

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

RICARDO SILVA DOS SANTOS

EXPRESSÃO GÊNICA DA FAMÍLIA HCN EM RATOS COM EPILEPSIA
INDUZIDA PELA PILOCARPINA E EM TECIDO HIPOCAMPAL E
CORTICAL HUMANO

PORTO ALEGRE

2008

RICARDO SILVA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA FAMÍLIA HCN EM RATOS COM EPILEPSIA INDUZIDA
PELA PILOCARPINA E EM TECIDO HIPOCAMPAL E CORTICAL HUMANO**

.

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde: área de concentração: Neurociências –Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- Requisito para a obtenção do Título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. JADERSON COSTA DA COSTA
Co-Orientador: Prof. Dra. DENISE CANTARELLI MACHADO

Porto Alegre
2008

RICARDO SILVA DOS SANTOS

Expressão Gênica Da Família HCN Em Ratos Com Epilepsia Induzida
Pela Pilocarpina E Tecido Hipocampal e Cortical Humano.

Tese a ser apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Médica e
Ciências da Saúde: área de
concentração: Neurociências –Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul- Requisito para a obtenção do Título
de Doutor em Neurociências.

Aprovado em _____ de _____ de 2008

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa- USP

Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna- UCS

Prof. Dr. Jorge Wladimir Junqueira Bizzi - Ulbra

Prof. Dr. Bernardo Garicochea - PUCRS

(membro Suplente) Prof. Dr. André Palmira - PUCRS

Para Maria de Fátima, é claro, sempre...

Para a “Poetisa” Maria Carolina

E o “Gamer” Maurício

*Para Jaderson Costa da Costa, eterno
professor, amigo, exemplo...
Da bolsa de Iniciação Científica ao
Doutorado*

Agradecimentos Especiais

- Para os professores **Jaderson Costa da Costa** e **Denise Cantarelli Machado** pela orientação, comentários, apoio e incentivos constantes.
.
- Para **Andréa Alencar Tavares**, amiga colaboradora e incansável neurocientista.
- Para os colegas e amigos do laboratório de Pneumologia/IPB-PUCRS, em especial **Christian Viezzer** e **Jeremiah Lubianca**, amigos e especialistas em técnicas de biologia molecular; as colegas pesquisadoras (“meninas”) **Luisa Moreira**, **Fernanda Cruz** e **Aline Vieira**.
- Para os colegas do Laboratório de Neurociências/IPB-PUCRS, em especial **Andréa Tavares**, **Fernanda Cunha**, **Zaquer Costa**, **Ricardo Breda**, **Simone Salamoni** e **Zuzete Pires**.
- Aos colegas do Serviço de Neurocirurgia do Hospital São Lucas, em especial **Drs Eduardo**, **Eliseu Paglioli-Neto** e em especial para o colega e colaborador **Dr. Ney A. Azambuja**, pela parceria na obtenção das amostras de tecido epiléptico humano.
- As secretárias do Instituto de Pesquisas biomédicas **Nelcy Nory Arndt** e **Thais Carneiro**.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde:
área de concentração: Neurociências – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos Pessoais

- Para a minha esposa, **Maria de Fátima**, pela compreensão, amizade e paciência nas horas de “loucura”.
- Para os **meus filhos** que souberam adiar vários de seus planos.
- Para os meus pais **Adão e Juracy**.
- Para a minha sogra, **Lídia**.
- Para o professor **Sérgio Laguna** , pelas discussões, amizade e orientação no mestrado.
- Aos meus residentes e ex-residentes do serviço de neurocirurgia: **Drs. Caio Mendonça, Isaac Bertuol, Cleverson Galvan , Rafael Opperman, André Beheregaray. Diego Silveira e Leonhard Britto**.
- Aos colegas da Neurocirurgia do Hospital Pompéia, em especial Drs. Leovegildo Frigeri, Marcelo Frigeri ,Carlos Ordovás, Rafael Pauletti e Fabiano Ruosso.
- Aos colegas da FSG pelo apoio e incentivo, em especial à **prof.^a Maria Helena Ramalho**.

“... Ao invés de optarmos por contar a história verdadeira de uma partícula, escolhemos contar todas suas possíveis histórias ...”

“... Vejam que, ao final, são apenas setinhas que apontam em diferentes direções, ao mesmo tempo ...”

Richard Feynman, físico, explicando seus diagramas de Eletrodinâmica quântica em suas “Lectures”.

RESUMO

Expressão Gênica da Família HCN em Ratos com epilepsia Induzida pela Pilocarpina e Tecido Hipocampal e Cortical Humano.

Os canais catiônicos ativados pela hiperpolarização (C_{HCNs}), são membros de uma família cuja expressão é fortemente correlacionada com a excitabilidade neuronal sendo codificado por 4 genes separados HCN1-HCN4. Sob o contexto das canalopatias os C_{HCNs} estão associados a diferentes formas de epilepsias adquiridas. O presente estudo tem como objetivo, determinar o padrão de expressão gênica da família HCN em diferentes regiões do sistema nervoso central (córtex temporal, subiculum, CA1, CA2 e cerebelo) de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina e tecido Hipocampal e Cortical Humano após cirurgia. Os níveis de expressão gênicas relativos dos genes HCNs foram quantificados pela técnica de PCR em tempo real utilizando o fluoróforo o SYBR Green. Neste estudo observamos, que: 1- em todas as áreas estudadas houve a transcrição de HCN1,2,3 e 4. 2- em ratos controles, ratos tratados com pilocarpina (agudo e crônico) e tecido hipocampal e cortical humano o transcrito HCN1 apresentou maior expressão relativa ; 3- no estudo comparativo entre ratos houve redução significativa do transcrito HCN1 de ratos tratados com pilocarpina crônico em relação ao seu controle em todas as áreas do sistema nervoso central estudadas. 4- no estudo comparativo entre tecido hipocampal humano houve redução significativa do transcrito HCN1 do tecido hipocampal de pacientes com epilepsia em relação ao tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico, 5- aumento da expressão relativa do transcrito HCN2 em CA1 de ratos tratados com piocarpina-Agudo acompanhado por queda na expressão no grupo crônico; 6-No estudo comparativo entre tecido hipocampal humano houve redução significativa do

transcrito HCN1 do tecido hipocampal de pacientes com epilepsia em relação ao tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico .7-no estudo comparativo entre tecido hipocampal humano houve redução significativa do transcrito HCN4 do tecido hipocampal de pacientes com epilepsia em relação ao tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico. Nossos dados reforçam a idéia de que os canais HCN estejam alterados no nível transcricional em resposta a breves períodos de atividade elétrica neuronal anormal, contribuindo para distúrbios de excitabilidade neuronal, como é típico da epilepsia.

ABSTRACT

Expression of a specific hyperpolarization-activity cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN1-4) in human and experimental epileptic rats.

Changes in the expression of ion channels, are emerging as possible mechanisms in the development of certain epilepsies. Hyperpolarization-activity cyclic nucleotide-gated cation channel (C_{HCNs}) contribute to various physiological properties and functions in the brain, including neuronal pacemaker activity, setting of resting membrane potential and dendritic integration of synaptic input. Four subunits of . hyperpolarization-activity cyclic nucleotide-gated cation channels HCN1-4 which generated H-current(I_H) have been cloned recently. To better understand the functional diversity of C_{HCNs} in the brain we examine the expression of these channels in areas CA1, CA2, subiculum, neocortex and cerebellum from rats brains and CA1 and neocortex of patients with mesial temporal sclerosis, that underwent surgery for medically intractable epilepsy (THET). Patients with cranioccephalic trauma were considered our control group. Male Wistar rats were divided into control and experimental/pilocarpine-treated groups acute (RTPA) and chronic (RTPC). Fifteen (acute group) and sixty (chronic group) after treatment with vehicle or pilocarpine rats were decapitated under thiopental anesthesia. Their brains were rapidly removed and prepared for Real-time PCR (RT-PCR). RT-PCR technique was used to investigated the expression of these genes in the areas above and we observed: 1- The four isoforms HCN1-4 were expressed in the anatomic areas studied in the nervous system. 2- HCN1 isoform had upregulation when compared inner groups. In the pilocarpine treated groups HCN1 mRNA expression had downregulation when compared with control groups. 5-In THET studied here, the profound lost of interneural and principal cells population and consequent reduced

inhibition caused a consequent downregulation of mRNA HCN1. 6-The upregulation of mRNA HCN2 subtypes in RTPA and downregulation occurred in the RTPC. 7-The HCN1 mRNA expression was lower in the patients with chronic epilepsy when we compared with the hippocampus of patients with traumatic injuries.

