo do hipocampo (HIP). Depois de avaliar a região mesial temporal no ventrículo lateral, a AMG foi obtida utilizando pinças sem termocoagulação. Depois da ressecção da AMG, o HIP foi removido, rapidamente dissecado em vidro refrigerado com gelo e depois congelado em nitrogênio líquido. O tempo total de manipulação do HIP desde o início da termocoagulação vascular até a sua ressecção completa foi controlado em cada caso. Todas as amostras de tecido cerebral foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e, em seguida, transferidas para um freezer -86 °C, onde ficaram acondicionadas até a realização das análises neuroquímicas. Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios mantiveram-se estáveis durante todos os procedimentos e não foram relatadas complicações

transoperatórias. Gasometria arterial, eletrólitos, hematócrito, hemoglobina, parâmetros hemodinâmicos (frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial média) e os parâmetros ácido-base foram determinados quando as estruturas do lobo temporal mesial (AMG e HIP) foram removidas. As variáveis hemodinâmicas e laboratoriais foram controladas, uma vez que poderiam trazer um viés de confusão para os resultados neuroquímicos (RONSONI *et al.*, 2015). O curso do tempo, desde a administração de dexametasona até a ressecção de que cada amostra, também foi controlado. A abordagem cirúrgica foi a mesma para todos os pacientes. Todos os procedimentos cirúrgicos e obtenção de amostras de tecido cerebral foram feitas pelo mesmo neurocirurgião e equipe médica. O esquema de amostragem e obtenção do tecido cerebral é apresentado na figura 27.

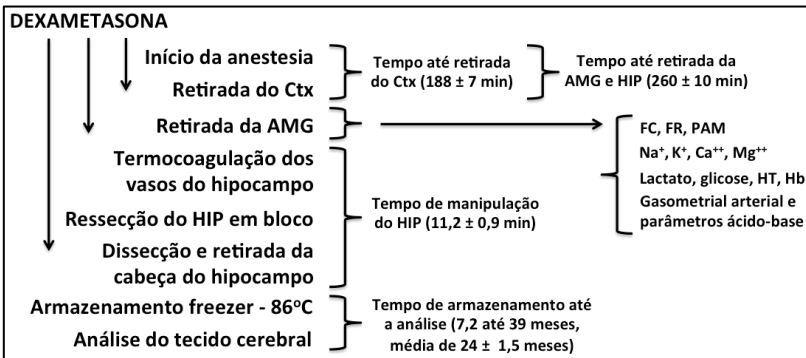


Figura 27. Procedimentos realizados para obtenção do tecido cerebral. Abreviaturas: FC, frequência cardíaca; FR, frequência respiratória; PAM, pressão arterial média; HT, hematócrito; Hb, hemoglobina.

4.4.5 Análises Neuroquímicas

4.4.5.1 Preparação das amostras

Para avaliar o nível de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845, das enzimas PKA, PKC, CaMKII e MAPKs, e o imunocontéudo dos transportadores de glutamato, PP1 e GFAP, western blotting foi realizado como descrito por (LEAL *et al.*, 2002; CORDOVA *et al.*, 2004; POSSER *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). As amostras de tecido cerebral (neocortex, amígdala e hipocampo) dos pacientes com ELT tratados cirurgicamente

foram preparadas como descrito por (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente na proporção de 1/4 (p/v) em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Cocktail inibidor de proteases). Os lisados foram primeiramente centrifugados a 3.000 x g por 2 min, a 4°C e depois a 10.000 x g por 10 min, a 4°C para eliminar os restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. A dosagem de proteínas foi determinada conforme metodologia descrita por Peterson (PETERSON, 1977). A seguir foram adicionados nas amostras o tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%).

4.4.6 Eletroforese e eletrotransferência

As proteínas (70 µg por poço) foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio/SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S.

4.4.7 Imunodeteção

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 hora e após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) incubadas overnight (4°C) com anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo BSA 2% nas diluições: 1:1000 (anti-fosfo-GluA1-Ser831, anti-fosfo-GluA1-Ser845, anti-total-GluA1, anti-fosfo-CaMKII, anti-total-CaMKII, anti-EAAT1, anti-EAAT2, anti-PP1ca e anti-GFAP) 1:2000 (anti-fosfo-PKA e anti-fosfo-PKC substratos, e anti-fosfo-ERK1/2), 1:5000 (anti-fosfo e total-JNK p54/46) 1:10000 (anti-fosfo e

total-p38^{MAPK}) e 1:40000 (anti-total-ERK1/2). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-rabbit ou mouse (ligado à peroxidase) e reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose, de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. O nível de fosforilação foi determinado pela razão entre a D.O da banda fosforilada e a D.O da banda total. O imunoconteúdo foi determinado pela razão entre a D.O da banda da proteína alvo e a D.O da banda da β -actina (CALLONI *et al.*, 2005; POSSER *et al.*, 2007). As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image®.

Devido à inexistência de grupo controle para as respectivas áreas cerebrais analisadas, a impossibilidade de usar tecido post-mortem (como grupo controle) em um estudo de vias de sinalização celular reguladas por fosforilação (ver figura 28) e visando minimizar os vieses interdias que possam ocorrer nas etapas do western blotting, foi criado uma amostra chamada de balizador (BLZ.). O balizador é constituído de um pool de três amostras de hipocampo de pacientes, homogeneizados da mesma forma que as amostras experimentais, entretanto esta mesma amostra foi aplicada em todas as eletroforeses realizadas. A D.O obtida para cada alvo na amostra balizador foi sempre considerada 100%, a partir daí, a D.O dos alvos em análise nas amostras experimentais presentes na eletroforese eram determinadas e relativizadas em porcentagem do balizador. Por exemplo, se a D.O para um determinado alvo na amostra balizador fosse 200 e a D.O do alvo na amostra experimental fosse 240, teríamos respectivamente os valores de 100 e 120% para o balizador e amostra experimental. Esta estratégia além de diminuir o erro experimental entre as análises, permite-nos fazer comparações e correlações entre os alvos analisados nas estruturas cerebrais.

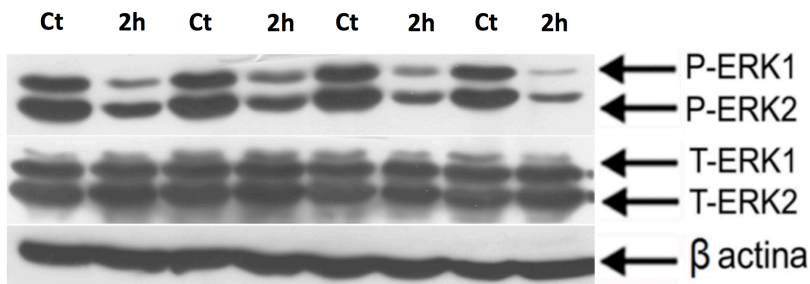


Figura 28. Fosforilação e expressão de ERK 1/2 no córtex cerebral de ratos jovens. As amostras referidas como controle (Ct) foram preparadas conforme protocolo padrão, sendo colocadas diretamente em nitrogênio líquido após o isolamento. As amostras referidas como (2h) foram isoladas do mesmo modo, porém mantidas durante 2 horas a temperatura de refrigeração (2-8°C) e em seguida colocadas em nitrogênio líquido. Após esta etapa, todas as amostras foram homogeneizadas e preparadas para a análise por Western blot seguindo o protocolo experimental padrão descrito anteriormente. O blot representativo mostra que as amostras de córtex cerebral mantidas durante 2 horas a temperatura de refrigeração tiveram uma diminuição drástica na fosforilação de ERK 1/2. Estes dados indicam que as amostras depois de isoladas devem ser imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, uma vez que parece ocorrer uma diminuição de fosforilação tempo-dependente. Esta análise inviabiliza o uso de tecido post-mortem para este tipo estudo, já que precisaríamos, no mínimo, de algumas horas para ter acesso e isolar as amostras cerebrais destes pacientes.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O nível de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 no neocórtex, amígdala e hipocampo dos pacientes com ELT que receberam ou não tratamento com dexametasona foram analisados pelo teste t de Student para amostras independentes. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. As variáveis neuroquímicas, clínicas, laboratoriais e neurocirúrgicas frente ao tratamento com dexametasona foram analisadas pelo teste t de Student ou teste exato de Fisher. Regressões lineares (uni e/ou multivariadas) foram utilizadas para investigar a associação independente entre o tratamento com dexametasona e os níveis de fosforilação dos sítios GluA1 na amígdala. O nível aceitável de significância para os testes foi de $p < 0,05$. Os testes foram realizados usando o pacote de software Statística 7.0 e o programa SPSS 17.

4.6 RESULTADOS

4.6.1 Western blot representativo dos alvos neuroquímicos analisados no neocórtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH

As figuras dos blottings apresentadas a seguir foram obtidas após análise neuroquímica realizada no neocórtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELT tratados cirurgicamente (n = 31). As imagens apresentadas foram escolhidas de forma aleatória, sendo representativas e ilustrativas, pois não correspondem diretamente aos grupos experimentais estudados neste capítulo (sem dexametasona, n = 11; com dexametasona n = 20). Esta aba de resultados tem como objetivo, mostrar através das imagens, a imunorreatividade dos anticorpos e a qualidade e reprodução da técnica nas amostras cerebrais de seres humanos (ver figuras 29 e 30).

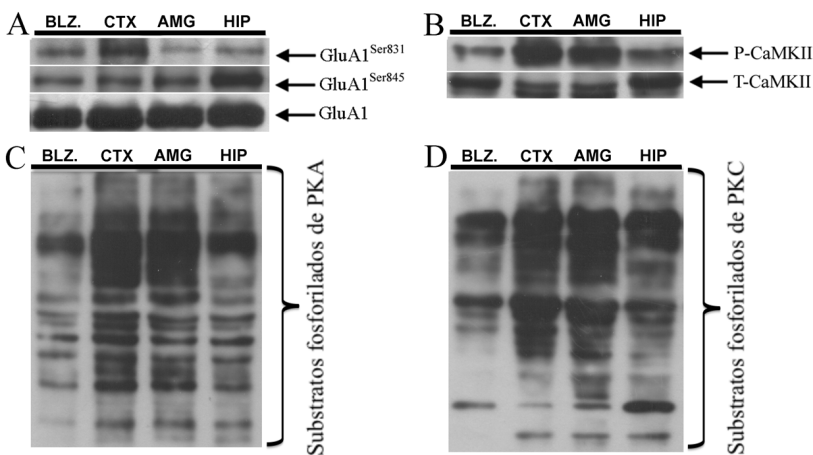


Figura 29. Western blot representativo da subunidade GluA1 do receptor AMPA (A) e das enzimas CaMKII (B), PKA (C), PKC e (D) no neocórtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELT tratados cirurgicamente. Abreviaturas: BLZ.; balizador.

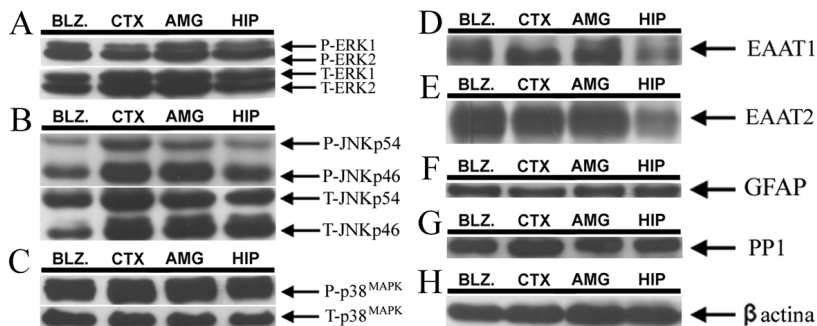


Figura 30. Western blot representativo das enzimas ERK, JNK e p38^{MAPK} (A-C) dos transportadores gliais de glutamato (D-E) e das proteínas GFAP (F), PP1 (G) e β actina (H) no neocórtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELT tratados cirurgicamente. Abreviaturas: BLZ.; balizador.

Conforme colocado anteriormente, o trabalho apresentado neste capítulo abordou 31 pacientes, 11 destes não receberam dexametasona e 20 receberam o corticoide como terapia antiinflamatória adjuvante. Foram analisadas três regiões cerebrais, porém os efeitos da administração de dexametasona sobre vias de sinalização intracelular foi investigada apenas na amígdala. Os resultados obtidos da avaliação do neocórtex e hipocampo e a relação com as variáveis demográficas, clínicas, eletrofisiológicas, neuroimagem estrutural, funcional, aspectos neuropsicológicos, psiquiátricos e resposta ao tratamento cirúrgico estão sendo analisados e serão apresentados em trabalhos posteriores.

Os resultados apresentados a seguir representam um manuscrito em fase de preparação para submissão a periódico da área, intitulado de **“High doses of dexamethasone decreases AMPA receptors phosphorylation levels in amygdala: a case control study with mesial temporal lobe epilepsy patients.”**

4.6.2 Efeitos da administração de dexametasona sobre vias de sinalização intracelular: um estudo realizado em pacientes com ELTM-EH

Os efeitos da administração de dexametasona sobre a fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 nas estruturas cerebrais dos pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente, são apresentados na tabela 5. Devido as múltiplas comparações (2 sítios de fosforilação de GluA1 em 3 estruturas cerebrais), situação que poderia aumentar a chance do erro tipo I, o nível "p" de significância para esta análise foi reduzido de $< 0,05$ a $< 0,0085$. Considerando os dois grupos experimentais ($n = 11$ e $n = 20$), o poder desta análise ($1 - \beta$) para encontrarmos uma diferença de 15% entre as médias de fosfo GluA1 entre os grupos que receberam ou não dexametasona foi de 90%.

Após a quantificação dos blottings realizados na amígdala (2 grupos experimentais: sem dexametasona, $n = 11$; com dexametasona $n = 20$), a análise estatística indicou uma diminuição da fosforilação do sítio GluA1-Ser831 ($20,9 \pm 2,8$ % $p = 0,0003$) nos pacientes que receberam dexametasona. A fosforilação do sítio GluA1-Ser845 não foi modulada na amígdala. No neocórtex a análise estatística indicou uma tendência de diminuição da fosforilação do sítio GluA1-Ser831 ($12,6 \pm 3,2$ % $p = 0,06$) e aumento na fosforilação do sítio GluA1-Ser845 ($14,2 \pm 3,6$ % $p = 0,02$) nos pacientes que receberam dexametasona. Por fim, a análise dos sítios de fosforilação no hipocampo revelaram uma tendência de diminuição da fosforilação do sítio GluA1-Ser831 ($12,7 \pm 4,0$ % $p = 0,10$), sem alterações na fosforilação do sítio GluA1-Ser845 (ver tabela 5).

Tabela 5. Níveis de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 no neocórtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELT tratados cirurgicamente, que receberam ou não dexametasona.

Variáveis	Todos os casos	Dexametasona		Valor de p
		Não (n = 11) média (E.P.M.)	Sim (n = 20) média (E.P.M.)	
NEOCÓRTEX				
P-GluA1-Ser831	118,6 (3,2)	126,9 (6,3)	114,3 (3,2)	0,06
P-GluA1-Ser845	112,4 (3,0)	103,1 (4,1)	117,3 (3,6)	0,02
AMÍGDALA				
P-GluA1-Ser831	109,3 (3,0)	122,8 (4,6)	101,9 (2,8)	0,0003***
P-GluA1-Ser845	108,1 (3,3)	108,2 (6,0)	108,0 (4,1)	0,98
HIPOCAMPO				
P-GluA1-Ser831	97,0 (3,7)	105,2 (7,2)	92,5 (4,0)	0,10
P-GluA1-Ser845	104,2 (3,6)	100,5 (7,8)	106,3 (3,7)	0,46

Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um n = 11 e n = 20. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. *** p < 0,001.

Considerando que o tratamento com dexametasona provocou uma diminuição significativa na fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala ($20,9 \pm 2,8$ % p = 0,0003) buscamos investigar a existência de uma relação dose-efeito entre estas variáveis. A figura 31 mostra um efeito dose-dependente do tratamento com dexametasona sobre os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala dos pacientes com ELT tratados cirurgicamente (r = 0,69; r² = 0,48; b = -145,6; p = 0,0002). Todas as regressões lineares foram realizadas baseando-se no trabalho de Ben e colaboradores (2013) (BEN *et al.*, 2013).

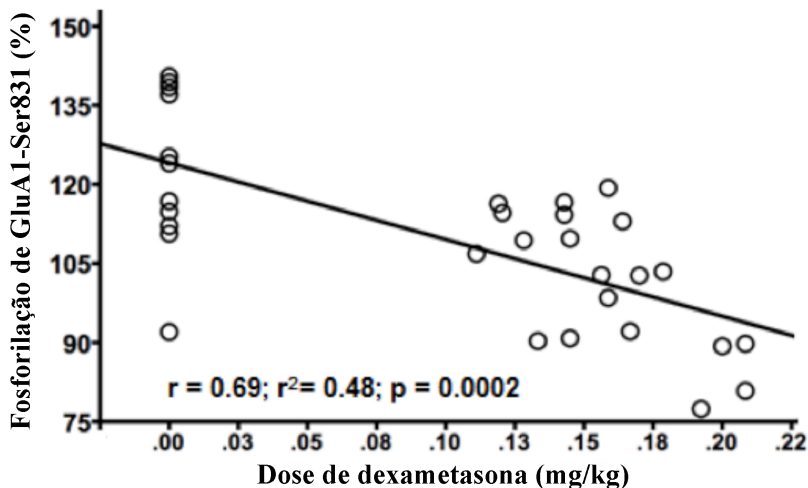


Figura 31. Regressão linear simples indicando a existência de uma relação dose-efeito, (dexametasona vs fosforilação de GluA1-Ser831) na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente. $r = 0,69$; $r^2 = 0,48$; $b = -145,6$; $p = 0,0002$.

Uma vez que a distribuição dos dados do gráfico anterior não é normal (devido a presença dos 10 pacientes que não receberam dexametasona) uma nova regressão linear foi realizada apenas com os pacientes que receberam o fármaco ($n = 21$). O grupo de pacientes que recebeu dexametasona (10 mg, i.v.) teve uma variação de peso corporal entre 48 e 90 kg, com média de $65,1 \pm 2,8$ kg; as doses de dexametasona variaram entre 0,11 e 0,21 mg/kg, com dose média de $0,15 \pm 0,006$ mg/kg. Esta nova análise confirma o efeito dose-dependente da dexametasona sobre a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala ($r = 0,66$; $r^2 = 0,43$; $b = -284,6$; $p = 0,002$, figura 32). Os dados obtidos da regressão linear, indicam que o tratamento com dexametasona pode explicar 43% da variação de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala, onde a cada 0,01 mg/kg de dexametasona administrada a fosforilação de GluA1-Ser831 diminui 2,84% (ver figura 32).

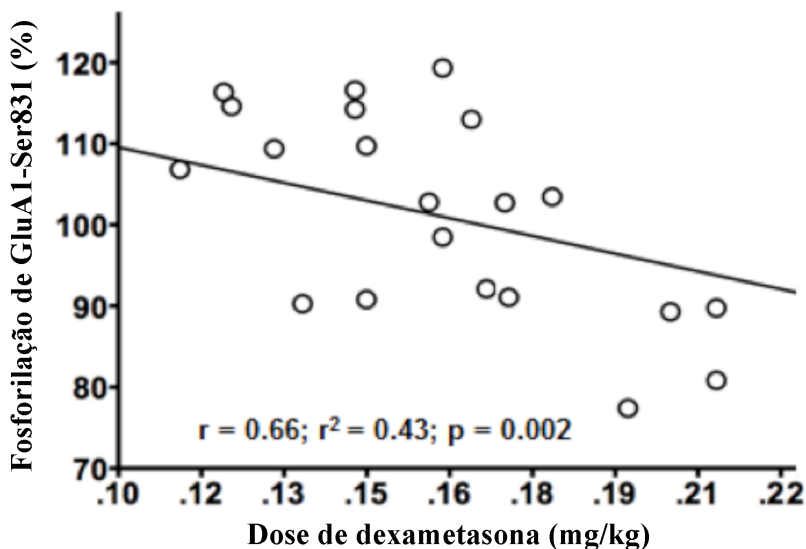


Figura 32. Regressão linear simples indicando a existência de uma relação dose-efeito, (dexametasona vs fosforilação de GluA1-Ser831) na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente que receberam o corticoide como terapia antiinflamatória adjuvante. $r = 0,66$; $r^2 = 0,43$; $b = -145,6$; $p = 0,002$.

Depois de confirmado o efeito dose-dependente da dexametasona sobre o sítio GluA1-Ser831 na amígdala decidimos investigar se este resultado não poderia ser oriundo da associação com outras variáveis até então não controladas, uma vez que o estudo foi realizado em pacientes. Dessa forma, variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas e cirúrgicas, foram controladas nos grupos tratados ou não com dexametasona. A tabela 6 ilustra resumidamente a correlação entre estas variáveis.

Tabela 6. Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas e cirúrgicas de pacientes com ELT tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona.

