

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**ANÁLISE MOLECULAR DA MODULAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-
ANGIOTENSINA E CALICREÍNAS-CININAS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA**

Marília Gabriella Alves Goulart Pereira

Ribeirão Preto - 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marília Gabriella Alves Goulart Pereira

**ANÁLISE MOLECULAR DA MODULAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-
ANGIOTENSINA E CALICREÍNAS-CININAS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica.

Ribeirão Preto - 2007

Pereira, Marília Gabriella Alves Goulart

Análise molecular dos sistema Renina-Angiotensina e Calicreínas-Cininas em modelo experimental de epilepsia - Ribeirão Preto, 2007. 103 p.;

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP, Departamento de Bioquímica e Imunologia
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto

1-epilepsia; 2-Renina-Angiotensina; 3-Calicreínas-Cininas; 4-RT-PCR; 5-ELT

Dedico este trabalho...

A minha mãe, mulher batalhadora e forte,
meu exemplo. Minha maior
incentivadora...amor da minha vida.

Aos meus irmãos Carlos Vinícius e Marina
pela confiança, carinho e principalmente
companheirismo...amo vocês!

Agradecimentos

- Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto pela confiança depositada em mim, por sua grande paciência e pelas oportunidades sempre concedidas. Sua preocupação em formar bons pesquisadores e pensadores é um exemplo, e foi essencial para a construção do meu conhecimento científico.

- Ao meu co-orientador Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco pelas horas dispensadas com muita paciência na minha orientação. Agradeço também pelo seu entusiasmo e amor pela Neurociência que acaba por nos contagiar.

Agradeço a estes dois educadores e formadores de espíritos críticos pelo amor que sinto pelo meu trabalho e por me permitir enxergar diferentes dimensões que a pesquisa pode alcançar... dos processos moleculares aos aspectos sociais.

- Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira pelas perguntas sempre estimulantes e por disponibilizar seu laboratório e mais que tudo, sua mente brilhante.

Aos alunos Hugo pelo coleguismo e ao aluno Felipe pela amizade e pela disponibilidade de sempre em ajudar e tirar muitas dúvidas.

A ex-aluna, agora pós doc, Laura Letícia pela boa convivência e dicas experimentais e pessoais muito sensatas.

- Ao Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes pelas discussões científicas e por disponibilizar o laboratório.

As alunas Sami, Adriana e Letícia pela disposição de sempre ajudar e pelos muitos momentos de descontração.

- Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero pelas sugestões e discussões muito relevantes para realização deste trabalho e pela disponibilidade em participar como banca julgadora do mesmo.

- A Prof^a Dr^a Maria Cristina de Oliveira Salgado pelas discussões, sugestões, incentivos e também pela disponibilidade em fazer parte da banca julgadora deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório Osmar e Orlando e aos alunos Luiz, Zé Wilson, Disney pelo cafezinho maravilhoso e é também pelos pontos de vistas tão diferentes.

A aluna Christiane Becari por todo apoio e amizade, sugestões, discussões muitas vezes científicas e extremamente importantes para a realização do trabalho e outros tipos de discussões não menos importantes e sempre acalentadoras.

- Ao Prof. Dr. Renê Belebene e ao seu aluno Antônio pela ajuda nas horas de sufoco e pela troca de idéias.

- Ao Prof. Dr. Masaharu Ikegaki pelo incentivo de sempre e conselhos que me ajudaram a trilhar os caminhos para a pós-graduação.

- Ao pessoal do laboratório. Pedro e Lucas pela ajuda de sempre e momentos de descontração. Tassiele, colega recém chegada, mas que faz parte da boa convivência de sempre do laboratório. Rosanão, amiga querida, sempre sensata e disposta a ajudar em qualquer momento experimental ou não. Patty, colega de laboratório sempre disposta a ajudar (inclusive nos fins de semana fazendo gel), agregada da república e amiga querida de bons conselhos e atitudes (de ceder a

casa para uma amiga escrevendo a dissertação até a corrida atrás de xérox de última hora). Obrigada por tornarem nosso ambiente de trabalho tão prazeroso.

_ A Lúcia e a Odete pela organização e administração técnica do laboratório que tornou possível o bom andamento dos trabalhos e pelas gostosuras e mimos que nos faz sentir querido.

- Ao pessoal do laboratório de Neurologia e Neuroetologia Experimental: Flávio, Malu, Marcelo, Franco, Gabriel, Maira, Arthur, Olagide, Poliana, Simone, Chico, Fred, Helena e Hugo. Pessoas muito queridas sempre dispostas a me auxiliar tanto na parte técnica como na troca de idéias. Pessoal, vocês me ajudaram muito durante estes dois anos e com certeza são diretamente responsáveis pela construção do meu conhecimento no mundo da Neurociência.

- Ao Daniel Gitaí, Carolina Baraldi e Sandra Yasuyo Fukada pela colaboração experimental e teórica neste trabalho e pela amizade.

_ Ao José Antônio Cortes de Oliveira pela paciência, pela disposição sempre em ajudar (experimentos no fim de semana, estatística, etc) e pela competência em manter a cepa WAR e, é claro pela amizade.

- A todos os funcionários e técnicos do departamento de Bioquímica. Em especial gostaria de agradecer a Ivone, Lúcia, Ronaldo, Téia e Victor, pela assistência e competência em tornar nossa vida de pós-graduando menos burocrática e é claro, obrigada pela amizade.

- A toda minha família, tios e primos, pelo apoio constante e grande carinho. Especialmente Tilulu, Tilivar e Vó Cirene pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida e principalmente durante minha trajetória acadêmica.

- A minha família Ribeirinha: Fabiana, Flor, Marcos e Rose; pessoas muito especiais que me ensinaram muitas coisas além da ciência da convivência e ouviram com paciência, ou não, minhas lamentações e empolgações. E aos agregados desta família pelos momentos de alegria: Reinaldo, Clarissa, Andréia, Tânia, Valéria e Júlio, Drous e Tito.

- Aos outros amigos da pós-graduação pela convivência agradável e por tornar essa fase da vida mais leve e descontraída: Maria Letícia, Cacá, Japonês, Pancinha, Ruither, Shirley, Livia, Lucas, Mané, Ana Paula, Vivi, Carlinha, Roberto, Stéfani.

- Aos amigos de sempre que contribuíram muito durante meu caminho até aqui e que deixa minha nostalgia muito gostosa: Willy, Tutuca, Carlos, Thiago, Carol, Marina, Érika e Márcio (e a lindinha da Maria Fernanda).

- A minha mãe e aos meus irmãos sempre!!!

- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

- A CAPES, CNPq e FAPESP, por apoiar financeiramente a realização deste trabalho.

Índice

Resumo	x
Abstract	xii
Lista de abreviaturas	xiv
1. Introdução	17
1.1. As epilepsias	17
1.2. Modelos experimentais em epilepsia	19
1.3. O Sistema Renina-Angiotensina	24
1.4. O Sistema Renina-Angiotensina e as Epilepsias	28
1.5. O Sistema Caliceínas-Cininas	29
1.6. O Sistema Caliceínas-Cininas e as Epilepsias	31
1.7. A enzima conversora e a interligação entre o SRA e o SCC	33
2. Objetivos	35
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Animais	36
3.2. Reagentes	36
3.3. Estimulação acústica	37
3.4. Dissecção dos tecidos do SNC	39
3.5. Isolamentos do coração	39
3.6. Extração de RNA total	40
3.7. Tratamento das amostras com DNAase	42
3.8. Transcrição Reversa e Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR)	42
3.8.1. Desenho de oligonucleotídeos	42
3.8.2. Transcrição reversa (RT).	43
3.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
3.8.4. Eletroforese em gel de agarose e análise semi-quantitativa	45
3.9. Real-time PCR	46
3.9.1. Desenho de oligonucleotídeos	46
3.9.2. Real-Time PCR	47
3.10. Análises estatísticas	48

4. Resultados	49
4.1. Alterações inatas da cepa WAR	49
4.1.1. Análise de receptores do Sistema Renina-Angiotensina	49
4.1.2. Análise de receptores do Sistema Calicreínas-Cininas	53
4.1.3. Análise da enzima conversora de angiotensina (ECA)	53
4.2. Estimulação acústica dos animais	57
4.3. Alterações centrais no modelo de Epilepsia do Lobo Temporal na cepa WAR (abrasamento audiológico)	60
4.3.1. Análise dos receptores do Sistema Renina-Angiotensina no hipocampo	60
4.3.2. Análise dos receptores do Sistema Calicreínas-Cininas no hipocampo	65
4.3.3. Análise da expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) no hipocampo	65
4.3.4. Análise de citocinas no hipocampo	69
4.4. Alterações periféricas no modelo de Epilepsia do Lobo Temporal na cepa WAR (abrasamento audiológico)	72
5. Discussão	79
6. Conclusões	92
7. Referências Bibliográficas	93

Resumo

As epilepsias são distúrbios neurológicos caracterizados pela hiperexcitabilidade do sistema nervoso central (SNC), decorrente do desequilíbrio entre mecanismos excitatórios e inibitórios. Estudos dos sistemas Renina-Angiotensina (SRA) e Calicreínas-Cininas (SCC) são classicamente voltados aos mecanismos de controle da pressão arterial e processos inflamatórios. Porém, no SNC estes sistemas são envolvidos em processos como início e propagação da excitabilidade e, conseqüentemente, podem estar envolvidos no disparo ou desenvolvimento das epilepsias. A cepa *Wistar audiogenic rat* (WAR) foi o modelo experimental de epilepsia escolhido devido à sua analogia para dois tipos de epilepsia com alta taxa de ocorrência entre humanos: as epilepsias generalizadas tônico-clônicas (modeladas por crises audiogênicas agudas, dependentes de substratos do tronco cerebral) e a epilepsia do lobo temporal (ELT) (modeladas pelo *kindling* ou abrasamento audiogênico, o qual, após repetição de crises audiogênicas, induz recrutamento de regiões límbicas).

Através das técnicas de RT-PCR foram analisadas os níveis de expressões dos mRNAs de componentes dos SRA e SCC em regiões do SNC relacionadas ao disparo e à propagação da hiperexcitabilidade no SNC. Para uma análise comparativa, os mesmos componentes foram também analisados a partir de tecido cardíaco. Os resultados obtidos mostram que: (i) todos os componentes do SRA (a enzima conversora de angiotensina (ECA) e os receptores AT₁, AT₂ e mas)

assim como do SCC (receptores B₁ e B₂) não são expressos em animais recém nascidos da cepa WAR quando comparados a Wistar; (ii) todos os componentes do SRA e do SCC analisados apresentam uma regulação positiva em WARs com ELT quando comparados aos WAR naïve; (iii) as citocinas IL-1 β e a IL-10 não estão moduladas na ELT e, (iv) os componentes do SRA e do SCC possuem uma modulação distinta no coração quando comparada àquela observada nos tecidos do SNC.

Nossos dados indicam que a suscetibilidade às crises audiogênicas da cepa WAR não está relacionada a uma diferença inata da expressão dos componentes dos SRA e SCC, uma vez que não foi observada modulação destes componentes em animais recém nascidos. Entretanto, a participação destes componentes possivelmente esteja relacionada a epileptogênese ou ao estabelecimento da ELT através de processos plásticos e excitatórios de longo prazo.

Abstract

Epilepsies are neurological disorders characterized by hyper-excitability of the central nervous system (CNS), as a consequence of an unbalance between excitatory and inhibitory signals. Studies of the Renin-Angiotensin (RAS) and Kallikrein-Kinin (KKS) systems are classically linked to mechanisms of blood pressure control and inflammatory processes. Nevertheless, in the CNS those systems are involved in processes such as triggering and transduction of excitability and, therefore, they may be involved with the initiation or establishment of epilepsies. The *Wistar audiogenic rat* (WAR) strain was the animal model of choice due to its analogy to two types of human's epilepsies with high occurrence: the generalized tonic-clonic epilepsies (modeled by acute audiogenic seizures, dependent on brainstem substrates) and the temporal lobe epilepsy (TLE) (modeled by audiogenic *kindling*, which after audiogenic seizures repetition induces limbic regions recruitment).

Using the RT-PCR technique, the mRNA expression levels of RAS and KKS components were analyzed in CNS regions related to triggering and transduction of hyper-excitability. Aiming at a comparative analysis, the same components were also analyzed in heart tissue. The results showed that: (i) all the components of RAS (angiotensin converting enzyme (ACE), AT₁, AT₂ and *mas* receptors) as well as the components from KKS (B₁ and B₂ receptors) were not differentially expressed when compared to the Wistars [control rats]; (ii) all the components

from the RAS and KKS presented an up-regulation in WARs with TLE when compared to the naïve WARs; (iii) the cytokines IL-1 β and IL-10 were not modulated in WARs with TLE; (iv) the RAS and KKS components have a different modulation in the heart when compared to that observed in tissues from the CNS.

Our data indicate that the susceptibility to the audiogenic seizures in the WAR strain is not related to an innate difference in the expression levels of RAS and KKS components since no modulation of such components was observed in new-born animals. However, the participation of those components is possibly related to epileptogenesis or the establishment of TLE by long term plastic and excitatory processes.

Lista de abreviaturas

Ang (1-7)	Angiotensina (1-7) → Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro
AngI	Angiotensina I → Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
AngII	Angiotensina II → Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AT ₁	Receptor de angiotensina tipo I
AT ₂	Receptor de angiotensina tipo II
B ₁	Receptor de cininas do tipo 1 (des Arg ⁹ -bradicinina e des Arg ¹⁰ -calidina)
B ₂	Receptor de cininas do tipo 2 (bradicinina e calidina)
BK	Bradicinina
B ₁ K0	<i>knockout</i> para o receptor B ₁
B ₂ K0	<i>knockout</i> para o receptor B ₂
cDNA	DNA complementar
Ct	Ciclo limiar
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
Des Arg ⁹ -BK	Des Arg ⁹ -bradicinina
Des Arg ⁹ -KD	Des Arg ⁹ -calidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos tri-fosfatos
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2

EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELT	Epilepsia do lobo temporal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPCR	Proteínas acopladas a proteína G
Hz	Hertz
i.c.v.	Intracerebroventricular
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina 10
IP3	Inositol trisfosfato
KD	Calidina
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (proteínas quinase ativadoras da mitose)
<i>Mas</i>	Receptor de angiotensina (1-7)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
nm	Nanômetros
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C

PTZ	Pentilenotetrazol
RNA	Ácido ribonucleotídeo
RNAm	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
SCC	Sistema Calicreínas-Cininas
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
WAR	<i>Wistar audiogenic rat</i>

1. Introdução

1.1. As epilepsias

O estudo epidemiológico das epilepsias no Brasil ainda é raro devido ao alto custo; porém, já existem algumas pesquisas por amostragem nas cidades de São Paulo, Salvador, Rio de Janeiro e São José do Rio Preto que mostram uma incidência de 13,3/1000 habitantes, 1,0/1000 habitantes, 5,1/1000 habitantes e 8,2/1000 habitantes, respectivamente (Marino Jr R, 1987; Almeida Filho, 1980; Gomes et al, 2002; Borges et al., 2004). Também se encontram em andamento estudos na cidade de Campinas que, assim como os estudos na cidade de São José do Rio Preto, fazem parte de um projeto da Organização Mundial da Saúde e da Liga Internacional de Epilepsia (*International League Against Epilepsy - ILAE*, 2005; Min e Sander, 2003). Mesmo havendo poucos estudos concluídos, podemos notar que a incidência da síndrome epiléptica no Brasil é alta e ainda pouco considerada pelas autoridades públicas.

Com relação aos dados mundiais, a prevalência de casos dessa síndrome é considerada alta, afetando de 1 a 2% da população mundial onde aproximadamente três milhões de novos casos somam-se a cada ano (Shneker e Fountain, 2003; Sander e Shorvon, 1996); acometendo pessoas independentemente de raça, sexo e condições sócio-econômicas (Berg et al., 1996).

As epilepsias compreendem um tipo de síndrome caracterizada por crises recorrentes e espontâneas. Estas crises são eventos paroxismais (súbitos) auto-

limitados que resultam de descargas neuronais anormais, involuntárias e rítmicas do sistema nervoso central (SNC), refletindo um desbalanço entre mecanismos excitatórios e inibitórios cerebrais (Engel, 1995).

A desordem epiléptica pode ser uma condição transmitida geneticamente ou uma consequência de um distúrbio cerebral específico. A predisposição genética somada aos fatores de ambiente precipitantes (e.g. trauma, febre, tumores) torna a suscetibilidade às crises epilépticas um processo dinâmico. Isso quer dizer que indivíduos com predisposição genética e baixo limiar de suscetibilidade podem apresentar crises convulsivas mais facilmente com o aparecimento de fatores precipitantes (Engel, 1995).

As crises epilépticas, de maneira geral, podem ser divididas em duas grandes classes: generalizadas e parciais. As crises generalizadas têm início nos dois hemisférios cerebrais, envolvem grande parte do SNC e em todos os casos acontece a perda de consciência. A crise parcial tem origem em uma região restrita de um dos hemisférios do SNC e sua extensão se dá em regiões adjacentes do local do início. Quando a crise parcial apresenta sintomas correspondentes apenas à área de início da crise, é então classificada de crise parcial simples. Porém, a crise parcial pode apresentar secundariamente uma generalização e alteração da consciência durante a crise, sendo assim classificada como crise parcial complexa (*ILAE*, 2005; Engel, 2001; Engel, 2006; Shneker e Fountain, 2003).

Um esquema do que foi aqui discutido é apresentado na Figura 1:

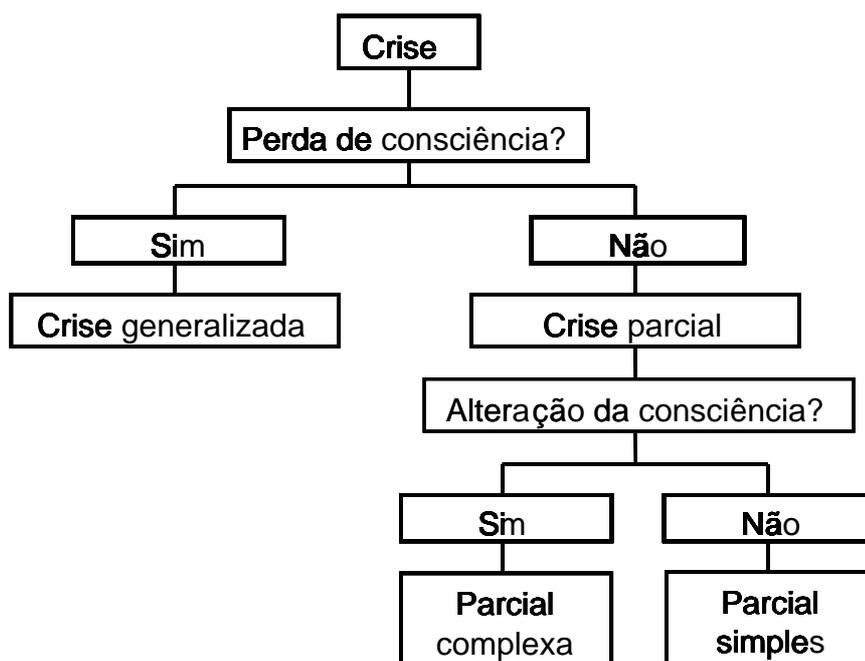


Figura 1. Chave esquemática da classificação geral das epilepsias. Modificada de: Shneker e Fountain, *Dis Mon*, 49 (7): 426-78 (2003).

1.2. Modelos experimentais em epilepsia

Pela complexidade e importância médica dessa síndrome, muitos modelos experimentais são desenvolvidos e utilizados para estudos de etologia (semiologia), processos morfológicos, bioquímicos e moleculares que ocorrem antes, durante e após as crises.

Alguns modelos para o estudo das epilepsias são baseados em linhagens de animais que apresentam predisposição genética a desenvolver crises epiléticas. Nestes modelos, estímulos sublimiáres de drogas convulsivantes, estímulos sonoros ou descargas elétricas são capazes de disparar as crises (Garcia-Cairasco, 2002).

Em 1990, o grupo do Prof. Norberto Garcia Cairasco deu início à seleção de uma cepa geneticamente suscetível a crises audiogênicas, denominada *Wistar audiogenic rat* (WAR). Essa cepa foi desenvolvida a partir do cruzamento endogâmico dos animais da linhagem Wistar que apresentavam predisposição a desenvolver crises epiléticas quando expostos a um estímulo sonoro (veja a primeira descrição destes animais em Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1983). Atualmente esta cepa está na 40^o geração e apresenta um consistente padrão genético, com conseqüente homogeneidade no fenótipo (e.g. gravidade alta das crises e latência reduzida para o início das crises) (Garcia-Cairasco et al, 1990 (resumo de Congresso; Doretto et al., 2003).