Our results support previous finding and further suggest unexpected actions of C_{HCNS} in the brain and indicate that HCN isoforms is dynamically regulated in human as well as in experimental models of hippocampal epilepsy, suggesting also that transcriptional dysregulation of HCN might contribute to the epileptogenic process and that certain mechanisms for the altered expression of HCN channels may be involved in the epileptogenic mechanisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág
Figura 1-	Comparação histológica de um hipocampo controle versus hipocampo com esclerose hipocampal.	4
Figura 2-	Diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampos de ratos e tecido humano	7
Quadro 1-	Resumo das principais correntes hipocampais	9
Quadro 2-	Sumário dos alvos dos fármacos- antiepiléticos	11
Quadro 3-	Propriedades Biofísicas da Corrente Ih gerada pelas diferentes isoformas dos canais H quando expressos em sistemas Heterólogos	20
Figura 3-	Propriedades dos Canais H	21
Figura 4-	Efeito da corrente Ih na excitabilidade	23
Figura 5 -	Modelo de Canalopatia Adquirida na epilepsia	24
Quadro 4-	Síndromes Epiléticas associadas às mutações gênicas que codificam os canais iônicos	25
Quadro 5-	Modificações observadas nos alvos das FAEs ou transportadores na epilepsia experimental ou em humanos	29
Figura 6-	Hipóteses para a Farmacorresistência	30
Quadro 6-	Origem do tecido cerebral e grupos de tratamento	40
Figura 7-	Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina .e do Grupo Controle	42
Figura 8-	Alterações comportamentais em um rato após injeção de pilocarpina:	43
Figura 9-	Obtenção das regiões encefálicas de ratos controles e epiléticos	47
Figura 10 -	Hipocampo Esquerdo antes (a) e depois (b) da ressecção cirúrgica.	49
Figura 11 -	Obtenção das amostras de tecido humano.	50
Quadro 7-	Caracterização dos pares oligonucleotídeos iniciadores das Famílias de genes para os HCNs para ratos	53
Quadro 8-	Caracterização dos pares oligonucleotídeos iniciadores das famílias de genes para os HCNs para o tecido Humano	53
Quadro 9 -	Mix para a reação de qPCR, conforme o número de amostras	54
Figura 12 –	a) Aparelho ICYCLER (BIO-RAD) para amplificação do cDNA do qRT-PCR e b) software para a leitura da amplificação ICYCLER 3.0	54
Figura 13-	Exemplos de curvas de amplificação obtidas dos genes HCNs e β -actina no set-up de PCR em tempo real	59
Figura 14 -	Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de Ratos Controles .	63
Figura 15-	Expressão relativa dos genes HCNs comparados com a expressão do gene HCN1 em tecidos cerebrais de ratos controles	64

Figura 16 -	Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de Ratos com epilepsia aguda.	68
Figura 17 -	Expressão relativa dos genes HCNs comparados com a expressão do gene HCN1 em tecidos cerebrais de ratos com epilepsia aguda	69
Figura 18 -	Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de ratos com epilepsia crônica	73
Figura 20 –	Comparação da expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	78
Figura 21 –	Comparação da expressão dos HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	78
Figura 22 -	Expressão dos HCNs em CA2 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	81
Figura 23 -	Proporção da expressão dos HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	81
Figura 24 –	Comparação da expressão dos HCNs em subiculum de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	84
Figura 25 -	Comparação da expressão relativa dos HCNs em subiculum de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	84
Figura 26-	Comparação da expressão dos HCNs em neocórtex de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	87
Figura 27 –	Comparação da expressão dos HCNs em neocórtex de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	88
Figura 28–	Comparação da expressão dos HCNs em cerebelo de ratos controles (RC) versus ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e crônico (RTPC)	91
Figura 29 –	Comparação da expressão dos HCNs no cerebelo de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC)	92
Figura 30 -	Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs no hipocampo e córtex humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico .	96
Figura 31 -	Expressão dos HCNs em relação ao HCN1 no hipocampo e córtex humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico	96
Figura 32 -	Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs no hipocampo humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal .	99
Figura 33 –	Expressão dos HCNs em relação ao HCN1 de HCNs no hipocampo humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal	99

- Figura 34** Comparação da expressão relativa dos HCNs do tecido hipocampal humano de pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária (THET) em relação aos pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico (THTC) **102**
- Figura 35** Comparação da expressão dos genes HCNs no tecido hipocampal humano de pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária (THET) versus submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico (THTC) **101**

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1-	Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles	62
Tabela 2-	Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais tratados com pilocarpina: Grupo Agudo	67
Tabela 3-	Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais tratados com pilocarpina: Grupo Crônico	72
Tabela 4-	Parâmetros analisados em CA1 para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC)	77
Tabela 5.	Parâmetros analisados em CA2, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC)	80
Tabela 6-	Parâmetros, analisados em subiculum, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC)	83
Tabela 7-	Parâmetros, analisados em neocórtex, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC)	86
Tabela 8-	Parâmetros analisados no cerebelo, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC)	90
Tabela 9 -	Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs de tecido humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico	95
Tabela 10-	Parâmetros Analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs no Tecido Hipocampal Humano de Pacientes com Epilepsia do lobo temporal	98
Tabela 11 -	Parâmetros, analisados no tecido hipocampal humano para comparar a expressão relativa dos genes HCNs de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico (THTC) em relação aos pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária (THET)	100

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Corno de Amon
CG	Células granulares do giro denteado
CE	Córtex Entorrinal
CER	Crises espontâneas recorrentes
C_{HCN}	Canais catiônicos ativados pela hiperpolarização (Canais H)
ELT	Epilepsia do lobo temporal
FH	Formação hipocampal
FAEs	Farmacos-antiepilépticos
HCN1-4s	Genes codificadores do C _{HCN}
HIPO	Hipocampo
ILEA	Liga internacional contra a epilepsia
I_H	Corrente H
GD	Giro denteado
GABA	Ácido gama-amino butírico
NGD	Neurônios granulares do GD
L/M interneurônios	<i>Moleculare-lacunosum</i> interneurônios
o/a interneurônios	<i>Oriens/alveous</i> interneurônios
PRMD	Proteína associada à resistência a múltiplas drogas
RC	Ratos controles
RTPC	Ratos tratados com pilocarpina-crônico
RTPA	Ratos tratados com pilocarpina-agudo
SE	<i>Status epilepticus</i>
SP	<i>Stratum pyramidale</i>
SL	<i>Stratum lucidum</i>
SM	<i>Stratum moleculare</i>
SG	<i>Stratum granulosum</i>
SR	<i>Stratum radiatum</i>
SO	<i>Stratum oriens</i>
SLM	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
PER	Via perfurante
FCS	Colaterais de Schaffer
FM	Fibras musgosas
Parâmetros Mensurados	
NC_T	Normalização do limiar do ciclo relativo
ΔC_T	Diferença comparativa entre N _{CT_{HCN1}} - N _{CT_{HCN1}} e um outro subtipo
ΔΔC_T	ΔC _{T(HCN1)} - ΔC _{T(HCNoutro subtipo)}
2^{-ΔΔCT}	Valor calculado que detecta a expressão relativa do gene

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Epilepsia	2
2.1.1. Conceito de Epilepsia:	2
2.1.2. Classificação das Epilepsias	3
2.1.3. Hipocampo	5
2.1.3.1 Anatomia do hipocampo	5
2.1.3.2. Canais e Correntes Iônicas Hipocampais	7
2.2. Canalopatias	11
2.2.1. Canalopatias provocadas pelos canais iônicos dependentes de voltagem	14
2.2.1.1. Canais de Na ⁺	14
2.2.1.2. Canais de Ca ⁺²	14
2.2.1.3. Canais de K ⁺	16
2.2.1.4. Canais de Cl ⁻ e associados a GABA	17
2.2.1.5. Canais Catiônicos Mistos ativados pela Hiperpolarização (Canais hiperpolarizantes- Canal H)	17
2.2.2. Canalopatias Provocadas Pelos Canais Iônicos Dependentes de ligante: Receptores da acetilcolina	25
2.3. Farmacorresistência	26
2.4. Modelos Experimentais	30
2.4.1. Modelo da pilocarpina	31
2.4.2. Expressão gênica em modelos experimentais de epilepsia	33
2.4.2.1. PCR e PCR em Tempo Real	33
2.5. Utilização de técnicas da biologia molecular no estudo da Epilepsia	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Geral:	39
3.2. Específicos:	39