Variáveis	Todos os casos n = 31 (%)	Dexametasona		Valor de p
		Não (n = 11)	Sim (n = 20)	
Sexo				
Feminino	18 (58,1)	4 (36,4)	14 (70,0)	0,13
Masculino	13 (41,9)	7 (63,6)	6 (30,0)	
Raça				
Caucasiano	27 (87,1)	9 (81,8)	18 (90,0)	0,60
Outras	04 (12,9)	2 (17,2)	2 (10,0)	
Estado civil				
Solteiro	17 (54,8)	8 (72,7)	9 (45,0)	0,33
Casado	10 (32,3)	2 (18,2)	8 (40,0)	
Divorciado ou viúvo	4 (12,9)	1 (9,1)	3 (15,0)	
Atividade de trabalho atual				
Trabalhando	11 (35,5)	4 (36,4)	7 (35,0)	0,26
Seguro saúde	4 (12,9)	7 (63,6)	9 (45,0)	
Afastado	16 (51,6)	0	4 (20,0)	
Histórico de IPI ^a				
Não	7 (22,6)	3 (27,3)	4 (20,0)	0,68
Sim	24 (77,4)	8 (72,7)	16 (80,0)	
Histórico familiar de epilepsia				
Não	12 (38,6)	4 (36,3)	8 (40,0)	0,41
Segundo grau ou distante	10 (32,3)	2 (18,2)	8 (40,0)	
Primeiro grau	6 (19,4)	3 (27,3)	3 (15,0)	
Desconhecido	3 (9,7)	2 (18,2)	1 (5,0)	
Lado da lesão				
Direito	16 (51,6)	4 (36,4)	12 (60,0)	0,27
Esquerdo	15 (48,4)	7 (63,6)	8 (40,0)	
Tratamento com DAEs ^b				
Monoterapia	9 (29,0)	6 (54,5)	3 (15,0)	

Duas DAEs ou mais	22 (71,0)	5 (45,5)	17 (85,0)	0,04*
Benzodiazepínicos				
Sim	15 (48,4)	7 (63,6)	9 (45,0)	
Não	16 (51,6)	4 (36,4)	11 (55,0)	0,46
DAEs^b				
CBZ				
Não	6 (19,4)	4 (36,4)	2 (10,0)	
Sim	25 (80,6)	7 (63,6)	18 (90,0)	0,16
PNB				
Não	19 (61,3)	9 (81,8)	10 (50,0)	
Sim	12 (38,7)	2 (18,2)	10 (50,0)	0,13
DPH				
Não	28 (90,3)	11 (100,0)	17 (85,0)	
Sim	03 (9,7)	0	03 (15,0)	0,54
VA				
Não	29 (93,5)	9 (81,8)	18 (90,0)	
Sim	2 (6,5)	2 (18,2)	2 (10,0)	0,60
LMT				
Não	27 (87,1)	9 (81,8)	18 (90,0)	
Sim	4 (12,9)	2 (18,2)	2 (10,0)	0,60
TPM				
Não	29 (93,5)	11 (100,0)	18 (90,0)	
Sim	2 (6,5)	0	2 (10,0)	0,53
Dominância manual				
Destro	27 (87,1)	9 (81,8)	18 (90,0)	
Canhoto	4 (12,9)	2 (18,2)	2 (10,0)	0,60
Comorbidades psiquiátricas				
Sem diagnóstico	14 (45,2)	4 (36,3)	10 (50,0)	
Depressão	8 (25,8)	2 (18,2)	6 (30,0)	
Ansiedade ^c	3 (9,7)	2 (18,2)	1 (5,0)	
Outras condições psiquiátricas ^d	6 (19,3)	3 (27,3)	3 (15,0)	0,48

	Média (S.E.M)			
Idade (anos)	36,4 (2,2)	34,6 (3,8)	37,3 (2,7)	0,57
Anos de escolaridade	6,6 (0,5)	6,0 (1,0)	6,9 (0,6)	0,43
Duração da doença (anos)	24,3 (2,0)	25,8 (3,1)	23,5 (2,6)	0,60
Frequência mensal das crises	9,4 (1,6)	5,0 (0,8)	11,6 (2,3)	0,05
QOLIE-31^e	35,2 (2,7)	38,2 (3,8)	33,5 (3,7)	0,43
Parâmetros hemodinâmicos				
PAM	67,5 (1,7)	64,0 (3,0)	68,8 (2,1)	0,30
Frequência cardíaca	73,7 (2,2)	70,0 (4,1)	75,0 (2,7)	0,30
Frequência respiratória	11,6 (0,3)	11,7 (0,5)	11,5 (0,4)	0,88
Análise sanguínea				
pH	7,41 (0,07)	7,41 (0,01)	7,42 (0,01)	0,66
PCO ₂	28,9 (0,8)	29,6 (1,5)	28,1 (0,9)	0,35
HCO ₃	20,0 (0,3)	20,7 (0,6)	19,6 (0,3)	0,20
PO ₂	229,0 (11,0)	214,6 (25,1)	237,8 (10,3)	0,32
Saturação de O ₂	99,7 (0,04)	99,6 (0,08)	99,7 (0,05)	0,90
Hematócrito	35,0 (0,7)	33,9 (1,4)	35,6 (0,8)	0,27
Hemoglobina	12,5 (0,9)	14,9 (2,9)	11,7 (0,3)	0,26
Glicose	116,3 (4,9)	103,4 (6,4)	121 (6,0)	0,10
Sódio	138,2 (3,9)	136,9 (1,2)	139 (1,7)	0,20
Potássio	4,1 (0,1)	4,2 (0,2)	4,1 (0,1)	0,63
Cálcio iônico	4,2 (0,1)	4,1 (0,1)	4,2 (0,2)	0,95
Magnésio	0,4 (0,08)	0,4 (0,02)	0,5 (0,01)	0,15
Ácido láctico	2,1 (0,2)	1,7 (0,3)	2,3 (0,3)	0,22
Armazenamento das amostras (meses)^f	24,0 (1,5)	28,2 (2,9)	21,5 (1,7)	0,05
Tempo desde a última crise (horas)^g	225 (82)	200 (63)	239 (122)	0,82
Tempo para retirada do CTX (min.)^h	188,3 (7,1)	184,8 (10,3)	190,0 (9,7)	0,71
Tempo retirada da AMG/HIP (min.)ⁱ	260,1 (10,0)	254,6 (16,9)	262,8 (12,8)	0,78
Tempo de manipulação do HIP (min.)^j	11,2 (0,9)	11,7 (1,3)	11,1 (1,2)	0,70

Análise estatística foi feita utilizando o teste exato de Fisher e o test t de Student; * p < 0,05.

^a IPI: insulto precipitante inicial;

^b DAES: CBZ: carbamazepina, PNB: fenobarbital, DPH: difenilhidantoina, VA: ácido valpróico, LMT: lamotrigina, TPM: topiramato;

^c Transtornos de ansiedade: ansiedade generalizada (2 no grupo não-dexa), fobia social (1 no grupo dexa);

^d Outros distúrbios psiquiátricos incluíram: transtorno disfórico, psicose pós-ictal, ansiedade pós-ictal;

^e QOLIE-31: Sigla em inglês “Quality of Life in Epilepsy Inventory-31”, significa Inventário de qualidade de vida em epilepsia.

^f Tempo de armazenamento entre a obtenção das amostras e a análise neuroquímica;

^g Tempo desde a última crise e a obtenção do tecido cerebral;

^h Tempo entre a indução da anestesia e a retirada do CTX;

ⁱ Tempo entre a indução da anestesia e a retirada da AMG/HIP;

^j Tempo entre o início da termocoagulação dos vasos do hipocampo e a completa ressecção do tecido.

As análises apresentadas na tabela 6 indicaram uma possível diferença entre os pacientes que receberam ou não tratamento com dexametasona para as seguintes variáveis: sexo ($p = 0,13$), regime do uso das DAEs ($p = 0,04$), uso de PNB ($p = 0,13$), frequência mensal das crises ($p = 0,05$), níveis séricos de glicose (transoperatório) ($p = 0,10$) e tempo de armazenamento das amostras ($p = 0,05$). Considerando estes dados criamos um modelo para investigar a correlação entre estas variáveis e os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831. A tabela 7 ilustra os resultados desta análise, onde somente as variáveis sexo, os níveis séricos de glicose e o tratamento com dexametasona apresentaram uma associação com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala.

Tabela 7. Modelo para avaliar a associação de variáveis com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala de pacientes tratados cirurgicamente.

Variáveis	P-GluA1-Ser831 na AMG média (E.P.M.)			Valor de p
Sexo				
Feminino	103 (3,6)			0,02* ^a
Masculino	117,4 (4,5)			
Tratamento com DAEs				
Monoterapia	114 (5,0)			0,51 ^a
Duas DAEs ou mais	109 (3,9)			
DAEs - PNB				
Não	111,7 (3,8)			0,32 ^a
Sim	105,4 (4,9)			
	Coeficientes da regressão linear			
	b	(r)	r ²	
Frequência mensal das crises	- 0,26	0,15	0,02	0,44 ^b
Níveis séricos de glicose	- 0,19	0,32	0,10	0,12 ^b
Tempo de armazenamento amostras	0,36	0,19	0,04	0,30 ^b
Dose de dexametasona (mg/kg)	- 145,6	0,69	0,48	0,00002*** ^b

Associação avaliada utilizando teste t de Student^a ou regressão linear^b. * p < 0,05, *** p < 0,001.

Como modelo final criamos uma regressão linear múltipla com as variáveis, sexo, níveis séricos de glicose e tratamento com dexametasona. Após a análise multivariada apenas o tratamento com dexametasona permaneceu associado de forma independente com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala ($r = 0,73$; $r^2 = 0,47$; $b = - 131,1$; $p = 0,001$, tabela 8). Estes resultados reforçam a análise e ideia anterior que já indicava uma alta correlação entre as variáveis: dose de dexametasona vs fosforilação de GluA1-Ser831. Por fim, podemos sugerir que este achado (efeito dose-dependente da dexametasona sobre a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala) não parece estar relacionado a vieses de confusão, uma vez que as variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas e cirúrgicas, foram controladas nos grupos tratados ou não com dexametasona.

Tabela 8. Modelo para avaliar a associação independente de variáveis com os níveis de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala de pacientes tratados cirurgicamente.

Variáveis	b	Valor de p
Constante da regressão linear	134,8	< 0,0001
Sexo	-0,90	0,85
Níveis séricos de glicose	- 0,10	0,33
Dose de dexametasona (mg/kg)	- 131,1	< 0,0001***

Associação avaliada utilizando regressão linear. $r = 0,73$; $r^2 = 0,47$; $b = - 131,1$; $p = 0,001$; *** $p < 0,001$.

Considerando a plausibilidade biológica de interação e os mecanismos regulatórios que envolvem a modulação por fosforilação do sítio GluA1-Ser831 decidimos investigar se o tratamento com dexametasona além de diminuir a fosforilação do sítio não poderia estar modulando enzimas regulatórias chave (cinases, fosfatases entre outros alvos), que direta ou indiretamente podem contribuir para o balanço final dos níveis de GluA1-Ser831 fosforilado. A tabela 9 indica os alvos moleculares modulados pelo tratamento com dexametasona nos pacientes com ELT tratados cirurgicamente.

Tabela 9. Níveis de fosforilação (PKA, PKC, CaMKII, ERK, JNK, p38^{MAPK}) e expressão (GluA1, EAATs, GFAP, PP1) de alvos moleculares analisados na amígdala de pacientes com ELT tratados cirurgicamente, que receberam ou não dexametasona.

Alvos analisados	Dexametasona		Valor de p
	Não (n = 11) média (E.P.M.)	Sim (n = 20) média (E.P.M.)	
AMÍGDALA			
GluA1	96,8 (3,8)	97,8 (2,8)	0,83
P-PKA	120,9 (5,8)	125,1 (6,5)	0,67
P-PKC	122,6 (5,5)	119,9 (5,5)	0,51
P-CaMKII	127,6 (9,9)	105,2 (3,7)	0,02*
P-ERK1	98,6 (5,1)	91,6 (3,9)	0,29
P-ERK2	96,6 (2,4)	98,8 (3,4)	0,87
P-JNKp46	99,8 (3,6)	100,4 (4,2)	0,93
P-JNKp54	100,68 (4,4)	99,5 (95,5)	0,89
P-p38^{MAPK}	102,8 (2,8)	105,3 (2,3)	0,52
EAAT1	98,1 (6,4)	94,1 (5,4)	0,65
EAAT2	90,2 (4,3)	95,5 (3,5)	0,36
GFAP	110,7 (4,0)	106,8 (1,9)	0,35
PP1ca	94,6 (2,8)	94,8 (2,0)	0,82

Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivado de um n = 11 e n = 20. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. * p < 0,05.

Dentre os alvos analisados que poderiam modular diretamente a fosforilação do sítio GluA1-Ser831, seja de forma positiva (PKC e CaMKII) ou negativa (PP1), apenas a ativação da enzima CaMKII foi alterada frente ao tratamento com dexametasona. Classicamente acoplada a fosforilação do sítio GluA1-Ser831, a fosforilação/ativação de CaMKII foi diminuída ($22,4 \pm 3,7$ %, p = 0,02). A queda na ativação da enzima CaMKII poderia estar relacionada com a diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser831. Foram avaliados também alvos que poderiam exercer efeitos regulatórios indiretos sobre a fosforilação do sítio GluA-Ser831 (ARAKI *et al.*, 2015), no entanto nenhuma das MAPKs ou transportadores gliais de glutamato (EAATs) foram modulados a nível de fosforilação e/ou expressão frente ao tratamento com dexametasona.

4.7 DISCUSSÃO

No presente capítulo foi avaliado o perfil de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GuA1-Ser845, das enzimas PKA, PKC, CaMKII, ERK 1/2, JNK p54/46 e p38^{MAPK}, bem como o imunocontéudo das proteínas EAAT1, EAAT2, PP1 e GFAP, todos analisados no neocortex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente. Considerando a administração de dexametasona, investigamos o efeito deste fármaco sobre estas vias de sinalização intracelular na amígdala dos pacientes fármaco resistentes.

Apesar da busca incessante por uma terapia farmacológica eficaz para a epilepsia, 20-30% dos pacientes são refratários (COSTA, 2002; BELEZA, 2009). Se for considerado as alternativas terapêuticas existentes, o tratamento cirúrgico é de longe a melhor opção para os casos de epilepsia fármaco resistente (VAN OIJEN *et al.*, 2006). A lobectomia temporal anterior-mesial é o tipo de cirurgia de epilepsia mais realizado em todo o mundo. O procedimento consiste essencialmente na ressecção limitada da porção anterior e neocortical do lobo temporal e a ressecção mais extensa das estruturas temporais mesiais (amígdala, hipocampo e giro parahipocampal) (WIEBE *et al.*, 2001).

A amígdala é uma pequena, mas importante região cerebral que faz parte do sistema límbico e está envolvida na produção de uma resposta ao medo e outras emoções negativas. Esta região é fundamental para a autopreservação da espécie por ser o centro identificador do perigo, gerando medo e ansiedade e colocando o animal em situação de alerta, aprontando-se para se evadir ou lutar. Ela se interconecta com o hipocampo, os núcleos septais, a área pré-frontal e o núcleo dorso-medial do tálamo. Essas conexões garantem seu importante desempenho na mediação e controle das atividades emocionais de ordem maior, como amizade, amor e afeição, nas exteriorizações do humor e, principalmente, nos estados de medo e ira e na agressividade. A amígdala é quem processa a informação sensorial em termos de memória emocional (SALZMAN e FUSI, 2010; FERNANDO, MURRAY e MILTON, 2013; DE ALMEIDA, CABRAL e NARVAES, 2015).

A sensação de medo iniciada por uma ameaça ambiental, por exemplo, desencadeia uma série de mecanismos de resposta ao estresse, um estado de alarme que promove uma série de alterações autonômicas e endócrinas fundamentais para autopreservação. A resposta ao estresse inclui a liberação de glicocorticoides sintetizados no córtex da adrenal e

catecolaminas a partir da medula da adrenal e nervos simpáticos. Esses hormônios do estresse, por sua vez, fornecem “feedback” para o cérebro e agem sobre estruturas neurais que controlam a emoção e cognição, alterando propriedades morfológicas e eletrofisiológicas de neurônios em áreas do cérebro que são cruciais para os processos de medo condicionado, incluindo a amígdala, hipocampo e o córtex pré-frontal (RODRIGUES, LEDOUX e SAPOLSKY, 2009).

Os glicocorticoides são uma classe de hormônios esteroides caracterizada pela habilidade de se ligar com o receptor de cortisol e desencadear efeitos similares (STAHN *et al.*, 2007). O cortisol é o principal glicocorticoide endógeno, a concentração presente no sangue sofre variação nas várias fases do dia (ritmo circadiano), com níveis mais altos pela manhã e níveis mais baixos à noite, após várias horas do início do sono. Estima-se que a produção diária de cortisol seja em torno de 12-15 mg/dia (ESTEBAN e YERGEY, 1990). Considerado um hormônio essencial para a vida, o cortisol regula funções cardiovasculares, metabólicas, imunológicas e homeostáticas (STAHN *et al.*, 2007). É importante salientar que mesmo em concentrações elevadas durante a resposta inflamatória ou em situações de estresse, os níveis dos hormônios endógenos não alcançam os valores plasmáticos encontrados na terapia farmacológica, o que pode levar a mecanismos moleculares de ação distintos entre os hormônios secretados e os sintéticos.

A maioria dos efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides é desencadeada pela ação genômica. Eles atravessam facilmente a membrana plasmática devido a sua estrutura lipofílica, ligando-se a receptores citoplasmáticos. Este complexo é translocado para o núcleo, onde se liga a sequências específicas do DNA denominadas GREs (glucocorticoid-responsive elements). A ligação do hormônio resulta na indução de síntese de proteínas antiinflamatórias (IL-10, anexina A-1 e IκB) (ALMAWI e MELEMEDJIAN, 2002; SCHACKE, DOCKE e ASADULLAH, 2002; STAHN *et al.*, 2007). Entretanto, alguns dos efeitos dos glicocorticoides são observados após um curto período de tempo e não poderiam ser explicados pelos mecanismos genômicos. Tem sido proposto três mecanismos de ação não genômicos: 1) interações não específicas dos glicocorticoides com membranas celulares; 2) efeitos não genômicos mediados pelo receptor citoplasmático e 3) interações específicas com receptores de membrana (LOWENBERG *et al.*, 2008; BOLDIZSAR *et al.*, 2010).

Os mecanismos moleculares da ação dos glicocorticoides ainda não estão completamente esclarecidos, porém sabe-se que a

concentração do hormônio na célula alvo é um fator determinante para o seu sítio de ação. Dentro da classe dos glicocorticoides a dexametasona é um dos antiinflamatórios mais utilizados na clínica. Os corticoides sintéticos são mais potentes que o cortisol endógeno, exceto a hidrocortisona que apresenta potência semelhante. Estima-se que a dexametasona seja 25 vezes mais potente que o cortisol (MEIKLE e TYLER, 1977). Considerando que um grupo de pacientes com ELTM-EH recebeu 10 mg de dexametasona como terapia antiinflamatória adjuvante, e que a sua potência é 25 vezes maior (comparada a potência do cortisol), no momento da cirurgia estes pacientes apresentavam concentrações séricas de corticoide 20 vezes superior a produção diária. Estes altos níveis de dexametasona, associado a níveis de cortisol matinal e o estresse causado pelo medo do processo cirúrgico, podem exercer efeitos regulatórios sobre áreas cerebrais relacionadas a emoções negativas, como no caso a amígdala.

A administração de dexametasona provocou uma diminuição significativa na fosforilação do sítio GluA1-Ser831 na amígdala dos pacientes tratados cirurgicamente. Este efeito foi dose-dependente, sendo que a cada 0,01 mg/kg de dexametasona administrada a fosforilação de GluA1-Ser831 diminuiu 2,84%. Em contraste, a fosforilação do sítio GluA1-Ser845 não foi alterada pela dexametasona. Este efeito sobre a fosforilação do sítio GluA1-Ser831 não está relacionado a variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas e cirúrgicas, uma vez que todas estas condições foram controladas nos pacientes tratados ou não com dexametasona.

Os níveis de fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 do receptor AMPA são modulados pela atividade de enzimas cinases e fosfatases. Esse processo de fosforilação sítio específico parece ser importante para indução/manutenção da potenciação de longa duração (LTP) e o próprio aprendizado e memória. Por outro lado, a defosforilação individual ou combinada desses resíduos, por PP1 e PP2B parece ser importante para endocitose do receptor e estabelecimento de depotenciação sináptica (LTD) (KANNO *et al.*; DIN *et al.*, 2010; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011). Dentre as moléculas que poderiam modular diretamente a fosforilação do sítio GluA1-Ser831, seja de forma positiva (PKC e CaMKII) ou negativa (PP1), apenas a ativação da enzima CaMKII foi alterada frente ao tratamento com dexametasona. Paralelo a queda de fosforilação do sítio GluA1-Ser831, o tratamento com dexametasona diminuiu a fosforilação/ativação de CaMKII. Esta queda na ativação da enzima CaMKII poderia explicar a diminuição de fosforilação do sítio GluA1-

Ser831. Foram avaliados também alvos que poderiam exercer efeitos regulatórios indiretos sobre a fosforilação do sítio GluA-Ser831 (ARAKI *et al.*, 2015), no entanto nenhuma das MAPKs ou transportadores glias de glutamato (EAATs) foram modulados a nível de fosforilação e/ou expressão frente ao tratamento com dexametasona.

Os mecanismos regulatórios e as implicações das alterações neuroquímicas provocadas pela dexametasona são complexas e devem ser investigadas. Sabe-se que o estresse agudo provocado por altos níveis de dexametasona aumenta a inserção de receptores AMPA no espaço sináptico no hipocampo (WHITEHEAD *et al.*, 2013). Além disso, o tratamento com dexametasona provoca alterações na composição e função do receptor NMDA no hipocampo. Estas modificações parecem estar relacionadas a déficits na plasticidade sináptica hipocampal e aprendizagem espacial (KAMPHUIS *et al.*, 2003). Contudo, os efeitos da dexametasona sobre GluA1 na amígdala nunca foram investigados.

Nossos resultados indicaram que a queda de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 e CaMKII na amígdala não foi acompanhada por alterações no imunocontéudo da subunidade catalítica da proteína fosfatase 1 (PP1ca). No entanto, não podemos descartar possíveis alterações na atividade de PP1, além disso, outras proteínas fosfatases tais como a proteína fosfatase 2A (PP2A) e 2B (calcineurina (CAN)) também podem defosforilar GluA1 e CaMKII e não foram analisadas neste trabalho (BANKE *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011). Esta hipótese (ativação de fosfatases) pode ser sustentada por um estudo realizado em cultura celular (cardiomiócitos), onde o tratamento com dexametasona foi capaz de aumentar o imunocontéudo de calcineurina (SANGEETHA, LAKSHMI e NIRANJALI DEVARAJ, 2015). Além disso, existem evidências que os níveis de cálcio intracelular podem ser modulados frente ao tratamento com corticoides (TAKAHASHI *et al.*, 2002), tal alteração poderia influenciar tanto na atividade de calcineurina como CaMKII, refletindo possivelmente alguns dos mecanismos moleculares da dexametasona. Como balanço final, os mecanismos de potenciação sináptica poderiam estar sendo alterados na amígdala dos pacientes que receberam dexametasona, hipótese respaldada pela queda de fosforilação de CaMKII e GluA1-Ser831.

4.8 CONCLUSÃO

Em conclusão, o trabalho demonstrou pela primeira vez os efeitos da dexametasona sobre a fosforilação da subunidade GluA1 do receptor AMPA na amígdala de pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente. Uma simples dose de dexametasona causou uma diminuição na fosforilação do sítio GluA1-Ser831 e da enzima CaMKII. Esta diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 parece ser proveniente da queda de ativação de CaMKII, uma vez que ambas são downreguladas pela dexametasona na amígdala. Como mecanismo secundário pode-se sugerir a participação e ativação de enzimas fosfatases nesta circuitaria molecular, indicando possivelmente alguns dos efeitos rápidos deste corticoide. Por fim, nossos achados contribuem para o entendimento dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na resposta ao estresse induzido pela dexametasona na amígdala de pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente.

Como capítulo final desta tese, apresento os resultados obtidos durante estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior, realizado entre agosto de 2014 e fevereiro de 2015. O trabalho foi realizado no Departamento de Farmacologia Molecular do Albert Einstein College of Medicine em New York, supervisionado pelo professor Dr. Lloyd D. Fricker.

5 CAPÍTULO IV: CARBOXIPEPTIDASE A6 E MOLÉCULAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR PTZ E PILOCARPINA EM ZEBRAFISH

5.1 ZEBRAFISH

O zebrafish (*Danio rerio*), conhecido popularmente por peixe-zebra ou “paulistinha”, é um teleósteo de 2-4 cm pertencente à família Cyprinidae, o qual foi utilizado pela primeira vez para pesquisas científicas por George Streisinger no Instituto de Tecnologia da Califórnia (EUA) (GRUNWALD e EISEN, 2002). Devido ao seu ovo ser translúcido e possuir um rápido desenvolvimento (2 meses), adquiriu grande aplicabilidade para estudos relacionados à biologia do desenvolvimento e embriogênese (LELE e KRONE, 1996; STERN e ZON, 2003). Além disso, o pequeno espaço requerido para a manutenção, o baixo custo e a praticidade para triagens em larga escala são outras características que tornaram esta espécie extremamente atrativa quando comparado a outros modelos animais (LIESCHKE e CURRIE, 2007).

Na última década houve um progresso considerável no estudo da genética e da genômica do zebrafish. Em 2001, o Instituto Sanger começou o sequenciamento do genoma dessa espécie e a identificação de regiões codificadoras (VOGEL, 2000; STERN e ZON, 2003). O zebrafish possui diversos genes evolutivamente conservados e apresenta um alto grau de homologia em torno de 70% com genes de mamíferos (BARBAZUK *et al.*, 2000; LIESCHKE e CURRIE, 2007).