O WAR é um modelo bem estabelecido para 2 tipos de epilepsia: (i) a epilepsia generalizada do tipo tônico-clônica, em que o disparo da crise acontece em regiões do mesencéfalo no primeiro estímulo sonoro e envolve grande parte do SNC; e (ii) a epilepsia do lobo temporal (ELT), na qual as áreas límbicas são recrutadas e passam a ser o foco epilético, isto acontece quando os animais recebem estímulos sonoros repetidos e passam a apresentar sintomas de crises parciais complexas que caracterizam a ELT. O estímulo acústico crônico faz com que as regiões do tronco cerebral (mesencéfalo) responsáveis pelo fenótipo agudo de corridas, pulos e quedas atônicas, estendam e aumentem suas conexões para circuitos do prosencéfalo (córtex, hipocampo e amígdala), tendo com conseqüência comportamental crises tipo límbicas: automatismos orofaciais, clonias, postura ereta e quedas. Estas alterações, além das EEGráficas e celulares

caracterizam bem o chamado abrasamento audiogênico ou *kindling* audiogênico (Moraes et al, 2000; Garcia-Cairasco, 2002; Romcy-Pereira e Garcia-Cairasco, 2003; Galvis-Alonso et al, 2004). Como mencionado anteriormente, algumas regiões do SNC são extremamente importantes para a geração e manutenção das crises convulsivas nos WARs. No mesencéfalo, o colículo inferior é um importante núcleo da via auditiva e também o local de início das crises audiogênicas e o colículo superior tem papel na transmissão da hiperexcitabilidade gerada no colículo inferior para núcleos motores do tronco cerebral. Já o hipocampo é uma região do sistema límbico que é recrutada quando os animais são submetidos ao abrasamento audiogênico, ou seja, foco da crise epiléptica na ELT (Figura 2) (Faingold, 1999; Moraes et al, 2000; Garcia-Cairasco, 2002; Romcy-Pereira e Garcia-Cairasco, 2003; Galvis-Alonso et al, 2004).

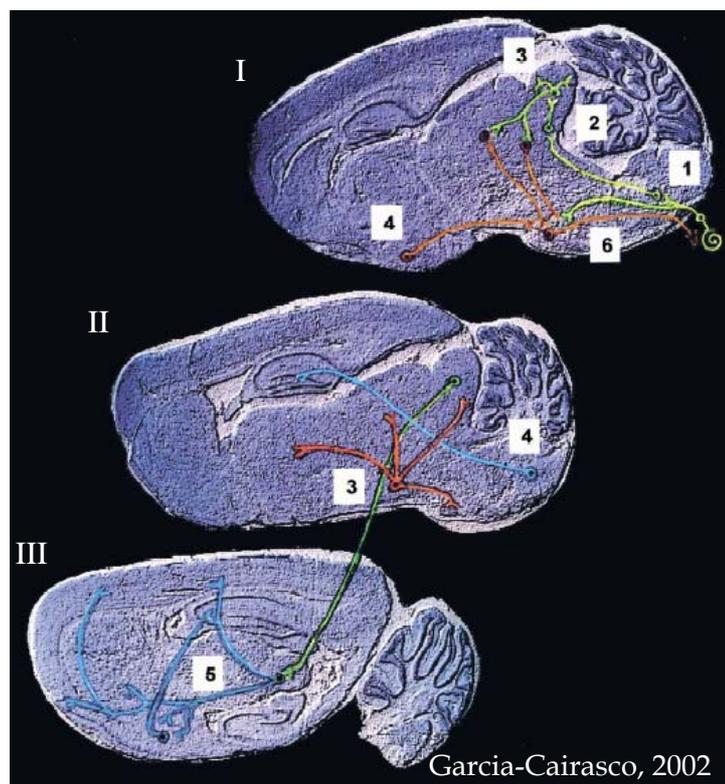


Figura 2. Representação das vias neuronais que são ativadas na crise audiogênica em WARs. **Verde** - Via auditiva que dá início na transdução do estímulo mecânico (som) em estímulo elétrico na cóclea (1) passando pelo colículo inferior (2) e colículo superior (I3). **Azul** - Vias neuronais recrutadas no abrasamento, conexão entre mesencéfalo e hipocampo (II4) e outras regiões corticais e límbicas como a amígdala (5). **Vermelho** - Vias motoras nigro-talâmicas, coliculares e pontinas (II3; I4) e vias finais motoras, projeções para a medula espinal (6). Retirado de Garcia-Cairasco, *Hearing Research*, 168: 208-222 (2002).

Aspectos importantes para a compreensão da suscetibilidade às crises epiléticas são os substratos neurais envolvidos, as cascatas de sinalização intracelular e a expressão de genes que levam às mudanças morfológicas de médio e longo prazo.

Em um trabalho publicado recentemente (Mesquita et al., 2005) com animais no dia pós-natal 2 (P2), ou seja, animais que não sofreram qualquer tipo de estresse sonoro, uma vez que o meato auditivo destes animais se torna funcional apenas no 14º dia de vida, foi verificado que nos ratos da cepa WAR existe uma diminuição inata de cerca de 45% na magnitude das correntes inibitórias GABAérgicas. Esses dados mostram a diminuição da amplitude e duração da hiperpolarização nos neurônios hipocâmpais dos ratos WAR pode ser a base para o entendimento da susceptibilidade desses animais a crises.

Outro aspecto investigado mais recentemente na cepa WAR, e que tem conexão com este trabalho, é o sistema cardiovascular, onde foi mostrado que mesmo sem qualquer tipo de estímulo sonoro, os animais adultos já apresentam um quadro de pressão arterial e frequência cardíaca aumentada (Oliveira et al., 2005). Além disso, estudos para a caracterização neuroendocrinológica da cepa mostraram que os WARs apresentam maior tamanho da glândula adrenal, embora apresentem um curva de crescimento diminuída em comparação com os controles, menor liberação basal de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, mas no entanto apresentam maior liberação de corticosterona em resposta ao ACTH exógeno (Umeoka et al., 2005). A liberação de corticosterona pela adrenal tem como efeito o aumento da resposta pressora tanto em ratos como em humanos (Whitworth et al., 2001).

O que se pode notar através destes trabalhos com a cepa WAR é que há uma possível modificação endógena relacionada a sistemas de controle da

pressão arterial e que as respostas a estímulos externos são diferencialmente moduladas nesses animais.

1.3. O Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é classicamente envolvido na regulação da pressão arterial e no processo de homeostase (e. g. retenção de sal e água). A cascata de sinalização clássica deste sistema é iniciada quando o angiotensinogênio, uma proteína circulante de alto peso molecular, é clivada pela enzima renina formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A enzima conversora de Ang I (ECA) por sua vez cliva esse peptídeo formando a angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo ativo que tem alta afinidade pelos receptores AT₁ e AT₂ (Figura 3) (Erdos; Skidgel, 1990).

Os receptores AT₁ e AT₂ têm cerca de 32% de homologia seqüencial e fazem parte da família de proteínas acopladas à proteína G (GPCR). Como todos os GPCRs, estes receptores possuem sete domínios transmembranais, conectados por três alças extracelulares e três alças intracelulares, possuindo um domínio amino terminal extracelular e um domínio carboxi terminal intracelular (Murphy et al, 1991; Nahmias et al, 1995).

A maioria dos efeitos fisiológicos clássicos da Ang II, como vasoconstrição, estimulação da secreção de aldosterona e retenção de sal e água, acontece através da ativação do receptor AT₁. A ativação da proteína G através deste receptor

culmina na produção dos mensageiros secundários inositol trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Como consequência, os níveis de cálcio intracelular são aumentados e há a ativação de proteínas quinases (Murphy et al., 1991 e Sasaki et al., 1991).

O mecanismo de sinalização do receptor AT₂ é menos compreendido, mas já se sabe que a ativação desse receptor resulta na ativação de fosfolipases A₂ (PLA₂) e provoca a liberação de óxido nítrico (NO), que na regulação da pressão arterial reverte os efeitos mediados pelo receptor AT₁, provocando vasodilatação (Nouet e Nahmias, 2000). Este “antagonismo” também ocorre em relação ao crescimento celular, que é inibido quando o receptor AT₂ é ativado, provavelmente através da ativação de MAPK específicas (Chung et al., 1998).

Atualmente outro receptor, denominado *mas*, tem sido relacionado ao SRA (Santos et al., 2003). O gene codificador para o receptor *mas* foi primeiramente caracterizado como um proto-oncogene (Rabin et al., 1987). Estudos posteriores descreveram erroneamente que este gene seria o codificador para o receptor de Ang II (Jackson et al., 1988). Hoje se sabe que o gene *mas* codifica um GPCR, que tem como ligante proposto a Ang (1-7). A Ang (1-7) é um heptapeptídeo derivado da clivagem de Ang I por endopeptidases e/ou da clivagem de Ang II pela enzima ECA₂, ou por outras carboxipeptidases capazes de retirar o resíduo de fenilalanina C-terminal da Ang II (Figura 3). Quando a Ang (1-7) se liga ao receptor *mas*, a ativação da cascata de sinalização intracelular culmina na ativação de quinases e na liberação de NO e prostaciclina. Desta forma, a ativação desse

receptor também está envolvida na modulação da pressão arterial, causando vasodilatação, ou seja, também “antagonizando” o efeito da ativação de AT_1 (Zohn et al., 1998 e Santos et al., 2003).

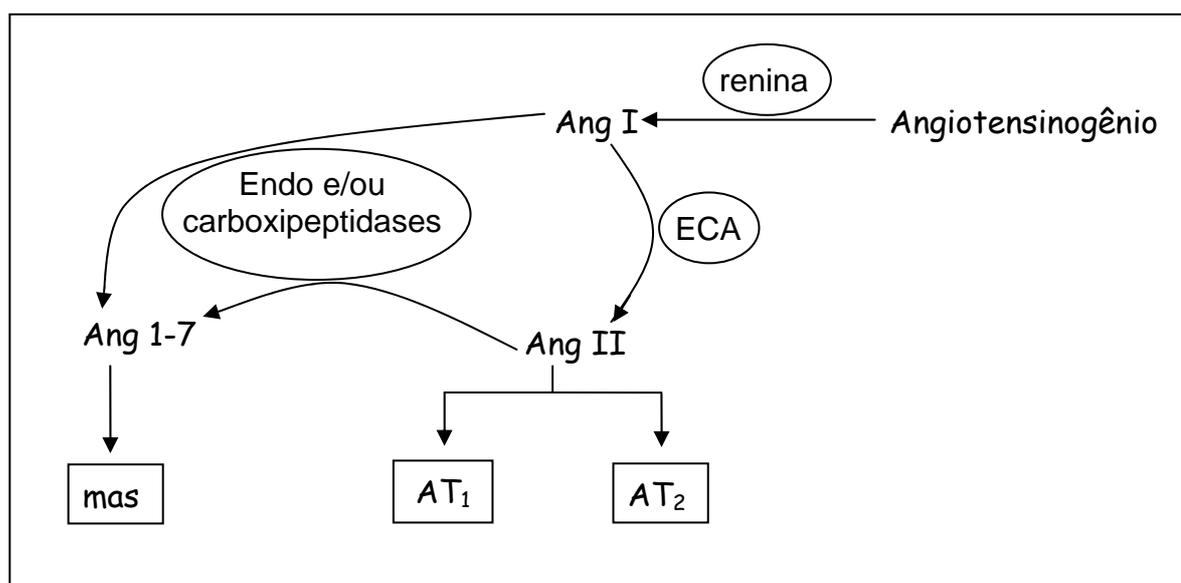


Figura 3. Representação esquemática do SRA.

Além do efeito vasoconstritor e vasodilatador de Ang II, o SRA está envolvido em diversos outros processos fisiopatológicos devido ao mecanismo local de produção de seus componentes, como na disfunção cardíaca e vascular (Urata et al., 1990; Yu et al., 1993) e nefropatias (Nicholls et al., 2001).

A partir da década de 60, se iniciaram as investigações de um mecanismo central do controle da pressão arterial pelo SRA (Bickerton e Buckley, 1961). Estes autores realizaram um experimento de circulação-cruzada, onde foi injetado Ang

II em um cão que tinha uma artéria conectada ao cérebro de um segundo cão, o que causou aumento da pressão arterial deste último apenas pela via nervosa.

Outras evidências do controle central da pressão arterial pelo SRA surgiram em 1971, quando foi detectada atividade de renina a partir do SNC (Ganten et al., 1971). No entanto, nesta época, ainda se acreditava que os componentes do SRA detectados no SNC podiam ter origem na circulação periférica. Em 1977, Sirett e colaboradores, utilizando ensaios de *binding*, determinaram a presença de receptores de angiotensina no SNC. A presença de receptores do SRA no SNC foi um forte indício que haveria uma ativação local da cascata de sinalização do SRA, mas ainda existia a dúvida em relação à origem da renina e do angiotensinogênio. Finalmente em 1986, Dzau e colaboradores detectaram o mRNA de renina e de angiotensinogênio no SNC. A partir destas informações foi reconhecido que haveria um controle de produção dos componentes e regulação local do SRA no SNC (Dzau et al., 1986). Hoje é aceita a existência de uma possível neurotransmissão angiotensinérgica, onde a Ang II (e outros metabólitos ativos) formada nos neurônios é captada em vesículas e liberada como neurotransmissor para o controle central de outros processos fisiológicos do SNC, como aprendizagem, memória e comportamentos sexuais (Diz, 2006).

Além do papel diretamente relacionado à neurotransmissão, o SRA está envolvido na modulação da neurotransmissão adrenérgica, colinérgica e GABAérgica. A administração central de Ang II facilita a liberação e reduz a

recaptação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático (Nicoletta, 1983) e leva à liberação de acetilcolina no SNC (Malinowska, 1976). A Ang II pode ter uma atividade excitatória ou inibitória na modulação de GABA, um componente que preferencialmente tem ação inibitória. Esta variação pode ser devida aos diferentes tipos de neurônios e/ou aos diferentes tipos de receptores de Ang II expressos (Albrech et al., 1997). Esses dados mostram a ligação dos SRA com o balanço de neurotransmissões excitatórias e inibitórias no SNC.

1.4. O Sistema Renina-Angiotensina e as Epilepsias

As síndromes epilépticas são um reflexo do desbalanço das neurotransmissões excitatórias e inibitórias do SNC, que sabidamente modulam a suscetibilidade às crises. Desta forma, com base no que foi descrito no item anterior, é possível inferir sobre a participação do SRA na regulação destes eventos no SNC. Apesar disso, o papel dos componentes do SRA especificamente em relação à epilepsia ainda é pouco investigado.

Através da administração de Ang II i.c.v. em camundongos, foi visto um aumento do limiar de suscetibilidade às crises induzidas por pentilenetetrazol (PTZ) e bicuculina (Tchekalarova e Georgiev 1999). Outros pesquisadores do mesmo grupo mostraram que a Ang II provoca uma diminuição da gravidade das crises induzidas por administração sistêmica de PTZ (Georgiev et al., 1986), assim

como uma diminuição da gravidade das crises no abramamento (ELT) induzido com PTZ (Georgiev et al, 1995).

Ainda utilizando o modelo de PTZ, Tchekalarova e Georgiev (1999) demonstraram que o efeito de Ang II no limiar das crises ocorre através do receptor AT_1 e, indiretamente, através do receptor de adenosina, mostrando um possível efeito protetor da Ang II sobre as crises epiléticas via receptor AT_1 .

Como se pode notar, todos os trabalhos relatando possíveis correlações entre crises epiléticas e o SRA foram realizados em modelos químicos de indução de crises. Estes modelos, por utilizarem altas doses de drogas, podem possivelmente afetar outros sistemas, que por sua vez também podem interferir na modulação do SRA.

1.5. O Sistema Calicreínas-Cininas

Em relação ao SCC, além do controle da pressão arterial, seus componentes também estão envolvidos em outros processos biológicos, tais como respostas inflamatórias e nociceptivas (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992 e Kaplan et al., 2002).

As cininas são polipeptídios mediadores da sinalização celular do SCC e são representadas pela calidina (KD) e bradicinina (BK). Esses peptídeos são gerados a partir da proteólise do cininogênio pela ação das enzimas calicreínas. A BK e KD são clivadas pelas cininases do plasma, gerando os metabólitos ativos desArg⁹-BK e

desArg¹⁰-KD. A ECA pode interferir nesse sistema degradando os peptídeos KD, BK, desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD formando metabólitos inativos (Regoli; Barabé 1980). As cininas exercem seu papel funcional através da ligação aos receptores B₂ e B₁ (Figura 4). Estes dois receptores também são membros da família de GPCR, e possuem alta identidade seqüencial (Mceachern et al., 1991 e Menke et al., 1994).

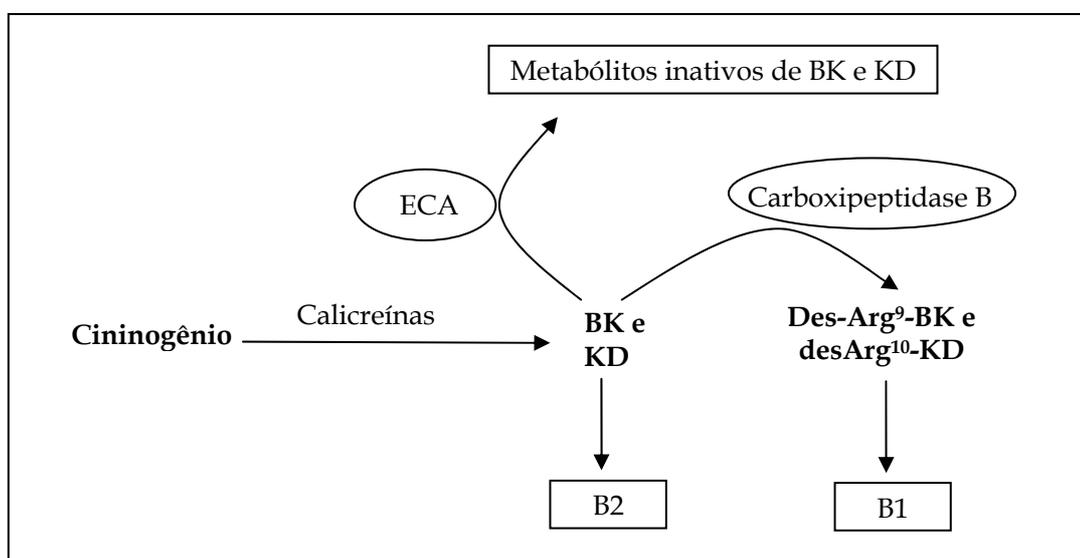


Figura 4. Representação esquemática do SCC.

A ativação destes receptores via proteína G leva à produção dos mensageiros secundários IP₃ e DAG. O IP₃ leva à liberação de cálcio intracelular e subsequente ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e da PLA₂, esta última levando a produção de prostaglandinas. O DAG leva à ativação da proteína quinase C (PKC) que inicia uma cascata de ativação de proteínas quinases (Moreau et al., 2005). A produção desses segundos mensageiros tem como efeitos a ação vasodilatadora e a liberação de moléculas inflamatórias (Heitsch et al., 2003).

Especificamente no processo inflamatório, a ativação do receptor B_1 é capaz de ativar um fator de transcrição denominado fator nuclear kappa-B (NF κ B) com conseqüente regulação na produção de citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-1 β e IL-1 α). Nesse caso, pode se dizer que existe retroalimentação positiva, uma vez que o aumento de IL-1 β também pode modular positivamente a transcrição de B_1 através do NF κ B (Phagoo et al, 2000).

Além do controle cardiovascular feito pela ação vasodilatadora das cininas, o papel do SCC na regulação da pressão sanguínea periférica também está relacionado a um controle via SNC (Diz e Jacobowitz, 1984 e Alvarez et al., 1992). Quando a BK é injetada centralmente, estimula a liberação de diferentes hormônios, tais como vasopressina, β -endorfina e prolactina (Brooks et al., 1986 e Drouhault et al., 1987) e em ensaios *in vitro* aumentam a liberação das catecolaminas (Dendorfer e Dominiak, 1995).