4.	MATERIAIS e MÉTODOS	40
4.1.	Grupos de Estudo	40
4.2.	Animais Experimentais.	40
4.2.1.	Indução da Epilepsia: Modelo da Pilocarpina	41
4.2.2.	Ratos Controles	43
4.3.	Seleção de pacientes doadores de tecido cerebral incluídos este estudo	44
4.3.1.	Tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia refratária (THET)	44
4.3.2.	Tecido humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico	45
4.4.	Obtenção e preparo dos tecidos cerebrais	45
4.4.1.	Obtenção das regiões encefálicas de ratos controles e epilépticos	45
4.4.2.	Obtenção das amostras de tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia (THET):	48
4.4.3.	Obtenção das amostras de tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico (THTC):	49
4.5.	Procedimentos para análise da expressão dos genes HCN1-4	51
4.5.1	Obtenção do RNA total das amostras	51
4.5.2.	Transcrição Reversa para obtenção dos cDNAs	52
4.5.3.	Técnica da PCR em tempo real (QT-PCR)	52
4.6.	Análise dos resultados	59
4.6.1.	Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo	59
4.6.2.	Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo entre as amostras de ratos.	60
4.6.3.	Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo entre as amostras de tecido hipocampal humano	60
4.7.	Considerações Éticas	60
5.	RESULTADOS	61
5.1.	Perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epilépticos dos grupos agudos e crônicos	62

5.1.1. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de Ratos Controles (RC)	64
5.1.2. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos tratados com pilocarpina – Grupo Agudo (RTPA)	69
5.1.3. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos tratados com pilocarpina – Grupo Crônico (RTPC)	74
5.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNS em diferentes regiões do sistema nervoso central de em ratos controles e epiléticos (grupos agudo e crônico)	79
5.2.1. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em CA1 de ratos controles <i>versus</i> epiléticos (agudo e crônicos)	80
5.2.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em CA2 de ratos controles <i>versus</i> epiléticos (agudo e crônicos)	83
5.2.3. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs subiculum de ratos controles <i>versus</i> epiléticos (agudo e crônicos)	86
5.2.4. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs do neocórtex de ratos controles <i>versus</i> epiléticos (agudo e crônicos)	89
5.2.5. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs no Cerebelo de ratos controles <i>versus</i> epiléticos (agudo e crônicos)	93
5.3. Perfil de expressão dos genes HCNs em hipocampo humano submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e hipocampo e córtex humano de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico.	97
5.3.1. Expressão dos genes HCN1-4 no tecido hipocampal e cortical humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico (THTC):	97
5.2.2. Expressão dos genes HCN1-4 no tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET):	101
5.4. Expressão dos genes HCN1-4 no tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET):	104
6. DISCUSSÃO	107

6.1. Perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central em ratos.	109
6.1.1. Expressão dos HCNs na formação Hipocampal em ratos	110
6.1.2. Expressão dos HCNs no Neocórtex de Ratos	111
6.1.3. Expressão dos HCNs no Cerebelo	112
6.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em ratos: ratos controles versus epilépticos	114
6.2.1. Expressão dos HCNs no Hipocampo de ratos	114
6.2.2. Expressão dos HCNs no Neocórtex	115
6.2.3. Expressão dos HCNs no Cerebelo	116
6.2.4. Alteração na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina em relação aos seus controles- regulação na expressão de HCN1 e HCN2 diferencialmente na epilepsia aguda	117
6.2.5. Alteração na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina em relação aos seus controles - Diminuição de HCNs na epilepsia crônica.	120
6.3. Perfil de expressão dos genes HCNs no tecido cortical e hipocampal Humano	123
6.3.1. Expressão dos HCNs no Hipocampo	124
6.3.2. Expressão dos HCNs no neocórtex	126
6.4. Estudo comparativo da distribuição dos genes HCNs hipocampal humano (THTC versus THET)	126
6.5. Modificações plásticas dos genes HCNs e excitabilidade neuronal	132
6.6. Padrão de expressão de HCNs relacionada ao Darwinismo neuronal.	134
6.7. Considerações Finais	135
7. CONCLUSÕES	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

1.INTRODUÇÃO:

Foram identificadas mutações em mais de 70 genes, que formam os canais iônicos, que estão relacionadas a diferentes doenças humanas entre elas a epilepsia. Surge a partir daí o conceito de canalopatia como base da disfunção que culmina em doenças nas mais diversas áreas do organismo. Um tema recente e excitante na fisiologia das canalopatias do sistema nervoso é o estudo dos canais catiônicos ativados pela hiperpolarização (C_{HCNS}), onde se têm o reconhecimento de que estes canais são membros de uma família cuja expressão é fortemente correlacionada com a excitabilidade neuronal.

O conhecimento das características desses canais pode portanto contribuir para a criação de fármacos específicos e conseqüentemente, melhor entendimento da regulação da excitabilidade neuronal. Os padrões de expressão dos genes da família que codificam os C_{HCN} ainda não são conhecidos.

O estudo da expressão gênica pela técnica da PCR em tempo real permite grandes avanços no conhecimento do comportamento de determinados genes. Esta técnica permite a quantificação específica dos transcritos e tem habilidade de monitorar em tempo real o progresso da reação de PCR através do uso de moléculas fluorescentes, sendo possível medir e quantificar a reação durante a fase exponencial da mesma.

Desta forma, o presente estudo permitirá determinar o padrão de expressão gênica da família HCN no córtex temporal, subiculum, CA1, CA2 e cerebelo de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina e hipocampus e córtex humanos após cirurgia para epilepsia refratária,

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1. Epilepsia:

2.1.1. Conceito de Epilepsia:

A epilepsia é considerada como paroxismos transitórios de descargas elétricas neuronais que ocorrem no encéfalo. Ela pode ser causada por uma grande variedade de fatores que resultam em manifestações clínicas (crises epiléticas) (Guerreiro e colaboradores, 1996). A epilepsia também pode ser vista como uma síndrome ou uma condição fisiopatológica crônica caracterizada pela expressão de crises epiléticas que recorrem mesmo na ausência da doença tóxica metabólica ou estado febril (Gastaut 1973). Este conceito destaca a entidade clínica, descrita como crise epilética, que é definida como resultado das descargas súbitas e excessivas de neurônios numa região do cérebro (crises focais) ou de áreas extensas envolvendo os dois hemisférios (crises generalizadas) (Meldrun e Rogawski, 2007). Outra situação importante é o *status epilepticus* (SE), no qual o indivíduo apresenta “crises epiléticas suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resultam num estado epilético contínuo e duradouro”.

Estima-se que entre 1 a 8% dos pacientes epiléticos apresentaram, em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE. De acordo com a organização Mundial da saúde, aproximadamente 0,8% da população mundial (50 milhões) é portadora de epilepsia (Pitkanen et al, 2007). Fernandes e colaboradores encontraram uma prevalência de 16,5-20,3/1000 respectivamente para a epilepsia ativa e inativa em Porto Alegre (Fernandes, 1993).

As faixas etárias com maior incidência são crianças com menos de 2 anos e idosos com mais de 65 anos (Guerreiro 1993). Ocorre um ligeiro predomínio do sexo masculino (Sander & Hart 1999).

2.1.2. Classificação das Epilepsias:

Existem muitas classificações das epilepsias: de acordo com a etiologia, com a idade de início das crises, com a topografia das descargas elétricas, com as manifestações clínicas, com os achados eletroencefalográficos ou tipos de crises epiléticas. O problema da classificação é controverso e ainda não existe um consenso sobre o melhor modo de fazê-la. Apesar disto a classificação mais usada é a proposta pela *Liga Internacional contra a Epilepsia (ILEA)*.

A Classificação das crises epiléticas de acordo com a ILEA baseia-se nas manifestações clínicas não levando em consideração a etiologia e anatomia. Ela divide as crises em dois grupos principais, de acordo com a origem da descarga neuronal primária: 1- as originadas em áreas corticais localizadas nos focos epiléticos (crises parciais) e 2- as caracterizadas por descargas sincrônicas, provenientes de ambos os hemisférios (crises generalizadas). Além disso, existem crises que não se enquadram em nenhuma categoria acima, sendo consideradas “não classificáveis”.

As crises focais ou parciais originam-se de um foco epilético, que representa uma região cortical localizada, onde ocorre uma descarga neuronal excessiva. As manifestações clínicas de uma crise parcial dependem da posição do foco no córtex, da propagação ou não dos fenômenos elétricos, e das vias corticais envolvidas. A

localização mais comum de origem das crises epiléticas é nos lobos temporais, o que posteriormente será abordado.