Desde os anos 60 e principalmente nas últimas décadas, o zebrafish tem franca expansão nas áreas da bioquímica (TAYLOR *et al.*, 2004; RICO *et al.*, 2011), neurociências (EDWARDS e MICHEL, 2002), farmacologia (GOLDSMITH, 2004) e da biologia do comportamento (EGAN *et al.*, 2009; BLASER e ROSEMBERG, 2012; ROSEMBERG *et al.*, 2012). Por apresentar pequeno tamanho e fácil absorção de compostos diluídos em água, a quantidade em gramas das moléculas teste passa a ser uma fração reduzida daquela necessária para roedores (GOLDSMITH, 2004). Isto facilita e reduz custos dos processos de triagem em larga escala de possíveis compostos com ação terapêutica (STERN e ZON, 2003; RICO *et al.*, 2011).

A necessidade do desenvolvimento de novas DAEs que venham a diminuir a porcentagem de pacientes epiléticos refratários demanda um desafio na triagem de novos compostos anticonvulsivos. Isto reforça a

necessidade do desenvolvimento de novos modelos animais de crises convulsivas e epilepsia (LOSCHER, 2011). Como os modelos de roedores apresentam um alto custo de manutenção e difícil manipulação genética, outros organismos emergem como alternativas úteis para a triagem inicial de fármacos ou mutações genéticas relacionadas a epilepsia (BERGHMANS *et al.*, 2007). Apesar de nos últimos anos os invertebrados (*Caenorhabditis elegans* e a *Drosophila melanogaster*) fornecerem achados sobre epilepsia, a ausência de um sistema nervoso complexo limita sua aplicabilidade (BARABAN, 2007). Desta forma, o zebrafish apresenta um grande potencial como modelo animal para o estudo da epilepsia. Além de ser um vertebrado, apresenta homologia fisiológica e similaridade dos constituintes da barreira hematoencefálica ao comparar-se com humanos (BARBAZUK *et al.*, 2000; JEONG *et al.*, 2008; RICO *et al.*, 2010; ELICEIRI, GONZALEZ e BAIRD, 2011).

5.1.1 Zebrafish: ferramenta para o estudo de crises convulsivas

O ano de 2005 marca o início da aplicação deste modelo animal nos estudos envolvendo crises epilépticas. Baraban e colaboradores (2005) publicaram um trabalho pioneiro no qual submeteram larvas de zebrafish a diferentes concentrações de pentilenotetrazol. O resultado foi visto como uma manifestação convulsiva tônico-clônica. Além disso, os autores observaram também uma atividade eletroencefalográfica epileptiforme no SNC das larvas, bem como o aumento na expressão de sinalizadores de atividade neuronal (c-Fos) (BARABAN *et al.*, 2005). Após este estudo, Berghmans e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez, a aplicabilidade deste modelo na triagem de compostos anticonvulsivos. Utilizando os critérios para observação das crises convulsivas descritos por Baraban (2005), e placas de 96 poços, colocaram uma larva de zebrafish por poço, adicionando pentilenotetrazol (PTZ), ou PTZ + o composto a ser testado, realizando assim uma vasta triagem de compostos classicamente aplicados em humanos. Tão importante quanto à aplicabilidade do modelo foram os achados frente às respostas a DAEs clássicas (BERGHMANS *et al.*, 2007). O modelo de roedor induzido por PTZ responde limitadamente a DAEs que atuam via sistema GABAérgico (LOSCHER, 1984). Contudo neste estudo, além desta mesma resposta vista no modelo de roedor, fármacos que atuam por outras vias, como por exemplo, a glutamatérgica, também apresentaram resposta anticonvulsiva (BERGHMANS *et al.*, 2007). Este achado indica que podemos realizar

uma ampla triagem farmacológica com um único modelo de crises convulsivas, diferentemente do observado em roedores.

5.1.1.1 Pentilenotetrazol (PTZ)

O pentilenotetrazol é um agente convulsivo capaz de gerar tanto crises agudas, quanto crônicas (método do abrasamento) (TAKECHI *et al.*, 2012). É um dos compostos mais utilizado nos últimos 60 anos com o propósito de desenvolvimento de DAEs (LOSCHER, 2011). Após uma administração subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.) de PTZ em roedores, os animais apresentam crises convulsivas do tipo tônico-clônica com duração de aproximadamente 5 min (BRITO *et al.*, 2006). Recentemente este composto também vem sendo utilizado para mimetizar crises convulsivas em zebrafish (BARABAN *et al.*, 2005). A ação convulsiva do PTZ deve-se principalmente ao seu antagonismo não competitivo sobre os receptores GABA-A, diminuindo assim a ação inibitória do GABA no SNC (RAMANJANEYULU e TICKU, 1984).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC (ROWLEY *et al.*, 2012). Ao ser liberado pelo neurônio pré-sináptico, este neurotransmissor atua em receptores ionotrópicos (GABA-A e GABA-C) (LAURIE, WIDEN e SEEBURG, 1992; PERFILOVA e TIURENKOV, 2011) ou metabotrópicos (GABA-B) (BOWERY, 1997), localizados tanto na pré-sinapse, quanto na pós-sinapse. Ao ligar-se no receptor GABA-A na pós-sinapse, o GABA promove a abertura do canal iônico, permitindo o influxo de íons Cl^- e o efluxo de íons K^+ do neurônio alvo, resultando na hiperpolarização do mesmo (SIEGHART e SPERK, 2002). À medida que o PTZ chega ao SNC, ele se liga aos receptores GABA-A impedindo a ação do neurotransmissor, consequentemente bloqueando o influxo de íons Cl^- e o efluxo de íons K^+ da célula neuronal (RAMANJANEYULU e TICKU, 1984). Devido a sua ação antagonista sobre os receptores GABA-A, o PTZ provoca um desequilíbrio no balanço excitação/inibição no SNC, resultando na hiperexcitabilidade neuronal e gerando uma crise epiléptica generalizada (FERANDO e MODY, 2012).

5.1.1.2 Pilocarpina

Como já descrito no capítulos I e II, o modelo da pilocarpina em roedores é altamente isomórfico com a ELT em humanos, e tem sido amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa por todo o mundo

(HAMILTON *et al.*, 1997; PRIEL e ALBUQUERQUE, 2002). A pilocarpina parece induzir o estado epiléptico por intermédio dos receptores muscarínicos, provocando um desequilíbrio entre excitação e a transmissão inibitória (TURSKI *et al.*, 1983). Recentemente alguns trabalhos vêm demonstrando a aplicabilidade e uso da pilocarpina como agente indutor de crises epiléticas em zebrafish, produzindo descargas elétricas aberrantes e generalizadas. (EDDINS *et al.*, 2010; VERMOESEN *et al.*, 2011). Diferentemente do PTZ que provoca crises convulsivas tônico-clônicas, a pilocarpina aumenta claramente a atividade locomotora destes animais, alteração esta que pode ser utilizada como um index de estimulação. Além disso, este aumento da atividade locomotora é revertido pela administração de antidepressivos combinado com pilocarpina (VERMOESEN *et al.*, 2011).

5.2 PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA E EPILEPSIA

Durante a última década, a predisposição genética para vários tipos de epilepsia tem sido associada a mutações em uma variedade de genes e, não surpreendentemente, a maioria destes genes codificam componentes de canais iônicos (GUTIERREZ-DELICADO e SERRATOSA, 2004; LERCHE *et al.*, 2013). No entanto, uma variedade de outros genes envolvidos no desenvolvimento cerebral e sinalização celular são também conhecidos por estarem associados com o aparecimento de crises convulsivas (NOEBELS, 2003; STEINLEIN, 2004; SALZMANN e MALAFOSSE, 2012). Dentre estes genes podemos citar a recente descoberta de mutação no gene *GAL*, precursor do neuropeptídeo galanina (GUIPPONI *et al.*, 2015). Os mecanismos pelo qual as mutações nestes genes provocam crises convulsivas são complexos e muitas vezes indiretos. Dessa forma, a investigação destes eventos é crucial para entender o envolvimento da predisposição genética no aparecimento da epilepsia, e, finalmente, o desenvolvimento de novos diagnósticos e tratamento.

O zebrafish nos fornece uma alternativa vantajosa para a manipulação genética, reprodução econômica e descoberta de drogas através de estudos *in vivo* (DELVECCHIO, TIEFENBACH e KRAUSE, 2011; LESSMAN, 2011; RINKWITZ, MOURRAIN e BECKER, 2011). Idealmente, um modelo animal deve ser baseado numa conhecida causa genética da doença, demonstrar com precisão as principais características da doença (epilepsia), e responder, ou não, a terapias comumente usadas em pacientes com a doença (validação farmacológica). Se bem sucedido, esse modelo pode nos trazer

informações para a compreensão da doença e assim catalisar explorações para novas terapias.

Recentemente a proteína carboxipeptidase A6 (CPA6) vem sendo associada com o aparecimento de convulsões febris (CF) e ELT em humanos (SALZMANN *et al.*, 2012; SAPIO *et al.*, 2012). Embora as CF e a ELT sejam eventos distintos, 25% dos pacientes com ELT e esclerose hipocampal mostram CF durante a infância (BAULAC *et al.*, 2004). Alguns autores colocam as CF e a ELT como patologias complexas com predisposição genética. Esta hipótese é apoiada pela recente identificação de mutações no gene da enzima CPA6 em pacientes com CF e ELT associado, e pacientes com ELT independente (SALZMANN *et al.*, 2012).

5.2.1 Catálise em C-terminal: uma modificação realizada por carboxipeptidases

A maioria, se não todas as proteínas que sofrem modificações pós-traducionais tem suas propriedades funcionais afetadas. Estas modificações podem estar relacionadas com a ativação ou inibição da atividade da proteína. Há também exemplos em que uma modificação em particular desempenha um papel modulador complexo, ativando certas propriedades, inibindo outras. Entre os tipos de modificações mais estudadas podemos citar a fosforilação (abordada nos capítulos anteriores), glicosilação, e a proteólise. O último grupo inclui mais de 500 proteases e peptidases que são conhecidas (QUESADA *et al.*, 2009). Enquanto são costumeiramente relacionadas a processos de degradação nas células, proteases e peptidases também podem ativar ou modular a atividade de proteínas e peptídeos. As proteases e peptidases estão divididas em duas grandes categorias com base na localização da clivagem sobre a proteína substrato. As endoproteases/endopeptidases clivam ligações peptídicas localizadas em qualquer parte da proteína, enquanto que exoproteases/exopeptidases requerem um C ou N-terminal próximo do local de clivagem. As aminopeptidases clivam proteínas e peptídeos a partir do N-terminal, frequentemente um ou dois resíduos de cada vez, dependendo da enzima. Em contraste, carboxipeptidases (CPs) clivam proteínas e peptídeos a partir do C-terminal, usualmente um resíduo de cada vez. A liberação de aminoácidos do C-terminal é um processo generalizado que desempenha um papel na degradação, processamento, e modulação de proteínas e peptídeos (QUESADA *et al.*, 2009).

5.2.2.1 Carboxipeptidase A6 (CPA6)

A enzima CPA6 foi descoberta em 2002, pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Lloyd D. Fricker (WEI *et al.*, 2002). Esta enzima faz parte da subfamília A/B das metalocarboxipeptidasas M14, clivando preferencialmente aminoácidos hidrofóbicos (alifáticos e aromáticos) no C-terminal de proteínas e peptídeos (LYONS, CALLAWAY e FRICKER, 2008; SAPIO *et al.*, 2012). Esta enzima é transcrita com um pró-domínio, que é clivado dentro da célula por uma enzima tipo furina, e após ser secretada se torna ativa. A ligação de CPA6 a matriz extracelular é importante para a proteína atingir sua conformação ativa e pode ser bloqueada por pré-incubação com heparina, sugerindo que CPA6 se ligue a regiões com elevada densidade de carga negativa, possivelmente através de regiões catiônicas da proteína que estão voltadas para o exterior (Fig. 33) (LYONS e FRICKER, 2010). A ligação a matriz extracelular é uma característica importante que a diferencia de outras CPA semelhantes, bem como a maioria de outras peptidasas da família das metalocarboxipeptidase M14 (LYONS, CALLAWAY e FRICKER, 2008).

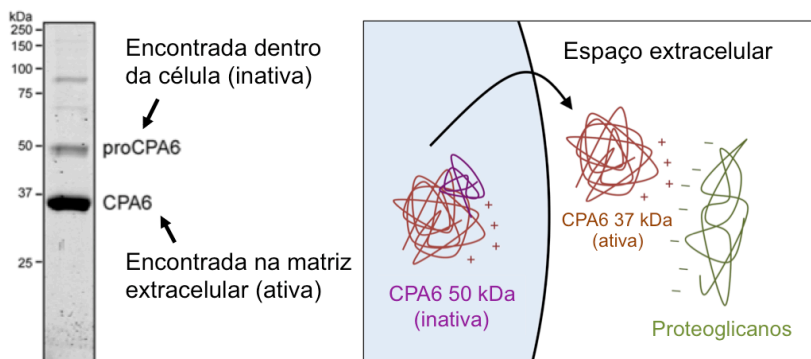


Figura 33. Ilustração representativa da enzima carboxipeptidase A6 (CPA6). A enzima é transcrita com um pró-domínio que é clivado dentro da célula por uma enzima tipo furina, e após ser secretada atinge sua conformação ativa (LYONS e FRICKER, 2010).

A sua distribuição tecidual foi estudada pela primeira vez em ratos. O mRNA de CPA6 foi detectado no bulbo olfatório, córtex cingulado, septo lateral, complexo olivar inferior e várias outras regiões do cérebro. Em camundongos adultos, CPA6 é altamente expressa no

bulbo olfatório, presente nas camadas de células granulares e mitral. Fora do SNC, CPA6 é expressa em vários tecidos do rato em desenvolvimento, tais como a medula óssea, pele e musculatura em torno do estômago (FONTENELE-NETO *et al.*, 2005; HAWRYLYCZ *et al.*, 2012; CONSORTIUM, 2013). Nos seres humanos, o mRNA de CPA6 foi detectado no hipocampo e nos núcleos da rafe (SALZMANN *et al.*, 2012). No entanto novos estudos devem ser realizados para confirmar exatamente quais células expressam CPA6.

O zebrafish também possui um gene codificador para CPA6. Durante o desenvolvimento das larvas, o mRNA da CPA6 é expresso em níveis aproximadamente iguais do 1º ao 5º dia (LYONS *et al.*, 2010). Este gene é expresso em somitos recém-formados nas larvas em desenvolvimento, bem como em células ectodérmicas da cauda, e na região posterior do olho (LYONS *et al.*, 2010). Abordagens *in vitro* têm demonstrado que CPA6 pode clivar um grande número de substratos (peptídeos) que são normalmente encontrados no SNC, dentre eles podemos citar as encefalinas, neurotensina e angiotensina (LYONS e FRICKER, 2010).

Dois mutações no gene que codifica a enzima CPA6 foram originalmente identificadas em pacientes com distúrbios convulsivos (SALZMANN *et al.*, 2012). Posteriormente, mutações adicionais da CPA6 foram relatadas em pacientes com ELT (SAPIO *et al.*, 2012) e epilepsia mioclônica juvenil (SAPIO *et al.*, 2015). No total, 6 raras mutações no gene da CPA6 já foram identificadas em pacientes com diferentes tipos de distúrbios convulsivos. Todas estas mutações reduzem a atividade da enzima na matriz extracelular, o que poderia provocar um desbalanço nos níveis de alguns neuropeptídeos, possivelmente aumentando os níveis de peptídeos excitatórios e/ou diminuindo os peptídeos inibitórios (SAPIO e FRICKER, 2014). Além disso, é possível que a atividade reduzida de CPA6 na matriz extracelular conduza alterações compensatórias na expressão de proteínas envolvidas na excitabilidade neuronal.

Uma vez que este gene é de significado clínico na fisiopatologia da epilepsia, o presente trabalho visa, através de ferramentas de manipulação genética (knockdown e superexpressão), realizar a caracterização comportamental e investigar o envolvimento da enzima CPA6 no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ e pilocarpina em zebrafish. Além disso, a análise de genes que codificam moléculas de sinalização intracelular, neuropeptídeos e subunidades de receptores neurais (CPA6, CPE, CREB, BDNF, c-fos, NPY, ACTH, CHGA, ProSAAS, substância P, neurotensina, endotelina 1, GluA1, GluA2,

GluN1, GluN2B, EAAT2, β actina) poderão contribuir para ampliar o entendimento das bases neuroquímicas do processo epileptogênico.

5.3. OBJETIVOS

5.3.1 Objetivos específicos

- Realizar avaliação comportamental no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ nas larvas de zebrafish controle (“wild-type”), “knockdown” para CPA6, com super expressão de CPA6 (“overexpression”), e co-injetadas com morfolino-oligonucleotídeo + mRNA para CPA6 (rescue).
- Realizar avaliação comportamental no modelo de crises convulsivas induzidas por pilocarpina nas larvas de zebrafish controle (“wild-type”), “knockdown” para CPA6, com super expressão de CPA6 (“overexpression”), e co-injetadas com morfolino-oligonucleotídeo + mRNA para CPA6 (rescue).
- Determinar os níveis de mRNA de genes que codificam moléculas de sinalização intracelular, neuropeptídeos e subunidades de receptores neurais (CPA6, CPE, CREB, BDNF, c-fos, NPY, ACTH, CHGA, ProSAAS, substância P, neurotensina, endotelina 1, GluA1, GluA2, GluN1, GluN2B, EAAT2, β actina) nas larvas wild-type e knockdown por meio de análise de alto rendimento utilizando PCR em tempo real.
- Determinar os níveis de mRNA de genes que codificam moléculas de sinalização intracelular, neuropeptídeos e subunidades de receptores neurais (CPA6, CPE, CREB, BDNF, c-fos, NPY, ACTH, CHGA, ProSAAS, substância P, neurotensina, endotelina 1, GluA1, GluA2, GluN1, GluN2B, EAAT2, β actina) nas larvas wild-type expostas ao PTZ e pilocarpina por meio de análise de alto rendimento utilizando PCR em tempo real.
- Correlacionar os achados bioquímicos com alterações comportamentais das larvas de zebrafish wild-type e knockdown expostas ao PTZ e pilocarpina.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Avaliação comportamental dos animais expostos ao PTZ

Os embriões de zebrafish foram coletados a partir de pares acasalados e mantidos sob condições padrões, 28°C na unidade de

núcleo no Albert Einstein College of Medicine, tal como descrito por (KIMMEL *et al.*, 1995; LAWRENCE, 2011). Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes e padrões estabelecidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais no Albert Einstein College of Medicine. As larvas de zebrafish com 3 dias pós-fertilização (3 dpf) e 7 dpf foram colocadas individualmente em placas com 12 poços, com aproximadamente 1 ml de “Egg water” (água para ovos) e mantidos a 32°C. O comportamento de natação foi monitorado através de uma câmera de alta resolução (JVC modelo GZ-MS230AU). Na primeira sessão, “baseline” (atividade de base, na presença de egg water) os animais foram monitorados e avaliados durante 10 minutos. Para indução das crises epilépticas experimentais, as larvas foram expostas individualmente as concentrações de 2,5 e 15 mM de PTZ prontamente dissolvido em água para ovos e mantidos a 32°C. O grupo controle foi exposto apenas à água do sistema. As crises convulsivas foram monitoradas e avaliadas durante 18 minutos na presença de PTZ por um investigador de forma cega de acordo com critérios estabelecidos (BARABAN *et al.*, 2005; BARABAN *et al.*, 2007).

5.4.2 Avaliação comportamental dos animais expostos a pilocarpina

Os embriões de zebrafish foram coletados a partir de pares acasalados e mantidos sob condições padrões, 28°C na unidade de núcleo no Albert Einstein College of Medicine. As larvas de zebrafish com 3 dpf foram colocadas individualmente em placas com 12 poços, com aproximadamente 1 ml de “Egg water” (água para ovos) e mantidos a 32°C. A atividade locomotora dos animais, medida pelo número de cruzamentos foi monitorada através de uma câmera de alta resolução (JVC modelo GZ-MS230AU). Na primeira sessão, “baseline” (atividade de base, na presença de egg water) os animais foram monitorados durante 10 minutos, deste tempo total, 1,5 min (8,5^o ao 10^o min) foi analisado. Para indução das crises epilépticas experimentais, as larvas foram expostas individualmente as concentrações de 15, 30 e 60 mM de pilocarpina prontamente dissolvida em água para ovos e mantidos a 32°C. O grupo controle foi exposto apenas à água do sistema. O comportamento dos animais foi gravado durante 18 minutos na presença de pilocarpina, armazenado e posteriormente analisado por um investigador de forma cega de acordo com critérios estabelecidos

(VERMOESEN *et al.*, 2011). A atividade locomotora nesta etapa também foi analisada durante 1,5 min (5^o ao 6,5^o min).

5.4.3 Ensaios de mobilidade e resposta a estímulos

Para o ensaio de mobilidade e capacidade de resposta a estímulos, foram utilizados dois testes. No primeiro teste as larvas com 3 dpf foram colocadas em poços individuais de uma placa de 12 poços com água para ovos. Um estímulo foi entregue por pipetagem de 200 µl de meio em direção as larvas com força suave. O estímulo foi calibrado de modo que provocaria uma resposta de ~ 40% sob condições basais. Subsequentemente um volume de meio contendo 5 mM de PTZ foi adicionado para uma concentração final de 2,5 mM de PTZ, o ensaio foi repetido em intervalos de 5 minutos. 10 estímulos foram entregues a um peixe em cada ponto de tempo. O segundo teste foi realizado utilizando uma sonda (estímulo táctil), onde a porcentagem de respostas ao toque foi medida. O estímulo foi calibrado de modo que provocaria uma resposta de ~ 80% sob condições basais. 3 estímulos foram entregues a cada peixe.

5.4.4 Manipulação genética (knockdown, overexpression e rescue)

Para obtenção das larvas de zebrafish knockdown, os embriões foram mantidos a 28°C em água para ovos e injetados com morfolino-oligonucleotídeos entre o estágio celular um e dois (no máximo 40 minutos pós-fertilização) (WESTERFIELD, 2007). Foram utilizados morfolinolinos dirigidos ao exon 2 (MO2) e exon 4 (MO4) da proteína CPA6. Em cada experimento, 3 ng de cada morfolino foi utilizado, promovendo a exclusão dos exons e inibindo a tradução destas sequências específicas de mRNA e expressão da proteína alvo (LYONS, SAPIO e FRICKER, 2013). O mesmo procedimento foi utilizado para super expressar o mRNA da proteína alvo, no entanto, ao invés de injetar o morfolino foram injetados embriões com mRNA (500 e 1000 pg) da proteína CPA6. O mRNA de CPA6 foi gerado a partir de um plasmídeo de CPA6 para zebrafish utilizando kit mMessage mMACHINE (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. CPA6-MO2 na dose de 3 ng já havia sido utilizado anteriormente para estudar o efeito do knockdown CPA6 em zebrafish (LYONS *et al.*, 2010), onde alterações morfológicas não foram detectadas nos animais. Além disso, um grupo de animais foi co-injetado com morfolino (MO2)

+ mRNA da proteína CPA6 (grupo descrito como rescue). Neste grupo de animais o morfolino foi previamente misturado com o mRNA e injetados juntos.

Os morfolino-oligonucleotídeos foram obtidos a partir da empresa Genetools, LLC, e dissolvidos em água ultra pura de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos morfolinos estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Sequência dos morfolino-oligonucleotídeos.