1.6. O Sistema Calicreínas-Cininas e as Epilepsias

O processo inflamatório é um importante mecanismo na epileptogênese. Como descrito anteriormente, a ativação de receptores de cininas também está correlacionada ao processo inflamatório. Desta forma, a participação do SCC nas epilepsias vem sendo recentemente estudada por alguns grupos de pesquisa.

O primeiro trabalho que relaciona diretamente o SCC e as epilepsias foi publicado por Bregola e colaboradores em 1999. Em modelos de epilepsia experimental de indução de crises por ácido caínico e abrasamento por estímulo elétrico na amígdala, foi observada uma resposta dose-dependente do efeito do agonista de B₁ no aumento do influxo de glutamato no hipocampo. O glutamato é um neurotransmissor excitatório, portanto o aumento do influxo deste neurotransmissor decorrente da ativação do receptor B₁ nos leva a inferir o possível papel deste receptor na modulação da hiperexcitabilidade do SNC (Bregola et al., 1999).

Em 2003, utilizando um modelo de ELT (abrasamento por estímulo elétrico na amígdala), Ongali e colaboradores analisaram a modulação dos receptores B₁ e B₂ em diversas regiões do SNC, inclusive no hipocampo. Em todas as regiões analisadas, os resultados mostram um aumento do receptor B₁ e uma diminuição do receptor B₂. O que pode ser inferido desses dados é que há uma modulação desses receptores na ELT no modelo de abrasamento elétrico e que essa modulação pode ter um papel importante no estabelecimento da epilepsia.

Outro grupo de pesquisa, utilizando o modelo de ELT por indução de crise através da injeção sistêmica de pilocarpina também avaliou a modulação dos receptores B₁ e B₂. Neste modelo a pilocarpina é injetada e o animal entra no chamado estado de mal epiléptico ou *status epilepticus* (SE), uma crise auto sustentada e duradoura. Ao longo dos dias após o SE os animais apresentam crises recorrentes espontâneas. Neste trabalho, a modulação dos receptores B₁ e B₂

foi analisada em três fases do desenvolvimento da ELT: fase aguda (6 horas pós SE), fase latente (5 dias pós SE sem apresentação de crises recorrentes) e fase crônica (pós SE com crises recorrentes) (Arganaraz et al., 2004a).

Estudos realizados com camundongos *knockout* para B₁ (B₁KO) e para B₂ (B₂KO) em modelo de ELT induzida por pilocarpina sistêmica, mostraram que os B₂KO tiveram o tempo de latência das crises diminuído e aumento da mortalidade das células do hipocampo. Já os B₁KO tiveram o período de latência aumentado e a morte celular do hipocampo e amígdala diminuiu em relação aos camundongos controles (Arganaraz et al., 2004b). Estes dados sugerem um relevante papel para o receptor B₂ como neuroprotetor do SNC e, mais uma vez, relacionam o receptor B₁ com possíveis mecanismos de hiperexcitabilidade do SNC.

Em um trabalho recente com pacientes com ELT foi detectado um aumento tanto do receptor B₁ quanto do receptor B₂ no hipocampo, o que reforçou mais uma vez a relação estreita entre epilepsia e o SCC, confirmando resultados já obtidos em modelos animais (Perosa et al., 2007).

1.7. A enzima conversora e a interligação entre o SRA e o SCC

A ECA tem participação fundamental na modulação dos processos em que estão envolvidos os sistemas SRA e SCC, porque além de formar Ang II esta enzima também é responsável por inativar os agonistas do SCC.

Como visto anteriormente, tanto os componentes do SCC como do SRA são produzidos e modulados localmente. Isto também parece acontecer para a ECA uma vez que o mRNA já foi detectado em tecidos nervosos como em neuroblastoma e em gliomas (Fishman et al., 1981; Okamura et al., 1981). Além disso, Correa e colaboradores (1985) e Chai e colaboradores (1987) relataram a co-localização de Ang II e ECA nas mesmas regiões do SNC. Assim podemos inferir que devido à produção local da ECA no SNC, à sua ação na modulação dos SCC e do SRA pode ser crucial para a regulação do balanço entre mecanismos excitatórios e inibitórios do SNC.

Um esquema geral dos componentes do SCC e SRA e sua interligação através da ECA pode ser visto na Figura 5.

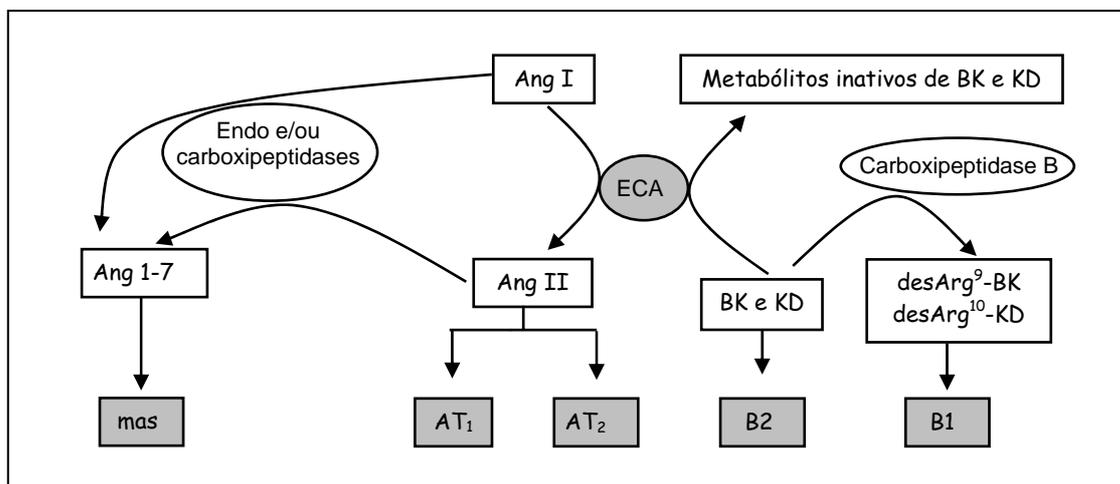


Figura 5. Representação esquemática do SRA e do SCC. Note que através da ECA ocorre a interligação entre os dois sistemas.

2. Objetivos

1. Investigar uma possível correlação entre alterações inatas do SRA e do SCC e a suscetibilidade às crises epilépticas em WARs.
2. Analisar a modulação dos diferentes receptores do SRA, dos receptores do SCC e da ECA na região do SNC envolvida no estabelecimento da ELT utilizando como modelo experimental os WARs;
3. Como comparação com a análise realizada no SNC, analisar a modulação dos diferentes receptores do SRA, dos receptores do SCC e da ECA no coração dos animais com ELT.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados como modelo experimental ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar resistentes a crises e ratos da linhagem Wistar geneticamente susceptíveis às crises (*Wistar audiogenic rats* - WAR) com idade de dois dias e com idade de 60 dias. Todos os protocolos deste trabalho seguem as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto (protocolo nº 200/2005).

Os ratos da linhagem Wistar resistentes às crises audiogênicas (controles) foram obtidos do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto. Os WARs foram obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto onde a cepa é mantida em ambiente ventilado, com filtração de ar, temperatura de 22°C e fotoperíodo de doze horas.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados em técnicas de Biologia Molecular foram adquiridos da *Invitrogen*, a menos que tenha sido especificado outro fabricante.

3.3. Estimulação acústica

Para o experimento de estimulação acústica foram utilizadas ratas fêmeas com 60 dias de idade. Os estímulos foram aplicados individualmente em caixas acústicas onde os animais foram expostos a um som de alta intensidade (120 dB e 60 Hz) até o aparecimento de crises tônico-clônicas ou durante o tempo máximo de um minuto. O comportamento dos animais foi monitorado e anotado durante o estímulo e por um minuto após o fim do estímulo. Os animais foram estimulados duas vezes ao dia (8-9 hs e 16-18 hs) por 15 dias, totalizando 30 estímulos. O índice de gravidade das crises generalizadas (tipo tônico-clônicas) foi determinado com base no índice mesencefálico de Garcia-Cairasco et al (1996) categorizado por Rossetti et al., (2006) (Tabela 1) e a gravidade das crises parciais complexas foi determinada pelo índice de Racine (Tabela 2 - Racine, 1972).

Tabela 1. Índice de gravidade das crises generalizadas. A partir da observação desses comportamentos, por estímulo, é dado a cada animal o índice da gravidade da crise convulsiva que o animal apresenta.

Índice mesencefálico de Garcia-Cairasco et al (1996), categorizado por Rossetti et al., (2006).	
0	Sem crise
1	Uma corrida e giros
2	Giro, corrida, pulo e quedas atônicas
3	Duas corridas, giros e quedas atônicas
4	Comportamentos anteriores e convulsão tônica (<i>opistotonus</i>)
5	Comportamentos anteriores e clonias parciais e generalizadas
6	Comportamentos anteriores e flexão ventral de cabeça
7	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas anteriores
8	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas posteriores

Tabela 2. Índice de gravidade das crises límbicas. A partir da observação desses comportamentos identifica-se ou não o aparecimento das crises límbicas. É dado a cada animal, por estímulo, o índice da gravidade das crises convulsivas.

Índice límbico (Racine, 1972)	
1.0	Automatismos faciais
2.0	Mioclonias de orelha, cabeça e tronco
3.0	Comportamentos anteriores e clonias das patas anteriores
4.0	Comportamentos anteriores e elevação
5.0	Comportamentos anteriores e queda

3.4. Dissecção dos tecidos do SNC

Os animais com 2 dias de idade foram submetidos a eutanásia por decapitação. Imediatamente após a decapitação, hipocampo, colículo inferior e colículo superior foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -70°C para utilização na análise de expressão do mRNA.. Esta análise inicial foi realizada em neonatos com 2 dias de vida (P2) porque nessa idade os ratos não sofreram nenhum tipo de estresse sonoro, já que o meato auditivo abre no 14º dia. Os animais com 60 dias de idade (submetidos ao estímulo acústico) foram eutanasiados 24 horas após o último estímulo. Imediatamente após a decapitação o hipocampo foi dissecado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -70°C para utilização na análise de expressão do mRNA.

3.5. Isolamentos do coração

Para comparar o SNC e o sistema periférico em relação à regulação do SRA e SCC, os mesmos animais com 60 dias de idade que foram submetidos à eutanásia para dissecção dos tecidos do SNC também tiveram o coração isolado. Este órgão do sistema periférico foi escolhido porque possui uma produção e regulação local do SRA e SCC. Imediatamente após a eutanásia, o coração foi removido após abertura do tórax, imerso sem solução salina, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -70°C para utilização na análise de expressão de mRNA.

3.6. Extração de RNA total

Para os diferentes tecidos obtidos de ratos Wistar e WARs foi utilizada a extração de RNA total pelo protocolo do reagente TRIzol. Os tecidos armazenados em freezer -70°C foram colocados em nitrogênio líquido e submetidos a pulverização por pressão. Foram então transferidos para tubos de centrífuga de 1,5 mL contendo TRIzol (1,0 mL TRIzol /100 mg de tecido), incubados a temperatura ambiente por 5 min e então foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado. Os tubos foram agitados em vórtex e, em seguida, centrifugados a 12.000 g a 4°C por 15 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada e transferida para um novo tubo, em seguida foi adicionado 1 mL de isopropanol. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 10 min. Após desprezar o sobrenadante foram adicionados 0,5 mL de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 g a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado por 10 min a temperatura ambiente. Para solubilizar o RNA total, os tubos receberam um volume de 10 μl de água de Milli-Q tratados com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras de RNA total foram mantidas a -70°C até o momento do uso.

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro DU 640 (*Beckman Coulter*, Estados Unidos) no comprimento de

onda de 260 nm (A_{260}), com fator de diluição igual a 50, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, com observação da integridade das subunidades 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico (Figura 6).

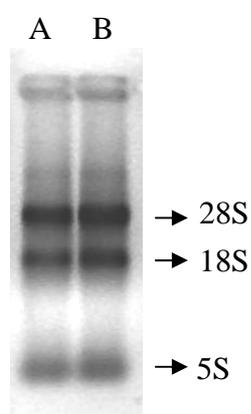


Figura 6. Padrão eletroforético de RNAs totais íntegros. **A.** 1 μg de RNA total do colículo inferior. **B.** 1 μg de RNA total do colículo superior.

Para preparar o gel de agarose 1%, foram dissolvidos 0,3 g de agarose a 30 mL de tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) preparado com água tratada com DEPC (0,1%). A agarose foi aquecida em forno de microondas até completa dissolução e logo após foram adicionados 4 μL da solução de brometo de etídio (10 mg/mL). Foi preparado um gel no sistema de eletroforese horizontal, aguardando-se a polimerização por uma hora. Foram adicionados 2 μL do tampão de corrida a 1 μL de amostra de RNA (concentrado 10X: glicerol 50%, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,4%), procedendo-se o carregamento do

gel com todas as amostras. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X, e a seguir as amostras foram visualizadas em transluminador e fotodocumentadas (*Sistema EDAS 290 KODAK, Estados Unidos*).

3.7. Tratamento das amostras com DNAase

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com *DNAase I Amplification Grade* para que os resultados não apresentassem um falso positivo por causa da amplificação do DNA restante e não do cDNA gerado.

Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL de tampão DNAase I (10X), 1 µL de enzima *DNAase I Amp. Grade* (0,1U/µL) e água com DEPC (0,1%) para o volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após incubação, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e a reação foi incubada por 10 min a 65 °C. Após o período de incubação a reação foi colocada no gelo para a utilização em seguida ou armazenada em -70 °C para utilização posterior.

3.8. Transcrição Reversa e Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR)

3.8.1. Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes que codificam para o receptor B₁ e B₂ do SCC, para os receptores AT₁, AT₂ e *mas* do

SRA e para a ECA foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*) As seqüências genômicas utilizadas foram obtidas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências dos oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos amplificados estão na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3. Seqüência de oligonucleotídeos utilizados na PCR para os diferentes genes e tamanhos dos produtos de amplificação. pb, pares de base.

Gene	Tamanho do fragmento amplificado	<i>Sense</i> (5'-3')	<i>Anti-sense</i> (5'-3')
β -actina	421 pb	CTAAGGCAAACCGTGAAAAGA	ATTGCCGATAGTGATGACCTG
AT ₁	600 pb	AACAACCTGCCTGAACCCCTCT	TCAGAACAAGACGCAGGCT
AT ₂	160 pb	CTCACACAAACCGGCAGATAAG	CCACAGCCAGATTGAAGATG
B ₁	25 0pb	GCCTCCCTGAGAGGACAGAAG	AGTGGGTTC AAGCAGCTGTG
B ₂	300 pb	GTCAACTGCCAGACACTG	TGCTGCTGTAGAGGTTTCATG
Mas	190 pb	CCTTTGGGAACCTGCATAAC	GGATACAGTGTGCCATTGC
ECA	200 pb	GCTCAACGGCTACTCTGATG	CCTAGCAGGTGAGCAGGAATG

3.8.2. Transcrição reversa (RT).

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA num processo denominado transcrição reversa, a qual foi realizada num volume de reação de 20 μ L utilizando-se 1 μ g de RNA total previamente tratado com DNAase. As transcriptases reversas catalisam a reação de formação de fitas de DNA (cDNA) a partir de um molde de RNA.

Foi utilizado o protocolo para a enzima *Improm* (*Promega*). Dentro do tubo para centrífuga onde o RNA total foi tratado com DNAase foi misturado 1 μL de Oligo-dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A reação foi incubada por 5 min a 70 °C e logo após, transferida para o gelo por 5 min. Foram acrescentados: 4 μL de tampão (5x), 2,4 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de dNTPmix com DEPC (10 mM) e 1 μL de enzima (1U/ μL). A reação foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e em seguida incubada a 42 °C por 60 minutos. Após o tempo de 60 minutos a reação foi incubada a 70 °C por 15 minutos e em seguida transferida para o gelo. O cDNA foi estocado a -20 °C até a utilização.

3.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os cDNAs serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume de 25 μL em tubos com os seguintes reagentes: 0,5 μL (10 μM) de cada oligonucleotídeo (*sense* e *anti-sense* para cada gene; Tabela 3), 2,5 μL de tampão para PCR (10X), 0,75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de dNTPs (10 μM) e 0,25 μL de *Platinum Taq DNA polimerase* (5U/ μL). O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 2 min a 94 °C seguida de 35-40 ciclos de amplificação. Cada ciclo é constituído das fases de desnaturação (94 °C) por 1 minuto, anelamento do oligonucleotídeo por 1 minuto (temperatura específica para cada par de oligonucleotídeo, ver Tabela 4) e extensão por 1 minuto (72 °C). No final dos ciclos de amplificação a reação fica por mais 7 minutos a 72 °C. Para cada par de oligonucleotídeos foi realizada a

PCR com água destilada substituindo a amostra para avaliação de possível contaminação dos oligonucleotídeos e também para cada amostra de tecido a PCR foi realizada utilizando-se RNA (tratado com DNAase) como molde para avaliação de possível contaminação por DNA genômico.

Tabela 4: Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e número de ciclos utilizados para a amplificação dos genes.

Gene	Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos	Número de ciclos
β -actina	55 °C	25
AT ₁	55 °C	35
AT ₂	55 °C	35
B ₁	58 °C	35
B ₂	58 °C	35
Mas	58 °C	40
ECA	55 °C	35

3.8.4. Eletroforese em gel de agarose e análise semi-quantitativa

Uma alíquota de 10 μ L de cada amostra foi analisada por eletroforese em 100 mL de gel de agarose 2% contendo 8 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL). O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com do marcador *Ladder 1Kb*. O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos esperados (Tabela 3), sendo neste momento realizada fotodocumentação (Sistema EDAS 290 KODAK, EUA).

Foi realizada análise semi-quantitativa, utilizando-se como parâmetro de comparação os valores de intensidade obtidos para a β -actina, proteína cujo gene é expresso constitutivamente, em cada amostra dos diferentes órgãos e tecidos. Para esta análise, foi empregada densitometria pelo programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada amostra foi obtida uma relação entre a intensidade da banda para o gene de interesse e para as bandas de β -actina no gel de agarose que foram plotadas no *Graphpad Prism* (*GraphPad, San Diego, EUA*) (Figura 7) e submetidas a análise estatística.

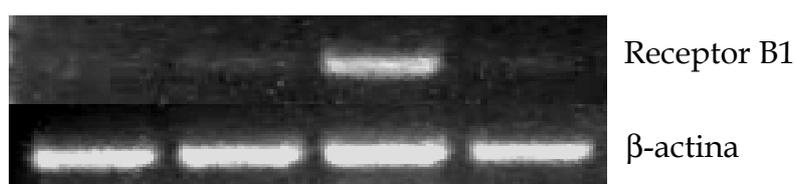


Figura 7. Gel de agarose 2% com o produto de PCR que corresponde ao tamanho esperado (receptor B1 e β -actina) para amostras diferentes. A partir da quantificação da densidade (ver item 2.8.4) das bandas é calculada a razão dos valores obtidos para o B1 e para β -actina.

3.9. Real-time PCR

3.9.1. Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídios utilizados para amplificação dos genes que codificam para IL-1 β , IL-10 e β -actina foram desenhados pelo programa *Primer Express*

(Applied Biosystems, EUA) baseados nas seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências dos oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5: Seqüência de oligonucleotídeos utilizados no *Real-time PCR* para os diferentes genes e tamanhos dos produtos de amplificação. pb, pares de base

Gene	Tamanho do fragmento	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
β -actina	210 pb	AGAAGATGACCCAGATCATGTTT A	AGCAGCCGIGGCCATCTCTTGCTC
IL-1 β	162 pb	ACTTCACCATGGAACCCGTGT	GCCACGGTTTTCTTATGGCTC
IL-10	146 pb	AACTTCGATCCTAAGGCTGGC	AGCAACCTGGTTTTCTCTTCCC

3.9.2. Real-Time PCR

Para o *Real-time PCR* foi utilizado cDNA sintetizado por transcrição reversa. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas usando *ABI Prism 5700* Sistema de detecção de seqüência (*Applied Biosystems*, Estados Unidos). O processo de ciclagem térmica consiste de 2 min a 50 °C, em seguida 2 min a 95 °C para a transcrição reversa e 40 ciclos a 95 °C por 15 s seguido de 57 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos para excluir possibilidades de contaminação por RNA ou DNA genômico. As condições do *Real-Time PCR* foram otimizadas para cada alvo com concentrações ideais de oligonucleotídeos, ausência de formação de dímeros dos

oligonucleotídeos e eficiente amplificação dos genes alvos e dos genes controles β -actina. Para a reação do *Real-time* PCR foi utilizado o mix *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX*, 1 μ L (10 μ M) de cada oligonucleotídeo específicos para cada gene amplificado e 1 pg de cDNA das diferentes amostras. Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da *Applied Biosystems*, utilizando a β -actina como gene normalizador.