Os principais sintomas, da epilepsia do lobo temporal (ELT), podem estar associados a lesões do sistema límbico temporal, em especial do hipocampo, da amígdala e parahipocampo (Blumcke et al., 1999; Chang e Lowenstein, 2003, Sloviter, 2005, .Avoli *et al.*, 2005) . A presença de esclerose hipocampal (figura 1) tem sido identificada como uma característica marcante na maioria dos casos sendo identificada desde 1825 (Sloviter, 2005, Cohen *et al.*, 2003).

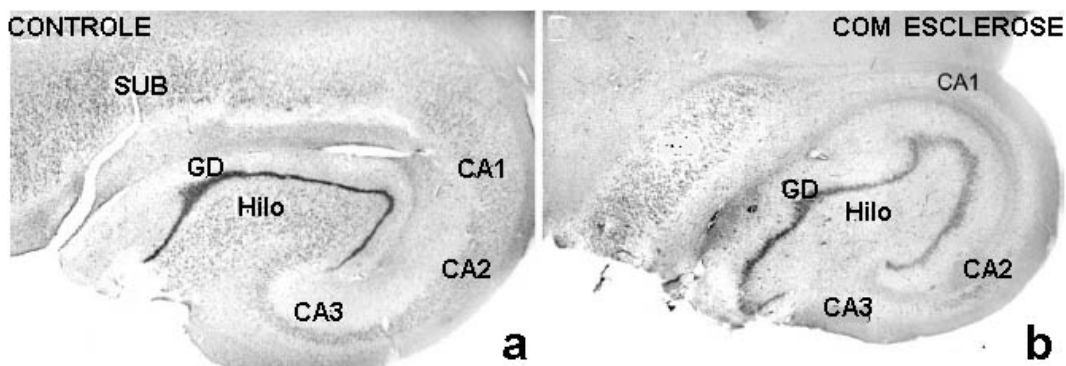


Figura 1 - Comparação histológica de um hipocampo controle versus hipocampo com esclerose hipocampal. Em a) hipocampo obtido de autópsia em b) hipocampo obtido na cirurgia. Notar em “b” perda neuronal extensa no hilo do giro dentado CA1 e CA3 e preservação nas áreas de CA2 e sibículo (SUB) (*adaptado de Sloviter, 2005*)

2.1.3. Hipocampo:

2.1.3.1 Anatomia do Hipocampo:

Os principais componentes do sistema límbico são os córtices límbicos associativos, a formação hipocampal, o complexo amigdalóide, os núcleos septais, o hipotálamo e o bulbo olfatório. O complexo amigdalóide e a formação hipocampal estão localizados na região medial do lobo temporal, adjacentes ao giro parahipocampal que é constituído pelo complexo subicular e os córtices entorrinal e parahipocampal (Van Hoesen, 1995; O'Mara *et al.*, 2001).

A formação hipocampal (FH) é constituída pelo hipocampo (HIPO), giro denteado (GD), complexo subicular e córtex entorrinal (CE) (revisado por Amaral e Witter, 1989; Knowles, 1992, Van Hoesen 1995). O HIPO é denominado *Cornus Ammonis*, ou corno de Amon (CA), por sua forma lembrar a de um chifre de carneiro presente na cabeça do “Deus Egípcio Amon”.

A lâmina contínua de neurônios principais que origina o corno de Amon e o giro denteado dobra-se sobre si mesma e separa-se ao longo do desenvolvimento, obliterando a fissura hipocampal e formando duas estruturas interdigitadas em forma de C, ambas constituindo um arqueocórtex em três camadas ou *strata* denteado (Knowles, 1992; Affifi e Bergman, 1998) Neurônios são denominados principais quando recebem ou realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região em que estão situados. Interneurônio é a denominação de neurônios que apenas possuem sinapses locais (Shepherd e Koch, 1997; Turner *et al.*, 1998)

Os neurônios piramidais do CA e granulares no GD são encontrados no *stratum pyramidale* (SP) e *stratum granulosum* (SG), respectivamente. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* (SR) e seus dendritos basais, o *stratum oriens* (SO). Os dendritos apicais dos neurônios

granulares do GD (NGD) constituem o *stratum moleculare* (SM) e seus dendritos basais misturam-se em um estrato polimórfico, com interneurônios, denominado hilus. Outros *strata* do hipocampo são o *stratum lucidum* (SL), formado pelos dendritos apicais proximais dos neurônios piramidais de CA3, e o *stratum lacunosum-moleculare* (SLM), formado pelos dendritos apicais distais dos neurônios granulares do GD.

Na região do CA, existe grande variedade de interneurônios. Estes incluem as células em cesto, localizadas próximas ao *SP* e fazem inibição via sinapse axo-somáticas, *oriens/alveous* interneurônios (O/A interneurônios), *moleculare-lacunosum* interneurônios (L/M interneurônios), e as células em candelabro que inibem as células piramidais em segmento inicial do axônio (Knowles, 1992; Turner *et al*, 1998).

A citoarquitetura da FH e as conexões entre as diversas regiões são bastante similares ao longo da escala filogenética, entretanto existem variações na posição dos hipocampos entre as espécies. Em roedores, por exemplo, a rotação hemisférica é parcial e o hipocampo é predominantemente dorsal. Podendo ser dividido em duas regiões distintas: inferior (com a região de CA1) e superior (com CA3). Na espécie humana a rotação hemisférica é completa, o hipocampo encontra-se posicionado ventralmente e a relação CA1 e CA3 é invertida quando comparada ao de rato (Figura 2).

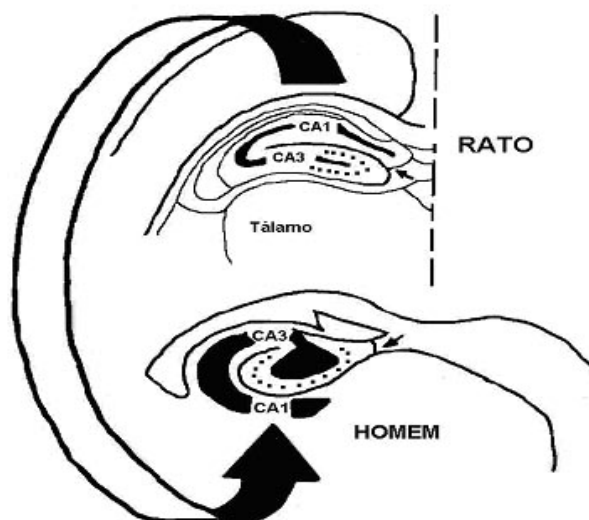


FIGURA 2. Diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampus de ratos e tecido humano. As pequenas setas indicam o sulco hipocampal. A seta grande indica a inversão no posicionamento do hipocampo com a rotação hemisférica. (adaptado de Duvemoy, 1988)

2.1.3.2. Canais e correntes iônicas hipocampais:

Antes de abordarmos as correntes iônicas, alguns pontos, quanto as propriedades básicas da membrana neuronal, como a excitabilidade devem ser considerados. A excitabilidade é uma das principais características neuronais e designa propriedades não-ôhmicas da membrana neuronal. Um exemplo crucial das propriedades excitáveis das membranas neuronais é a geração de potenciais de ação. A duração dos potenciais de ação é em “ms” e seus mecanismos são bem entendidos. O trabalho de Hodgkin e Huxley demonstrou que apenas dois íons são suficientes para provocá-lo: uma forte corrente de entrada de Na^+ e uma forte corrente de saída de K^+ , ambas provocadas pela despolarização. Neste modelo, a despolarização da membrana além de um limiar abre os canais de Na^+ e com o

rápido influxo dos íons para dentro da célula, provoca após uma saída rápida de K^+ (repolarização).

As correntes iônicas constituem, portanto, a base para o entendimento do funcionamento dos neurônios tanto isoladamente, quanto como elementos de uma população neuronal interligados formando circuitos elétricos. Elas também são essenciais para a compreensão do funcionamento dos neurotransmissores. Dessa forma, o maior (ou menor) nível de atividade elétrica de um neurônio é resultante do somatório de todas as condutâncias iônicas de membrana que determinarão por fim, os potenciais propagáveis da célula.

Numa das hipóteses da farmacorresistência na epilepsia, tópico a ser abordado a seguir, destacaremos alterações de determinados canais iônicos. Os quadros 1 e 2 mostram respectivamente um resumo das principais características das correntes iônicas, produzidas pelos seus respectivos canais iônicos, e um sumário do alvo da atuação dos fármacos-antiepilépticos (FAEs) nos respectivos alvos.