Morfolino-oligonucleotídeos	Sequência
Ctrl-MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
CPA6-MO2	AGAAAATAAGGGACTCACTGTCAAG
CPA6-MO4	CTTGTCAGCCATGTGCTCACCTCTT

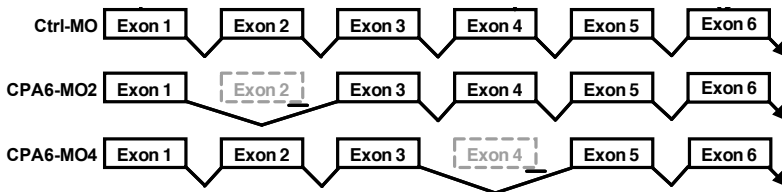


Figura 34. Morfolinos (MOs) projetados para bloquear o splicing do exon 2 (CPA6-MO2) ou exon 4 (CPA6-MO4). Eventos de splicing estão indicados por linhas contínuas desenhadas entre os exons. A ligação dos MOs a regiões específicas provoca a exclusão dos exons (linha tracejada) e frameshifts na transcrição.

5.4.5 Determinação dos níveis de mRNA por qRT-PCR

5.4.5.1 Extração de RNA

Os embriões de zebrafish foram eutanasiados e armazenados em RNAlater (Qiagen). Repetições biológicas (n) de amostras de mRNA representam pools de mRNA a partir de 6 larvas. Para investigar o papel dos genes que codificam moléculas de sinalização intracelular, neuropeptídeos e subunidades de receptores neurais (CPA6, CPE, CREB, BDNF, c-fos, NPY, ACTH, CHGA, ProSAAS, substância P, neurotensina, endotelina 1, GluA1, GluA2, GluN1, GluN2B, EAAT2, β actina), em resposta ao knockdown de CPA6, PTZ e pilocarpina, o RNA foi extraído das larvas de zebrafish utilizando primeiramente o reagente

Trizol (600 μ l). As larvas foram maceradas em Trizol, centrifugadas e posteriormente, o sobrenadante retirado e colocado junto a 600 μ l de álcool etílico 70% em um tubo de propileno livre de RNase. Após homogeneização por inversão, o volume final de cada tubo foi adicionado individualmente em colunas de extração de RNA, seguidos por centrifugação. Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído por DNA genômico, foi realizado tratamento de todas as amostras com DNase I. Após extração, o RNA total foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop, estabelecendo assim as concentrações de RNA de cada amostra, permitindo que no processo de síntese do cDNA as mesmas concentrações de cDNA fossem alcançadas para cada amostra.

5.4.5.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada através de uma reação de transcrição reversa utilizando a SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) e iniciadores Oligo-dT 12-18 (Invitrogen). A mistura de RNA total, dNTP's e os iniciadores (Oligo-dT) foi previamente aquecida a 65°C por 5 minutos e, em seguida, resfriadas em gelo por 1 minuto. A reação foi realizada por 50 min a 50°C.

5.4.5.3 qRT-PCR

As análises quantitativas da expressão dos genes, previamente selecionados, foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Os primers utilizados (Tabela 11) para as análises de qRT-PCR foram desenhados de acordo com a sequência do gene em estudo (GenBank para zebrafish), obedecendo as regras e parâmetros requeridos. As reações foram realizadas com 5-10 ng do cDNA de cada amostra. Além do cDNA, a reação foi composta de iniciadores específicos e 2X Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), com volume final de 8 μ l. Para as análises da expressão dos genes selecionados de cada amostra, foram monitorados os níveis de expressão de β actina, gene não afetado pela condição analisada (controle endógeno). O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador (AB7900 Real Time PCR, Applied Biosystems) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno foram realizadas em triplicatas. As análises dos dados de fluorescência obtidos

foram realizadas em software apropriado. Os Cycle tresholds (Cts) utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controle endógeno. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método descrito por Livak e Schmittgen (2001) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 11. Sequências dos primers utilizados para o ensaio de qRT-PCR.

Nome do gene	Símbolo gene	Sequência
beta actin	β -act	F, 5' AGCAGGAGTACGATGAGTCTG 3' R, 5' GGTAACGCTTCTGGAATGAC 3'
brain-derived neurotrophic factor	bdnf	F, 5' GTTGCGCGGAGGTCCTATC 3' R, 5' CTTCTAACCTGTTGGAACCTTACTG 3'
cAMP responsive element binding protein 1a	creb1a	F, 5' GTCTGTGTGCGGCTATCTAG 3' R, 5' GCCGCCATGGAACTTGTG 3'
carboxypeptidase A6 (Exon 2)	cpa6	F, 5' GCTACGTCGGTGATCAAGTG 3' R, 5' GCCAAAGGTCACCTGTCAAG 3'
carboxypeptidase A6 (Exon 4)	cpa6	F, 5' CGCAGATCTGAACTTCAGTATG 3' R, 5' TGACCAATAGAAAACAGATCAACC 3'
carboxypeptidase E	cpe	F, 5' GGATACACGAGCCTGGTGAG 3' R, 5' AGATACTGAGCCAGATGATGAG 3'
chromogranin A	chga	F, 5' GCTCCTGGTGAATGTTGTGCATC 3' R, 5' TCCACAATACACTTCATCACCTTC 3'
endothelin 1	edn1	F, 5' TCTGGATAAAGAGTGCCTTAC 3' R, 5' ATATGACACCGTTTCGCTCTG 3'
glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1a	gria1a	F, 5' AAGTTCCCAAGCGAAGACTGAA 3' R, 5' GTTCTGGAAAAGCTGTGGACATG 3'
glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2a	gria2a	F, 5' GGAGACTGCTGGCCAATC 3' R, 5' TCCACACGCACTGTTTAAGAG 3'
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D- aspartate 1a	grin1a	F, 5' CGAGCCCAAGATTGTGAACA 3' R, 5' CCTGGGTGACGGCATCTTTA 3'
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D- aspartate 2B	grin2b	F, 5' AGTCGGGTAAATTGGATGCATT 3' R, 5' CCAGCTTACAGCCCTCATCAC 3'
neuropeptide Y	npy	F, 5' CTCGCCAAGTATTATTCAGCAC 3' R, 5' CTTGACCTTTTCCCATACCTCTG 3'
neurotensin	nts	F, 5' GACCAGGGAAAAGCAATAG 3' R, 5' CTGCTCGCCTTACCTTTG 3'
proopiomelanocortin a	pomca	F, 5' TTTCTGTGCAAAAGAGATGGTG 3' R, 5' ATAATTGTATGCATTCGAAGATGTC 3'
proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	psk1nl	F, 5' CGCTACAAGCAGGAGAGAC 3' R, 5' ATCTTCTCCACAAGGTATCTGAG 3'
solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), 2b	slc1a2b	F, 5' ATTGTGATGGTGATCGCCTTC 3' R, 5' CAGACCAGCCAGACCTGTG 3'
tachykinin 1	tac1	F, 5' GCAACAATCAGATACAGGATGAG 3' R, 5' GTGCATTTGACAGAGCCG 3'
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos	F, 5' CCGCACACAACCCATCTG 3' R, 5' GGTCGTGATGATGTGTTTGGT 3'

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student para amostras independentes, ANOVA de uma ou duas vias, ou ANOVA de medidas repetidas, seguidos pelo post-hoc Tukey HSD, quando apropriado. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e o nível de significância aceito para os testes foi de $p \leq 0,05$. Testes

paramétricos foram realizados utilizando o pacote de software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

5.6 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir representam o manuscrito submetido no final de 2015 ao periódico PLOS ONE, intitulado de **“Knockdown of carboxypeptidase A6 in zebrafish larvae reduces response to seizure-inducing drugs and causes changes in the level of mRNAs encoding signaling molecules”**.

5.6.1 Knockdown para CPA6 previne o comportamento natatório convulsivo induzido por PTZ

O PTZ é um agente convulsivo capaz de gerar tanto crises agudas, quanto crônicas (TAKECHI *et al.*, 2012). A utilização de larvas de zebrafish como modelo para examinar o comportamento em resposta a drogas indutoras de crises convulsivas já foi previamente estabelecida (BARABAN *et al.*, 2005; BARABAN *et al.*, 2007). Em resposta a adição de PTZ, as larvas com 3 dpf apresentaram comportamento natatório convulsivo de forma dose e tempo-dependentes (Fig. 35A). Nos primeiros minutos após a adição de doses baixas de PTZ, a atividade locomotora é elevada. Em doses mais elevadas e/ou exposições mais longas, os animais apresentaram comportamento estereotipado rápido, movimentos de natação circulares e descoordenados (BARABAN *et al.*, 2005). Os embriões wild-type com 3 dpf foram tratados com PTZ por 18 minutos e o comportamento natatório convulsivo foi registrado para cada intervalo de minuto, utilizando os critérios descritos anteriormente (CAMPBELL *et al.*, 2014). Os animais wild-type expostos às concentrações de 2,5 ou 15 mM de PTZ apresentaram significativamente mais episódios de crises convulsivas, sendo que 2,5 mM produziu aproximadamente 3 episódios de crise e a concentração de 15 mM de PTZ alcançou uma média de 12 episódios de crise ao final do período de observação [$F(2,34) = 22,63$, $p < 0,001$] (Fig. 35A).

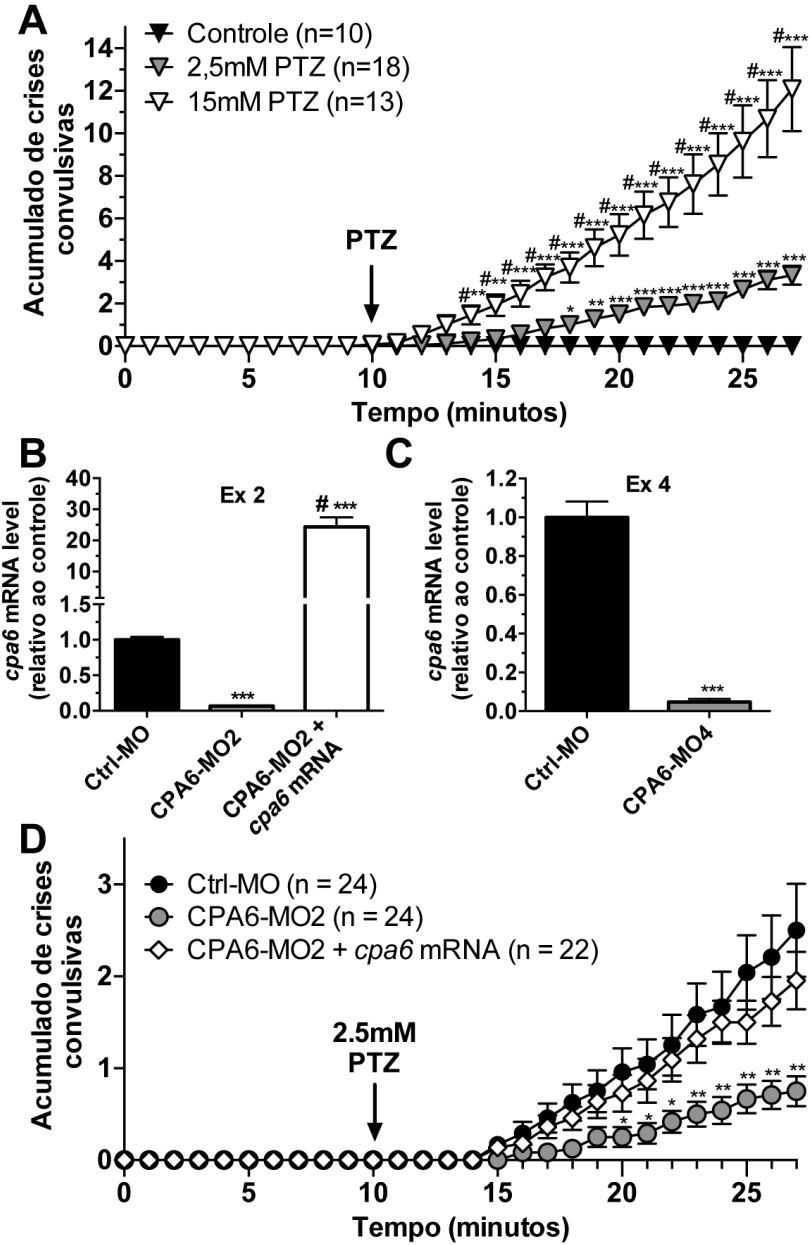
Em um estudo prévio, CPA6-MO2 já havia sido utilizado na dose de 3 ng (LYONS *et al.*, 2010). Utilizamos a mesma dose neste trabalho por ela não causar qualquer alteração morfológica bruta ou aumento da mortalidade (dados não mostrados). Para validação do knockdown para CPA6, os níveis do mRNA para o exons 2 e 4 foram analisados, uma

vez que os morfolidos causam exclusões específicas dos exons 2 e 4, e um desvio de enquadramento no início da transcrição (Fig. 34). As figuras 35B e 35C demonstram claramente a efetividade dos morfolidos, sendo que tanto CPA6-MO2 ([F (2,9) = 63,20, $p < 0,001$]) (Fig. 35B), quanto CPA6-MO4 (teste t, $p < 0,001$) (Fig. 35C) foram capazes de diminuir ~ 90% os níveis do mRNA da proteína CPA6 quando comparado ao grupo Ctrl-MO. O grupo Ctrl-MO se trata de larvas injetadas com uma sequência que não causa alterações nos níveis do mRNA e da proteína CPA6. Além disso, a figura 35B demonstra que as larvas co-injetadas (CPA6-MO2 + mRNA), grupo recuperado (chamado de “rescue”), apresentou um aumento próximo a 25 vezes nos níveis do mRNA da proteína CPA6 ([F (2,9) = 63,20, $p < 0,001$]). O grupo rescue tem como objetivo, o reestabelecimento do fenótipo selvagem dos embriões e fornece provas da especificidade do morfolino, uma vez que a tradução do mRNA recuperado (injetado) substitui a produção da proteína que foi inibida pelo morfolino. Caso o morfolino apresente efeitos inespecíficos (ação sobre outros alvos), a injeção de mRNA não reestabelecerá o fenótipo e efeito comportamental.

Após a validação dos morfolidos e grupo rescue, o próximo passo foi avaliar os efeitos comportamentais do knockdown para CPA6 frente a exposição das larvas de zebrafish ao PTZ. As figuras 35D e 35E demonstram que as larvas knockdown para CPA6 apresentam um menor número de crises convulsivas quando comparadas ao grupo Ctrl-MO (todos os grupos foram expostos ao PTZ). Tanto MO2 ([F (2,24) = 4,26, $p < 0,001$]) como MO4 ([F (1,26) = 12,25, $p < 0,001$]) foram capazes de reduzir o número de episódios de crise durante o período analisado. O grupo de larvas co-injetadas (rescue) apresentaram-se de forma igual ao grupo Ctrl-MO (Fig. 35D), indicando o reestabelecimento do fenótipo selvagem para este grupo, sugerindo alta especificidade do morfolino utilizado. A diferença significativa no comportamento natatório convulsivo entre embriões injetados com Ctrl-MO e CPA6-MO4 não foi observada utilizando a dose de 15 mM de PTZ ([F (2, 34) = 0,84, $p = 0,72$]) (Fig. 36). Este resultado pode ser explicado por uma saturação do efeito com a dose mais elevada de PTZ. Dessa forma, para as análises subsequentes utilizamos a concentração de 2,5 mM de PTZ.

Outro parâmetro analisado nestes grupos foi o tempo de latência para a primeira crise convulsiva (CAMPBELL *et al.*, 2014). Na figura 35F o grupo controle não recebeu PTZ e, portanto, não apresentou comportamento natatório convulsivo (Fig. 35F). A latência para estes animais foi determinada em 1080 segundos (tempo de duração do teste). O tempo de latência para a primeira crise convulsiva foi reduzida em

embriões expostos ao PTZ 2,5 e 15 mM ([F (2,38) = 87,99, $p < 0,001$]) (Fig. 35F). Em paralelo com os resultados apresentados nas figuras 35D e 35E podemos observar nas figuras 35G e 35H que os grupos MO2 ([F (2,67) = 4,82, $p < 0,05$]) e MO4 (teste t; $p < 0,01$), apresentaram um tempo médio superior para a primeira crise convulsiva quando comparados ao grupo Ctrl-MO após exposição ao PTZ 2,5 mM. A co-injeção de CPA6-MO2 + mRNA restaurou a resposta ao níveis do Ctrl-MO (Fig. 35G).



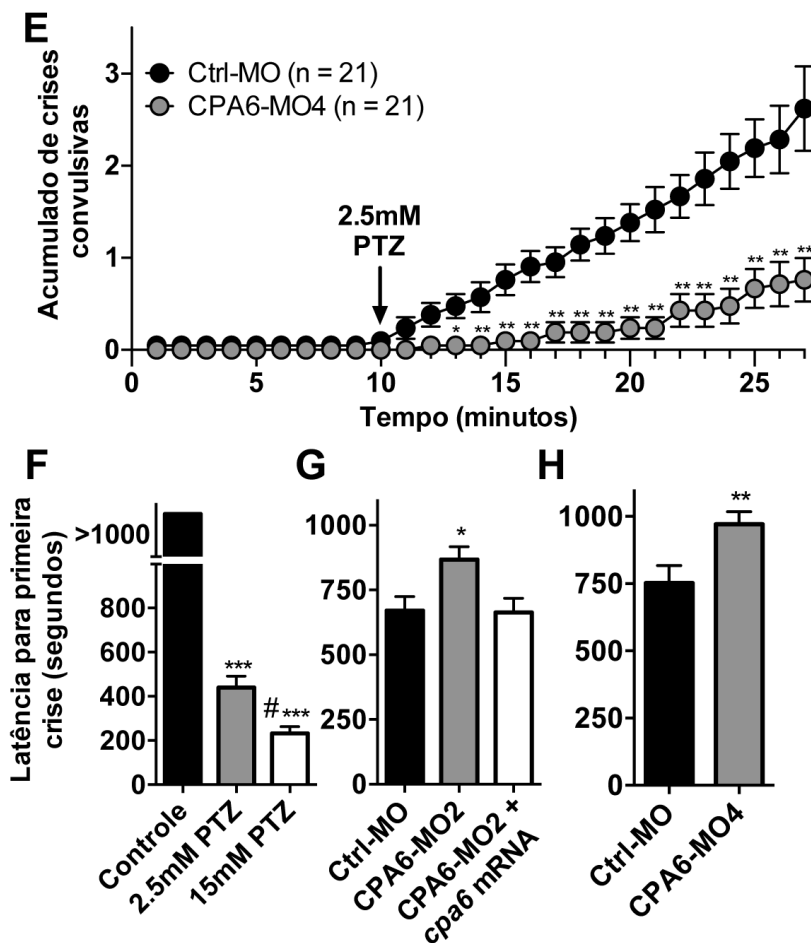


Figura 35. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, expostas a concentração de 2,5 mM de PTZ. (A) Acumulado de crises convulsivas em larvas wild-type durante um período de 10 minutos de baseline + 18 minutos de exposição ao PTZ. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle nos respectivos time-points; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo 2,5 mM de PTZ nos respectivos time-points. (B, C) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas injetadas com morfolinóis dirigidos ao exon 2 e exon 4, e larvas co-injetadas com MO2 + mRNA CPA6 (rescue). Na figura B utilizamos ANOVA de uma via, seguido de Tukey HSD. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO; #, $p < 0,001$

comparado com o grupo CPA6-MO2. Na figura C, teste t de Student. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO. (D, E) Acumulado de crises convulsivas em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2, MO4 e MO2 + mRNA (grupo rescue). ANOVA de medidas repetidas, seguida de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ comparado com o grupo Ctrl-MO nos respectivos time-points. (F, G e H). Tempo de latência para a primeira crise convulsiva após a exposição ao PTZ em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas. ANOVA de uma via, seguido de Tukey HSD foi utilizado na figura F. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo 2,5 mM de PTZ. Na figura G foi utilizado ANOVA de uma via, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$ comparado com os grupos Ctrl-MO e CPA6-MO2 + mRNA. No painel H foi utilizado o teste t de Student. **, $p < 0,01$ comparado com o grupo Ctrl-MO. As barras de erro mostram E.P.M.

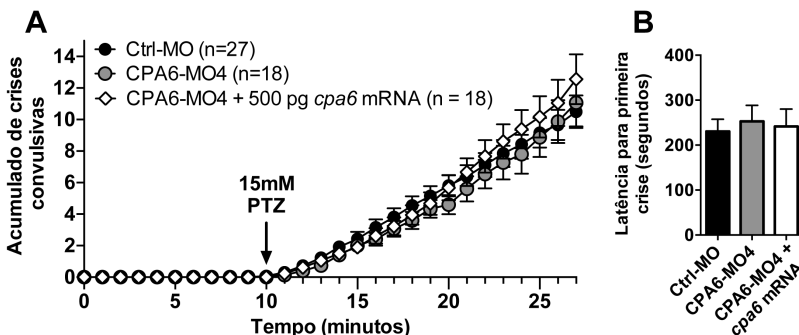
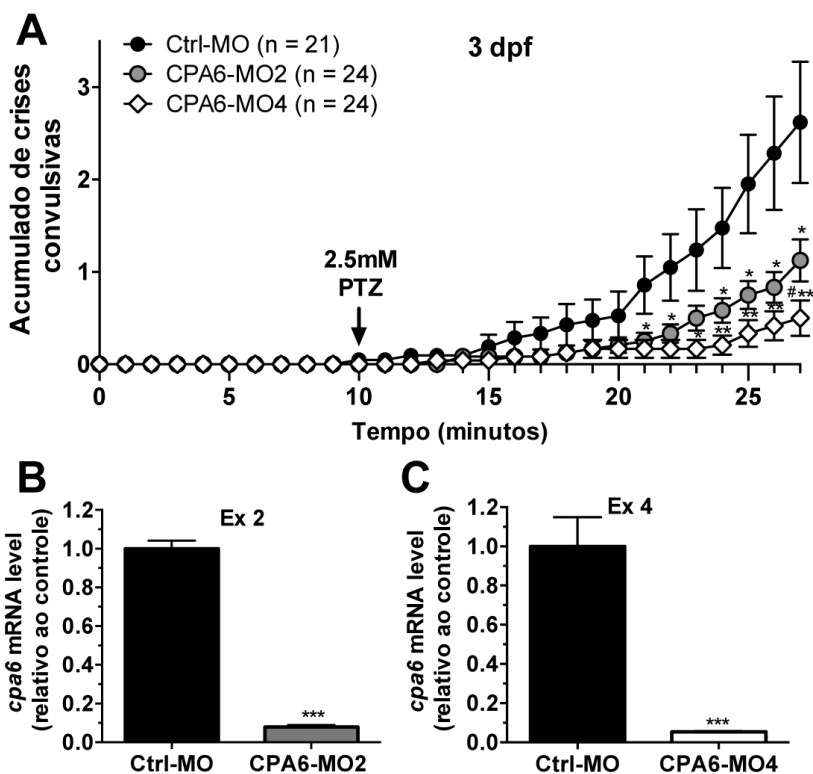


Figura 36. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, expostas a concentração de 15 mM de PTZ. (A) Acumulado de crises convulsivas em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO4 durante um período de 10 minutos de baseline + 18 minutos de exposição ao PTZ. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de medidas repetidas. (B) Tempo de latência para a primeira crise convulsiva após a exposição ao PTZ. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de uma via. As barras de erro mostram E.P.M.