Os dados foram expressos usando o método de Ciclo limite (Ct ou *Cycle threshold*), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. O cálculo da média do Δ Ct da duplicata das amostras (Ct do gene alvo menos o Ct do gene normalizador) foi submetido a regressão linear.

O primeiro parâmetro utilizado é o valor de limiar da curva de amplificação obtida pela amplificação do cDNA alvo (Ct). Houve a normalização dos valores subtraindo-se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo pelo Ct do gene normalizador (Δ Ct). Devido à característica logarítmica desse valor, houve utilização do parâmetro $2^{-\Delta$ Ct, para a expressão dos dados (Kubista et al., 2006).

3.10. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos pela média e normalizados pelo valor máximo. A diferença entre os grupos foi determinada utilizando-se *test t* (*Student*) ou *One-way ANOVA* (pós teste *Newman-Keuls*). Os valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$, *), ($P < 0,01$, **) e ($P < 0,001$, ***) foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Alterações inatas da cepa WAR

Inicialmente decidimos investigar a hipótese da existência de uma correlação entre alterações inatas dos SRA e/ou SCC e a susceptibilidade às crises epilépticas em WARs. Para isso, analisamos por RT-PCR os níveis de expressão dos mRNAs para diferentes componentes destes sistemas em 3 regiões do SNC (hipocampo, colículo inferior e colículo superior) de WARs neonatais. Como explicado detalhadamente na introdução, estas regiões foram escolhidas porque possuem importante papel nas crises audiogênicas agudas e crônicas.

4.1.1. Análise de receptores do Sistema Renina-Angiotensina

Os resultados obtidos demonstram que em WARs não existe a expressão diferenciada inata do mRNA dos receptores AT₁ (Figura 8), AT₂ (Figura 9) e *mas* (Figura 10) do SRA, tanto no hipocampo como no colículo inferior e colículo superior, quando comparados os ratos Wistar (controle).

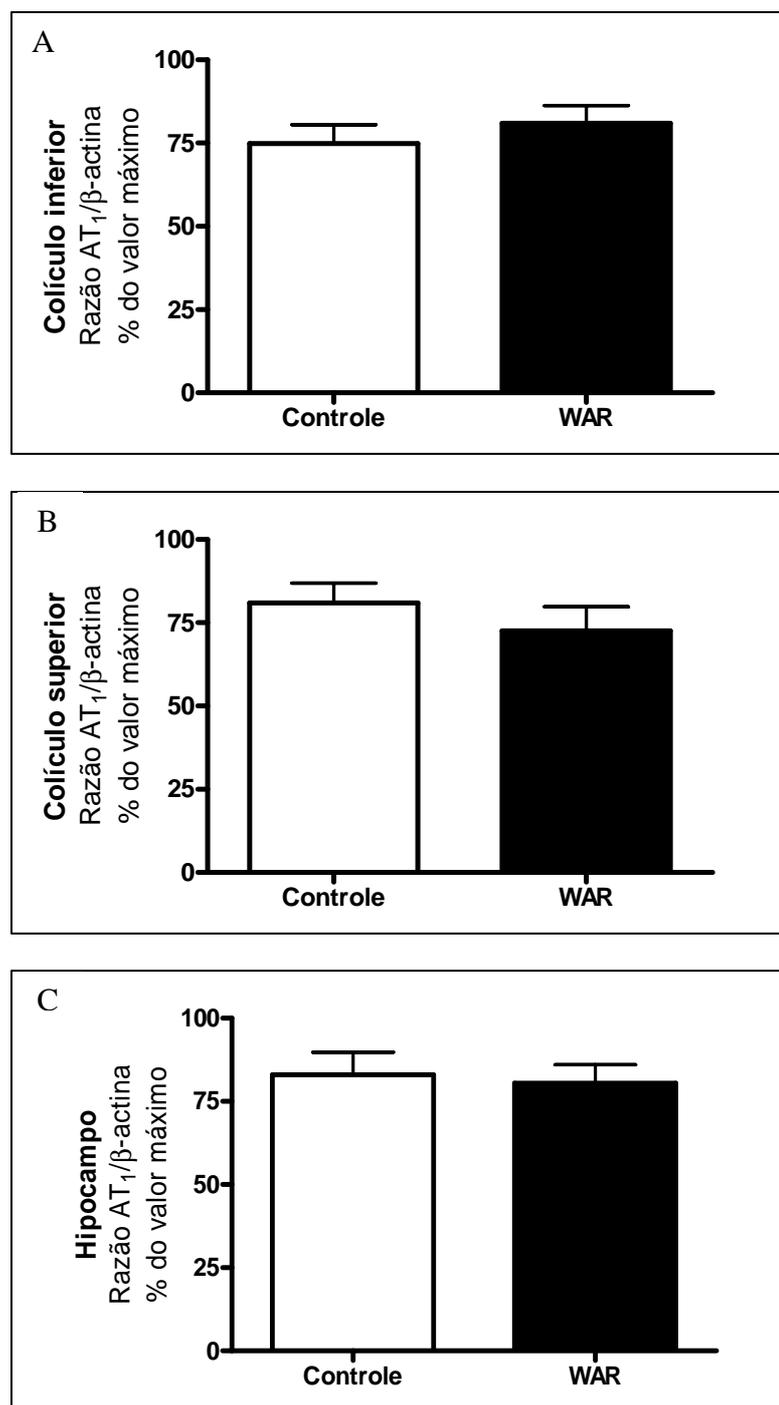


Figura 8. Níveis de expressão do mRNA de AT₁ em relação ao de β-actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

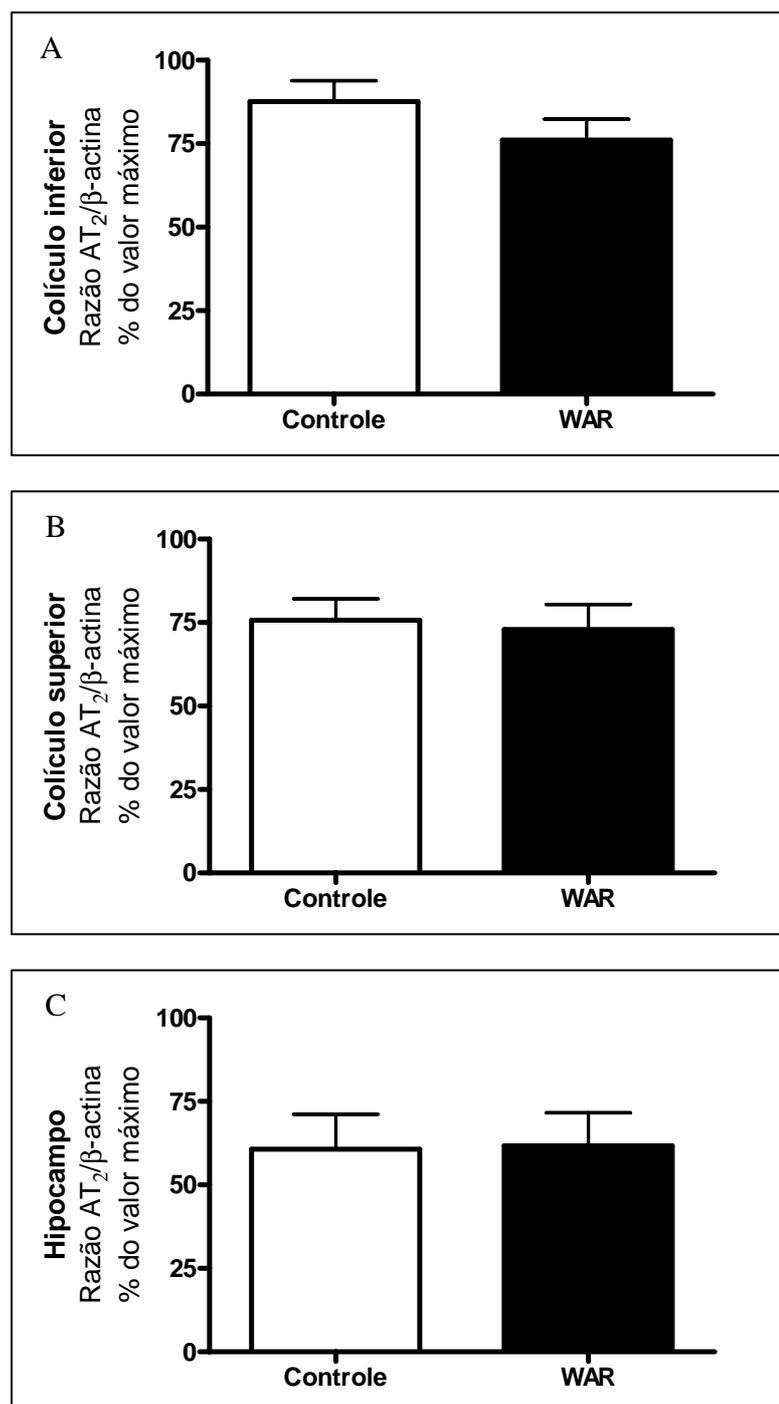


Figura 9. Níveis de expressão do mRNA de AT₂ em relação ao de β-actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

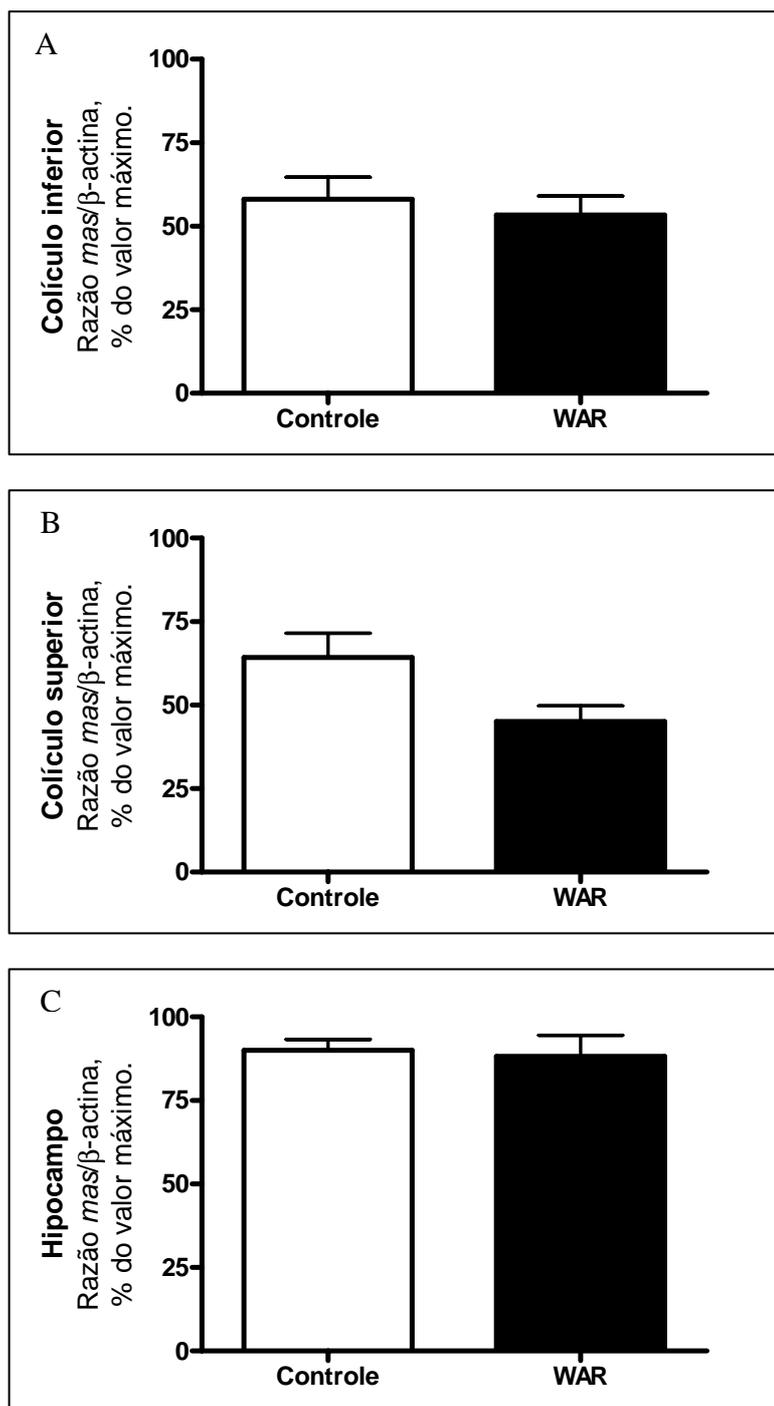


Figura 10. Níveis de expressão do mRNA de *mas* em relação ao de β -actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

4.1.2. Análise de receptores do Sistema Calicreínas-Cininas

Nossos resultados também mostram que em WARs não existe expressão diferenciada inata do mRNA dos receptores B₁ (Figura 11) e B₂ (Figura 12) do SCC em nenhuma das regiões do SNC analisadas, quando comparados com os Wistar (controle).

4.1.3. Análise da enzima conversora de angiotensina (ECA)

O ponto chave que conecta os dois sistemas aqui analisados é a ECA. O mRNA para esta enzima também não apresentou em WARs expressão diferenciada nas regiões do SNC analisadas quando comparado ao controle (Figura 13).

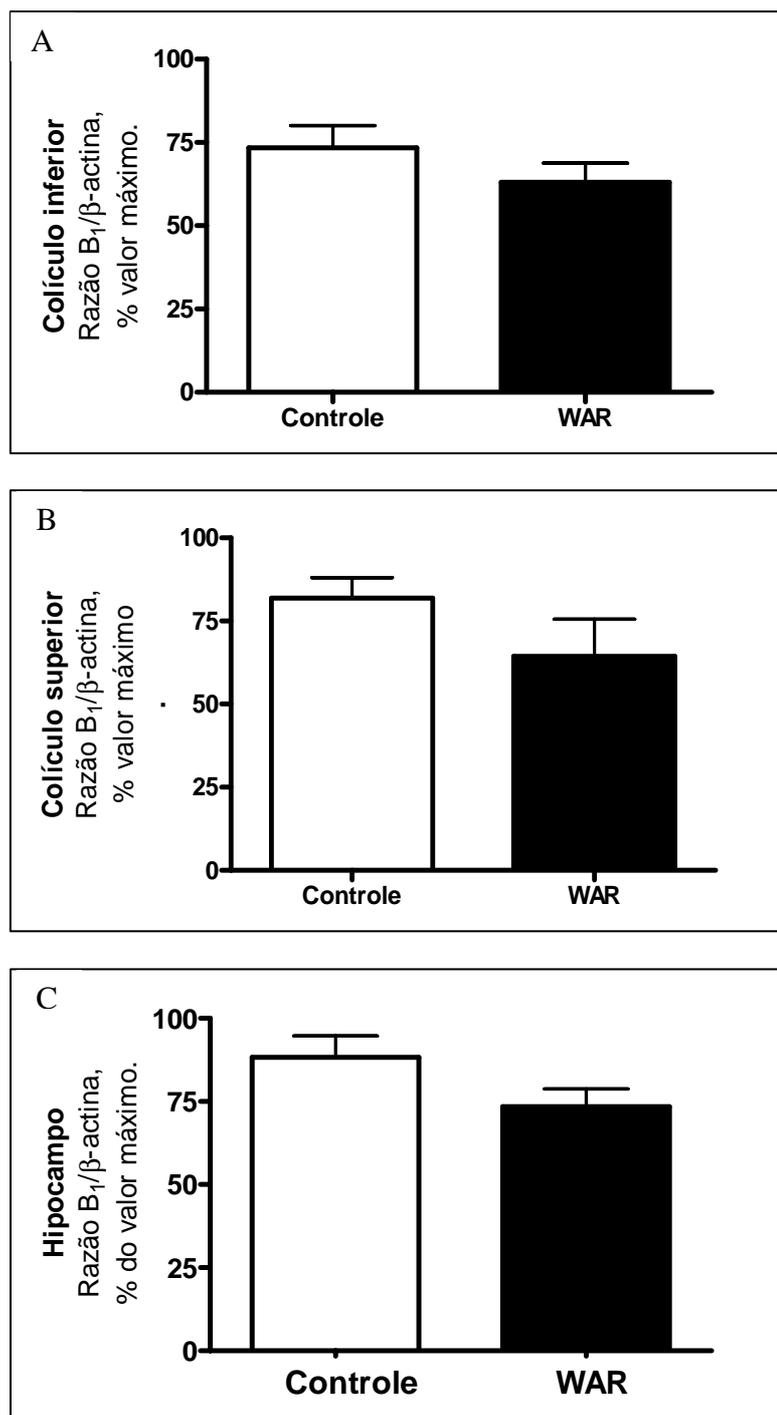


Figura 11. Níveis de expressão do mRNA de B₁ em relação ao de β-actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

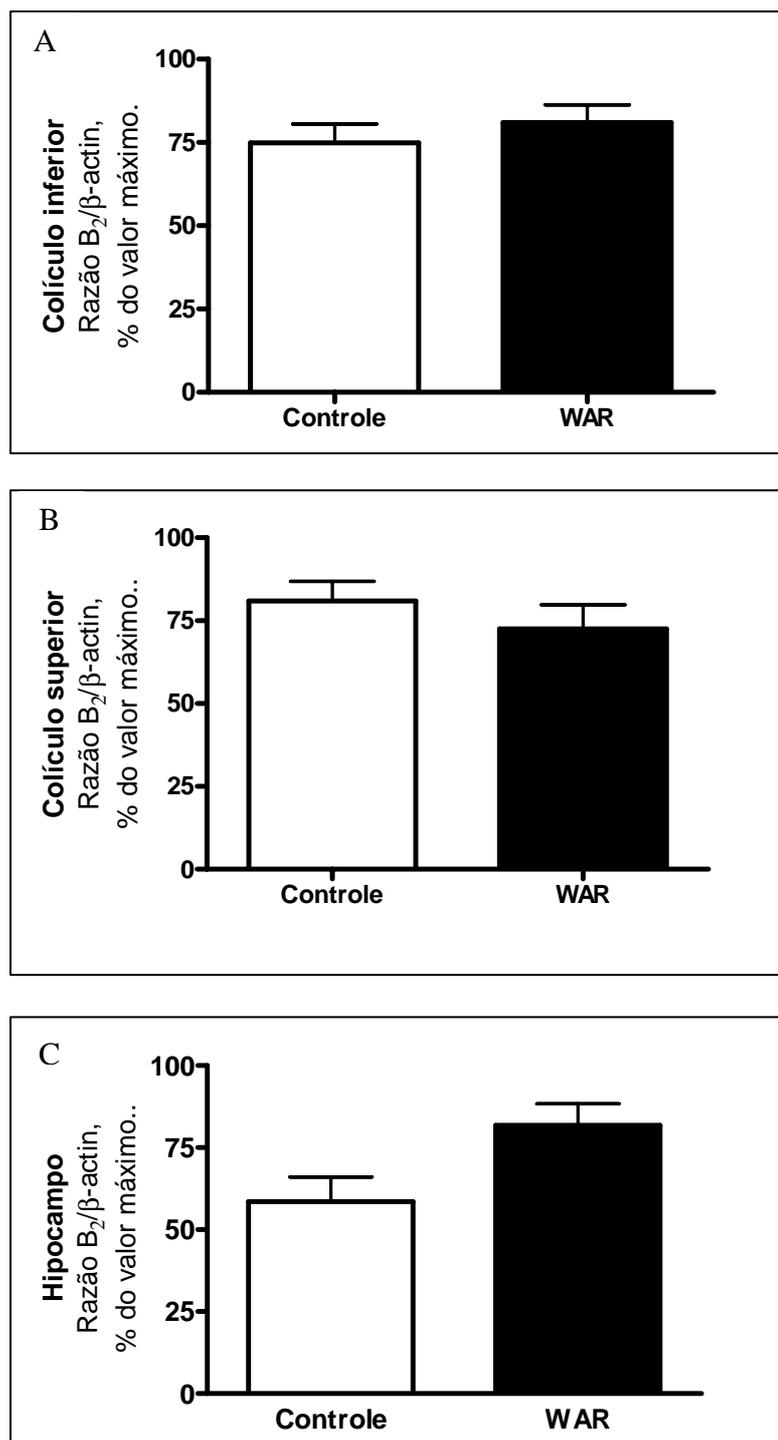


Figura 12. Níveis de expressão do mRNA de B₂ em relação ao de β-actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