Os canais iônicos dependentes de voltagem são fundamentais na excitabilidade neuronal. Cada canal iônico dependente de voltagem é formado por glicoproteínas transmembranas (Kullmann e Hanna 2002a,b).. Os canais voltagem-dependentes formam uma vasta classe de proteínas transmembrana e incluem canais seletivos como os de Na^+ , Ca^{+2} , K^+ , Cl^- (Hammond, 2000). Entre estes, os canais-H (C_{HCN}) são únicos, pois possuem função de marcapasso sendo importantes em várias atividades rítmicas, são modulados por segundos mensageiros como AMPc, possuem grande sensibilidade a alterações na atividade neuronal mostrando mudanças na expressão após algum tempo de atividade elétrica anormal (Bräuer *et al*, 2001, Kullmann e Hanna 2002, Kullmann e Hanna 2002, Poolos, 2004, Richichi *et*

al, 2008). A questão de interesse permanece como estes canais alteram as redes neuronais após período de lesão.

O mal funcionamento dos canais, adquiridos ou herdados comprometem a função cerebral e podem ser responsáveis por epilepsia, desordens motoras ou sensitivas e doenças neuropsiquiátricas (Kullmann e Hanna 2002, Noebels, 2003 a, b; Jentsch *et al.*, 2004; Poolos, 2004, 2005, Hirose, 2006).

No tópico canalopatias serão caracterizados os principais tipos de canais iônicos.

Quadro 1- Resumo das principais correntes hipocampais:

• CORRENTES DE SÓDIO (I_{Na})	
I_{NaR}	Corrente de sódio rápida (I_{NaR}) registrada em CA1, comporta-se como corrente convencional do tipo voltagem dependente, com limiar de ativação de -50 a 60 mV e um tempo de ativação máxima de $0,9$ ms (Hammond, 2000). É sensível a TTX. A I_{NaR} é descrita no soma e terminações dendríticas. Função básica é a genese e propagação do potencial de ação
I_{Nap}	Corrente de sódio de longa duração (I_{Nap}). Sua inativação é lenta se comparada a I_{NaR} responsável pelo PA. Ela é ativada com potenciais cerca de 10 mV mais positivos do que o Potencial de membrana. Em células piramidais de CA1 e células neocorticais a gênese das descargas em salva endógenas são mediadas pelo I_{Nap} . Na presença de TTX ou quando o sódio é substituído pelo íon colina essa corrente de retificação desaparece (Hammond, 2000).
• CORRENTES DE CÁLCIO (I_{Ca}) :	
I_{CaT}	Ela é uma corrente de baixo limiar e é ativada e rapidamente desativada. Os mecanismos de ativação e desativação são tempo e voltagem dependentes sendo que essas propriedades cinéticas participariam na gênese de espículas de cálcio de baixo limiar. Em células granulares em desenvolvimento a IT parece ativar atividade em salva e despolarização pós-potenciais (Zhang <i>et al.</i> , 1993).

$I_{CaN,L,P}$	São correntes de alto limiar. A corrente tipo L, contribui para a corrente de cálcio de longa duração ao ser ativada por intensa despolarização. As do tipo N são ativadas a partir de potenciais hiperpolarizados (similar ao I_{CaT}), mas precisa de uma despolarização potente para ser ativada (O'Dell e Alger, 1991) são encontradas na parte pré-sináptica de células piramidais e contribuem para a liberação do neurotransmissor. A corrente tipo P diferencia das tipo N e L em que é ativada a potenciais de membranas mais negativos e por apresentar propriedades farmacológicas diferentes (Poncer <i>et al.</i> , 1997). Essas correntes de Ca podem participar na gênese de descargas em salva (Hammond, 2000).
---------------	--

• **CORRENTES DE POTÁSSIO (I_K)**

$I_K(I_{KDR})$	Retificador tardio ("Delayer rectifier"): É encontrada em todo o Sistema Nervoso, é ativada em potenciais de $-40mV$ e lenta inativação. Acredita-se que contribua para a repolarização dos potenciais de ação e de sua hiperpolarização pós-potencial (Storm, 1987).
I_A	A corrente do tipo I_A , é uma corrente transitória com cinética de ativação suficientemente rápida para participar na repolarização pós-potenciais de ação (Storn, 1987). Além disso regula a excitabilidade neuronal. (Segal <i>et al.</i> , 1984).
I_D	Corrente transitória de inativação lenta do tipo D: Apresenta uma rápida ativação e uma lenta inativação foi descrito por Storm (1988) em células piramidais hipocampais. Um dos efeitos do I_D é a demora no disparo do potencial de ação (PA) induzida justamente após a despolarização do potencial de membrana ao limiar. Um outro efeito seria um aumento da repolarização após PA (Storn, 1987).
I_M	Corrente de K muscarina-sensível, com condutância sublimiar e com cinética de não inativação. Esta corrente participa do na gênese do pós-potencial hiperpolarizante rápido e intermediário (fAHP, mAHP) e também contribui na acomodação neuronal após descargas de potenciais de ação durante longas despolarização. Ela pode ser bloqueada por agentes colinérgicos muscarínicos (ex.pilocarpina) (Hammond, 2000).

• **CORRENTES DE CATIONICAS ATIVADAS PELA HIPERPOLARIZAÇÃO**

I_H	Essa família de correntes tem nomes variados: I_H ("hiperpolarização"), I_Q ("queer") ou ("funny") (Pape, 1996). Elas carregam tanto Na^+ quanto K^+ em células hipocampais de CA1, a I_H participa do controle do padrão de disparo neuronal na resposta neuronal a estímulos excitatórios assim como na fase de despolarização que segue o AHP não dependentes de Ca. Esta corrente também é conhecida como "camaleão" pois, dependendo da situação ela pode contribuir tanto na excitação quanto inibição) (ver Chen <i>et al.</i> , 2002; Poolos, 2004; Inaba <i>et al.</i> , 2006). Na epilepsia ela parece ajudar na excitabilidade (ver Poolos, 2004, 2005, Inaba <i>et al.</i> , 2006, Herrman <i>et al.</i> , 2007)). O canal H será abordado em detalhes posteriormente no itens: canalopatias (página: 12)
-------	---

• **Correntes ativadas por Ca^{2+} intracelular**

I_C	Nas células do hipocampo encontramos outro grupo de correntes ativadas por Ca^{2+} intracelular (Lancaster e Adams, 1986), a I_C . Esta, além de ser regulada pelo Ca^{2+} intracelular, é tempo dependente de voltagem. Ela é fortemente ativada pelo potencial de ação simples e sua ativação contribui para a repolarização e gênese da hiperpolarização rápida (Hammond, 2000).
I_{AHP}	Corrente semelhante a I_C , mas com cinética mais lenta e participando da gênese do pós-potencial hiperpolarizante lento (Madison e Nicoll, 1984). Ela pode ser modulada por diversos neurotransmissores (ex. acetilcolina, dopamina e glutamato). A ação dos mesmos pode alterar a excitabilidade neuronal (Hammond, 2000). A I_{AHP} participa no processo de acomodação neuronal controlando a frequência de disparo (Madison e Nicoll, 1984).

QUADRO 2- SUMÁRIO DOS ALVOS DOS FÁRMACOS- ANTIEPILEPTICOS

FAE	CANAIS VOLTAGEM-DEPENDENTES						NEUROTRANSMISORES	
	I_{NaR}	I_{NaP}	I_{Ca}	I_K	I_M	I_H	GABA	GLU
PHT	X	X	X	X				
CBZ	X		X					
OCBZ	X		X					
LMT	X	X	X	X		X		
VPA	X	X	X				X	
TOP	X	X	X	X			X	X
RET					X			
GAB			X	X		X		
PB			X				X	
BDZ			X				X	

Abreviaturas: -lamotrigina (LMT), - retigabina (RET); gabapentina (GAB), - benzodiazepínico (BDZ), fenobarbital (PB); carbamazepina (CBZ), topiramato (TOP), fenitoína (PHT) valproato sódico (VPA), oxcarbamazepina (OCBZ). ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato (GLU) Dados revisados por (Remy e Beck, 2006)

2.2. Canalopatias :

A função dos canais iônicos na epileptogênese é conhecida desde a década de 60 quando foi demonstrado experimentalmente que a alteração da excitabilidade

neuronal dependia de correntes iônicas transmembranas (Matsumoto e Ajmore-Marsan, 1964). Entretanto, somente recentemente foi evidenciado a importância destes em disfunções do sistema nervoso como a epilepsia. Um importante passo nesta direção foi possível através de experimentos, envolvendo mutante de *drosophila*. Estes resultados mostraram mutações em um gene que codifica canais de potássio causando hiperexcitabilidade nervosa anormal resultando no comportamento anormal destes dípteros (apud Tempel *et al*, 1988).