No intuito de averiguar a funcionalidade do knockdown para CPA6 e um possível retorno do mRNA de CPA6 a níveis basais nas larvas de zebrafish com 7 dpf, um conjunto de embriões foi injetado com MO2 e MO4 e avaliado 7 dpf. Curiosamente, as figuras 37E e 37F mostram que as larvas injetadas com MO2 e MO4, 7 dpf continuaram apresentando uma queda de aproximadamente 80 e 90% dos níveis de mRNA da proteína CPA6, respectivamente (teste t; $p < 0,001$). Estes dados sugerem que a dose de 3 ng de morfolino é capaz de manter a

queda de expressão do mRNA da proteína CPA6 por até 7 dpf, diferentemente do que se aplica, quando em geral nesta técnica no 5º dpf temos um retorno do mRNA e da proteína alvo aos níveis do controle (BILL *et al.*, 2009). A figura 37D demonstra que as alterações comportamentais encontradas 3 dpf (Fig. 37A) são mantidas neste período de desenvolvimento da larva ([F (2,34) = 16,01, $p < 0,001$). Estes dados indicam que as larvas com 7 dpf também poderiam ser utilizadas neste modelo de crises convulsivas, no entanto visando a otimização dos experimentos e obtenção de resultados, todas as análises foram realizadas utilizando larvas com 3 dpf.



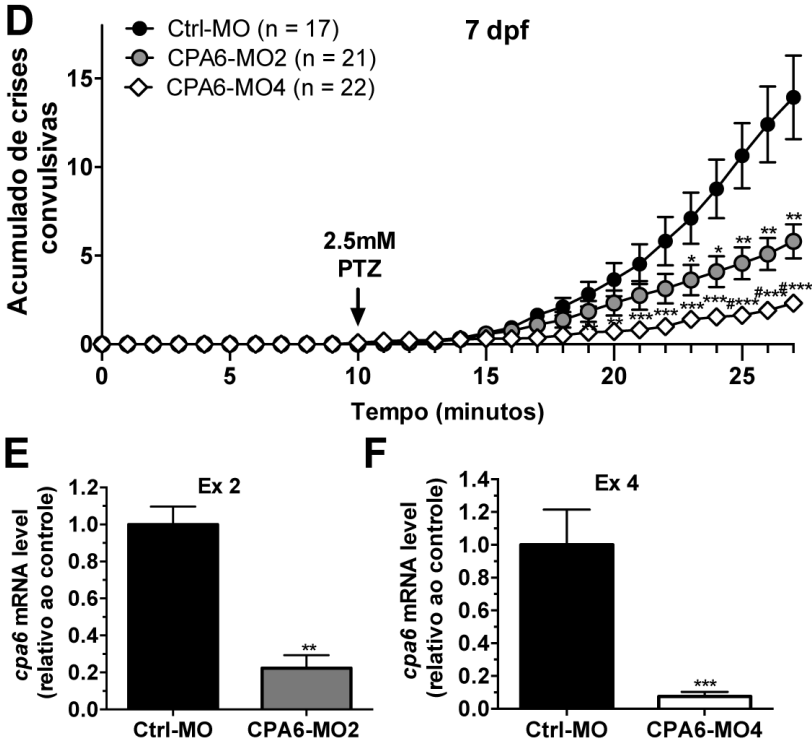


Figura 37. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6, 3 e 7 dpf expostas ao PTZ. (A) Acumulado de crises convulsivas em larvas (3 dpf) wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2 e MO4. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ comparado com o grupo Ctrl-MO nos respectivos time-points; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo CPA6-MO2 no respectivo time-point. (B, C) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas com 3 dpf injetadas com morfolinolinos dirigidos ao exon 2 e exon 4. Teste t de Student. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO. (D) Acumulado de crises convulsivas em larvas (7 dpf) wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2 e MO4. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO nos respectivos time-points; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo CPA6-MO2 nos respectivos time-points. (E, F) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas com 7 dpf injetadas com morfolinolinos dirigidos ao exon 2 e exon 4. Teste t de Student. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO. As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.2 Knockdown para CPA6 previne o aumento da atividade locomotora induzido pela pilocarpina

Alguns trabalhos vêm demonstrando a aplicabilidade e uso da pilocarpina como agente indutor de crises epilépticas em zebrafish (EDDINS *et al.*, 2010; VERMOESEN *et al.*, 2011). Diferentemente do PTZ, que provoca crises convulsivas tônico-clônicas, a pilocarpina aumenta claramente a atividade locomotora dos animais, o que poderia ser utilizado como um index de estimulação das larvas de zebrafish. A atividade locomotora foi medida pela contagem de transições no quadrante (Fig. 38). A distância total percorrida também foi examinada, porém optamos pela primeira medida (número de cruzamentos) pela facilidade de execução da análise (Fig. 39). Neste sentido, utilizando as concentrações de 15, 30 e 60 mM de pilocarpina identificamos que as larvas de zebrafish wild-type apresentaram aumento do número de cruzamentos de forma concentração-dependente (Fig. 38A). As larvas injetadas com MO2 apresentaram uma drástica diferença no aumento da atividade locomotora nas três doses de pilocarpina testadas ([F (2,100) = 9,70, $p < 0,001$]) (Fig. 38A). Da mesma forma que MO2, MO4 também foi capaz de prevenir o aumento da atividade locomotora frente a exposição de 15 mM de pilocarpina (teste t, $p < 0,001$) (Fig. 38E). O grupo de larvas co-injetadas (rescue) apresentaram uma reversão parcial do aumento da atividade locomotora (Fig. 38C) frente a exposição de 15 mM de pilocarpina ([F (2,69) = 8,72, $p < 0,001$]).

As figuras 38B, 38D e 38F demonstram que tanto CPA6-MO2 (38B-D) quanto CPA6-MO4 (38F) foram capazes de diminuir em aproximadamente 90% os níveis do mRNA da proteína CPA6 quando comparadas ao grupo Ctrl-MO (teste t, $p < 0,001$). Além disso, a figura 38D demonstra que as larvas co-injetadas (CPA6-MO2 + mRNA), apresentaram um aumento nos níveis do mRNA da proteína CPA6 ([F (2,9) = 39,37, $p < 0,001$]).

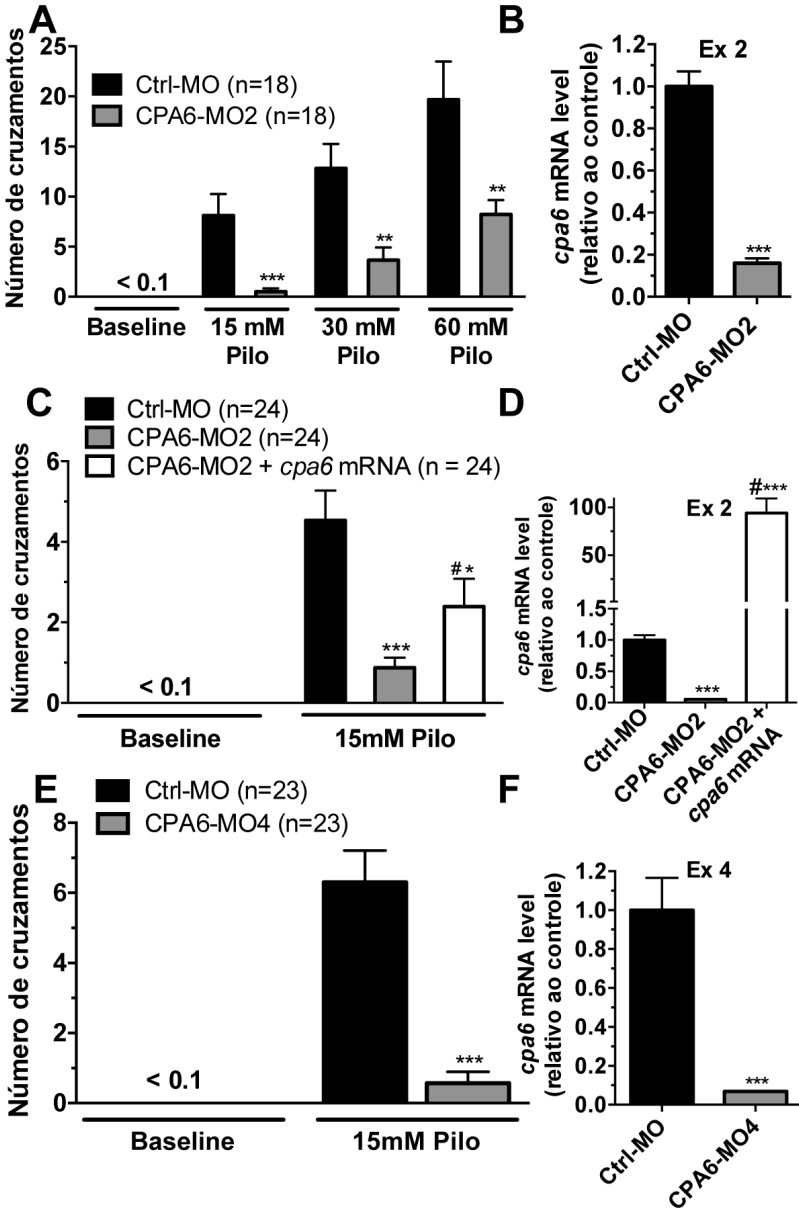


Figura 38. Análise comportamental de larvas de zebrafish knockdown para CPA6 expostas a pilocarpina. (A) Número de cruzamentos das larvas wild-type e injetadas com MO2 durante 90 segundos no baseline e durante 90 segundos no

período de exposição a pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey HSD. **, $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o respectivo grupo Ctrl-MO. (B) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas injetadas com morfólino dirigidos ao exon 2. Teste t de Student. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO. (C) Número de cruzamentos das larvas wild-type e injetadas com MO2 e larvas co-injetadas com MO2 + mRNA CPA6 (rescue). ANOVA de uma via, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo CPA6-MO2. (D) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas injetadas com morfólino dirigidos ao exon 2 e das larvas co-injetadas com MO2 + mRNA CPA6 (rescue). ANOVA de uma via, seguido de Tukey HSD. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO; #, $p < 0,001$ comparado com o grupo CPA6-MO2. (E) Número de cruzamentos das larvas wild-type e injetadas com MO4. (F) Níveis do mRNA para CPA6 nas larvas injetadas com morfólino dirigidos ao exon 4. Teste t de Student. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo Ctrl-MO. As barras de erro mostram E.P.M.

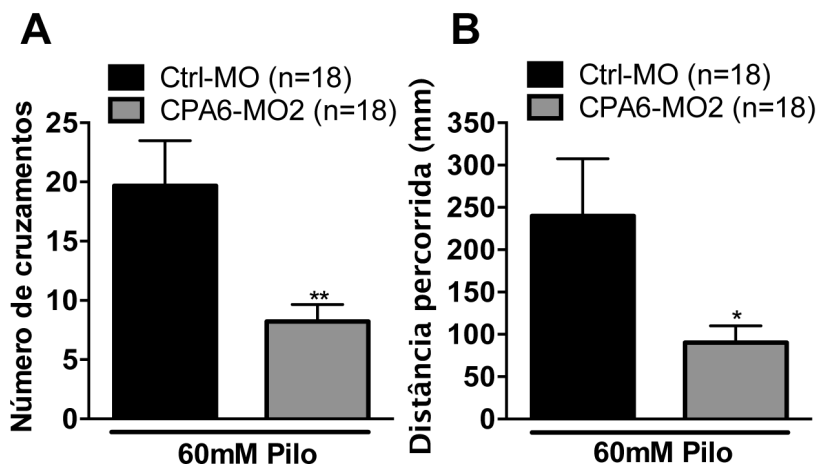


Figura 39. Atividade locomotora de animais expostos a pilocarpina, uma comparação de resultados utilizando o número de cruzamentos (manual) e a distância total percorrida (software). Um grupo de animais foi injetado com Ctrl-MO e outro com CPA6-MO2, ambos foram testados com 3 dpf. (A) Os vídeos foram analisados manualmente, contando o número de cruzamentos entre os quadrantes (atividade locomotora) (B) Os mesmos vídeos foram analisados por um software apropriado que mediu a distância total percorrida (mm) (atividade locomotora). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com respectivo grupo Ctrl-MO. As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.3 Superexpressão de CPA6 não altera os parâmetros comportamentais induzidos por PTZ ou pilocarpina

As larvas de zebrafish foram injetadas com 500 e 1000 pg de mRNA para a proteína CPA6 e os parâmetros comportamentais analisados frente a exposição ao PTZ e pilocarpina. Como podemos observar nas figuras 40A e 40B, os animais injetados com mRNA apresentaram o mesmo perfil comportamental quando comparado aos seus respectivos controles, indicando que a superexpressão do mRNA não altera o número de crises convulsivas (PTZ), bem como não altera a atividade locomotora das larvas expostas a pilocarpina. Para validar o estudo de overexpression do mRNA para CPA6, a figura 40C demonstra que a injeção de 500 pg de mRNA foi capaz de aumentar aproximadamente 20 vezes os níveis de mRNA para CPA6. Da mesma forma a injeção de 1000 pg provocou um aumento próximo a 40 vezes ($[F(2,14) = 27,30, p < 0,001]$).

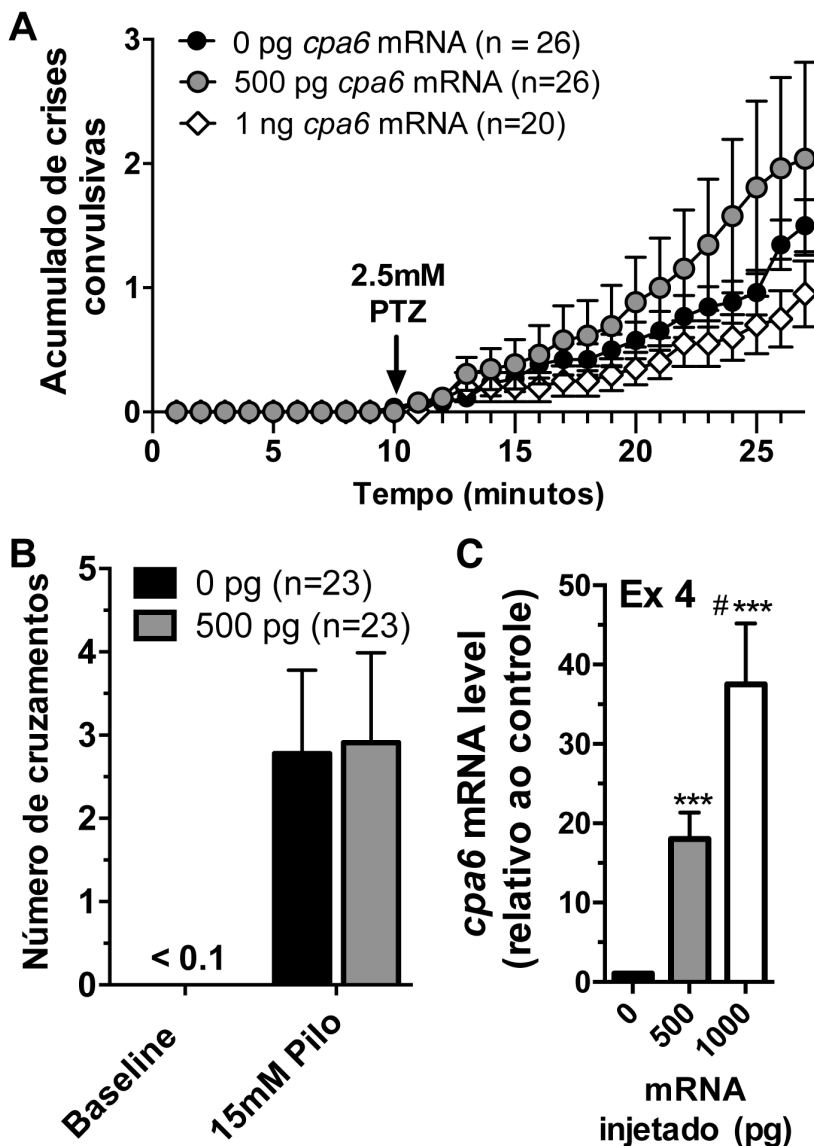


Figura 40. Análise comportamental de larvas de zebrafish que superexpressam CPA6, frente a exposição ao PTZ e pilocarpina. (A) Acumulado de crises convulsivas em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com injeção de mRNA para CPA6 nas concentrações de 500 e 1000 pg durante um período de 10 minutos de baseline + 18 minutos de exposição ao PTZ. A análise

estatística foi realizada utilizando ANOVA de medidas repetidas. (B) Número de cruzamentos das larvas wild-type e injetadas com 500 pg de mRNA para CPA6 durante 90 segundos no baseline e durante 90 segundos no período de exposição a pilocarpina. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. (C) Níveis do mRNA para CPA6 das larvas injetadas com mRNA nas concentrações de 500 e 1000 pg. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste Tukey HSD. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo 0 pg; #, $p < 0,05$ comparado com o grupo 500 pg. As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.4 Knockdown para CPA6 não altera a capacidade de resposta a estímulos das larvas de zebrafish

O comportamento do tipo convulsivo das larvas expostas a drogas indutoras foi definido de acordo com os padrões já descritos. No entanto, as larvas que apresentam alterações morfológicas (defeitos na cauda ou de outra forma) podem não se comportar normalmente. Embora as larvas knockdown para CPA6 não apresentaram nenhuma anomalia física óbvia, foi testado se elas podiam responder a estímulos em condições basais e na presença das mesmas concentrações de PTZ utilizadas no ensaio comportamental.

As larvas knockdown para CPA6 não apresentaram alterações na resposta a estimulação com água em condições basais ([F (2,44) = 0,24, $p = 0,79$]) (Fig. 41A). Na presença de PTZ, também não foram encontradas mudanças significativas na resposta à estimulação nas larvas injetadas com CPA6-MO2 ([F (1,4) = 0,91, $p = 0,46$]) e CPA6-MO4 ([F (1,4) = 0,43, $p = 0,78$]) (Figs. 41C e 41D). A capacidade de resposta ao toque também foi testada (Fig. 41B), contudo, não foram observadas diferenças na resposta a estimulação táctil em condições basais [F (2,81) = 0,37, $p = 0,69$]. Os resultados da figura 41 não demonstram alterações na capacidade de resposta aos estímulos, indicando que as larvas geneticamente modificadas (MO2 e MO4) não apresentam déficits motores.

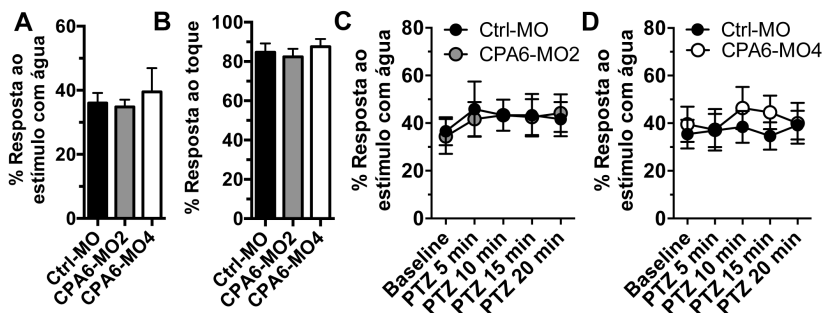


Figura 41. Análise da capacidade de resposta a estímulos das larvas de zebrafish. (A) % de resposta ao estímulo com água das larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2 e MO4 em condições basais. (B) % de resposta ao toque de larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2 e MO4 em condições basais. A análise estatística das figuras A e B foi realizada utilizando ANOVA de uma via. (C) % de resposta ao estímulo com água das larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO2 na presença de PTZ 2,5 mM durante 20 minutos. (D) % de resposta ao estímulo com água das larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de MO4 na presença de PTZ 2,5 mM durante 20 minutos. A análise estatística das figuras C e D foi realizada utilizando ANOVA de medidas repetidas. As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.5 Knockdown para CPA6 altera a expressão de neuropeptídeos, moléculas de sinalização celular e subunidades de receptores neurais

Considerando que a enzima extracelular CPA6 está envolvida no processamento de muitos peptídeos e proteínas (LYONS *et al.*, 2010), decidimos investigar se as alterações comportamentais observadas nas larvas geneticamente modificadas, não poderiam estar relacionadas com alterações nos níveis de neuropeptídeos. Trabalhos recentes têm demonstrado o envolvimento de neuropeptídeos no processo epiléptico (KOVAC e WALKER, 2013; CLYNEN *et al.*, 2014). Os neuropeptídeos podem contribuir para tal desequilíbrio através da modulação de efeitos excitatórios e inibitórios. Boa parte destes neuropeptídeos precisam ser clivados para atingirem a sua forma ativa. Neste sentido resolvemos examinar a expressão destas moléculas (potenciais alvos de CPA6) e outros genes conhecidos por regular a excitabilidade neuronal nas larvas de zebrafish knockdown para CPA6.

A figura 42 demonstra que em condições basais (sem exposição ao PTZ ou pilocarpina) as larvas geneticamente modificadas (knockdown para CPA6) apresentam alterações na expressão de uma gama de neuropeptídeos, moléculas de sinalização celular e até subunidades de receptores glutamatérgicos. O knockdown para CPA6 foi capaz de diminuir a expressão do mRNA de c-fos e BDNF, ambas moléculas utilizadas como marcadores de excitabilidade neural em modelos de crises convulsivas. Carboxipeptidase E (CPE), outra peptidase da família das metalocarboxipeptidase M14, também se encontra diminuída. Além disso, outros neuropeptídeos como neuropeptídeo Y, cromogranina A, pcsk1nl (gene codificador para ProSAAS), tac1 (gene codificador para substância P), neurotensina e endotelina 1 também foram diminuídos na condição knockdown quando comparado ao grupo Ctrl-MO. O gene que codifica a subunidade GluN1 do receptor glutamatérgico NMDA e o transportador glial de glutamato EAAT2 (codificado pelo gene slc1a2b) também estão downregulados nas larvas knockdown para CPA6.

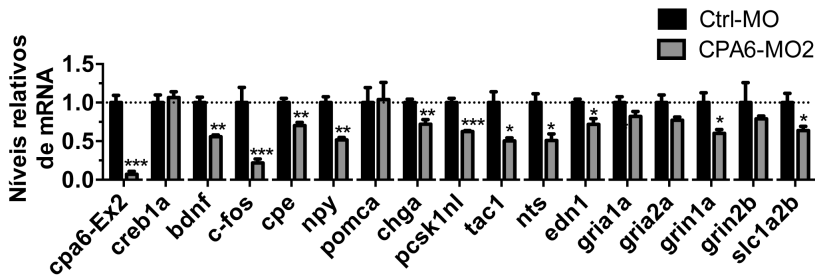


Figura 42. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type e larvas geneticamente modificadas com a injeção de CPA6-MO2. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$ em comparação com o respectivo grupo Ctrl-MO ($n=4$). As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.6 Exposição ao PTZ altera a expressão de neuropeptídeos e moléculas de sinalização celular

Para testar se os níveis de mRNAs dos alvos examinados na figura 42 seriam afetados pelo tratamento com PTZ, wild-type zebrafish foram expostos a concentração de 15mM de PTZ durante 1 h e os níveis de mRNA foram analisados 1, 5 e 23 h após o período de exposição ao PTZ (ou seja, 2, 6, e 24 h após o início da exposição ao PTZ). Uma hora

após a exposição ao PTZ, os níveis de mRNA dos genes de CREB, BDNF, c-fos, neuropeptídeo Y, cromogranina A, pcsk1nl, tac1, neurotensina e endotelina 1 foram up-regulados em comparação aos seus respectivos grupos controle (Fig. 43). Cinco horas após a exposição ao PTZ, os níveis de mRNA de BDNF, c-fos, POMC α (gene codificador para ACTH), tac1 e neurotensina foram aumentados. O nível de mRNA de CPA6 foi diminuído em relação ao grupo controle (Fig. 43). Um dia depois da exposição ao PTZ, apenas os níveis do mRNA de BDNF e pcsk1nl permaneceram aumentados de forma significativa (Fig. 43). Não foram detectadas alterações significativas nos níveis do mRNA dos genes que codificam os receptores e transportadores glutamatérgicos em nenhum dos tempos analisados.