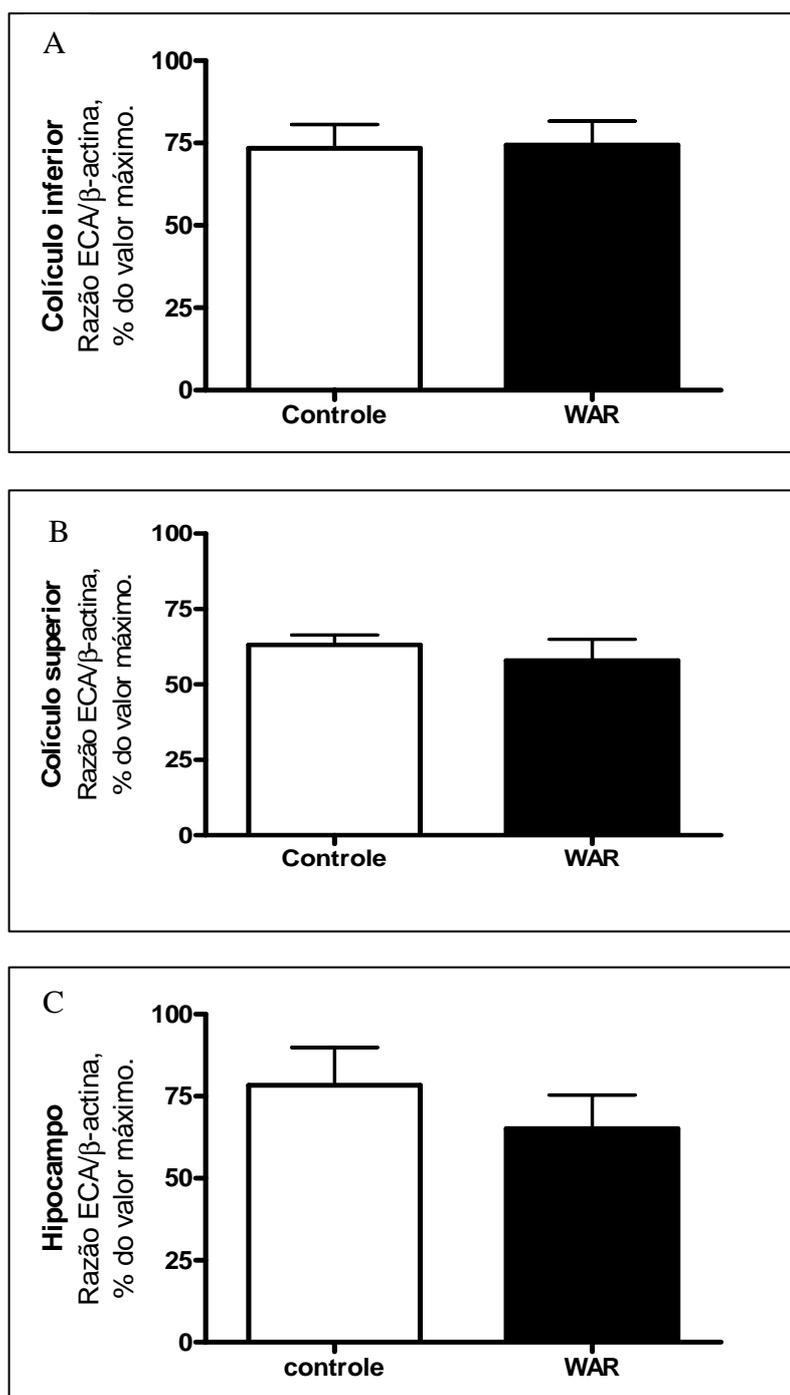


Figura 13. Níveis de expressão do mRNA de ECA em relação ao de β -actina no colículo inferior (A), colículo superior (B) e no hipocampo (C). Dados representando a média de 7 experimentos independentes. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

4.2. Estimulação acústica dos animais

O WAR é um modelo suscetível às crises epiléticas audiogênicas. A predisposição genética aliada à indução exógena, que é o estímulo sonoro, provoca crises convulsivas generalizadas e, quando são feitos estímulos sonoros repetidos provocam o chamado abrasamento audiogênico, recrutando regiões do sistema límbico. Como pode ser visto na Figura 14, quando se inicia o recrutamento de circuitos límbicos, a gravidade destas crises aumenta e concomitantemente a gravidade das crises generalizadas tende a diminuir. Os ratos Wistar resistentes (controles) quando recebem o estímulo sonoro não desenvolvem crises convulsivas, mesmo depois de muitos dias de estímulo (Figura 15). O índice de gravidade das crises generalizadas foi determinado com base no índice mesencefálico desenvolvido por Garcia-Cairasco et al., (1996) e recentemente categorizado (Rossetti et al., 2006) (ver Tabela 1, página 38) e a gravidade das crises parciais complexas foi determinada pelo índice de Racine (1972) (ver Tabela 2, página 38).

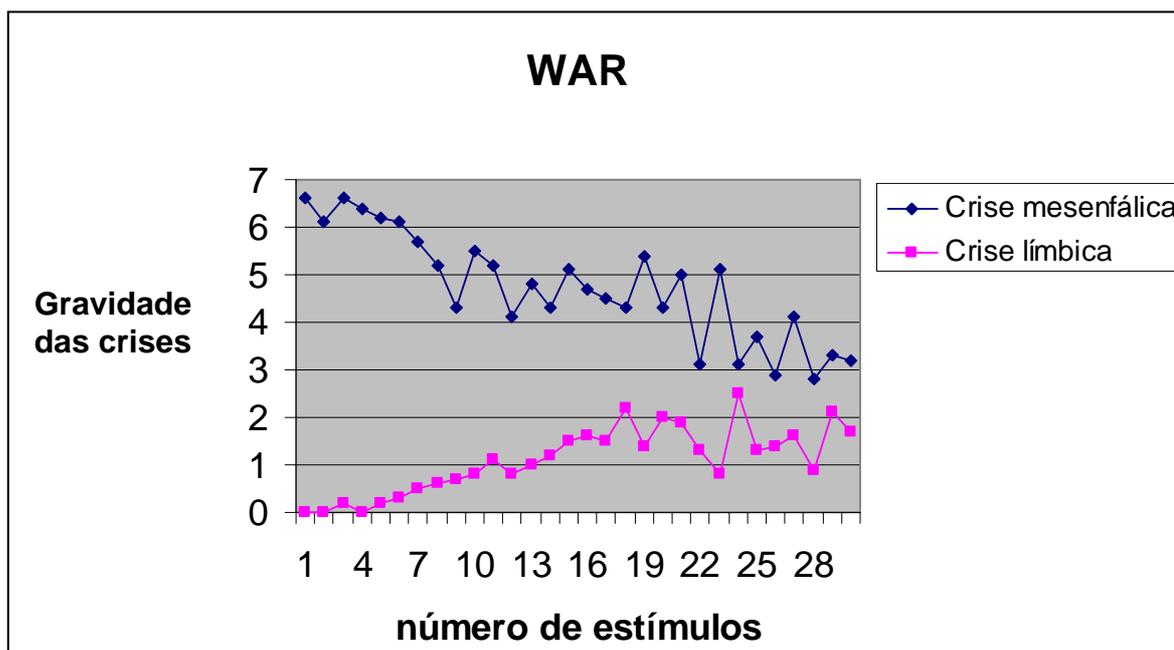


Figura 14. Perfil do desenvolvimento antagônico, das crises comportamentais mesencefálicas e posteriormente límbicas nos WARs submetidos ao abrasamento audiogênico (n=10).

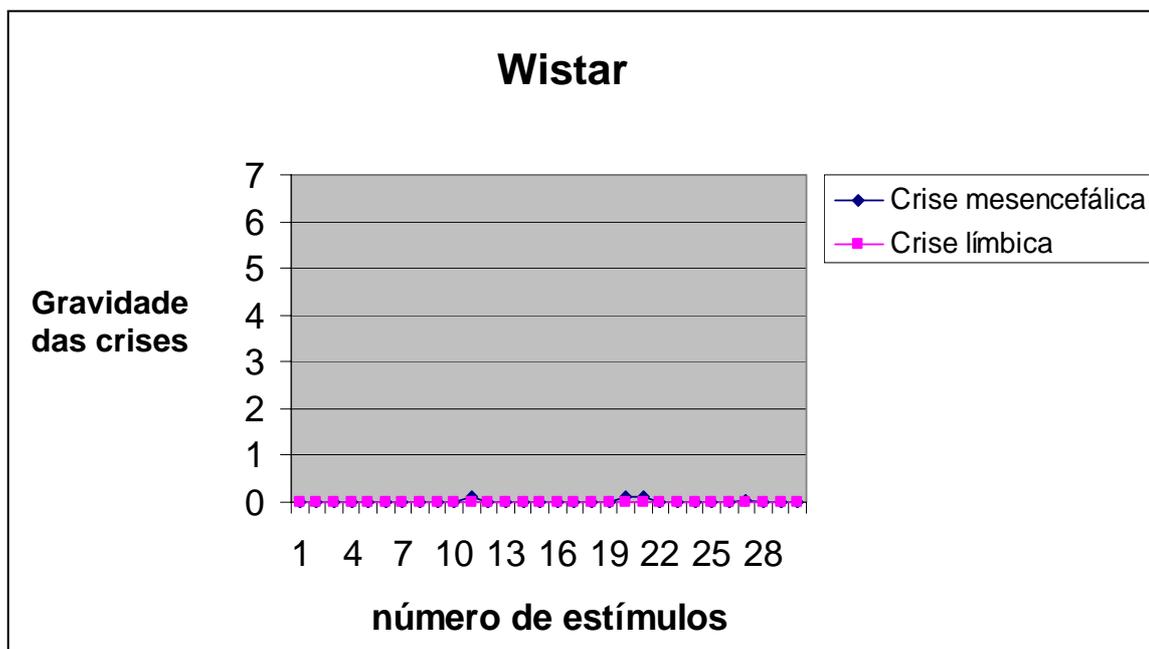


Figura 15. Ausência praticamente completa de crises comportamentais mesencefálicas e límbicas nos ratos Wistar durante os estímulos crônicos acústicos (n=10).

4.3. Alterações centrais no modelo de Epilepsia do Lobo Temporal na cepa WAR (abrasamento audiogênico)

Como visto detalhadamente na introdução, tanto o SCC como o SRA podem ter participação na epileptogênese e/ou no estabelecimento da epilepsia. Uma vez que observamos não haver alterações inatas, decidimos investigar a hipótese de uma possível modulação do SRA e do SCC na ELT em WAR, tipo de epilepsia que reflete crises parciais complexas e é apresentada após o abrasamento audiogênico, o qual ocorre neste modelo com estímulos repetidos e com conseqüente recrutamento límbico (Garcia-Cairasco et al., 1996; Moraes et al., 2000). Assim, analisamos em hipocampo (região recrutada com o abrasamento - veja Introdução página 21) os níveis de expressão do mRNA dos receptores AT₁, AT₂ e *mas* do SRA e dos receptores B₁ e B₂ do SCC, assim como da ECA.

4.3.1. Análise dos receptores do Sistema Renina-Angiotensina no hipocampo

Para os componentes do SRA analisados foi demonstrada uma regulação positiva da expressão do mRNA dos receptores AT₁, AT₂ e *mas* após o abrasamento audiogênico. Foi observado um aumento nos níveis de expressão de mRNA de cerca de 5 vezes para o receptor AT₁ (Figura 16), cerca de 3,3 vezes para o receptor AT₂ (Figura 17) e cerca de 4 vezes para o receptor *mas* (Figura 18),

quando comparados ao grupo WAR que não recebeu estímulo sonoro (WAR naïve). Nos WARs que receberam estímulo sonoro e tiveram crises generalizadas tônico-clônicas agudas pode ser observado que não houve nenhum tipo de modulação na expressão do mRNA dos receptores AT₁ (Figura 16), AT₂ (Figura 17) e *mas* (Figura 18) quando comparados aos WARs naïve. Não foi observada qualquer tipo de modulação da expressão dos mRNAs destes receptores quando analisados em Wistars resistentes que receberam 30 estímulos sonoros (Figuras 16, 17 e 18).

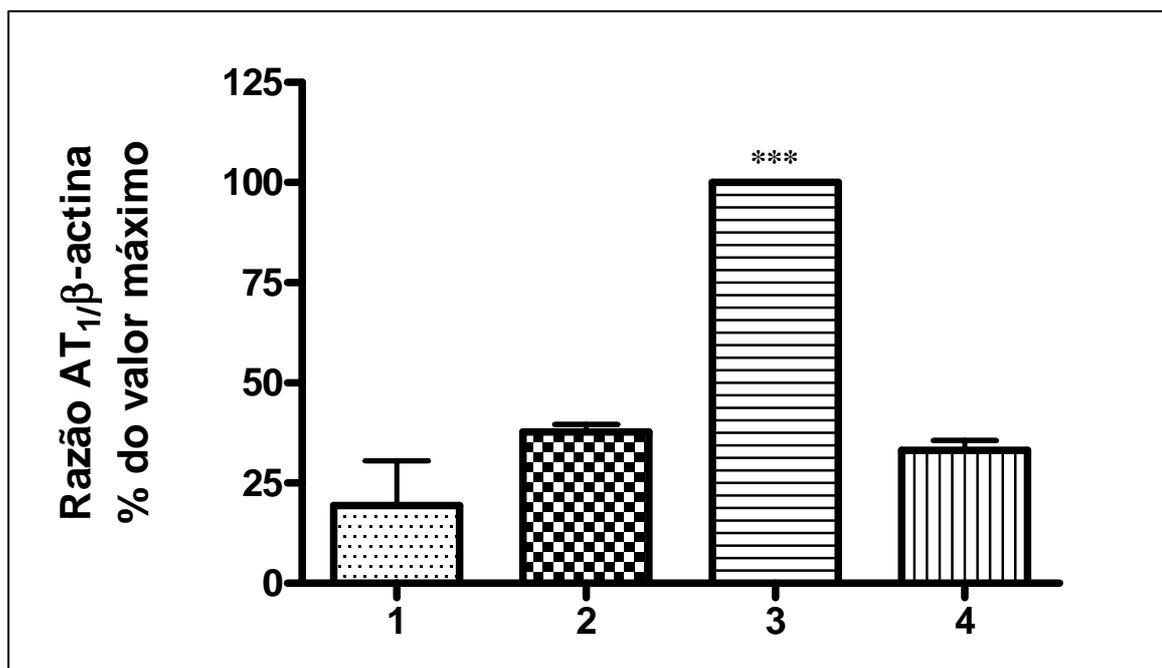


Figura 16. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor AT₁ no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*: *** = $p < 0,001$.

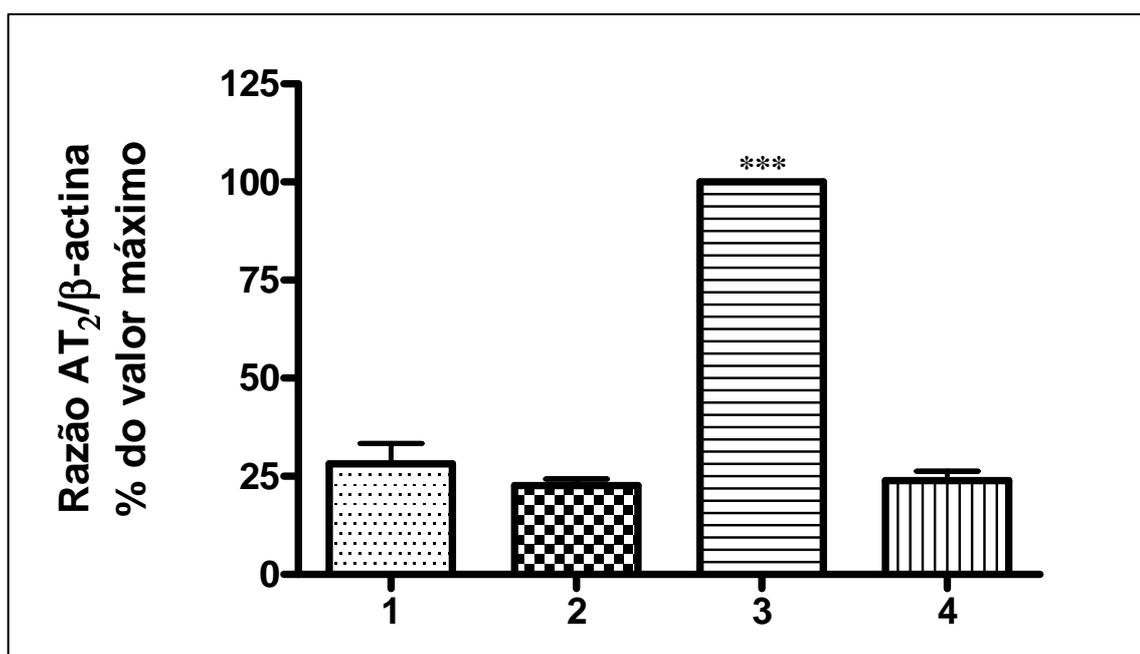


Figura 17. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor AT₂ no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*: *** = $p < 0,001$.

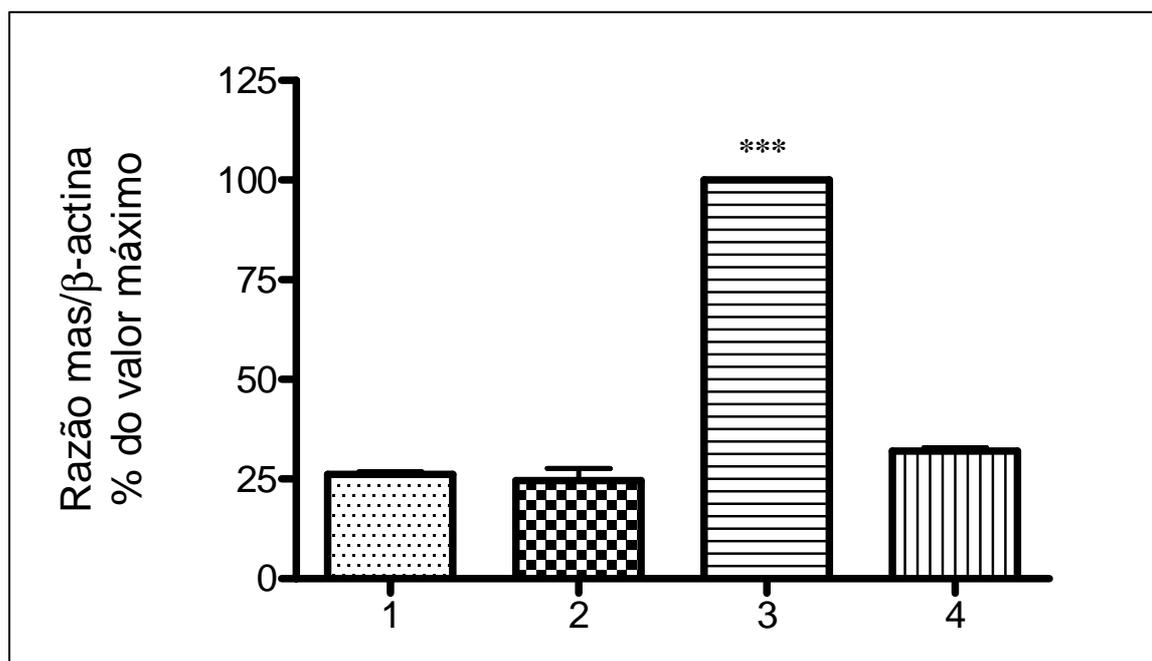


Figura 18. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor *mas* no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*: *** = $p < 0,001$.

4.3.2. Análise dos receptores do Sistema Caliceínas-Cininas no hipocampo

Nossos resultados demonstram que nos WARs com abrasamento audiogênico houve uma *up-regulation* na expressão do mRNA dos receptores B₁ e B₂ do SCC; cerca de 6,6 vezes para o receptor B₁ (Figura 19) e cerca de 5 vezes para o receptor B₂ (Figura 20) quando comparados ao WAR naïve. Assim como para o SRA, nos WARs que receberam apenas um estímulo sonoro e tiveram crises generalizadas tônico-clônicas, pode ser observado que não houve modulação na expressão do mRNA do receptor B₁ (Figura 19) e do receptor B₂ (Figura 20) quando comparados aos WARs naïve. A expressão dos mRNAs destes receptores também não sofreu qualquer tipo de modulação quando analisados em Wistars que receberam 30 estímulos sonoros (Figuras 19 e 20).