A hipótese da canalopatia parece acomodar a teoria do desequilíbrio na qual foi fundamentada a epileptologia (McNamara, 1999). Esta teoria postulada por Gowers (1880) aponta o desequilíbrio, entre excitação e inibição como causa das descargas anormais no cérebro (apud Treiman, 2001). Quanto à hiperexcitabilidade, um dos poucos consensos existentes na ELT, é atribuída, pelo menos em parte, a quatro fatores: 1) aumento da excitação e propagação da atividade de determinados grupos de neurônios que disparam atividade em salva de potenciais de ação; 2) aumento da transmissão mediada pelo glutamato, particularmente via conexões recorrentes, 3) hipofunção das conexões inibitórias mediadas pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (Mody e Heinemann 1987; Traub *et al*, 1996; Buckmaster *et al*, 2002) e 4) inibição preservada porém efetiva (Wittner *et al.*, 2005).

Os canais iônicos, por constituírem uma classe heterogênea de complexos protéicos inseridos na bicamada lipídica, são cruciais para a excitabilidade neuronal, sendo importantes alvos para as drogas antiepilépticas (George, 2004). Até recentemente diversas epilepsias idiopáticas estavam associadas a mutações gênicas dos canais iônicos controlados por ligantes e por voltagem. O reconhecimento de que certas síndromes epilépticas são canalopatias iniciou uma nova era para a compreensão das patofisiologia das crises epilépticas (George,

2004, ver Poolos, 2005). Alterações da função dos canais iônicos ocorrem após o *status epilepticus* nos modelos experimentais (Brooks-Kayal, 1998, Bernard et al, 2004; Jung et al, 2007), entretanto, não está muito claro como estes correlatos iniciam as crises espontâneas.

As mutações em genes associados com canais iônicos podem ser agrupadas em 3 grandes categorias: 1) alteração dos canais formadores de poros responsáveis pelo fluxo iônico; 2) alteração de moléculas reguladoras dos canais e 3) mutações que não interferem no funcionamento do canal (Noebels, 1998).

Segundo Rodríguez (2002), os canais iônicos implicados na epilepsia são classificados de acordo com o estímulo que os ativam em: dependentes de voltagem, operados por ligantes, associados à proteína G e associados a segundos mensageiros (*apud* Porto, 2007).

2.2.1. Canalopatias provocadas pelos canais iônicos dependentes de voltagem:

2.2.1.1. Canais de Na⁺

Algumas das características da corrente gerada por estes canais já foram expostos no quadro 1. Mutações nas subunidades formadoras do poro e das subunidades acessórias β desses canais no SNC foram descobertas em algumas formas de epilepsias, como as mutações nas subunidades α SCN1A e β SCN1B, que causa epilepsia generalizada tais como as convulsões febris (Steinlein, 2000; George, 2004; Hirose, 2006, revisado por McNamara, 2006).

2.2.1.2. Canais de Ca⁺²

Estudos iniciais nas décadas de 70 e 80 evidenciaram a possível participação dos canais de Ca⁺² dependentes de voltagem nas epilepsias. Foi verificado que as reduções acentuadas na concentração extracelular desse íon poderiam criar atividade epiléptica em tecidos cerebrais como o giro denteado e outras estruturas hipocampais (Traub e Llinas, 1979; Jefferys e Haas, 1982). A magnitude dessa participação depende de neurônios específicos dessas regiões cerebrais (Loscher, 2006). Relatos na literatura verificaram que o aumento agudo do influxo de Ca⁺² é importante para manutenção da hiperexcitabilidade reflexa que ocorre em processos convulsivos (Steinlen, 2000, McNamara, 1999, 2006). Além disso, a observação de

que a ativação de canais de Ca^{+2} pode induzir alterações na expressão gênica (Steinlein e Noebels, 2000, Jones, 2002, George, 2004, Hirose, 2006, revisado por Porto *et al*,2007) sugere uma participação de maneira crônica na epilepsia.

Atualmente, são descritos seis subtipos de canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem *L*, *N*, *P*, *Q*, *R* e *T* (Yaari et al, 1983, revisado por Porto et al,2007), onde pelo menos três desses subtipos (*N*-, *P*- e *Q*-) tem sido implicados no controle da liberação de neurotransmissores nas sinapses, como acetilcolina e serotonina, e ainda, o do tipo *T* tem papel importante nas descargas rítmicas das crises epilépticas generalizadas de ausência (Deckers, et al, 2003, Porto et al,2007). Nas células granulares do giro denteado, de pacientes com epilepsia do lobo temporal e no modelo de epilepsia induzida por ácido cínico, foi verificado aumento da densidade destes canais sem serem observados mudanças consistentes na função (Beck et al, 1998).

O bloqueio da abertura dos canais de Ca^{+2} pode ser usado no tratamento de vários tipos de crises através da redução da concentração dos íons Ca^{+2} no citoplasma neuronal, reduzindo a possibilidade de dano celular excitotóxico provocado pela epilepsia (Porto et al.,2007)

2.2.1.3. Canais de K⁺

Os canais de K⁺ dependentes de voltagem participam da repolarização e hiperpolarização da membrana que segue as alterações paroxísticas da despolarização, evitando a repetição do potencial de ação. Nos processos epiléticos, estes canais participam da modulação da atividade elétrica, no desencadeamento de crises epiléticas (Steinlen, 2000; George, 2004; Hirose, 2006, McNamara, 2006) e como alvo de drogas anticonvulsivantes tem sido descritos na literatura (Wickenden, 2002, Araújo et al, 2003). As mutações nos genes responsáveis pela formação dos canais de potássio provocam diminuição da repolarização, gerando uma hiperexcitabilidade.

Existe também uma canalopatia que foi adquirida no modelo experimental de ELT. A excitabilidade dos dendritos dos neurônios piramidais de CA1 estava aumentada devido a diminuição dos canais de potássio do tipo A e pelo aumento da fosforilação pela sinalização extracelulares das quinases. A inibição desta reverte a excitabilidade dendrítica a nível controle (Bernard et al, 2004).

Os canais KCNQ correlacionam-se a correntes do tipo M que recebem este nome porque é inibida pela estimulação de receptores muscarínicos da acetilcolina (revisado por George, 2004). Essas correntes estão envolvidas na regulação da excitabilidade sublimiar dos neurônios e sua responsividade aos sinais de entrada (*inputs*) sinápticos. Esta regulação da excitabilidade neuronal provavelmente explica por que uma pequena perda de correntes M é suficiente para causar epilepsia (revisado George,2004, Hirose, 2006, McNamara, 2006) .

2.2.1.4. Canais de Cl⁻ e associados a GABA:

O GABA e a Glicina são os principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso. Eles exercem seu rápido efeito inibitório através de canais de Cl⁻. Apenas dois genes envolvidos em canais de Cl⁻ e GABA têm sido relacionados com epilepsia (Wallace, 2002, George 2004, Hirose 2006) Mutações da subunidade $\gamma 2$ do receptor do GABA, GABAA (GABRG2) foram identificadas na epilepsia com crises de ausência na infância e convulsões febris generalizadas.(Wallace, 2002, George 2004, Hirose 2006).

Outro gene que codifica canais de cloreto e que também está associado com a epilepsia herdada é o CLCN2 (George, 2004).

2.2.1.5. Canais catiônicos mistos ativados pela hiperpolarização (Canais hiperpolarizantes- C_{HCHNS}):

Os C_{HCHNS} foram identificados inicialmente no coração e recentemente na retina e neurônios motores (DiFrancesco, 1993, Pape, 1996). Dependendo da sua localização e da célula, a corrente produzida pelos C_{HCHNS} apresentam funções distintas (ver revisão de Santoro e Baran, 2003). Em termos de evolução os C_H apareceram recentemente no repertório dos canais iônicos aparecendo junto com os canais de sódio voltagem-dependente (ver Poolos, 2005).