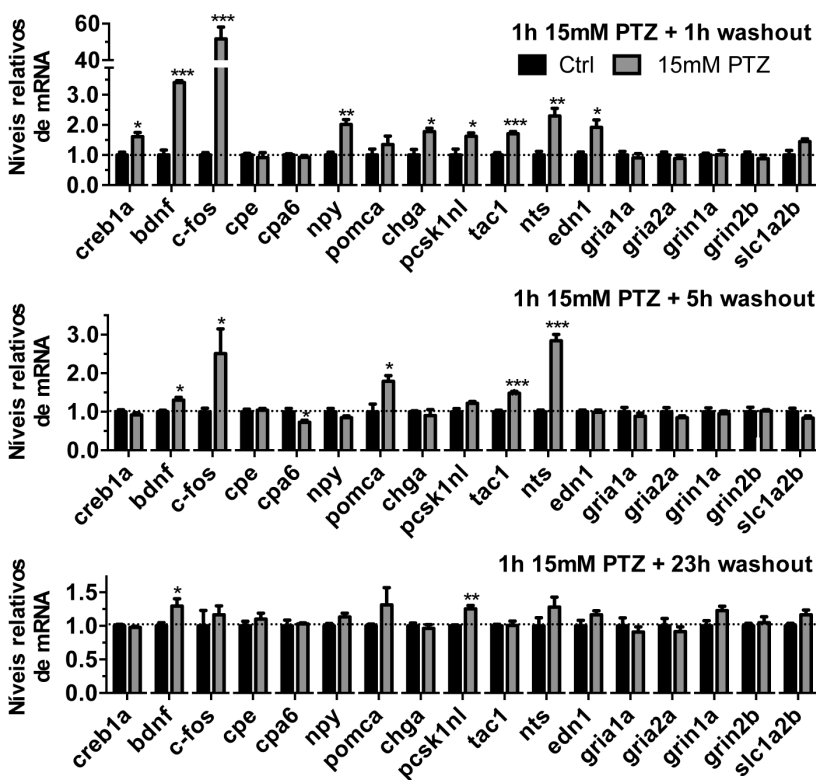


Figura 43. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type expostas a concentração de 15 mM de PTZ durante 1 h. As análises foram feitas 1, 5 e 23 h após o período de exposição ao PTZ. A análise estatística foi

realizada utilizando teste t de Student. $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$ em comparação com o respectivo grupo Ctrl-MO ($n=4$). As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.7 Exposição a pilocarpina altera a expressão de neuropeptídeos e moléculas de sinalização celular

Nós também testamos os efeitos da pilocarpina nas larvas de zebrafish. Wild-type zebrafish foram expostos a 60 mM de pilocarpina durante 1 h e os níveis de mRNA dos genes analisados 1, 5 e 23 h após a exposição a pilocarpina. Uma hora após a exposição a pilocarpina, os níveis de mRNA para c-fos, neurotensina e endotelina 1 foram aumentados quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Fig. 44). Cinco horas após a exposição a pilocarpina, apenas os níveis de mRNA de c-fos permaneceram significativamente aumentados (Fig. 44). Curiosamente, um dia depois da exposição à pilocarpina, os níveis de mRNA de c-fos permaneceram elevados, no entanto, os níveis de mRNA dos genes CREB, BDNF, neuropeptídeo Y, pcsk1nl e tac1 foram reduzidos (Fig. 44). Os níveis de mRNA dos genes da CPE, CPA6 e slc1a2b também foram reduzidos (Fig. 44). Os níveis de mRNA dos genes que codificam os receptores glutamatérgicos não foram alterados em nenhum dos tempos analisados.

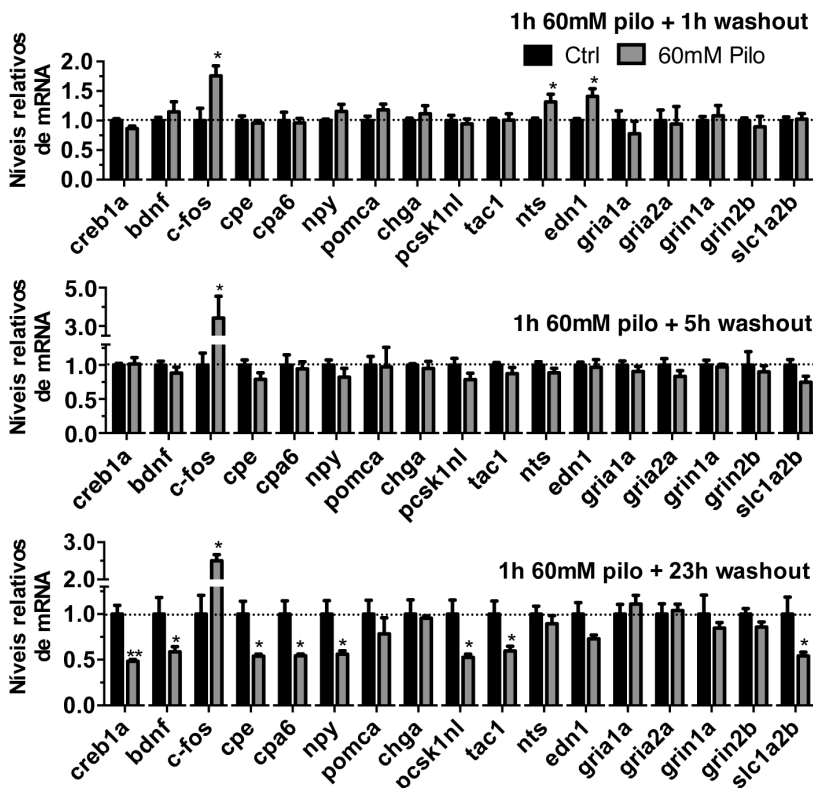


Figura 44. Níveis relativos de mRNA de neuropeptídeos, moléculas de sinalização intracelular e subunidades de receptores neurais em larvas wild-type expostas a concentração de 60 mM de pilocarpina durante 1 h. As análises foram feitas 1, 5 e 23 h após o período de exposição a pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$ em comparação com o respectivo grupo Ctrl-MO ($n=4$). As barras de erro mostram E.P.M.

5.6.8 Pré-tratamento com 60 mM de pilocarpina reduz as crises convulsivas induzidas por PTZ 2,5 mM

Com base na observação de que muitos dos genes alterados pelo knockdown de CPA6 também foram alterados 1 dia após o tratamento com pilocarpina 60 mM (diminuição de BDNF, CPE, CPA6, neuropeptídeo Y, pcsk1nl, tac1 e slc1a2b), nós buscamos investigar se os animais pré-tratados com pilocarpina mostrariam uma sensibilidade

reduzida ao comportamento de natação convulsiva induzido por PTZ, como observado nas larvas knockdown para CPA6. A resposta comportamental dos animais expostos ao PTZ 2,5 mM, foi avaliada 23 horas após o tratamento com pilocarpina 60mM. As larvas de zebrafish pré-tratadas com pilocarpina (1 h) e, em seguida, expostas ao PTZ 2,5 mM mostraram uma diminuição nos episódios de crise convulsiva durante os 18 minutos avaliados [$F(1,12) = 9,13, p < 0,001$] (Fig. 45A). Também foi encontrado um aumento no tempo de latência para a primeira crise convulsiva após exposição ao PTZ (teste t de Student, $p < 0,01$), (Fig. 45B). Estes efeitos comportamentais foram semelhantes aos observados nas larvas injetadas com CPA6-MO2 ou CPA6-MO4 e expostas ao PTZ. O pré-tratamento com 60 mM de pilocarpina não teve efeito sobre a atividade locomotora dos animais re-expostos em seguida a pilocarpina 15 mM (Fig. 45C).

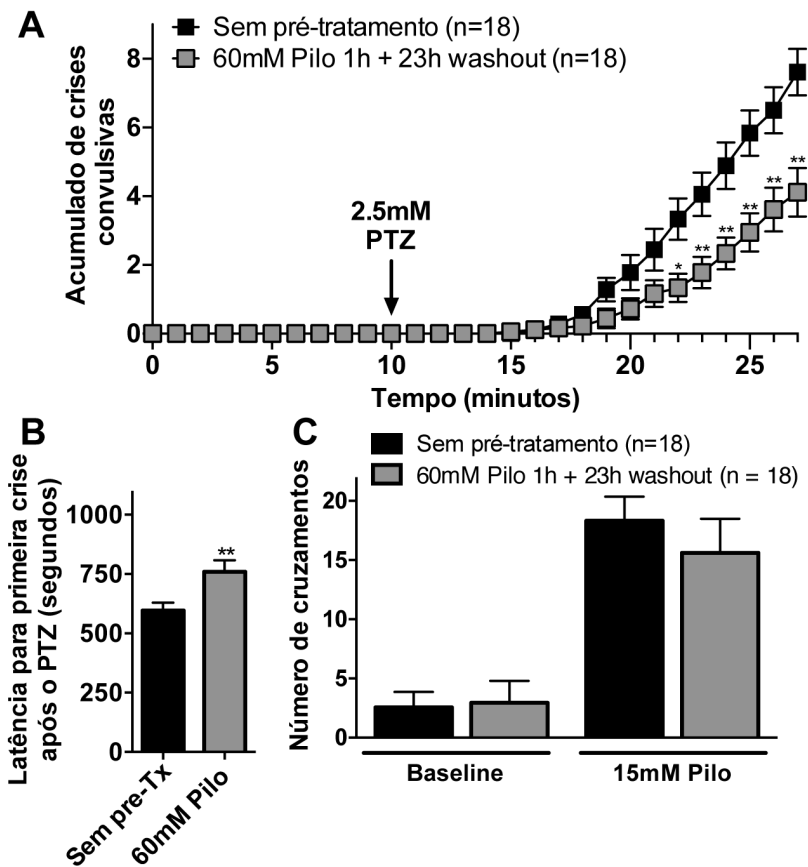


Figura 45. Análise comportamental de larvas de zebrafish pré-tratadas com pilocarpina 60 mM por 1h, re-expostas ao PTZ e a pilocarpina 23 h depois. Larvas wild-type foram divididas em dois grupos, o primeiro grupo foi exposto a 60 mM de pilocarpina durante 1 h (pré-tratamento), enquanto o segundo grupo não foi tratado com a droga. Após um período de 23 h adicionais, os animais foram re-expostos as concentrações de 2,5 mM de PTZ e 15 mM de pilocarpina, e os episódios de crise convulsiva e a atividade locomotora foi avaliada. (A) Acumulado de crises convulsivas em larvas (4 dpf) wild-type expostas ao PTZ. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido de Tukey HSD. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ comparado com o grupo sem pré-tratamento nos respectivos time-points. (B) Tempo de latência para a primeira crise convulsiva após a exposição ao PTZ. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. **, $p < 0,01$ em comparação com o grupo sem pré-tratamento. (C) Os animais pré-tratados com 60 mM de pilocarpina durante 1 h, foram re-respostos a 15 mM de pilocarpina e o número de cruzamentos

(atividade locomotora) foi avaliado durante 90 segundos no baseline e durante 90 segundos no período de exposição a droga. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. As barras de erro mostram E.P.M.

5.7 DISCUSSÃO

Alterações na condutância de canais iônicos, os quais exercem controle direto sobre a atividade elétrica, vem sendo há muito tempo relacionado com epilepsias genéticas. A sinalização peptidérgica através de receptores de neuropeptídeos pode alterar a excitabilidade neuronal por diversos mecanismos, incluindo a modulação da expressão e/ou condutância de canais iônicos. Diversas vias de sinalização peptidérgicas, bem como populações celulares peptidérgicas são alteradas na epilepsia, e estão relacionadas com a doença em seres humanos (BRUNSON, AVISHAI-ELINER e BARAM, 2002; OKUMURA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009). Evidências de vários estudos sugerem que os peptídeos são moléculas de sinalização celular poderosas com relação à regulação das crises convulsivas (PATRYLO *et al.*, 1999; BRUNSON, AVISHAI-ELINER e BARAM, 2002; TSENOV *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009).

CPA6 é uma enzima extracelular que pode processar neuropeptídeos por remoção de um ou mais aminoácidos (LYONS, CALLAWAY e FRICKER, 2008). No caso das encefalinas, por exemplo, CPA6 remove resíduos hidrofóbicos no C-terminal, inativando o peptídeo e impedindo a sua ligação aos receptores opióides. No entanto, no caso da angiotensina I, CPA6 remove resíduos hidrofóbicos e converte o peptídeo em angiotensina II, a forma que é ativa para os receptores de angiotensina. Assim, CPA6 tanto pode inativar como ativar diferentes neuropeptídeos *in vitro* (LYONS, CALLAWAY e FRICKER, 2008). Dada a relação entre mutações na enzima CPA6 e epilepsia (SALZMANN *et al.*, 2012; SAPIO *et al.*, 2012; SAPIO *et al.*, 2015), estudos visando elucidar os potenciais substratos de CPA6 poderiam lançar uma nova luz sobre a epileptogênese. O mRNA de CPA6 é expresso principalmente no bulbo olfatório de ratos e camundongos (FONTENELE-NETO *et al.*, 2005; HAWRYLYCZ *et al.*, 2012; CONSORTIUM, 2013), com um padrão mais amplo de expressão ao longo do desenvolvimento (FONTENELE-NETO *et al.*, 2005). Nos animais adultos, é provável que CPA6 processe neuropeptídeos nos terminais nervosos de neurônios olfatórios projetados para o córtex piriforme ou entorrinal, ambos os quais podem provocar convulsões na presença de estimulação anormal (PIREDDA e GALE, 1985;

BARTOLOMEI *et al.*, 2005). Níveis baixos, mas detectáveis de mRNA de CPA6 estão presentes no hipocampo humano e núcleos da rafe (SALZMANN *et al.*, 2012), e é possível que a atividade de CPA6 nestas regiões contribua para a excitabilidade elétrica.

A fim de compreender melhor o papel da enzima CPA6 na etiologia da epilepsia e na regulação da atividade neuronal, modelos animais que apresentem deficiência da enzima CPA6 podem se tornar ferramentas de estudo interessantes. Para este fim, geramos um modelo de crises convulsivas com larvas de zebrafish knockdown para CPA6. O presente estudo baseou-se em uma crescente literatura que institui a utilização do zebrafish no estudo de genes que podem modular a resposta a drogas indutoras de crises convulsivas (BARABAN *et al.*, 2005; BARABAN *et al.*, 2007; HORTOPAN, DINDAY e BARABAN, 2010). A descoberta de que o knockdown para CPA6 reduz a capacidade de resposta a dois indutores de crises convulsivas diferentes (Fig. 35 e Fig. 38), sem alteração concomitante na motilidade (Fig. 41) demonstra que o efeito do knockdown para CPA6 é seletivo para a resposta as drogas indutoras de crises convulsivas, e não está relacionado com alterações na motilidade ou déficits motores. Além disso, a descoberta de que as larvas geneticamente modificadas são menos sensíveis ao antagonismo de GABA-A (mecanismo de ação do PTZ) e a ativação muscarínica não seletiva da pilocarpina, sugere que a resistência das redes neuronais estão relacionadas a estímulos de entrada de diferentes receptores e sinais funcionais.

Nós postulamos que o mecanismo mais provável pelo qual o knockdown de CPA6 altere a excitabilidade neuronal esteja relacionado com modificações no processamento de neuropeptídeos. Com base nesta hipótese, são vários os argumentos que podem explicar o porquê dos humanos com mutações na enzima CPA6 estarem associadas a um grau elevado de crises convulsivas, enquanto as larvas de zebrafish knockdown para CPA6 apresentam uma menor susceptibilidade as crises convulsivas induzidas por PTZ e pilocarpina. Uma possível explicação, seria que a enzima CPA6 possa atuar sobre diferentes peptídeos em humanos e zebrafish, isto devido à falta de conservação na sequência dos peptídeos. Por exemplo, os peptídeos natriuréticos não conservaram os resíduos do C-terminal em zebrafish, apresentando uma sequência diferente em seres humanos (SHIMEKAKE *et al.*, 1992; POTTER *et al.*, 2009). Da mesma forma, os peptídeos produzidos a partir de proSAAS (pcsk1nl) são pouco conservados quando comparamos mamíferos e zebrafish (KUDO *et al.*, 2009). Assim, o conjunto de neuropeptídeos processados por CPA6 pode ser diferente

em zebrafish e mamíferos. É possível também que a circuitaria neuronal seja diferente, levando a diferentes padrões de inervação dos neurônios que liberam os peptídeos processados pela enzima CPA6. Finalmente, uma mutação pontual (observada em humanos) não é o mesmo que um knockdown. A nossa hipótese de trabalho é de que as mutações pontuais, associadas com as crises convulsivas e o fenótipo de perda de função da enzima, deveriam ser mimetizadas pelo knockdown de CPA6. Este pressuposto baseia-se na extensa caracterização da epilepsia associada a mutações genéticas em seres humanos, onde todas as variantes da doença apresentam níveis diminuídos da atividade de CPA6 na matriz extracelular *in vitro* (SALZMANN *et al.*, 2012; SAPIO *et al.*, 2012; SAPIO *et al.*, 2015). No entanto, é possível que as várias mutações pontuais, contribuam para um fenótipo de ganho de função, o que não poderia ser reproduzido pelo knockdown para CPA6.

Os níveis de mRNA de precursores de peptídeos estão correlacionados com os disparos de neurônios peptidérgicos. Dessa forma, a diminuição do mRNA de uma gama de moléculas precursoras de peptídeos (*npv*, *chga*, *psk1nl*, *tacl*, *nts* e *edn-1*) e CPE nas larvas de zebrafish knockdown para CPA6 podem estar envolvidos com uma redução nos padrões de disparo de alta frequência que liberam neuropeptídeos (Fig. 42). A queda de expressão do mRNA do gene que codifica a subunidade GluN1 do receptor NMDA, o transportador glial de glutamato EAAT2, BDNF e *c-fos* (marcadores de excitabilidade neural) sugere uma depressão na atividade da circuitaria ao longo do SNC, podendo assim explicar a resistência das larvas geneticamente modificadas as drogas indutoras de crises convulsivas (PTZ e pilocarpina). Como complemento a esta abordagem, nós examinamos a expressão destes genes em time-points específicos após a exposição ao PTZ (Fig. 43) ou pilocarpina (Fig. 44). Enquanto o mRNA de uma gama de genes que codificam neuropeptídeos aumentam intensamente após exposição ao PTZ, estes mesmos mRNAs diminuem 24 h após a estimulação com pilocarpina, indicando uma segunda fase do programa transcricional, fato que não ocorre após o tratamento com PTZ. A constatação de que CPA6 diminui durante pelo menos um time-point após a estimulação com PTZ ou pilocarpina, sugere que os níveis de mRNA da enzima CPA6 são regulados pela atividade neuronal. O fato do mRNA de CPE geralmente permanecer inalterado, apesar de ser necessária em todos os grânulos densos peptidérgicos, sugere que neste modelo nem todos os grânulos devem ser amplamente liberados. Cromogranina A (*chga*), que é altamente expressa em neurônios peptidérgicos, aumenta de forma aguda com a exposição ao PTZ, porém

permanece inalterada após o tratamento com pilocarpina, reforçando ainda mais a ideia de que um subconjunto de neurônios peptidérgicos pode sofrer alterações a longo prazo no seu conteúdo genético, provavelmente devido a alta frequência de disparos dentro desta população de células.

As larvas de zebrafish expostas a pilocarpina apresentaram um ligeiro aumento no mRNA de genes que codificam precursores de neuropeptídeos excitatórios (1 h), como a neurotensina (nts) e endotelina 1 (edn-1), sendo que a longo prazo (24 h) a maioria dos peptídeos analisados foram diminuídos, sugerindo um programa transcricional de duas fases, talvez, consistente com o modelo da pilocarpina em ratos, onde após um insulto os animais passam por um período de intensa reorganização neural até atingirem a epilepsia crônica (GOTO *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). A expressão de endotelina-1 foi alterada por PTZ e pilocarpina, e estudos já demonstraram que a injeção deste peptídeo, um potente vasoconstritor, provoca crises convulsivas em ratos (TSENOV *et al.*, 2007), sendo assim a indução deste gene na fase inicial é consistente com o seu papel na transmissão excitatória, além dos seus efeitos vasculares e oxidativos. A forma ativa do peptídeo endotelina-1 também é encontrada aumentada após crises convulsivas (BIAGINI, SALA e ZINI, 1995; JO *et al.*, 2011). A sequência deste peptídeo é altamente conservada no zebrafish quando comparado a seres humanos (SCHNEIDER *et al.*, 2007). Além disso, o resíduo de triptofano na porção C-terminal da endotelina-1 confere a este peptídeo propriedades que o colocam como um bom substrato para CPA6 (LYONS, CALLAWAY e FRICKER, 2008; LYONS e FRICKER, 2010).

Os efeitos do PTZ quanto ao nível de mRNA dos genes analisados neste trabalho, apontam na maioria dos casos para alterações transitórias, enquanto que a pilocarpina parece induzir alterações a nível genético duradouras, o que reflete presumivelmente, em diferenças na estimulação de redes neuronais. Em roedores, a administração sistêmica de pilocarpina induz crises límbicas que se tornam secundariamente generalizadas. Estes eventos são seguidos por um período de maturação epiléptica (após o insulto) e intensa reorganização neural antes de atingirem a epilepsia crônica (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; MELLO *et al.*, 1993; LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013; LOSCHER, HIRSCH e SCHMIDT, 2015). Com base na observação de que a pilocarpina é capaz de induzir alterações a longo prazo em redes de excitabilidade, as alterações neuroquímicas nos níveis de mRNA 24 h após a estimulação com pilocarpina podem explicar parcialmente as

alterações plásticas a longo prazo da atividade cerebral. A constatação de que os embriões pré-tratados com pilocarpina são resistentes ao tratamento com PTZ (Fig. 45) suporta a ideia de um período refratário em que o cérebro é menos susceptível a excitabilidade do antagonismo de GABA-A, após uma sequência de alterações neurais induzidas pelo agonista muscarínico. As alterações a nível transcricional identificadas neste estado, apresentam similaridades ao estado basal dos animais knockdown para CPA6, ao menos em ambas as condições os animais são resistentes ao estímulo excitatório. A figura 46 ilustra principais alterações a nível de mRNA encontradas nas larvas de zebrafish injetadas com CPA6-MO2 e pré-tratadas com pilocarpina.

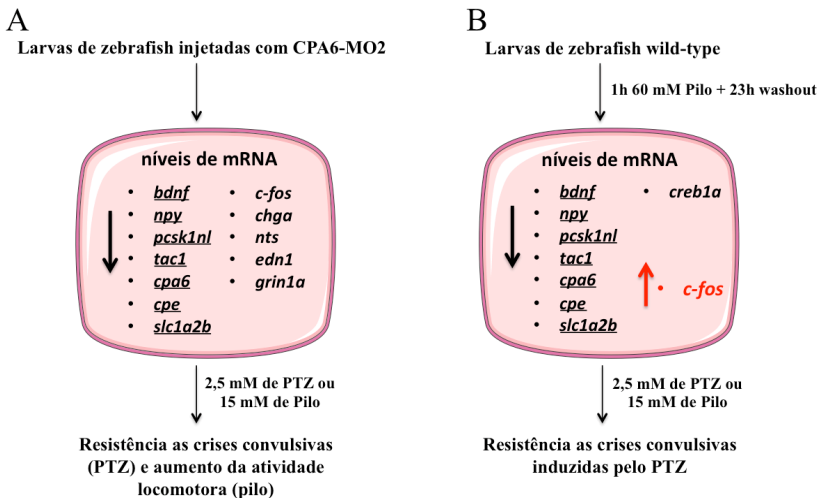


Figura 46. Resumo das principais alterações a nível de mRNA encontradas nas larvas de zebrafish injetadas com CPA6-MO2 (A) e larvas de zebrafish wild-type pré-tratadas por 1h com 60 mM + 23 h de washout (B). Como desfecho final nas duas condições, os animais apresentaram resistência as crises convulsivas induzidas pelo PTZ. Os animais injetados com CPA6-MO2 foram resistentes ao aumento da atividade locomotora induzido pela pilocarpina.