4.3.3. Análise da expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) no hipocampo

Neste modelo de abrasamento audiogênico também houve aumento de cerca de 2,5 vezes no nível de expressão da ECA em relação aos WARs sem estímulo. Tanto os WARs que tiveram crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo) quanto os Wistars que receberam 30 estímulos, não sofreram modulação da expressão do mRNA quando comparados aos WARs naïve. (Figura 21).

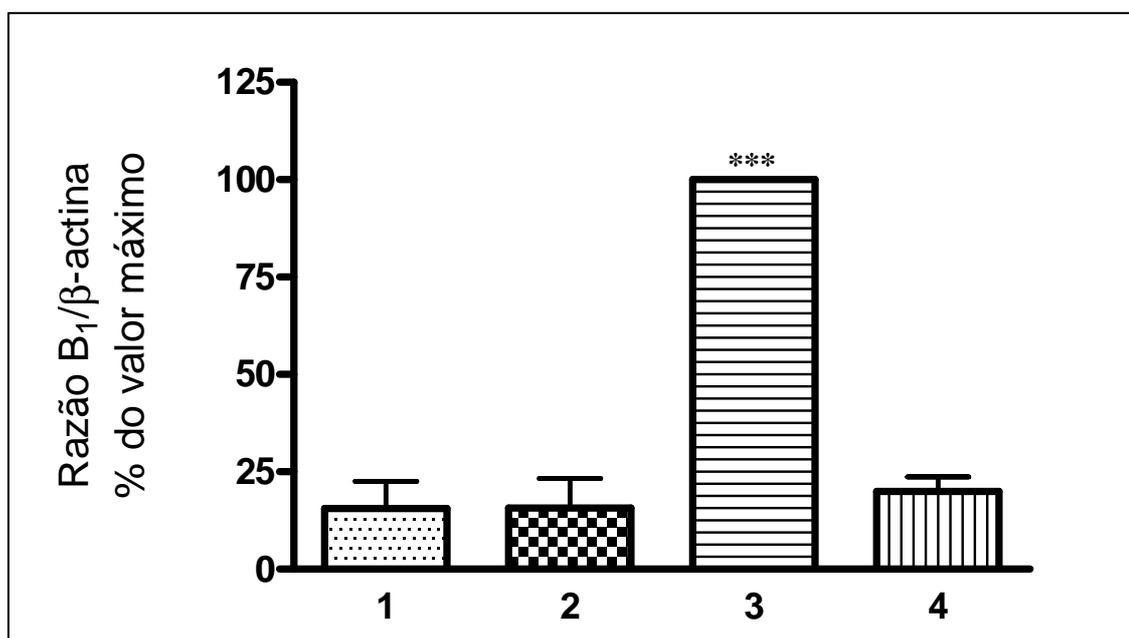


Figura 19. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor B₁ no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA* (*Newman-Keuls*): *** = $p < 0,001$.

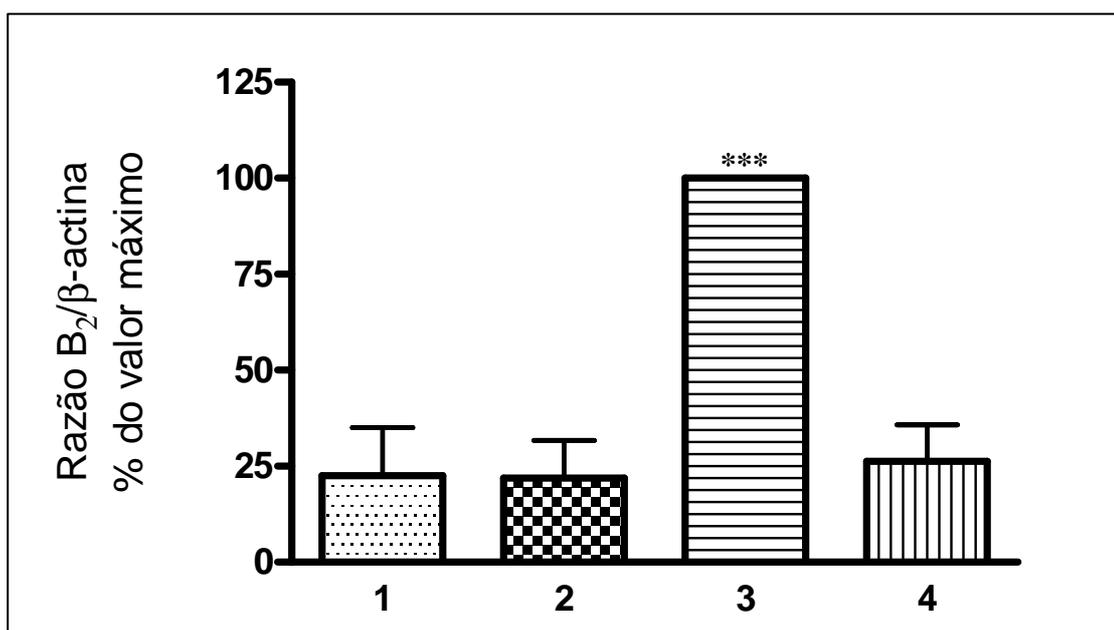


Figura 20. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor B₂ no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*: *** = $p < 0,001$.

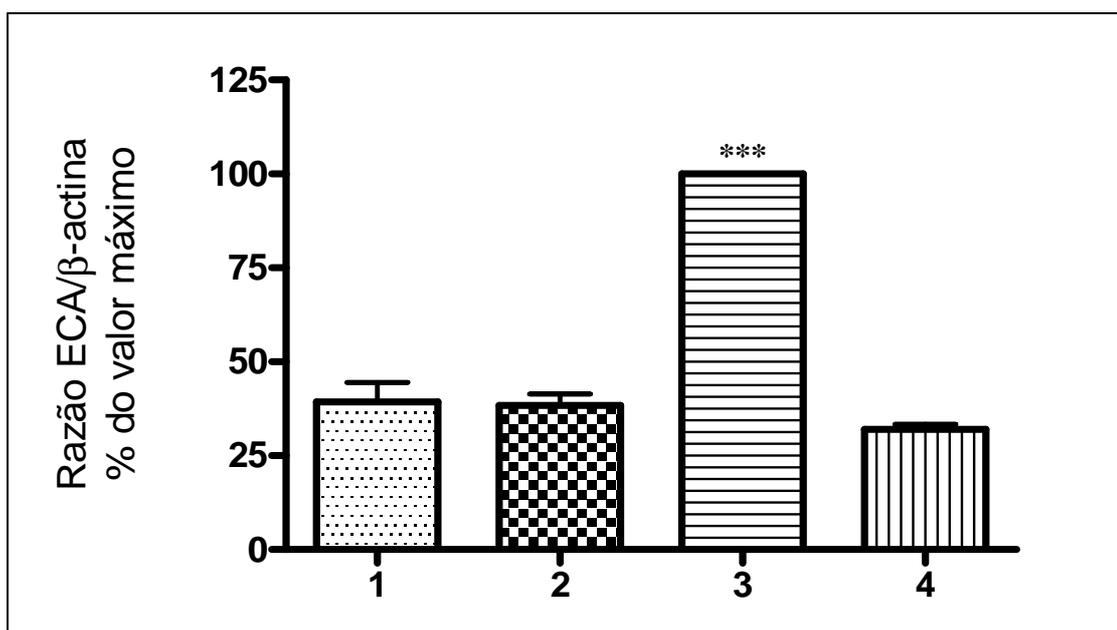


Figura 21. Análise da modulação da expressão do mRNA da ECA no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*: *** = $p < 0,001$.

4.3.4. Análise de citocinas no hipocampo

A inflamação é um processo importante no estabelecimento da epilepsia, como as citocinas são moléculas diretamente envolvidas no processo inflamatório decidimos analisar os níveis de expressão do mRNA de duas citocinas por *Real-time PCR* no hipocampo de ratos com ELT, uma citocina pró-inflamatória (IL-1 β) e uma citocina antiinflamatória (IL-10).

Os níveis de expressão de mRNA para estas citocinas no hipocampo de WARs com ELT foram comparados a WARs com crise generalizada, WARs sem estímulo sonoro, animais Wistar que receberam 30 estímulos sonoros. Os resultados obtidos mostram que não houve modulação significativa da expressão do mRNA para IL-10 (Figura 22) assim como para a IL-1 β (Figura 23) em nenhum dos grupos.

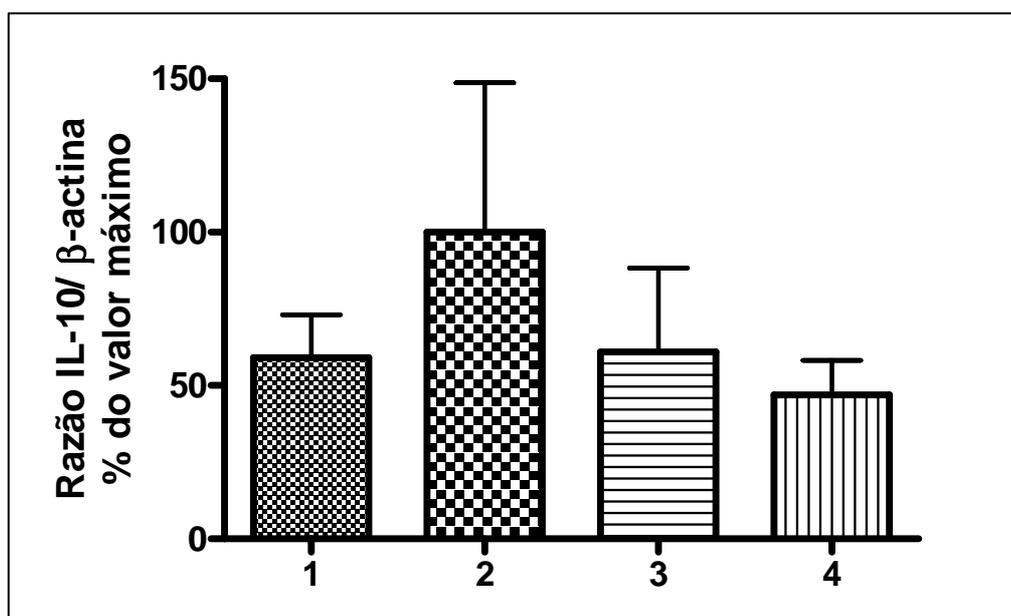


Figura 22. Expressão do mRNA de IL-10 no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. $P > 0.05$.

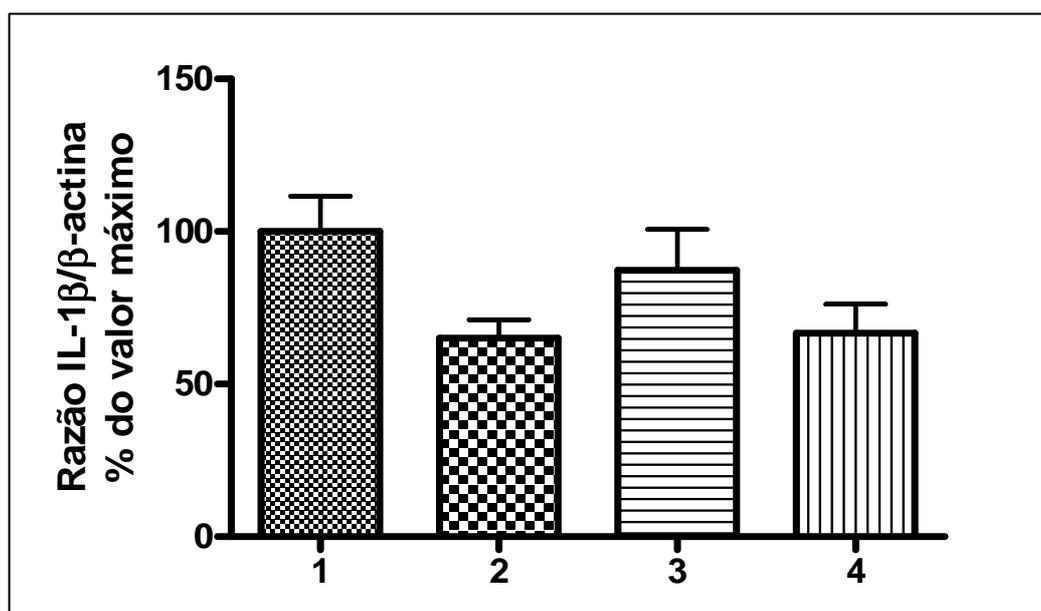


Figura 23. Expressão do mRNA de IL-1 β no hipocampo. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=5). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. $P > 0.05$.

4.4. Alterações periféricas no modelo de Epilepsia do Lobo Temporal na cepa WAR (abrasamento audiogênico)

Com base nos resultados obtidos no SNC, decidimos então investigar a modulação da expressão dos mRNAs dos componentes do SRA e SCC na ELT, tendo como parâmetros os mesmos grupos utilizados anteriormente: WAR naïve, WAR com crise generalizada e ratos Wistar que receberam 30 estímulos sonoros.

A análise dos receptores AT₁ (Figura 24), AT₂ (Figura 25) e *mas* (Figura 26) do SRA, dos receptores B₁ (Figura 27) e B₂ (Figura 28) do SCC e a ECA (Figura 29) foram analisados no coração. O objetivo foi verificar se a expressão do mRNA desses componentes no SNC era acompanhado pela expressão do mRNA no sistema periférico.

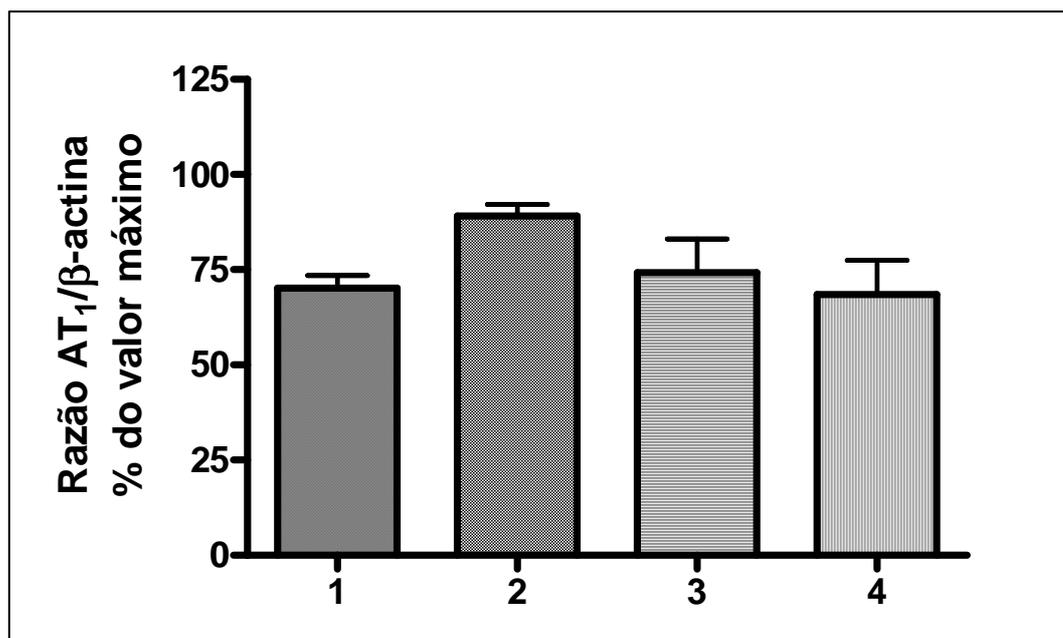


Figura 24. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor AT₁ no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiológico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA* (*Newman-Keuls*). $P > 0.05$.

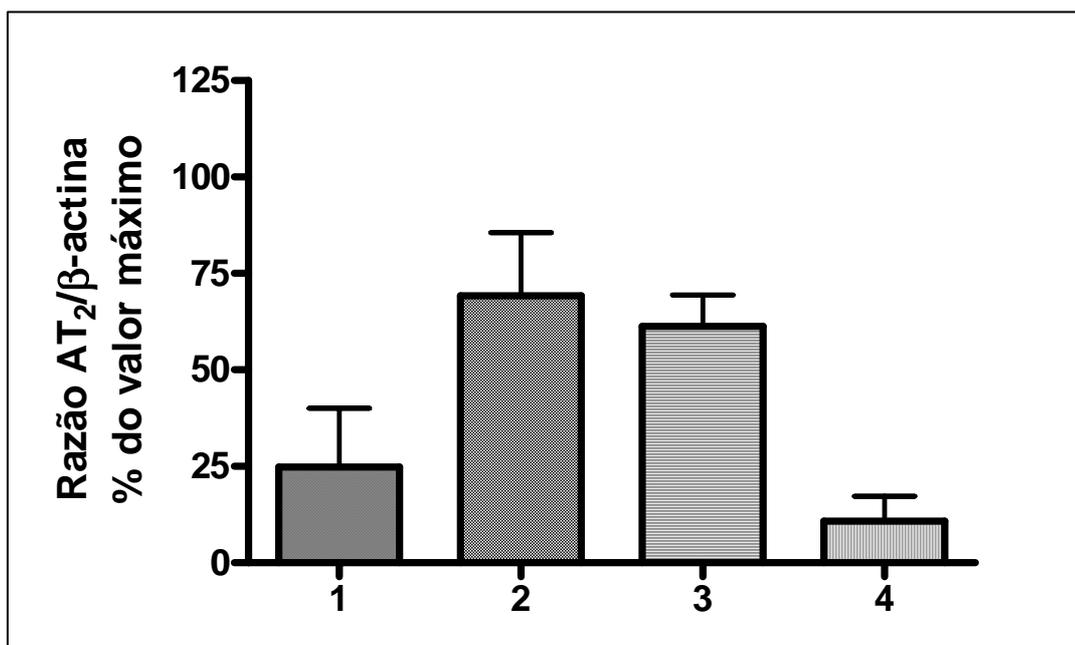


Figura 25. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor AT₂ no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiológico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. P>0.05.

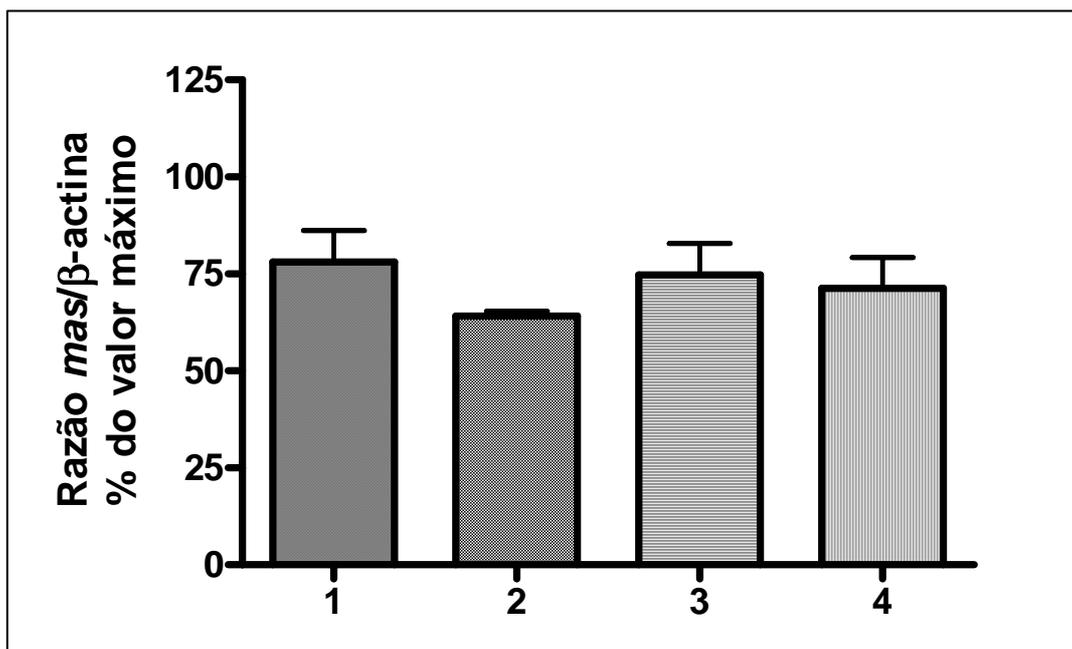


Figura 26. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor *mas* no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. $P > 0.05$.