Os C_{HCHN} são canais voltagem-dependentes estruturalmente semelhante ao canal de potássio conduzindo primariamente corrente de sódio. A abertura dos C_{HCHN}

podem ser moduladas pelos níveis intracelulares de AMPc. Desta forma podem ser tanto controlado por voltagem quanto por segundo mensageiro. Além disso, os C_{HCNS} ainda possuem a propriedade de conduzir correntes de K^+ (Chen et al, 2002, Poolos, 2004)

Os $C_{HCN1-HCN4}$ são codificados por 4 genes separados HCN1-HCN4 (Santoro et al, 199, 2000, Chen et al, 2002, Poolos, 2004,2005). Cada subunidade é composta por seis domínios transmembrânicas e um ligado ao nucleotídeo cíclico no qual se acredita que seja semelhante a forma de um canal homo ou heteromérico (Chen et al, 2002). A localização cromossômica dos genes foram determinadas para as famílias C_{HCN2} : 19p13.3 (Ludwig et al., 1999) e HCN4: 15q24-q25 (Seifert et al., 1999). A seqüência de nucleotídeos codifica transcritos de aproximadamente 780-1200 aminoácidos, com uma estrutura similar aos canais de K^+ , incluindo seis domínios conservados S1-S6 dentro da família gênica. É importante notar que há um motivo seletivo entre S4-S6 que marcadamente caracteriza os canais seletivos para K^+ . Entretanto, outros aminoácidos adjacentes diferem dos canais de K^+ , contribuindo para características únicas nos canais HCN. Todos os canais (C_{HCN1} , C_{HCN2} , C_{HCN3} e C_{HCN4}) das famílias possuem um domínio conservado (terminal C conservado chamado CNBD que contém 120 aminoácidos. Este região é importante na regulação exercida pelo AMPc (Figura 3 A e B).

A composição das subunidades influenciam a cinética e a voltagem-dependência de ativação além da modulação pelo 2° mensageiro que envolve AMPc . Por exemplo, a subunidade HCN1 caracteriza-se por apresentar uma cinética rápida e ativação por uma despolarização relativa da membrana. Já o HCN2 apresenta uma cinética de ativação mais lenta. (Chen et al, 2002). O HCN2 responde melhor a modulação do AMPc do que HCN1.

No sistema nervoso, os canais estão distribuídos amplamente no córtex, hipocampo e tálamo, bem como nos nervos periféricos (ver Poolos, 2004). Quanto a localização dos C_{HCN_s} nos neurônios, são mais abundantes nos dendritos do que nas regiões perisomáticas nos neurônios principais do córtex (Santoro e Tibbs, 1999).

A expressão dos genes HCNs no sistema nervoso central têm sido objeto de estudo tanto em nível transcripcional quanto da proteína produzida. Cada isoforma dos HCNs tem distribuição distinta (Santoro et al, 1997, 2000, 2003, Herrmann et al, 2007). Os C_{HCN1} , C_{HCN2} são encontrados principalmente no córtex e hipocampo; o C_{HCN2} também é abundante no tálamo juntamente com o C_{HCN4} (Santoro et al, 2000). No caso dos canais C_{HCN3} , aparecem modestamente no cérebro em regiões como o bulbo olfatório e hipotálamo (ver revisão de Herrman et al, 2007). Existem poucos relatos na literatura que envolvem a função dos HCNs 3 e 4, a maioria dos estudos se concentram nos HCNs 1 e 2 (Bender et al, 2003; Powel et al, 2008).

O C_{HCN1} é encontrado em abundância no hipocampo, neocórtex e nas células de Purkinje no cerebelo. A perda deste pode provocar defeitos de aprendizado e tarefas motoras. Estudos eletrofisiológicos da plasticidade sináptica em camundongos knockouts de HCN1 revelaram que a LTP (potenciação de longo prazo) em CA1 estava normal, entretanto, a LTP gerada na região na via perfurante para os dendritos mais distais de CA1 estavam aumentadas (Nolam et al 2004- ver Herrman et al, 2007)

Camundongos Knockouts de HCN2 são facilmente distinguidos por apresentarem hipoatividade e ataxia. Registros eletroencefálicos revelaram que estes mutantes apresentam epilepsia com crises de ausência. Esses resultados revelaram que os HCN2, juntamente com os canais de cálcio representam fortes

candidatos ao gene da epilepsia com crise de ausência no homem (Herrmann et al, 2007).

Tanto os C_{HCN_s} e as suas correntes produzidas, a I_H , possuem propriedades biofísicas incomuns, como “camaleões” na excitabilidade neuronal (Poolos, 2004). Elas exercem inúmeras funções no comportamento funcional do neurônio. Eles auxiliam na regulação de propriedades da membrana como o potencial de membrana, fazendo ora hiperpolarização da mesma pela entrada de potássio na célula, ora despolarizando pela entrada de sódio, regulando a resistência de entrada e a própria excitabilidade neuronal (Poolos, 2005) (Figura 2-C).

Quadro 3-Propriedades Biofísicas da Corrente I_H gerada pelas diferentes isoformas dos canais H quando expressos em sistemas Heterólogos (Santoro, 2000, Stieber et al, 2005)

Propriedades	C_{HCN1}	C_{HCN2}	H C_{HCN3}	C_{HCN4}
Cinética de Ativação	100-300 ms	200-500 ms	>750ms	>500 ms
V_{50}	-110 mV	-130 mV	-77 mV	<130 mV
Sensibilidade ao AMPc	+1,5 mV	15-20 mV	insensível	+15-20 mV