5.8 CONCLUSÃO

O presente trabalho suporta firmemente a presença de alterações na sinalização peptidérgica e supressão de inputs excitatórios após a perda de função da enzima CPA6 ou pré-tratamento do zebrafish com pilocarpina. Estas alterações parecem estar relacionadas com a resistência as crises convulsivas induzidas por PTZ e aumento da

atividade locomotora induzida pela pilocarpina. A partir destes achados, as análises futuras podem se restringir ao estudo de vias que são ativadas ou desativadas quando a atividade extracelular de CPA6 é reduzida por mutações genéticas. O objetivo final é identificar os neuropeptídeos que causam alterações na excitabilidade neural e aumentam a susceptibilidade as crises convulsivas, o que pode torná-los alvos para o desenvolvimento de novas terapias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da utilização de abordagens neuroquímicas e comportamentais, este estudo investigou alterações da circuitaria e maquinaria intracelular no SNC e a relação com transtornos neuropsiquiátricos que acometem os pacientes com epilepsia. As análises neuroquímicas e comportamentais foram realizadas em roedores submetidos ao modelo da pilocarpina e pacientes com ELTM-EH, refratários farmacologicamente e tratados cirurgicamente. Por fim, a utilização do zebrafish atrelado a poderosas ferramentas de manipulação genética serviu como modelo experimental para reprodução de crises convulsivas e estudo das epilepsias genéticas.

Demonstramos pela primeira vez um desequilíbrio na fosforilação do receptor AMPA e vias de sinalização intracelular em regiões específicas do hipocampo frente ao modelo da pilocarpina. Embora a sequência e combinações de eventos celulares provavelmente não sejam totalmente sobreponíveis, é bastante plausível que alterações de parte da maquinaria neuroquímica/celular utilizada para eventos fisiológicos esteja envolvida com o processo epileptogênico. Além disso, alterações neurocomportamentais que acometem os pacientes com ELTM-EH foram reproduzidas neste modelo animal, possivelmente relacionada com as modificações a nível molecular já identificadas nas fases de maturação e epilepsia crônica (LOPES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de técnicas de monitorização intracraniana para avaliar os pacientes com crises refratárias e a otimização dos procedimentos cirúrgicos permitiram a obtenção do tecido epiléptico humano, o qual constituiu uma importante ferramenta para investigação dos mecanismos moleculares nos pacientes epilépticos. Nosso trabalho demonstrou de maneira inédita os efeitos da dexametasona sobre a fosforilação da subunidade GluA1 do receptor AMPA na amígdala de pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente. Como balanço final, os mecanismos de potenciação sináptica parecem estar sendo alterados na amígdala dos pacientes que receberam dexametasona, hipótese respaldada pela queda de fosforilação de CaMKII e GluA1-Ser831. Os mecanismos regulatórios e as implicações destas alterações são complexas e devem ser investigadas, contudo, estes achados contribuem para o entendimento dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na resposta ao estresse induzido pela dexametasona na amígdala.

Por fim, utilizando o zebrafish como ferramenta para indução de crises convulsivas, demonstramos que os embriões geneticamente

modificados (knockdown para CPA6) apresentam resistência as drogas indutoras (PTZ e pilocarpina). Diferentemente dos achados em humanos, onde mutações no gene que codifica a enzima CPA6 está relacionado com distúrbios convulsivos. É complicado extrapolarmos uma comparação entre a doença em humanos e o modelo em zebrafish, porém os achados demonstram em ambas as situações o envolvimento da proteína CPA6 com o processo epileptogênico. Além disso, nossos resultados suportam firmemente a presença de alterações na sinalização peptidérgica e supressão de inputs excitatórios após a perda de função da enzima CPA6.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, S. J. *et al.* . Neuropsychiatric morbidity in focal epilepsy. **Br J Psychiatry**, v. 192, n. 6, p. 464-9, 2008.

ALMAWI, W. Y.; MELEMEDJIAN, O. K. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. **J Mol Endocrinol**, v. 28, n. 2, p. 69-78, 2002.

ALPER, K. *et al.* . Seizure incidence in psychopharmacological clinical trials: an analysis of Food and Drug Administration (FDA) summary basis of approval reports. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 4, p. 345-54, 2007.

ARAKI, Y. *et al.* . Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. **Neuron**, v. 85, n. 1, p. 173-89, 2015.

ARAÚJO, D. *et al.* . Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 8, p. 1354-9, 2006.

ARMIJO, J. A. *et al.* . Ion channels and epilepsy. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 15, p. 1975-2003, 2005.

ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1023S-5S, 2000.

BABB, T. L. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. **Adv Neurol**, v. 79, p. 763-79, 1999.

BABB, T. L. *et al.* . Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 351-63, 1991.

BANKE, T. G. *et al.* . Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 89-102, 2000.

BARABAN, J. M. *et al.* . Identification of p42 mitogen-activated protein kinase as a tyrosine kinase substrate activated by maximal electroconvulsive shock in hippocampus. **J Neurochem**, v. 60, n. 1, p. 330-6, 1993.

BARABAN, S. C. Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. **Curr Opin Neurol**, v. 20, n. 2, p. 164-8, 2007.

BARABAN, S. C. *et al.* . A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. **Epilepsia**, v. 48, n. 6, p. 1151-7, 2007.

BARABAN, S. C. *et al.* . Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 131, n. 3, p. 759-68, 2005.

BARBAZUK, W. B. *et al.* . The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**, v. 10, n. 9, p. 1351-8, 2000.

BARCO, A.; BAILEY, C. H.; KANDEL, E. R. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1520-33, 2006.

BARTOLOMEI, F. *et al.* . Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. **Epilepsia**, v. 46, n. 5, p. 677-87, 2005.

BAULAC, S. *et al.* . Fever, genes, and epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 7, p. 421-30, 2004.

BELEZA, P. Refractory epilepsy: a clinically oriented review. **Eur Neurol**, v. 62, n. 2, p. 65-71, 2009.

BEN, J. *et al.* . Brain MAPKs levels are differentially associated with seizures threshold and severity progression in pentylentetrazole-kindled mice. **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 9, p. 726-9, 2013.

BERG, A. T.; BLACKSTONE, N. W. Concepts in classification and their relevance to epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 70 Suppl 1, p. S11-9, 2006.

BERGHMANS, S. *et al.* . Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy Res**, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2007.

BERKELEY, J. L.; DECKER, M. J.; LEVEY, A. I. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular

signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. **J Neurochem**, v. 82, n. 1, p. 192-201, 2002.

BJERRUM O.J., HEEGAARD N.H.H. CRC handbook of immunoblotting of proteins. **CRC Press** 1, 1988.

BIAGINI, G.; SALA, D.; ZINI, I. Diethyldithiocarbamate, a superoxide dismutase inhibitor, counteracts the maturation of ischemic-like lesions caused by endothelin-1 intrastriatal injection. **Neurosci Lett**, v. 190, n. 3, p. 212-6, 1995.

BILL, B. R. *et al.* . A primer for morpholino use in zebrafish. **Zebrafish**, v. 6, n. 1, p. 69-77, 2009.

BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36931, 2012.

BLOSS, E. B.; HUNTER, R. G. Hippocampal kainate receptors. **Vitam Horm**, v. 82, p. 167-84, 2010.

BOLDIZSAR, F. *et al.* . Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 521-6, 2010.

BONAN, C. D. *et al.* . Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 39, n. 3, p. 229-38, 2000.

BOWERY, N. G. Metabotropic GABA(B) receptors cloned at last. **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 4, p. 103, 1997.

BRACEY, J. M. *et al.* . Prolonged seizure activity leads to increased Protein Kinase A activation in the rat pilocarpine model of status epilepticus. **Brain Res**, v. 1283, p. 167-76, 2009.

BRANDT, C. *et al.* . Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 30, n. 25, p. 8602-12, 2010.

- BRITO, V. B. *et al.* . Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. **Brain Res Bull**, v. 68, n. 6, p. 414-8, 2006.
- BRODIE, M. J.; FRENCH, J. A. Management of epilepsy in adolescents and adults. **Lancet**, v. 356, n. 9226, p. 323-9, 2000.
- BRUNSON, K. L.; AVISHAI-ELINER, S.; BARAM, T. Z. ACTH treatment of infantile spasms: mechanisms of its effects in modulation of neuronal excitability. **Int Rev Neurobiol**, v. 49, p. 185-97, 2002.
- BUCKINGHAM, S. C.; ROBEL, S. Glutamate and tumor-associated epilepsy: glial cell dysfunction in the peritumoral environment. **Neurochem Int**, v. 63, n. 7, p. 696-701, 2013.
- BURNS, J. D. *et al.* . Intensive care management of acute ischemic stroke. **Emerg Med Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 713-44, 2012.
- BYLER, D. L. *et al.* . Rapid onset of hippocampal atrophy in febrile-infection related epilepsy syndrome (FIRES). **J Child Neurol**, v. 29, n. 4, p. 545-9, 2014.
- CALLONI, G. W. *et al.* . Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 141-5, 2005.
- CAMPBELL, P. D. *et al.* . Unique function of Kinesin Kif5A in localization of mitochondria in axons. **J Neurosci**, v. 34, n. 44, p. 14717-32, 2014.
- CAMPBELL, S. L.; HABLITZ, J. J. Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex. **Neuroscience**, v. 127, n. 3, p. 625-35, 2004.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CARR, W. J. *et al.* . Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 90, n. 9, p. 821-8, 1976.

CARVALHO, A. L.; DUARTE, C. B.; CARVALHO, A. P. Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1245-55, 2000.

CASCINO, G. D. Surgical treatment for epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 60, n. 2-3, p. 179-86, 2004.

CASTRO, A. A. *et al.* . Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 229, n. 1, p. 208-15, 2012.

CAVALHEIRO, E. A. *et al.* . Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 1994.

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

CHEN, J. W.; WASTERLAIN, C. G. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 246-56, 2006.

CHEN, N. *et al.* . A macaque model of mesial temporal lobe epilepsy induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic Acid. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72336, 2013.

CLYNEN, E. *et al.* . Neuropeptides as targets for the development of anticonvulsant drugs. **Mol Neurobiol**, v. 50, n. 2, p. 626-46, 2014.

CONSORTIUM, G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nat Genet**, v. 45, n. 6, p. 580-5, 2013.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v. 129, n. Pt 7, p. 1659-73, 2006.

- COPPOLA, A.; MOSHE, S. L. Animal models. **Handb Clin Neurol**, v. 107, p. 63-98, 2012.
- CORDOVA, F. M. *et al.* . Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res**, v. 998, n. 1, p. 65-72, 2004.
- CORNAGGIA, C. M. *et al.* . Correlation between cognition and behavior in epilepsy. **Epilepsia**, v. 47 Suppl 2, p. 34-9, 2006.
- COSTA, J. C. [Surgical treatment of epilepsies in children]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78 Suppl 1, p. S28-39, 2002.
- COSTA, M. S. *et al.* . Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. **Neurosci Lett**, v. 356, n. 1, p. 41-4, 2004.
- CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.
- CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 3, p. 327-35, 2001.
- D'AMBROSIO, R. The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis. **Pharmacol Ther**, v. 103, n. 2, p. 95-108, 2004.
- DANTZER, R. *et al.* . Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-8, 1987.
- DE ALMEIDA, R. M.; CABRAL, J. C.; NARVAES, R. Behavioural, hormonal and neurobiological mechanisms of aggressive behaviour in human and nonhuman primates. **Physiol Behav**, v. 143, p. 121-35, 2015.
- DELORENZO, R. J.; SUN, D. A.; DESHPANDE, L. S. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. **Pharmacol Ther**, v. 105, n. 3, p. 229-66, 2005.

DELVECCHIO, C.; TIEFENBACH, J.; KRAUSE, H. M. The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. **Assay Drug Dev Technol**, v. 9, n. 4, p. 354-61, 2011.

DERKACH, V. A. *et al.* . Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 2, p. 101-13, 2007.

DETOUR, J. *et al.* . A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 499-508, 2005.

DI MAIO, R. *et al.* . Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 3, p. 482-95, 2011.

DIN, N. *et al.* . The function of GluR1 and GluR2 in cerebellar and hippocampal LTP and LTD is regulated by interplay of phosphorylation and O-GlcNAc modification. **J Cell Biochem**, v. 109, n. 3, p. 585-97, 2010.

DONG, Z.; BODE, A. M. Dialogue between ERKs and JNKs: friendly or antagonistic? **Mol Interv**, v. 3, n. 6, p. 306-8, 2003.

DOS SANTOS, J. G., JR. *et al.* . Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 37-48, 2005.

DOS SANTOS, V. V. *et al.* . Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid-beta (A β (1-40)) administration in mice. **Behav Brain Res**, v. 244, p. 107-15, 2013.

DUDEK, F. E. *et al.* . The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 53-65, 2002.

EDDINS, D. *et al.* . Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure: comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. **Neurotoxicol Teratol**, v. 32, n. 1, p. 99-108, 2010.

EDWARDS, J. G.; MICHEL, W. C. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. **J Comp Neurol**, v. 454, n. 3, p. 294-309, 2002.

EGAN, R. J. *et al.* . Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 205, n. 1, p. 38-44, 2009.

ELICEIRI, B. P.; GONZALEZ, A. M.; BAIRD, A. Zebrafish model of the blood-brain barrier: morphological and permeability studies. **Methods Mol Biol**, v. 686, p. 371-8, 2011.

ENGEL J., PEDLEY T.A. Introduction: What is epilepsy? In: ENGEL J, PEDLEY TA, editors. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. First ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven**. Chap 1-7, 1997.

ENGEL, J., JR. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-52, 2001.

ENGEL, J., JR.; INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST, E. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-803, 2001.

ENGEL, J., JR.; WILSON, C.; BRAGIN, A. Advances in understanding the process of epileptogenesis based on patient material: what can the patient tell us? **Epilepsia**, v. 44 Suppl 12, p. 60-71, 2003.

ENGELBORGHS, S.; D'HOOGHE, R.; DE DEYN, P. P. Pathophysiology of epilepsy. **Acta Neurol Belg**, v. 100, n. 4, p. 201-13, 2000.

ESTEBAN, J. A. *et al.* . PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 136-43, 2003.

ESTEBAN, N. V.; YERGEY, A. L. Cortisol production rates measured by liquid chromatography/mass spectrometry. **Steroids**, v. 55, n. 4, p. 152-8, 1990.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2009.

FAURE, J. B. *et al.* . A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: effects of carisbamate administration during status epilepticus. **Epilepsia**, v. 54, n. 7, p. 1203-13, 2013.

FAURE, J. B. *et al.* . Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 5, p. 644-53, 2014.

FEDDERSEN, B. *et al.* . On the psychopathology of unilateral temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 6, n. 1, p. 43-9, 2005.

FERANDO, I.; MODY, I. GABAA receptor modulation by neurosteroids in models of temporal lobe epilepsies. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 9, p. 89-101, 2012.

FERNANDES, P. T. *et al.* . Epilepsy stigma perception in an urban area of a limited-resource country. **Epilepsy Behav**, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2007.

FERNANDES, M.J.S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados**. vol. 27, p.85-98, 2013.

FERNANDO, A. B.; MURRAY, J. E.; MILTON, A. L. The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. **Front Behav Neurosci**, v. 7, p. 190, 2013.

FISHER, R. S. *et al.* . Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, 2005.

FLAVELL, S. W.; GREENBERG, M. E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 31, p. 563-90, 2008.

FONTENELE-NETO, J. D. *et al.* . Identification and distribution of mouse carboxypeptidase A-6. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 137, n. 1-2, p. 132-42, 2005.

FRITSCHY, J. M. Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. **Front Mol Neurosci**, v. 1, p. 5, 2008.

FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J. D.; MARTIN, L. J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. **J Neurosci**, v. 17, n. 21, p. 8363-75, 1997.

GAITATZIS, A.; TRIMBLE, M. R.; SANDER, J. W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand**, v. 110, n. 4, p. 207-20, 2004.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. [Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, n. 4, p. 323-8, 2005.

GOLDENBERG, M. M. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment. **P T**, v. 35, n. 7, p. 392-415, 2010.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 5, p. 504-12, 2004.

GOTO, E. M. *et al.* . Akt pathway activation and increased neuropeptide Y mRNA expression in the rat hippocampus: implications for seizure blockade. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 169-76, 2010.

GRAY, E. E. *et al.* . Inhibitory interactions between phosphorylation sites in the C terminus of alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-type glutamate receptor GluA1 subunits. **J Biol Chem**, v. 289, n. 21, p. 14600-11, 2014.

GROTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LOSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Exp Neurol**, v. 207, n. 2, p. 329-49, 2007.

GROTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LOSCHER, W. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. **Exp Neurol**, v. 213, n. 1, p. 71-83, 2008.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 9, p. 717-24, 2002.

GUARNIERI, R. *et al.* . Do psychiatric comorbidities predict postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy surgery? **Epilepsy Behav**, v. 14, n. 3, p. 529-34, 2009.

GUIPPONI, M. *et al.* . Galanin pathogenic mutations in temporal lobe epilepsy. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 11, p. 3082-91, 2015.

GUTIERREZ-DELICADO, E.; SERRATOSA, J. M. Genetics of the epilepsies. **Curr Opin Neurol**, v. 17, n. 2, p. 147-53, 2004.

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

HAWRYLYCZ, M. J. *et al.* . An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. **Nature**, v. 489, n. 7416, p. 391-9, 2012.

HEINRICHS, S. C.; SEYFRIED, T. N. Behavioral seizure correlates in animal models of epilepsy: a road map for assay selection, data interpretation, and the search for causal mechanisms. **Epilepsy Behav**, v. 8, n. 1, p. 5-38, 2006.

HELMSTAEDTER, C.; KOCKELMANN, E. Cognitive outcomes in patients with chronic temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47 Suppl 2, p. 96-8, 2006.

HENKE, P. G. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. **Brain Res Bull**, v. 25, n. 5, p. 691-5, 1990.

HENLEY, J. M.; WILKINSON, K. A. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 11-27, 2013.

HERMAN, S. T. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. **Neurology**, v. 59, n. 9 Suppl 5, p. S21-6, 2002.

HESDORFFER, D. C. *et al.* . Depression and suicide attempt as risk factors for incident unprovoked seizures. **Ann Neurol**, v. 59, n. 1, p. 35-41, 2006.

HOLMES, G. L. *et al.* . Seizure-induced memory impairment is reduced by choline supplementation before or after status epilepticus. **Epilepsy Res**, v. 48, n. 1-2, p. 3-13, 2002.

HORTOPAN, G. A.; DINDAY, M. T.; BARABAN, S. C. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. **Dis Model Mech**, v. 3, n. 3-4, p. 144-8, 2010.

HUMMEL, T. *et al.* . Olfactory bulb volume in patients with temporal lobe epilepsy. **J Neurol**, v. 260, n. 4, p. 1004-8, 2013.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

JEONG, J. Y. *et al.* . Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. **Brain Res Bull**, v. 75, n. 5, p. 619-28, 2008.

JIANG, W. *et al.* . Involvement of extracellular regulated kinase and p38 kinase in hippocampal seizure tolerance. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 4, p. 581-8, 2005.

JO, S. M. *et al.* . Up-regulation of endothelial endothelin-1 expression prior to vasogenic edema formation in the rat piriform cortex following status epilepticus. **Neurosci Lett**, v. 501, n. 1, p. 25-30, 2011.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, 2002.

KALEMENEV, S. V. *et al.* . Impairment of exploratory behavior and spatial memory in adolescent rats in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Dokl Biol Sci**, v. 463, n. 1, p. 175-7, 2015.

KALININ, V. V.; POLYANSKIY, D. A. Gender differences in risk factors of suicidal behavior in epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 6, n. 3, p. 424-9, 2005.

KAMPHUIS, P. J. *et al.* . Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. **FASEB J**, v. 17, n. 8, p. 911-3, 2003.

KANNER, A. M. Epilepsy and mood disorders. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 9, p. 20-2, 2007.

KANNER, A. M. Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. **Curr Opin Neurol**, v. 21, n. 2, p. 190-4, 2008.

KANNO, T. *et al.* . Regulation of AMPA receptor trafficking by O-glycosylation. **Neurochem Res**, v. 35, n. 5, p. 782-8,

KEMENY, A. A. Surgery for epilepsy. **Seizure**, v. 11 Suppl A, p. 461-5, 2002.

KIM, Y. D. *et al.* . Antiepileptic drug withdrawal after successful surgery for intractable temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 46, n. 2, p. 251-7, 2005.

KIMMEL, C. B. *et al.* . Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KOVAC, S.; WALKER, M. C. Neuropeptides in epilepsy. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 467-75, 2013.

KRALL, R. L. *et al.* . Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. **Epilepsia**, v. 19, n. 4, p. 393-408, 1978.

KUDO, H. *et al.* . Identification of proSAAS homologs in lower vertebrates: conservation of hydrophobic helices and convertase-inhibiting sequences. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1393-9, 2009.

KUMMER, A. *et al.* . [Frequency of epilepsy in psychiatric inpatients]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, n. 2, p. 165-6, 2005.

- LAURIE, D. J.; WISDEN, W.; SEEBURG, P. H. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. **J Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 4151-72, 1992.
- LAWRENCE, C. Advances in zebrafish husbandry and management. **Methods Cell Biol**, v. 104, p. 429-51, 2011.
- LEAL, R. B. *et al.* . Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 178, n. 1, p. 44-51, 2002.
- LEE, A.; POW, D. V. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 12, p. 1901-6, 2010.
- LEE, H. K. *et al.* . Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 955-9, 2000.
- LEE, H. K. *et al.* . Glycosylated neurotensin analogues exhibit sub-picomolar anticonvulsant potency in a pharmacoresistant model of epilepsy. **ChemMedChem**, v. 4, n. 3, p. 400-5, 2009.
- LEITE, J. P. *et al.* . Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? **Epilepsia**, v. 46 Suppl 5, p. 134-41, 2005.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnol Adv**, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.
- LERCHE, H. *et al.* . Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. **J Physiol**, v. 591, n. Pt 4, p. 753-64, 2013.
- LESSMAN, C. A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 93, n. 3, p. 268-80, 2011.
- LI, L. M. *et al.* . Demonstration Project on Epilepsy in Brazil: situation assessment. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65 Suppl 1, p. 5-13, 2007.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 353-67, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LONGRIGG, J. Epilepsy in ancient Greek medicine--the vital step. **Seizure**, v. 9, n. 1, p. 12-21, 2000.

LOPES, M. W. *et al.* . Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 87, p. 22-33, 2015.

LOPES, M. W. *et al.* . Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. **Exp Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 153-63, 2013.

LOPES, M. W. *et al.* . Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Res**, v. 37, n. 9, p. 1868-78, 2012.

LOSCHER, W. Genetic animal models of epilepsy as a unique resource for the evaluation of anticonvulsant drugs. A review. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 6, n. 9, p. 531-47, 1984.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, 2011.

LOSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 4, p. 668-700, 2010.