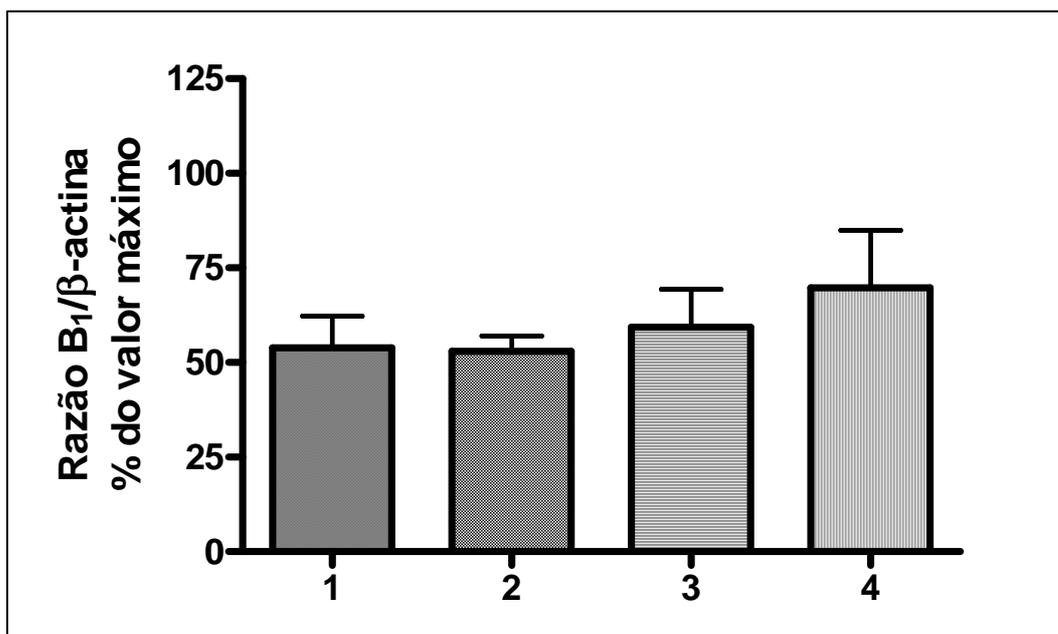


Figura 27: Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor B₁ no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA* (*Newman-Keuls*). $P > 0.05$.

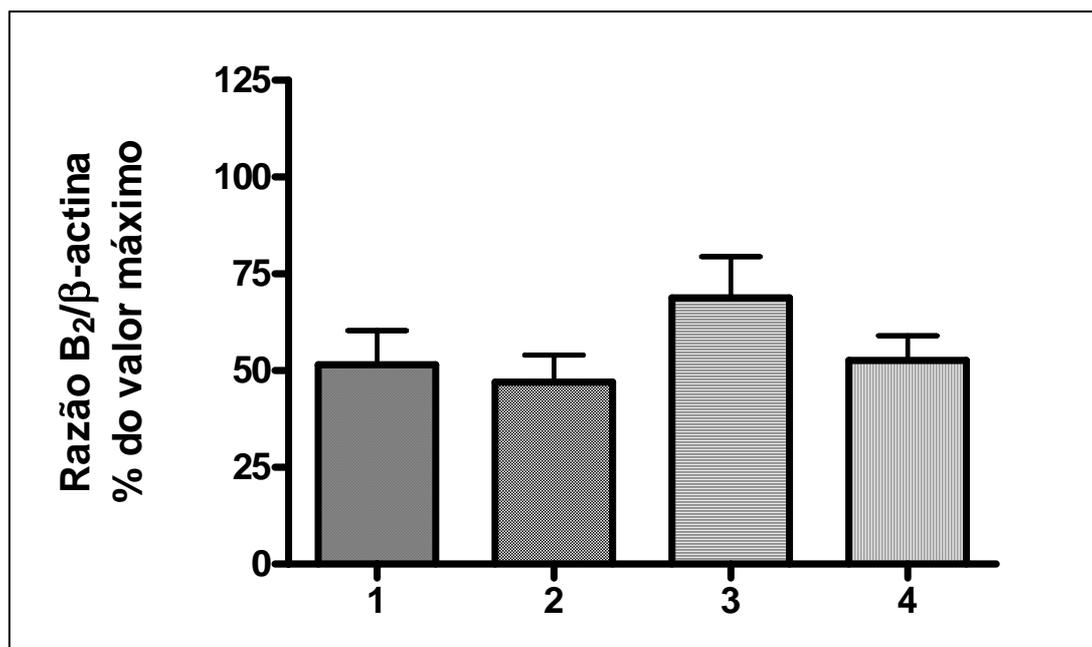


Figura 28. Análise da modulação da expressão do mRNA do receptor B₂ no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiológico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. P>0.05.

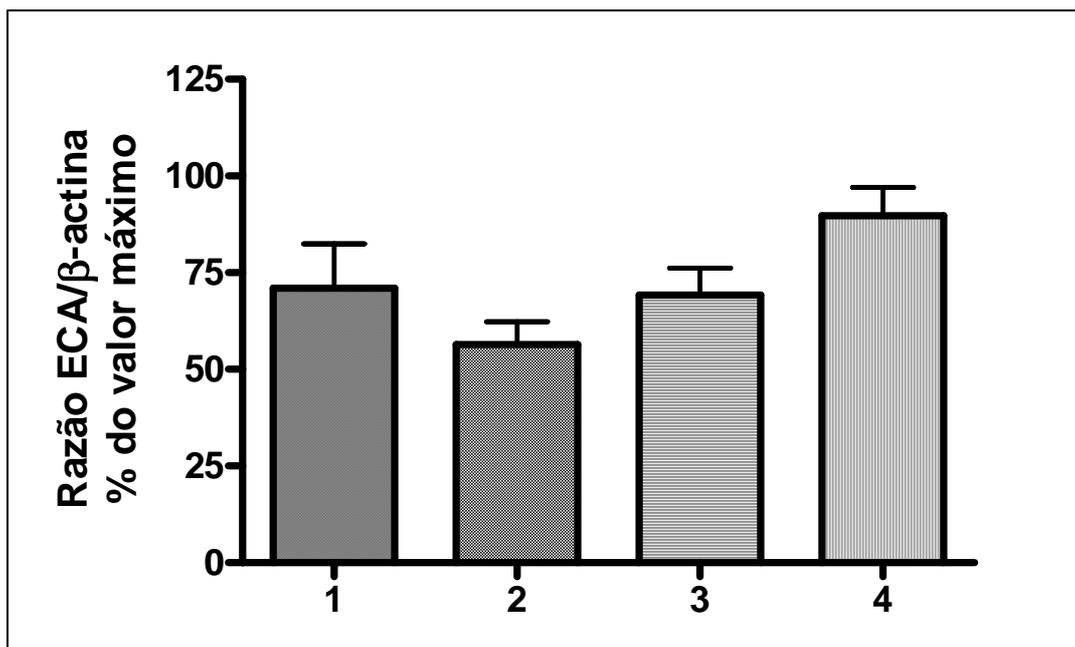


Figura 29. Análise da modulação da expressão do mRNA da ECA no coração. 1) WAR sem estímulo; 2) WAR com crise generalizada tônico-clônica (1 estímulo); 3) WAR com abrasamento audiogênico (30 estímulos) e 4) Wistar após 30 estímulo sonoros. Os dados foram normalizados a partir do valor máximo da razão obtida em cada experimento (n=4). Os dados foram analisados por *one-way ANOVA (Newman-Keuls)*. $P > 0.05$.

5. Discussão

Como detalhadamente explanado anteriormente, as epilepsias são síndromes neurológicas complexas que estão relacionadas a diferentes causas, que podem ser endógenas (como uma predisposição genética) ou exógenas (como um trauma, tumor ou acidentes vasculares), ou ainda podem ser uma mistura dos dois fatores, onde a predisposição genética pode ser um facilitador no estabelecimento da epilepsia, disparado a partir de um estímulo exógeno (Engel, 1995). Estas diferentes causas podem gerar diferentes tipos de epilepsias, que são classificadas principalmente pelos sintomas apresentados pelo indivíduo, que por sua vez refletem o local de origem do disparo da hiperexcitabilidade da crise. Possíveis mecanismos moleculares relacionados ao disparo e à manutenção da crise são muito estudados, mas apesar disso o controle da maioria dos tipos de epilepsia ainda é pouco satisfatório.

Devido à complexidade de mecanismos envolvidos na geração e manutenção das crises, muitos modelos animais têm sido desenvolvidos, de modo a permitir diferentes abordagens experimentais no estudo destas síndromes. O modelo experimental de epilepsia escolhido para a realização deste trabalho foi a cepa WAR (Doretto et al., 2003), a qual possui características que foram detalhadamente descritas na Introdução desta dissertação (ver páginas 12-15). Neste modelo audiogênico, a predisposição genética aliada à indução exógena (o estímulo sonoro) provoca crises convulsivas generalizadas tônico-

clônicas em protocolos agudos. Após exposição a estímulos sonoros repetidos é gerado o chamado abrasamento audiogênico, onde regiões do sistema límbico, como o hipocampo, são recrutadas (Garcia-Cairasco, 2002). Como descrito por Garcia-Cairasco e colaboradores (1996), quando se inicia o recrutamento da região límbica a severidade destas crises aumenta e concomitantemente a severidade das crises generalizadas tende a diminuir (veja Figura 14). A explicação para esse fato seria uma possível competição entre circuitos acústica-motores, sensorio-motores e sensório-límbicos na transmissão dos impulsos nervosos de caráter epileptiforme e epileptogênico. Como pode ser visto na Figura 15, os ratos Wistar resistentes (controles) quando recebem o estímulo sonoro não entram em crise convulsiva, mesmo depois de muitas exposições a estímulos sonoros. Estes resultados comprovam que o *background* genético é essencial para o desenvolvimento da crise convulsiva.

Classicamente, os mecanismos moleculares envolvidos na geração da hiperexcitabilidade são aqueles envolvidos no balanço entre neurotransmissores excitatórios (e.g. glutamato) e inibitórios (e.g. GABA). Além destes, o SCC e SRA, embora classicamente envolvidos no controle cardiovascular e processos inflamatórios, estão presentes no SNC e, alguns estudos já foram iniciados sobre suas correlações com a epilepsia (Georgiev e Tchalarova, 2005; Arganaraz et al., 2004a e 2004b; Bregola et al., 1999; Ongali et al, 2003).

O primeiro dado que nos chamou a atenção para uma correlação entre o SRA e a síndrome epiléptica gerada nos WARs foi o trabalho de Oliveira e

colaboradores (2005) onde foi descrito que os WARs apresentavam um quadro de homeostase cardíaca alterada, quando comparados aos animais Wistar resistentes. Além disso, como descrito na Introdução, existe uma regulação local dos componentes do SRA no SNC que participa da modulação da neurotransmissão e podem influenciar a regulação da pressão sistêmica. A partir destes dados, decidimos investigar a possibilidade da participação do SRA na suscetibilidade dos WAR às crises audiogênicas. Essa hipótese foi verificada através da análise do nível de expressão dos componentes do SRA em WARs neonatos em relação aos animais Wistar neonatos resistentes. Como foi mostrado nas Figuras 8, 9, 10 e 13, em nenhuma das regiões do SNC analisadas houve diferença na expressão dos WARs em relação aos animais Wistar resistentes. Assim, podemos inferir que a suscetibilidade dos WAR não está relacionada aos níveis de expressão dos receptores do SRA (AT_1 , AT_2 e *mas*) e nem aos níveis de expressão de ECA nas regiões do SNC analisadas no período neonatal.

Apesar dos receptores do SRA e da ECA não estarem envolvidos com a suscetibilidade às crises, estudos recentes relacionam a ativação dos receptores do SRA à modulação da hiperexcitabilidade do SNC (Wright e Harding, 2004). Portanto, foi realizado um estudo da modulação da expressão de tais receptores após uma crise generalizada tônico-clônica aguda e após o abrasamento audiogênico (30 crises) em WARs. Nossos resultados mostram que os níveis dos mRNAs dos receptores AT_1 , AT_2 , *mas* e da ECA não foram alterados com um único estímulo sonoro, ou seja, com a ocorrência da crise generalizada tônico-

clônica (veja Figuras 16, 17, 18 e 21). Por outro lado, após o abrasamento audiogênico (que representa o modelo da ELT), houve um aumento significativo nos níveis de expressão de mRNA de AT_1 , AT_2 , *mas* e ECA (veja Figuras 16, 17, 18 e 21).

O aumento da expressão destes componentes do SRA no modelo de ELT pode ser interpretado como causa do disparo das crises límbicas, mas também como parte de um mecanismo de retroalimentação positiva, ou seja: o disparo da crise leva a um aumento dos componentes do SRA gerando maior hiperexcitabilidade, que novamente aumenta a expressão dos componentes deste sistema.

Já foi descrito que a ativação do receptor AT_1 , é capaz de inibir correntes de potássio e aumentar as correntes de cálcio (Sumners et al., 1996; Shapiro et al, 1994) resultando na despolarização e subseqüentemente na excitabilidade do SNC. Existem alguns genes, entre eles *c-fos*, os quais são utilizados como marcadores de atividade cerebral (Del Bel et al, 1998). A Ang II através da ativação dos seus receptores é capaz de ativar a expressão de *c-fos* no sistema límbico (Roberts et al., 1995), parte do SNC que está associada à suscetibilidade às crises e que, como descrito anteriormente, é uma região altamente requisitada na ELT, representado neste estudo pelo abrasamento audiogênico em WARs. Desta maneira, é possível inferir que um aumento dos níveis de expressão dos receptores AT_1 e AT_2 no hipocampo de WARs com ELT (Figuras 16 e 17) pode estar relacionado à diminuição do limiar para o disparo das crises, e logo

participando no estabelecimento da ELT. O aumento da expressão da ECA na ELT (veja Figura 21) pode ter relação direta na ativação da excitabilidade do SNC através de AT₁ e AT₂, uma vez que o aumento da sua expressão está diretamente relacionado ao aumento da geração de Ang II e logo à ativação dos receptores AT₁ e AT₂.

Apesar desses indícios de que Ang II provavelmente está relacionada à excitabilidade do SNC, alguns pesquisadores têm mostrado que a Ang II também apresenta efeito neuroprotetor. A administração de Ang II i.c.v. em camundongos causou um aumento do limiar de suscetibilidade às crises induzidas por PTZ e bicuculina (Tchekalarova e Georgiev 1999). Além disso, a administração de Ang II provoca uma diminuição da gravidade das crises induzidas por administração sistêmica de PTZ (Georgiev et al., 1986), assim como uma diminuição da severidade das crises no modelo de ELT induzido com PTZ (Georgiev et al, 1995). Certamente a comparação entre crises audiogênicas e crises induzidas por PTZ é muito complicada já que geralmente as crises induzidas por PTZ se fazem em animais normais e as audiogênicas em animais geneticamente selecionados como os WARs, e tem sido motivo de detalhada discussão (Garcia-Cairasco, 2006).

O que podemos perceber é que existe um papel aparentemente contraditório da Ang II na ativação dos receptores AT₁ e AT₂, onde ora participam da ativação da hiperexcitabilidade do SNC (como na ativação de *c-fos* e regulação dos canais iônicos) e ora agem como neuroprotetores. O fato de a Ang II funcionar como um peptídeo neuroprotetor pode estar relacionado à indução

das crises, estabelecendo na situação patológica (e.g. epilepsia) um papel oposto ao da situação fisiológica (e.g. regulação dos canais iônicos na ativação da excitabilidade do SNC). Outra hipótese seria que o uso de PTZ, embora seja um modelo bem aceito no meio científico, pode estar interferindo em outros sistemas, que também teriam alterados os níveis de expressão dos receptores de Ang II e por esta razão participando da diminuição da gravidade das crises.

Em relação à participação do receptor *mas*, em 1988, Santos e colaboradores detectaram no mesencéfalo de cão que o peptídeo Ang (1-7) era formado em maior quantidade do que a Ang II. No mesmo período, Young e colaboradores (1988) observaram que o receptor *mas* era altamente expresso no hipocampo e no córtex cerebral. Hoje se sabe que o receptor *mas* é, entre os receptores do SRA, o mais expresso no hipocampo (Allen et al, 1998). Além disso, Martin e Hockfield (1993) observaram que existe um aumento da expressão do mRNA do receptor *mas* no hipocampo após a ocorrência de crises convulsivas. Portanto, os resultados aqui apresentados, onde a regulação desse receptor é modulada positivamente na ELT (Figura 18), além de corroborar os dados da literatura, nos levam a inferir que o receptor *mas* possa estar diretamente relacionado ao processo de hiperexcitabilidade do SNC com origem no hipocampo.

Além do SRA, o SCC está classicamente relacionado ao controle cardiovascular através da ativação do receptor B₂, que tem como efeito clássico final a vasodilatação. Além disso, a ativação do receptor B₁ está bem descrita na literatura como envolvida em processos inflamatórios. De acordo com Marceau

(1995) a indução da expressão do receptor B_1 acontece principalmente quando há liberação de mediadores inflamatórios ou injúria. Porém, no SNC o receptor B_1 pode ser encontrado constitutivamente expresso, assim como o receptor B_2 (Calixto et al., 2000). O ponto comum entre esses dois sistemas é a ECA, que além de produzir Ang II também degrada as cininas. Assim como o SRA, o SCC também possui um mecanismo de produção e regulação local no SNC.

Assim, os dados de Oliveira e colaboradores (2005) relacionados alterações da homeostase cardíaca em WARs também nos levaram a pensar na hipótese de uma possível relação entre o SCC e a suscetibilidade destes animais às crises.

Portanto, num primeiro momento, avaliar a diferença nos níveis de expressão dos receptores B_1 e B_2 entre WARs neonatos e Wistar resistentes neonatos nos daria um primeiro indício no envolvimento do SCC na origem das crises audiogênicas. De acordo com os resultados obtidos, tanto o receptor B_1 (Figura 19) quanto o receptor B_2 (Figura 20) não foram diferencialmente expressos nos WARs em nenhuma das regiões envolvidas no disparo da crise audiogênica assim como no hipocampo quando comparados aos animais Wistar resistentes. O que podemos inferir a partir desses resultados é que a suscetibilidade dos WAR às crises audiogênicas e também ao recrutamento de regiões límbicas após o abramento audiogênico não se deve à diferença na expressão inata dos receptores B_1 e B_2 no SNC da cepa WAR, assim como visto para os receptores do SRA e a ECA.

Já foi sugerido que as cininas e seus receptores estão associados a processos de longo prazo, como a inflamação crônica, que podem levar à epileptogênese e à transição entre um cérebro normal e um cérebro epilético (Bregola et al, 1999; Vezzani e Granata, 2005). Esta hipótese vem de encontro aos nossos resultados, já que apenas na ELT os receptores B_1 e B_2 tiveram a expressão regulada positivamente, o que não ocorreu na indução de crise generalizada (veja Figuras 19 e 20).

Bregola e colaboradores (1999) utilizando dois modelos de epilepsia, um modelo de SE agudo por injeção de ácido caínico e um modelo de abrasamento elétrico, observaram que o agonista de B_1 causava maior liberação do glutamato no hipocampo dos animais que sofreram o abrasamento elétrico do que em relação aos animais induzidos ao SE por ácido caínico. Isto sugere que a atividade biológica do receptor B_1 através da liberação de glutamato é mais pronunciada no abrasamento, e logo que esta atividade pode não ser uma consequência da crise em si, mas sim de uma condição epilética de hiperexcitabilidade crônica.

O possível efeito deletério da ativação do receptor B_1 também foi sugerido por Arganaraz e colaboradores (2004b). Através da análise de parâmetros comportamentais e histológicos em modelo experimental de injeção de pilocarpina sistêmica, foi observado um aumento da latência para a primeira crise associada a uma diminuição de crises espontâneas e uma diminuição da morte celular em animais *knockout* para B_1 . Em relação ao receptor B_2 , aqueles autores sugerem que ele tenha um papel neuroprotetor, uma vez que animais *knockout*

para o receptor B₂ apresentaram uma morte celular acentuada, aumento de crises recorrentes espontâneas e diminuição do período latente. Portanto, o balanço da expressão destes dois receptores é de fundamental importância para a manutenção da excitabilidade fisiológica normal no SNC.