- LOSCHER, W.; HIRSCH, L. J.; SCHMIDT, D. The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy - Traditional view versus new concepts. **Epilepsy Behav**, v. 52, n. Pt A, p. 78-92, 2015.
- LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 3-16, 2002.
- LOWENBERG, M. *et al.* . Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 1025-9, 2008.
- LYONS, P. J.; CALLAWAY, M. B.; FRICKER, L. D. Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase. **J Biol Chem**, v. 283, n. 11, p. 7054-63, 2008.
- LYONS, P. J.; FRICKER, L. D. Substrate specificity of human carboxypeptidase A6. **J Biol Chem**, v. 285, n. 49, p. 38234-42, 2010.
- LYONS, P. J. *et al.* . Carboxypeptidase A6 in zebrafish development and implications for VIth cranial nerve pathfinding. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12967, 2010.
- LYONS, P. J.; SAPIO, M. R.; FRICKER, L. D. Zebrafish cytosolic carboxypeptidases 1 and 5 are essential for embryonic development. **J Biol Chem**, v. 288, n. 42, p. 30454-62, 2013.
- MAJAK, K.; PITKANEN, A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. **Epilepsy Behav**, v. 5 Suppl 1, p. S35-44, 2004.
- MARCHETTI, R. L. [Epilepsy in the shadow of Brazilian psychiatry]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 1, p. 67-8, 2004.
- MARQUES, T. E. *et al.* . Validation of suitable reference genes for expression studies in different pilocarpine-induced models of mesial temporal lobe epilepsy. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71892, 2013.
- MATHERN, G. W. *et al.* . The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 118 (Pt 1), p. 105-18, 1995.

MATHERN, G. W. *et al.* . Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels correlate with aberrant fascia dentata mossy fiber sprouting in the pilocarpine model of spontaneous limbic epilepsy. **J Neurosci Res**, v. 54, n. 6, p. 734-53, 1998.

MCBAIN, C. J.; MAYER, M. L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev**, v. 74, n. 3, p. 723-60, 1994.

MCKINNEY, R. A. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 1, p. 107-16, 2010.

MCNAMARA, J.O. Pharmacotherapy of the Epilepsies. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., ed. lit. – **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill. Chap. 19, p.501-25, 2006.

MEADOR, K. How to image memory in epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 6, n. 6, p. 189-91, 2006.

MEIKLE, A. W.; TYLER, F. H. Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. **Am J Med**, v. 63, n. 2, p. 200-7, 1977.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000.

MELLO, L. E. *et al.* . Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-95, 1993.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 4, p. 369-415, 1998.

MOSEWICH, R. K.; SO, E. L. A clinical approach to the classification of seizures and epileptic syndromes. **Mayo Clin Proc**, v. 71, n. 4, p. 405-14, 1996.

MULLER, C. J. *et al.* . Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. **Eur J Pharmacol**, v. 619, n. 1-3, p. 15-24, 2009a.

MULLER, C. J. *et al.* . Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. **Exp Neurol**, v. 219, n. 1, p. 284-97, 2009b.

NEBREDA, A. R.; PORRAS, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 6, p. 257-60, 2000.

NEWTON, C. R.; GARCIA, H. H. Epilepsy in poor regions of the world. **Lancet**, v. 380, n. 9848, p. 1193-201, 2012.

NOEBELS, J. L. The biology of epilepsy genes. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 599-625, 2003.

NUNES, J. C. *et al.* . Hippocampal sclerosis and ipsilateral headache among mesial temporal lobe epilepsy patients. **Seizure**, v. 20, n. 6, p. 480-4, 2011.

OBRENOVITCH, T. P.; URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 1, p. 39-87, 1997.

OH, M. C. *et al.* . Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. **J Biol Chem**, v. 281, n. 2, p. 752-8, 2006.

OKUMURA, A. *et al.* . ACTH therapy for generalized seizures other than spasms. **Seizure**, v. 15, n. 7, p. 469-75, 2006.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* . The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, 2008.

OTTERSEN, O.P., STORM-MATHISEN, J. Glutamate. In: BJÖRKLUND A., HÖKFELT T., eds. **Handbook of chemical neuroanatomy**. vol 18. Amsterdam: Elsevier, 2000.

PARENT, J. M. *et al.* . Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 59, n. 1, p. 81-91, 2006.

PARENT, J. M.; VALENTIN, V. V.; LOWENSTEIN, D. H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. **J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 3174-88, 2002.

PATRYLO, P. R. *et al.* . NPY inhibits glutamatergic excitation in the epileptic human dentate gyrus. **J Neurophysiol**, v. 82, n. 1, p. 478-83, 1999.

PAULI, C. *et al.* . Predictors of quality of life in patients with refractory mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 25, n. 2, p. 208-13, 2012.

PEARCE, J. M. Bromide, the first effective antiepileptic agent. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 412, 2002.

PERFILOVA, V. N.; TIURENKOV, I. N. [GABAC receptors: structure and functions]. **Eksp Klin Farmakol**, v. 74, n. 1, p. 45-9, 2011.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.

PIREDDA, S.; GALE, K. A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex. **Nature**, v. 317, n. 6038, p. 623-5, 1985.

PITKANEN, A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. **Epilepsia**, v. 51 Suppl 3, p. 2-17, 2010.

PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 2, p. 173-86, 2011.

PITKANEN, A. *et al.* . Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 67-83, 2002.

POPOLI, M. *et al.* . The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, 2012.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

POSSER, T. *et al.* . Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.

POST, R. M. Neurobiology of seizures and behavioral abnormalities. **Epilepsia**, v. 45 Suppl 2, p. 5-14, 2004.

POTTER, L. R. *et al.* . Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handb Exp Pharmacol**, n. 191, p. 341-66, 2009.

PREDIGER, R. D. *et al.* . The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p. 391-403, 2006.

PREDIGER, R. D. *et al.* . Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav Brain Res**, v. 153, n. 1, p. 149-57, 2004.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 6, p. 957-64, 2005.

PREDIGER, R. D.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors

modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behav Pharmacol**, v. 16, n. 4, p. 209-18, 2005.

PRIEL, M. R.; ALBUQUERQUE, E. X. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 40-6, 2002.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QUESADA, V. *et al.* . The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D239-43, 2009.

RAKHADE, S. N.; LOEB, J. A. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 2, p. 226-36, 2008.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, M. K. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur J Pharmacol**, v. 98, n. 3-4, p. 337-45, 1984.

REYNOLDS, E. H.; KINNIER WILSON, J. V. Psychoses of epilepsy in Babylon: the oldest account of the disorder. **Epilepsia**, v. 49, n. 9, p. 1488-90, 2008.

RICO, E. P. *et al.* . Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. **Brain Res Bull**, v. 81, n. 4-5, p. 517-23, 2010.

RICO, E. P. *et al.* . Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicol Teratol**, v. 33, n. 6, p. 608-17, 2011.

RINKWITZ, S.; MOURRAIN, P.; BECKER, T. S. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 2, p. 231-43, 2011.

ROBBINS, C. A.; TEMPEL, B. L. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 1, p. 134-41, 2012.

ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 180-6, 1997.

RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 289-313, 2009.

RONSONI, M. F. *et al.* . Mitochondrial Respiration Chain Enzymatic Activities in the Human Brain: Methodological Implications for Tissue Sampling and Storage. **Neurochem Res**, 2015.

ROSEMBERG, D. B. *et al.* . Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 613-23, 2012.

ROTHSTEIN, J. D. *et al.* . Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 675-86, 1996.

ROWLEY, N. M. *et al.* . Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochem Int**, v. 61, n. 4, p. 546-58, 2012.

RUBIO, C. *et al.* . In vivo experimental models of epilepsy. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 10, n. 4, p. 298-309, 2010.

SALZMAN, C. D.; FUSI, S. Emotion, cognition, and mental state representation in amygdala and prefrontal cortex. **Annu Rev Neurosci**, v. 33, p. 173-202, 2010.

SALZMANN, A. *et al.* . Carboxypeptidase A6 gene (CPA6) mutations in a recessive familial form of febrile seizures and temporal lobe epilepsy and in sporadic temporal lobe epilepsy. **Hum Mutat**, v. 33, n. 1, p. 124-35, 2012.

SALZMANN, A.; MALAFOSSE, A. Genetics of temporal lobe epilepsy: a review. **Epilepsy Res Treat**, p. 863702, 2012.

SANABRIA, E. R.; SU, H.; YAARI, Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Physiol**, v. 532, n. Pt 1, p. 205-16, 2001.

SANACORA, G. *et al.* . Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-37, 2008.

SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-70, 2003.

SANDERSON, J. L.; DELL'ACQUA, M. L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 321-36, 2011.

SANGEETHA, K. N.; LAKSHMI, B. S.; NIRANJALI DEVARAJ, S. Dexamethasone promotes hypertrophy of H9C2 cardiomyocytes through calcineurin B pathway, independent of NFAT activation. **Mol Cell Biochem**, 2015.

SANTOS, S. D. *et al.* . Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 105-25, 2009.

SAPIO, M. R.; FRICKER, L. D. Carboxypeptidases in disease: insights from peptidomic studies. **Proteomics Clin Appl**, v. 8, n. 5-6, p. 327-37, 2014.

SAPIO, M. R. *et al.* . Naturally occurring carboxypeptidase A6 mutations: effect on enzyme function and association with epilepsy. **J Biol Chem**, v. 287, n. 51, p. 42900-9, 2012.

SAPIO, M. R. *et al.* . Novel carboxypeptidase A6 (CPA6) mutations identified in patients with juvenile myoclonic and generalized epilepsy. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123180, 2015.

SAWYER, T. F.; HENGHELD, A. K.; PEREZ, W. A. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. **Behav Neurosci**, v. 98, n. 5, p. 908-13, 1984.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 7, n. 4, p. 348-54, 2007.

SCHMIDT, D.; BAUMGARTNER, C.; LOSCHER, W. Seizure recurrence after planned discontinuation of antiepileptic drugs in seizure-free patients after epilepsy surgery: a review of current clinical experience. **Epilepsia**, v. 45, n. 2, p. 179-86, 2004.

SCHNEIDER, L. A. *et al.* . Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. **J Exp Med**, v. 204, n. 11, p. 2629-39, 2007.

SCHWARZBOLD, M. L. *et al.* . Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 10, p. 1883-93, 2010.

SCORZA, F. A. *et al.* . The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 345-65, 2009.

SEINO, M. Classification criteria of epileptic seizures and syndromes. **Epilepsy Res**, v. 70 Suppl 1, p. S27-33, 2006.

SEO, J. *et al.* . Early deficits in social behavior and cortical rhythms in pilocarpine-induced mouse model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 241, p. 38-44, 2013.

SEPKUTY, J. P. *et al.* . A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6372-9, 2002.

SHAEFI, S.; HARKNESS, W. Current status of surgery in the management of epilepsy. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 1, p. 43-7, 2003.

SHETH, R. D. Intractable pediatric epilepsy: presurgical evaluation. **Semin Pediatr Neurol**, v. 7, n. 3, p. 158-65, 2000.

SHETH, R. D. *et al.* . Pediatric epilepsy surgery: neuroimaging, neuropsychology, and anticonvulsants. **Semin Pediatr Neurol**, v. 7, n. 3, p. 166-77, 2000.

SHIMEKAKE, Y. *et al.* . The role of the C-terminal region of rat brain natriuretic peptide in receptor selectivity. **FEBS Lett**, v. 309, n. 2, p. 185-9, 1992.

SHUKLA, G. D. *et al.* . Psychiatric manifestations in temporal lobe epilepsy: a controlled study. **Br J Psychiatry**, v. 135, p. 411-7, 1979.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 8, p. 795-816, 2002.

SLOVITER, R. S. Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the "latent period" and other concepts. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 9, p. 85-92, 2008.

SLOVITER, R. S.; BUMANGLAG, A. V. Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 3-15, 2013.

SLOVITER, R. S. *et al.* . Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. In: NOEBELS, J. L.; AVOLI, M., *et al.* (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. Bethesda (MD), 2012.

SPERK, G.; DREXEL, M.; PIRKER, S. Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 12, p. 29-31, 2009.

STAHN, C. *et al.* . Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. **Mol Cell Endocrinol**, v. 275, n. 1-2, p. 71-8, 2007.

STEINLEIN, O. K. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 400-8, 2004.

STERN, H. M.; ZON, L. I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 7, p. 533-9, 2003.

STEWART, O. *et al.* . Seizures and the regulation of astroglial gene expression. **Epilepsy Res Suppl**, v. 7, p. 197-209, 1992.

STEWART, A. M. *et al.* . Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? **Brain Res Bull**, v. 87, n. 2-3, p. 135-43, 2012.

STEWART, L. S.; LEUNG, L. S. Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. **Epilepsy Behav**, v. 4, n. 2, p. 153-60, 2003.

SUTULA, T. P. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. **Epilepsy Res**, v. 60, n. 2-3, p. 161-71, 2004.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 113-164, 2000.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem**, v. 76, n. 1, p. 1-10, 2001.

SWINKELS, W. A. *et al.* . Psychiatric comorbidity in epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 7, n. 1, p. 37-50, 2005.

TAKAHASHI, T. *et al.* . Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. **J Neurochem**, v. 83, n. 6, p. 1441-51, 2002.

TAKECHI, K. *et al.* . [Impaired memory following repeated pentylentetrazol treatments in kindled mice]. **Yakugaku Zasshi**, v. 132, n. 2, p. 179-82, 2012.

TANAKA, K. *et al.* . Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science**, v. 276, n. 5319, p. 1699-702, 1997.

TANG, F. R.; LOKE, W. K.; LING, E. A. Comparison of status epilepticus models induced by pilocarpine and nerve agents - a systematic review of the underlying aetiology and adopted therapeutic approaches. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 6, p. 886-99, 2011.

TAYLOR, M. R. *et al.* . A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4584-9, 2004.

TIBBLES, L. A.; WOODGETT, J. R. The stress-activated protein kinase pathways. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 10, p. 1230-54, 1999.

TSENOV, G. *et al.* . Intrahippocampal injection of endothelin-1: a new model of ischemia-induced seizures in immature rats. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 5, p. 7-13, 2007.

TURSKI, W. A. *et al.* . Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**, v. 321, n. 2, p. 237-53, 1984.

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

TZSCHENTKE, T. M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. **Amino Acids**, v. 23, n. 1-3, p. 147-52, 2002.

VAN OIJEN, M. *et al.* . Resective epilepsy surgery in childhood: the Dutch experience 1992-2002. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 10, n. 3, p. 114-23, 2006.

VASCONCELOS-DUENAS, D. [Epilepsy: an incapacitating disease? Propitiatory topic for a free program for epileptics]. **Gac Med Mex**, v. 137, n. 1, p. 73-8, 2001.

VERMOESEN, K. *et al.* . Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 3, p. 450-60, 2011.

VOGEL, G. Genomics. Sanger will sequence zebrafish genome. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1671, 2000.

WALZ, R. *et al.* . Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical structures. **Behav Brain Res**, v. 105, n. 2, p. 219-23, 1999.

WAXMAN, E. A.; LYNCH, D. R. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. **Neuroscientist**, v. 11, n. 1, p. 37-49, 2005.

WEI, S. *et al.* . Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 14954-64, 2002.

WESTERFIELD M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. **Eugene, OR: M. Westerfield**, 1993.

WHITEHEAD, G. *et al.* . Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. **Brain**, v. 136, n. Pt 12, p. 3753-65, 2013.

WHITLOCK, J. R. *et al.* . Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093-7, 2006.

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

WINDER, D. G.; SWEATT, J. D. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 461-74, 2001.

ZACCARA, G.; GANGEMI, P. F.; CINCOTTA, M. Central nervous system adverse effects of new antiepileptic drugs. A meta-analysis of placebo-controlled studies. **Seizure**, v. 17, n. 5, p. 405-21, 2008.

ZHAO, Q. *et al.* . Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. **Pediatr Res**, v. 55, n. 3, p. 498-506, 2004.

8 ANEXOS

8.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS A TESE (ABSTRACT)

“Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy.”

Neurochemistry International 87 (2015) 22–33

Contents lists available at ScienceDirect



Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci

Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy



Mark William Lopes ^a, Samantha Cristiane Lopes ^b, Ana Paula Costa ^c,
 Filipe Marques Gonçalves ^a, Débora Kurrie Rieger ^a, Tanara Vieira Peres ^c, Helena Eyng ^a,
 Rui Daniel Prediger ^{b,c}, Alexandre Paim Diaz ^a, Jean Costa Nunes ^d, Roger Walz ^{c,d,e},
 Rodrigo Bainy Leal ^{a,c,*}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^e Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário (HU), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2015
 Received in revised form 6 May 2015
 Accepted 7 May 2015
 Available online 14 May 2015

Keywords:

Epilepsy
 Pilocarpine
 Hippocampus
 AMPA receptor phosphorylation
 Signaling pathways

ABSTRACT

Disturbances in glutamatergic transmission and signaling pathways have been associated with temporal lobe epilepsy (TLE) in humans. However, the profile of these alterations within specific regions of the hippocampus and cerebral cortex has not yet been examined. The pilocarpine model in rodents reproduces the main features of TLE in humans. The present study aims to characterize specific alterations of the glutamatergic transmission and signaling pathways in the dorsal (DH) and ventral hippocampus (VH) and temporal cortex (Ctx) of male adult Wistar rats 60 days after pilocarpine treatment (chronic period). The western blotting analyzes show a decrease of AMPA glutamate receptor subunit (GluA1)-Ser⁸⁴⁵ phosphorylation; reduction of ERK1 and PKA activity; up-regulation of GFAP and down-regulation of the glutamate transporter EAAT2 expression in the DH. In contrast, in the VH it was observed a decrease of GluA1-Ser⁸⁴⁵ phosphorylation and JNKp54 and PKC activity. In the Ctx, only ERK1 phosphorylation/activity decreased. The level of GluA1-Ser⁸⁴⁵ phosphorylation and PKA activity (DH) and the level of GluA1-Ser⁸⁴⁵ phosphorylation and PKC activity (VH) appear to be correlated, respectively. These findings suggest a differential imbalance of the signaling pathways involved in the site-specific phosphorylation of AMPA receptor in the hippocampus. Furthermore, we suggest that dorsal hippocampus is probably more susceptible to the impairment of glutamate uptake and glucose, since only this area displayed a significant decrease of EAAT2 and increment of GFAP. Taken together, our study suggests that specific neurochemical alterations take place in hippocampal sub regions. This approach may be valuable for understanding the onset of seizures and the alterations of neuronal excitability in specific regions and may help to establish therapeutic targets for treatment of this neuropathology.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AMPAR, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; AP5, ammonium persulfate; BSA, bovine serum albumin; CaMKII α and β , Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α and β ; CaN, calcineurin; CNS, central nervous system; Ctx, temporal cortex; DH, dorsal hippocampus; EAAT1 and 2, excitatory amino acid transporters 1 and 2; ERK 1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; GABA, γ -aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluA1-Ser⁸⁴⁵, glutamate receptor subunit serine 831; GluA1-Ser⁸⁴⁵, glutamate receptor subunit serine 845; HRP, horseradish peroxidase; JNK1/2/3, c-Jun amino-terminal kinases 1–3; LumiGLO, luminol chemiluminescent substrate; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; OD, optic density; p38^{MAPK} α , β , γ and δ , p38 mitogen-activated protein kinase α , β , γ and δ ; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKC, protein kinase C; PPI, protein phosphatase 1; PPI α , protein phosphatase 1 (catalytic subunit); PPI β , protein phosphatase 2A; SDS, SDS; FBGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SE, Status epilepticus; SRS, spontaneous recurrent seizures; TBS-T, Tris-buffered saline with Tween; TBS, Tris-buffered saline; TLE, temporal lobe epilepsy; VH, ventral hippocampus.

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil - 88040-900. Tel.: +55 48 37215045; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: rbleal@gmail.com (R.B. Leal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.05.003>
 0197-0186/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

“Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy.”

Epilepsy & Behavior 55 (2016) 92–100



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yebeh

Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy



Mark William Lopes^a, Samantha Cristiane Lopes^b, Danúbia Bonfanti Santos^a, Ana Paula Costa^c,
Rilipe Marques Gonçalves^a, Nelson de Mello^d, Rui Daniel Prediger^{b,c}, Marcelo Farina^{a,c},
Roger Walz^{c,e}, Rodrigo Bains Leal^{a,c,*}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d Centro de Ciências da Saúde e do Esporte – CEHD, Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^e Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário (HU), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2015

Revised 25 November 2015

Accepted 2 December 2015

Available online xxxxx

Keywords:

Epilepsy

Pilocarpine model

Behavioral impairments

ABSTRACT

Epilepsy is a brain function disorder characterized by unpredictable and recurrent seizures. The majority of patients with temporal lobe epilepsy (TLE), which is the most common type of epilepsy, have to live not only with seizures but also with behavioral alterations, including anxiety, psychosis, depression, and impaired cognitive functioning. The pilocarpine model has been re-recognized as an animal model of TLE. However, there are few studies addressing behavioral alterations in the maturation phase when evaluating the time course of the epileptogenic process after pilocarpine administration. Therefore, the present work was designed to analyze the neurobehavioral impairments of male adult Wistar rats during maturation and chronic phases in the pilocarpine model of epilepsy. Behavioral tests included: open-field tasks, olfactory discrimination, social recognition, elevated plus maze, and the forced swimming test. The main behavioral alterations observed in both maturation and chronic phases of the pilocarpine model were olfactory and short-term social memory deficits and decrease in the immobility time in the forced swimming test. Moreover, increased anxiety-like responses were only observed in the maturation phase. These findings indicate that early behavioral impairments can be observed in the pilocarpine model during the maturation phase, and these behavioral deficits also occur during the acquired epilepsy (chronic phase). Several of the neurobehavioral impairments that are associated with epilepsy in humans were observed in the pilocarpine-treated rats, thus, rendering this animal model a useful tool to study neuroprotective strategies as well as neurobiological and psychopathological mechanisms associated with epileptogenesis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a brain function disorder characterized by unpredictable and recurrent seizures. Its prevalence in the general population is approximately 0.5–1% [1], reaching at least 50 million people worldwide [2]. Epilepsy can be caused by various precipitating events, such as traumatic brain injury (TBI), ischemic stroke, cerebral infections, or an initial/acute prolonged seizure (status epilepticus, SE) [3].

The majority of patients with epilepsy have to live not only with the seizures but also with many additional medical complications that may

be associated with epilepsies [4]. Temporal lobe epilepsy (TLE), the most common type of epilepsy, is frequently related to neurobehavioral alterations, such as anxiety, psychosis, depression, and impaired cognitive functioning [4–8]. Memory impairments in patients with TLE are related to hippocampal alterations, whereas the neurobiological mechanisms underlying the relationship between TLE and psychiatric disorders are poorly understood [5,7,9,10].

Animal models of epilepsy may help to enrich our understanding of the mechanisms subjacent the relationship between epilepsy and behavioral anomalies [11–13]. Systemic administration of pilocarpine in rodents reproduces the principal features of human TLE [14]. Pilocarpine induces limbic seizures that become secondarily generalized, advancing to SE, which lasts for several hours (acute period). In the traditional description of the epileptogenic process, the SE is followed by a latent “seizure-free” period (4–44 days, mean of 15 days) [14] and by a chronic period (after 45 days) characterized by the presence of spontaneous recurrent seizures (SRS) [14–19]. A widely accepted

Abbreviations: GABA, γ -aminobutyric acid; ip, intraperitoneal; Pilo, pilocarpine; RBD, ratio of investigation duration; SE, status epilepticus; SRS, spontaneous recurrent seizures; TBI, traumatic brain injury; TLE, temporal lobe epilepsy.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil. Tel.: +55 48 37215048; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: rbleal@gmail.com (R.B. Leal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.001>
1525-5050/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.