Além dos estudos com camundongos *knockout*, Arganaraz e colaboradores (2004a), utilizando o modelo experimental de pilocarpina sistêmica em ratos Wistar, analisaram a expressão do mRNA dos receptores B₁ e B₂ em 3 fases do desenvolvimento da ELT: fase aguda (6 horas pós SE), fase latente (5 dias pós SE sem apresentação de crises recorrente) e fase crônica (pós SE com apresentação de crises recorrentes). Em relação ao receptor B₁, o aumento dos níveis de expressão do mRNA aconteceu na fase aguda e na fase latente apesar da proteína continuar aumentada na fase crônica. Isto pode representar que no período crônico as crises recorrentes não induzem o aumento da expressão do mRNA e, portanto, o receptor B₁ provavelmente tenha um papel chave durante a epileptogênese. Por outro lado, foi observado um aumento dos níveis de expressão de mRNA do receptor B₂ nas 3 fases. Desta maneira, este receptor pode estar envolvido na manutenção e estabelecimento da epilepsia. Portanto, os receptores do SCC estão sendo modulados nas diferentes fases associadas à epileptogênese e ao estabelecimento do “cérebro epiléptico”, assim como exercem algum tipo de balanço entre os sistemas excitatórios e inibitórios do SNC.

Embora a injeção sistêmica de pilocarpina seja um modelo já bem estabelecido para a ELT (Cavalheiro et al, 1991), a pilocarpina é um agonista

colinérgico e pode interferir na regulação de diversos sistemas centrais e periféricos. A verificação do aumento da expressão do receptor B₁ e B₂ utilizando um modelo experimental baseado em um *background* genético que quando induzido por estímulos sonoros repetidos leva à ocorrência da ELT (Garcia-Cairasco et al., 1996; Dutra Moraes et al., 2000; Romcy-Pereira e Garcia-Cairasco, 2003; Galvis-Alonso et al., 2004) é de grande relevância porque corrobora com a hipótese destes receptores estarem envolvidos diretamente com a epilepsia e não com outro mecanismo indireto associado a efeito de estresse do estímulo sonoro (animais Wistar não apresentam as alterações aqui descritas) ou, no caso dos modelos químicos, à indução das crises por outros fatores não específicos. Diferentemente dos nossos resultados, Ongali e colaboradores (2003) relataram um aumento da expressão do receptor B₁ e uma diminuição do receptor B₂, no hipocampo e em outras áreas do SNC sete dias depois do último estímulo em modelo de abrasamento por estímulos elétricos. É importante ressaltar que estes resultados foram obtidos através da técnica de *binding*; o que reflete uma medida do nível de expressão da proteína. Estes resultados distintos dos nossos resultados podem nos levar a reflexão sobre o quão confiável pode ser a quantificação dos mRNAs correspondentes. Este aspecto deve ser considerado durante a análise e discussão dos dados. Mesmo levando em consideração o possível viés da discrepância entre valores de mRNA e proteína, é importante ressaltar que o aumento evidente de um mRNA específico é um forte indício de que mecanismos estão sendo mobilizados na célula para que ocorra transcrição e

subseqüente tradução. É possível que na dinâmica da maquinaria celular possam estar ocorrendo diferentes controles pós-traducionais, que tem papel crucial para o nível de proteína detectada.

Importantemente, foi recentemente publicado um trabalho onde foram analisadas as modulações dos receptores B₁ e B₂ em pacientes com ELT (Perosa et al., 2007). Estes resultados corroboram os nossos resultados, onde os receptores B₁ e B₂ foram modulados positivamente. Os resultados deste trabalho realizado em humanos reforçam a hipótese de que a expressão dos receptores B₁ e B₂ pode ter uma relação crucial com a condição epiléptica do cérebro.

Assim, ainda resta saber se os mecanismos pelos quais os receptores B₁ e B₂ poderiam participar na epileptogênese e/ou estabelecimento da epilepsia envolvem o desencadeamento de processos inflamatórios. Um mecanismo já estudado em culturas de fibroblastos é a retroalimentação positiva entre mediadores inflamatórios e a expressão dos receptores B₁ e B₂. A administração de citocina IL-1 β foi capaz de induzir o aumento da expressão do mRNA tanto do receptor B₁ como do receptor B₂ (Phagoo et al., 2000), assim como a ativação dos receptores B₁ e B₂ também são capazes de aumentar os níveis de expressão IL-1 β (Phagoo et al, 1999).

Os níveis de expressão da IL-1 β são baixos em cérebros normais. Quando há a indução de crises por ácido caínico, em menos de 30 minutos os níveis de expressão de mRNA e de proteínas são aumentados voltando ao nível basal de 48-72 horas após o início da crise (Oprica et al., 2003). Utilizando o modelo de

indução de SE por estímulo elétrico foi observado que os níveis de IL-1 β continuam aumentados até 60 dias após o estímulo (De Simoni et al., 2000).

Com base nestes dados, junto aos nossos resultados que demonstraram um aumento da expressão dos receptores B₁ e B₂ no modelo de ELT em WARs, fizemos a análise da expressão do mRNA da IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória. Os nossos resultados mostram que não há uma conexão direta neste caso, já que o aumento dos receptores B₁ e B₂ não foi acompanhado pelo aumento da IL-1 β (veja Figura 23). Vinte e quatro horas após a indução de crises nos modelos químico e elétrico de epilepsia os níveis de citocinas ainda estão altos, o que não acontece para os WARs aqui estudados, os quais após este tempo permanecem com os níveis de IL-1 β semelhantes aos WARs sem estímulo tanto na crise generalizada quanto no abramamento (Figura 23). Assim, é possível concluir que a participação dos receptores B₁ e B₂ na ELT nos WARs deve ser através da participação no controle de vias excitatórias e inibitórias, ou na regulação de outras citocinas.

Como a IL-10 é uma citocina anti-inflamória, seria importante verificar se um possível evento inflamatório poderia estar sendo regulado por diminuição da expressão desta citocina. Mas, como pode ser observado na Figura 22, assim como para a IL-1 β também não houve modulação da expressão da IL-10.

Finalizando as análises de caracterização dos SRA e SCC na cepa WAR, decidimos investigar a modulação dos componentes destes sistemas no coração dos animais que apresentavam a ELT. Nosso objetivo foi verificar se a super regulação dos receptores dos SRA e SCC, assim como a da ECA, seria específica

do hipocampo, ou se o fato do animal apresentar ELT interferiria na regulação destes sistemas de forma geral. Como pode ser observado nas Figuras 24 a 29, não houve modulação dos níveis de mRNA dos componentes dos SCC e SRA em nenhum dos grupos analisados. Desta forma, podemos inferir que a modulação do SCC e SRA detectada no hipocampo após ELT são específicas desta região e provavelmente está relacionada a epileptogênese e estabelecimento da ELT, uma vez que esta região está diretamente associada à geração das crises convulsivas nesse modelo de epilepsia (Romcy-Pereira e Garcia-Cairasco, 2003).

6. Conclusões

1. A suscetibilidade às crises audiogênicas da cepa WAR não está relacionada a uma diferença inata da expressão dos componentes dos SRA e SCC, uma vez que não foi observada modulação destes componentes em WARs recém nascidos quando comparados aos animais Wistar.
2. Na ELT em WARs os componentes do SRA e do SCC foram regulados positivamente.
3. Na ELT em WARs os níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 não foram alterados.
4. Quando analisada a expressão dos componentes do SRA e SCC no coração em relação a ELT foi verificado que não houve modulação de nenhum dos componentes analisados.

7. Referências Bibliográficas

Albrecht, D., M. Broser, et al. (1997). "Excitatory action of angiotensins II and IV on hippocampal neuronal activity in urethane anesthetized rats." **Regul Pept** 70(2-3): 105-9.

Allen, A. M., I. Moeller, et al. (1998). "Angiotensin receptors in the nervous system." **Brain Res Bull** 47(1): 17-28.

Arganaraz, G. A., J. A. Silva, Jr., et al. (2004a). "The synthesis and distribution of the kinin B₁ and B₂ receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy." **Brain Res** 1006(1): 114-25.

Adolfo Arganaraz, G., S. Regina Perosa, et al. (2004b). "Role of kinin B₁ and B₂ receptors in the development of pilocarpine model of epilepsy." **Brain Res** 1013(1): 30-9.

Berg, A. T., F. M. Testa, et al. (1996). "The epidemiology of epilepsy. Past, present, and future." **Neurol Clin** 14(2): 383-98.

Bickerton, R. and J. P. Buckley (1961). "Evidence for a Central Mechanism in Angiotensin Induced Hypertension." **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 106(4): 834-&.

Bhoola, K. D., C. D. Figueroa, et al. (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." **Pharmacol Rev** 44(1): 1-80.

- Bregola, G., K. Varani, et al. (1999). "Changes in hippocampal and cortical B₁ bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy." **Neuroscience** 92(3): 1043-9.
- Brooks, D. P., L. Share, et al. (1986). "Interrelationship between central bradykinin and vasopressin in conscious rats." **Brain Res** 371(1): 42-8.
- Calixto, J. B., D. A. Cabrini, et al. (2000). "Kinins in pain and inflammation." **Pain** 87(1): 1-5.
- Cavalheiro, E. A., J. P. Leite, et al. (1991). "Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures." **Epilepsia** 32(6): 778-82.
- Chai, S. Y., F. A. Mendelsohn, et al. (1987). "Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography." **Neuroscience** 20(2): 615-27.
- Correa, F. M., L. M. Plunkett, et al. (1985). "Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme (kininase II) binding in individual rat brain nuclei with 125I-351A, a specific enzyme inhibitor." **Brain Res** 347(1): 192-5.
- Chung, O., H. Kuhl, et al. (1998). "Physiological and pharmacological implications of AT₁ versus AT₂ receptors." **Kidney Int Suppl** 67: S95-9.
- Del Bel, E. A., M. C. Silveira, et al. (1998). "Differential expression of c-fos mRNA and Fos protein in the rat brain after restraint stress or pentylenetetrazol-induced seizures." **Cell Mol Neurobiol** 18(3): 339-46.

- Dendorfer, A. and P. Dominiak (1995). "Characterization of bradykinin receptors mediating catecholamine release in PC12 cells." **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 351(3): 274-81.
- De Simoni, M. G., C. Perego, et al. (2000). "Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus." **Eur J Neurosci** 12(7): 2623-33.
- Diz, D. I. (2006). "Approaches to establishing angiotensin II as a neurotransmitter revisited." **Hypertension** 47(3): 334-6.
- Diz, D. I. and D. M. Jacobowitz (1984). "Cardiovascular effects of discrete intrahypothalamic and preoptic injections of bradykinin." **Brain Res Bull** 12(4): 409-17.
- Doretto, M. C., C. G. Fonseca, et al. (2003). "Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR)." **Behav Genet** 33(1): 33-42.
- Drouhault, R., N. Abrous, et al. (1987). "Bradykinin parallels thyrotropin-releasing hormone actions on prolactin release from rat anterior pituitary cells." **Neuroendocrinology** 46(4): 360-4.
- Dutra Moraes, M. F., O. Y. Galvis-Alonso, et al. (2000). "Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures." **Epilepsy Res** 39(3): 251-9.
- Dzau, V. J., J. Ingelfinger, et al. (1986). "Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains." **Hypertension** 8(6): 544-8.

- Erdos, E. G. and R. A. Skidgel (1990). "Renal metabolism of angiotensin I and II." **Kidney Int Suppl** 30: S24-7.
- Engel, J. (1995). "Concepts of Epilepsy." **Epilepsia** 36: S23-S29.
- Engel, J. (2001). "Classification of epileptic disorders." **Epilepsia** 42(3): 316-316.
- Engel, J. (2006). "Report of the ILAE Classification Core Group." **Epilepsia** 47(9): 1558-1568.
- Faingold, C. L. (1999). "Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat." **Adv Neurol** 79: 311-21.
- Fishman, M. C., E. A. Zimmerman, et al. (1981). "Renin and angiotensin: the complete system within the neuroblastoma x glioma cell." **Science** 214(4523): 921-3.
- Galvis-Alonso OY, Cortes De Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. (2004). "Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain)". **Neuroscience** 125(3):787-802.
- Ganten, D., R. Boucher, et al. (1971). "Renin activity in brain tissue of puppies and adult dogs." **Brain Res** 33(2): 557-9.
- Garcia-Cairasco N, Sabbatini RM. (1983). "Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat". **Braz J Med Biol Res.** Jul; 16(2):171-83.

Garcia-Cairasco N, D. M., Lobo MC (1990). "Genetic selection of a strain Wistar rats susceptible to audiogenic seizures. A quantitative analyses." **Epilepsia** 31(815).

Garcia-Cairasco, N., H. Wakamatsu, et al. (1996). "Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats." **Epilepsy Res** 26(1): 177-92.

Garcia-Cairasco, N. (2002). "A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures." **Hear Res** 168(1-2): 208-22.

Garcia-Cairasco, N. (2006) "Behavior, neural circuits and plasticity in acute and chronic models of generalized tonic-clonic seizures." In: Hirsch, E, Andermann, F, Chauvel, P, Engel, G, Silva, F L, Luders, H. (Org.). *Progress in Epileptic Disorders, Generalized Seizures: From clinical phenomenology to underlying systems and networks*. Mountrouge, France: John Libbey Eurotext, v. 2, p. 197-228.

Georgiev, V. P., M. B. Lazarova, et al. (1995). "Further evidence for the interactions between angiotensin II and GABAergic transmission in pentylenetetrazol kindling seizures in mice." **Neuropeptides** 28(1): 29-34.

Georgiev, V. P., B. P. Petkova, et al. (1986). "Interactions of angiotensin II and GABA-ergic agents at the threshold of convulsive reactions." **Acta Physiol Pharmacol Bulg** 12(2): 14-20.

Gomes M, Zeitoune RG, Kropf LA, Beeck Ed Eda S. (2002). "A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil". **Arq Neuropsiquiatr** Sep; 60(3-B):708-11.

Tchekalarova J, Georgiev V. (2005) Angiotensin peptides modulatory system: how is it implicated in the control of seizure susceptibility? **Life Sci Jan**, 14; 76(9): 955-70.

Heitsch, H. (2003). "The therapeutic potential of bradykinin B₂ receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease." **Expert Opin Investig Drugs** 12(5): 759-70.

"International league against epilepsy - ILAE.", <<http://www.ilae-epilepsy.org>>

Jackson, T. R., L. A. Blair, et al. (1988). "The mas oncogene encodes an angiotensin receptor." **Nature** 335(6189): 437-40.

Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (2002). "Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease." **J Allergy Clin Immunol** 109(2): 195-209.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med** Apr-Jun; 27(2-3):95-125.

Malinowska, L., A. Olszewski, et al. (1976). "The influence of angiotensin on central effect of acetylcholine in rats." **Pol J Pharmacol Pharm** 28(6): 685-90.

Marceau, F. (1995). "Kinin B1 receptors: a review." **Immunopharmacology** 30(1): 1-26.

Marino Jr R, C. A., Pinho E (1987). "Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo." **Arq Neur-Psiq** 44: 243-254.

Martin, K. A. and S. Hockfield (1993). "Expression of the mas proto-oncogene in the rat hippocampal formation is regulated by neuronal activity." **Brain Res Mol Brain Res** 19(4): 303-9.

McEachern, A. E., E. R. Shelton, et al. (1991). "Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor." **Proc Natl Acad Sci U S A** 88(17): 7724-8.

Menke, J. G., J. A. Borkowski, et al. (1994). "Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor." **J Biol Chem** 269(34): 21583-6.

Moreau, M. E., N. Garbacki, et al. (2005). "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets." **J Pharmacol Sci** 99(1): 6-38.

Mesquita, F., Jr., J. F. Aguiar, et al. (2005). "Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats." **Brain Res Bull** 65(2): 177-83.

Min, L. L. and J. W. A. S. Sander (2003). "National demonstration project on epilepsy in Brazil." **Arquivos De Neuro-Psiquiatria** 61(1): 153-156.

Murphy, T. J., R. W. Alexander, et al. (1991). "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." **Nature** 351(6323): 233-6.

Nahmias, C., S. M. Cazaubon, et al. (1995). "Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells." **Biochem J** 306 (Pt 1): 87-92.

Nicoletta, P., M. Pochiero, et al. (1983). "Interaction between renin-angiotensin system and cholinergic system in brain." **Neuropharmacology** 22(11): 1269-75.

- Nicholls, M. G., J. I. Robertson, et al. (2001). "The renin-angiotensin system in the twenty-first century." **Blood Press** 10(5-6): 327-43.
- Nouet, S. and C. Nahmias (2000). "Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor." **Trends Endocrinol Metab** 11(1): 1-6.
- Okamura, T., D. L. Clemens, et al. (1981). "Renin, angiotensins, and angiotensin-converting enzyme in neuroblastoma cells: evidence for intracellular formation of angiotensins." **Proc Natl Acad Sci U S A** 78(11): 6940-3.
- Oliveira M, Oliveira J. A., Salgado H. C, Garcia-Cairasco N., Fazan Jr R. (2005). Pressão arterial e frequência cardíaca de ratos com crises convulsivas audiogênicas. **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**.
- Ongali, B., M. M. Campos, et al. (2003). "Autoradiographic analysis of rat brain kinin B₁ and B₂ receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy." **J Comp Neurol** 461(4): 506-19.
- Oprica, M., C. Eriksson, et al. (2003). "Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system." **J Cell Mol Med** 7(2): 127-40.
- Perosa, S. R., G. A. Arganaraz, et al. (2007). "Kinin B₁ and B₂ receptors are overexpressed in the hippocampus of humans with temporal lobe epilepsy." **Hippocampus** 17(1): 26-33.
- Phagoo, S. B., S. Poole, et al. (1999). "Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts." **Mol Pharmacol** 56(2): 325-33.

Phagoo, S. B., M. Yaqoob, et al. (2000). "Regulation of bradykinin receptor gene expression in human lung fibroblasts." **Eur J Pharmacol** 397(2-3): 237-46.

Rabin, M., D. Birnbaum, et al. (1987). "Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements." **Oncogene Res** 1(2): 169-78.

Regoli, D. and J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." **Pharmacol Rev** 32(1): 1-46.

Roberts, K. A., L. T. Krebs, et al. (1995). "Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats." **Brain Res** 682(1-2): 13-21.

Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N. (2003) "Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining." **Neuroscience**;119(2):533-46.

Rossetti F, Rodrigues MC, de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. (2006) "EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain)". **Epilepsy Res.** Dec; 72(2-3): 192-208.

Sander, J. W. and S. D. Shorvon (1996). "Epidemiology of the epilepsies." **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 61(5): 433-43.

Santos, R. A., K. B. Brosnihan, et al. (1988). "Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem." **Hypertension** 11(2 Pt 2): I153-7.

- Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(14): 8258-63.
- Sasaki, K., Y. Yamano, et al. (1991). "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." **Nature** 351(6323): 230-3.
- Sirett, N. E., A. S. McLean, et al. (1977). "Distribution of angiotensin II receptors in rat brain." **Brain Res** 122(2): 299-312.
- Shapiro, M. S., L. P. Wollmuth, et al. (1994). "Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins." **Neuron** 12(6): 1319-29.
- Shneker, B. F. and N. B. Fountain (2003). "Epilepsy." **Dis Mon** 49(7): 426-78.
- Sumners, C., M. Zhu, et al. (1996). "Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K⁺ and Ca²⁺ currents: intracellular mechanisms." **Am J Physiol** 271(1 Pt 1): C154-63.
- Tchekalarova, J. and V. Georgiev (1999). "Adenosine-angiotensin II interactions in pentylenetetrazol seizure threshold in mice." **J Physiol Paris** 93(3): 191-7.
- Umeoka Ehl, A.-R. J., Garcia-Cairasco N, Elias Llk (2005). Avaliação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos audiogênicos. **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**.
- Urata, H., B. Healy, et al. (1990). "Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts." **Circ Res** 66(4): 883-90.

Vezzani, A. and T. Granata (2005). "Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence." **Epilepsia** 46(11): 1724-43.

Whitworth, J. A., C. G. Schyvens, et al. (2001). "Glucocorticoid-induced hypertension: from mouse to man." **Clin Exp Pharmacol Physiol** 28(12): 993-6.

Young, D., K. O'Neill, et al. (1988). "Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain." **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(14): 5339-42.

Yu, H., H. Rakugi, et al. (1993). "The role of activated vascular angiotensin II generation in vascular hypertrophy in one-kidney, one clip hypertensive rats." **J Hypertens** 11(12): 1347-55.

Wright, J. W. and J. W. Harding (2004). "The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory." **Prog Neurobiol** 72(4): 263-93.

Zohn, I. E., M. Symons, et al. (1998). "Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac." **Mol Cell Biol** 18(3): 1225-35.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)