V_{50} -A metade da ativação máxima

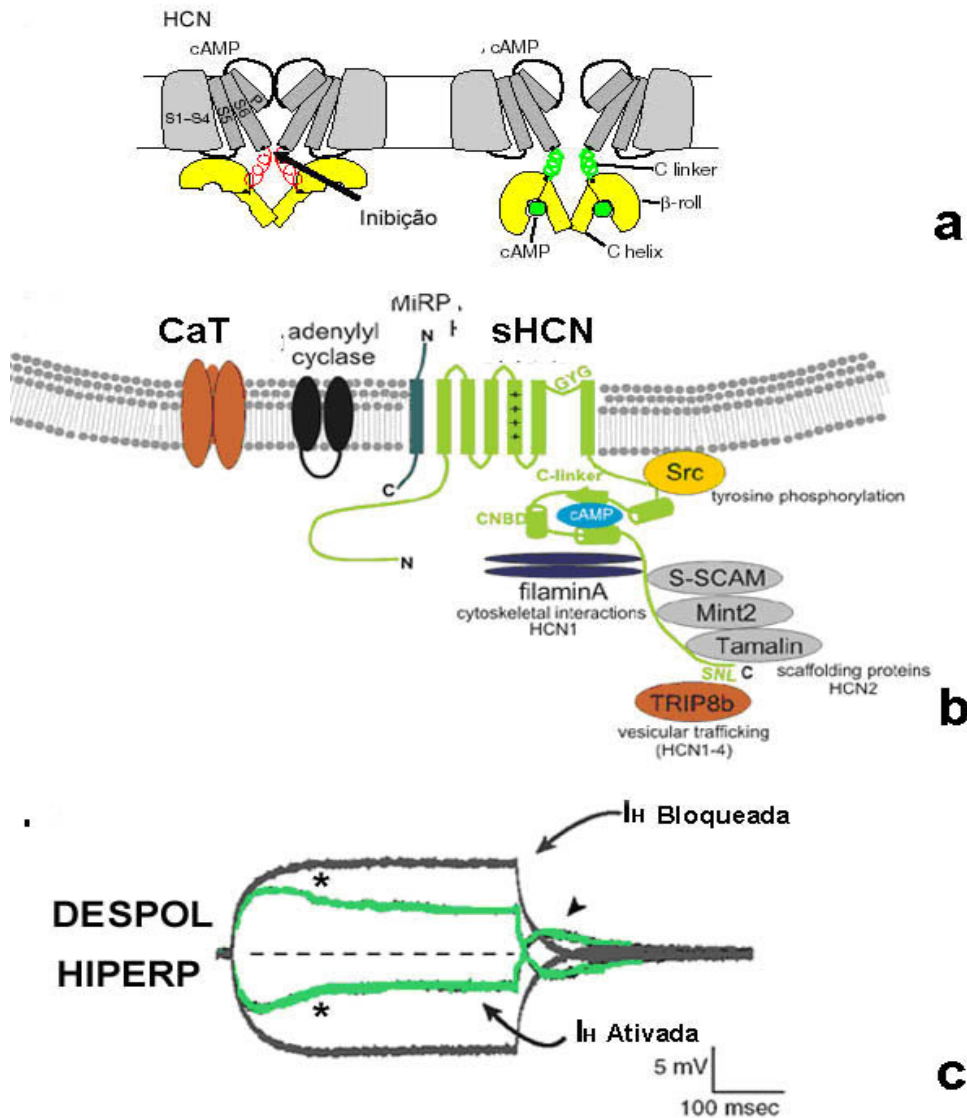


Figura 3: Propriedades dos Canais H: A) MODULAÇÃO DA ABERTURA DOS CANAIS-H PELO $AMP_{cicl\acute{o}ico}^{-}$ a) efeito do AMPc nos canais HCNs. O diagrama ilustra duas das quatro subunidades que compreendem um canal HCN. O centro do domínio transmembrânico (S1±S6) indicado em cinza. Os cilindros representam o domínio citoplasmático C que está acoplado ao segmento S6 transmembrânico para domínio ligado ao nucleotídeo cíclico (CNBD). Este consiste em um subdomínio β -roll (região semi circular amarelo) e C-helix (cilindro amarelo). A esquerda, mostra a ausência do AMP cíclico e o subdomínio β -roll por uma tensão acoplada com o C (em vermelho). A direita mostra que a presença do AMPc provoca alterações do CNBD que provoca a abertura do canal. *Adaptado de Wainger et al, 2001, Nature, vol 411* B) Proteínas reguladoras e acessórias dos C_{HCNS} : juntamente com os C_{HCNS} são encontrados os canais de cálcio tipo T (CaT), adenilato ciclase, MiRP1 C) Registro eletrofisiológico intracelular mostrando correntes despolarizantes (Desp) e hiperpolarizantes (Hiperp). Em verde mostra a corrente I_H ativada (*) e em preto bloqueada pelo bloqueador ZD7288. *Adaptado de Poolos, 2004*

A literatura tem apresentado contradição quanto à importância funcional da corrente I_H ; na camada II do córtex entorrinal de ratos normais a alta incidência aumentaria a excitabilidade (Van der Linden e Lopes da Silva, 1998). Existem evidências ainda da participação da I_H na epileptogênese, no modelo experimental de crises febris onde, tanto a I_H quanto a inibição mediada pelo neurotransmissor ácido gama-amino-butírico (GABA) estariam aumentadas (Poolos, 2004). O aumento, nestas condições, poderia ser consequência de modificações da cinética (Santoro e Tibbs, 1999) ou alteração da expressão (Brewster *et al.*, 2002) de determinados subtipos de canais I_H (HCN). Em contrapartida, a redução de I_H na camada III do córtex entorrinal (Shah *et al.*, 2004), dos hipocampos de animais com epilepsia induzida pela pilocarpina (Santoro e Baran, 2003, Jung *et al.*, 2007) e no modelo de crises de ausência (Strauss *et al.*, 2004), aumentaria a excitabilidade neuronal. Neste conceito, aplicação de bloqueadores seletivos de I_H teriam um potente efeito antiepiléptico (Kitayama *et al.*, 2003, Santoro e Baran, 2003) e este conceito tem impulsionado a busca de drogas antiepilépticas que potencializem a atividade da I_H no combate as crises (Surges *et al.*, 2003), (figura 4). Embora tenha sido demonstrada uma relação entre a modulação da I_H com os modelos experimentais, ainda não há dados suficientes para a transposição desses achados para epilepsia humana (Poolos *et al.*, 2004).

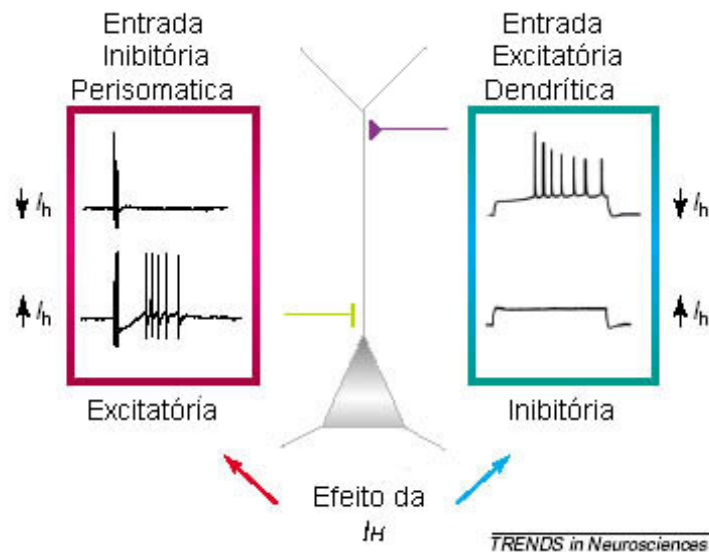


Figura 4- Efeito da corrente IH na excitabilidade. Contradição na literatura quanto à função da IH no Sistema Nervoso, pró ou anti-Excitação?: (Santoro e Baran, 2003)

Poolos (2005) hipotetizou uma canalopatia nos C_{HCNs} . Esta hipótese pode ser explicada como um ciclo que basicamente recapitula a lógica “*seizures beget seizures*”: A agressão inicial que pode ser provocada, por exemplo, por hipertermia ou lesão na cabeça. Em modelos experimentais (pilocarpina, cainato, “*kindling*”) induz crises. Seguindo a agressão inicial ocorre uma alteração da função dos C_{HCNs} (crise induzida pela canalopatia). Na figura 5, os C_{HCNs} são mostrados como o canal iônico alterado, mas a alteração destes canais poderia ser em qualquer espécie de canal iônico. Essa canalopatia produz um aumento da excitabilidade intrínseca de neurônios isolados. Na última fase do ciclo resulta nas crises recorrentes. Essa última fase do ciclo é de difícil compreensão e por enquanto as primeiras duas fases podem acontecer numa escala de minutos a horas, a transição da fase aguda para a crônica geralmente requer dias a horas em modelos experimentais; e de meses a

anos na epilepsia humana. Esse período constitui a fase latente e é observado em epilepsias adquiridas tanto em humanos quanto nos modelos onde a lesão inicial foi identificada (Herman, 2002; White, 2002). O que ainda não está claro nesta hipótese é em qual período há perda da expressão dos C_{HCNs} e como estes promovem o estabelecimento da epilepsia (Poolos, 2005).

Segundo Poolos (2005) a fenomenologia do período latente pode auxiliar nesta questão. Se os C_{HCNs} , ou outros canais iônicos, forem à causa da epilepsia deve se esperar que as alterações ocorram logo após a lesão persistindo no período crônico independentemente das crises espontâneas recorrentes (i.e. quando tratadas com FAEs). Além disso, deveria se esperar que os C_H , ou outro canal iônico sejam importantes na epileptogênese e nestes casos a intervenção farmacológica restauraria a função normal do canal durante o período latente evitando a progressão para a fase crônica.

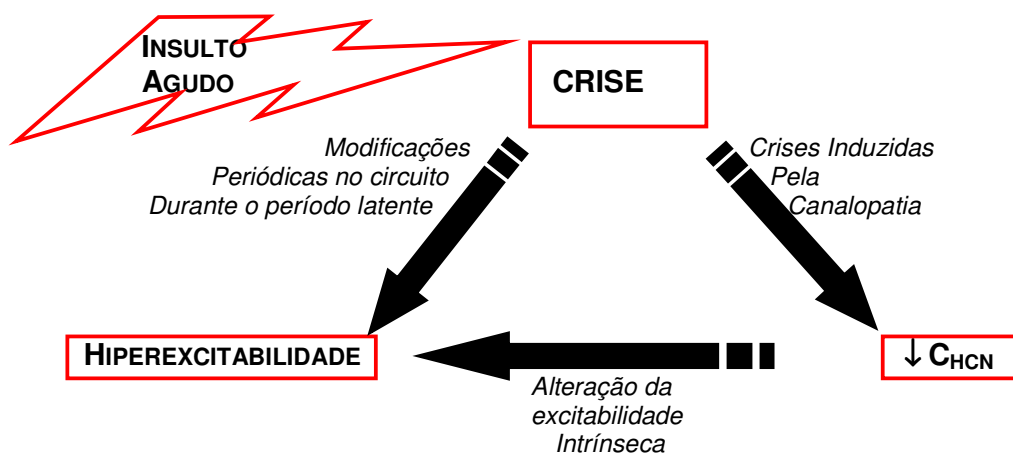


FIGURA 5 Modelo de Canalopatia Adquirida na epilepsia. Um insulto agudo provoca crises agudas, que causam alterações na função do canal iônico resultando em hiperexcitabilidade intrínseca que predispõe excitabilidade no circuito gerando crises espontâneas recorrentes.

2.2.2. Canalopatias provocadas pelos canais iônicos dependentes de ligante: receptores da acetilcolina:

Efeitos mutagênicos nos receptores nicotínicos parecem estar relacionados com a Epilepsia do Lobo Frontal Autossômica Dominante Noturna. Mutações nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2*, cujo efeito altera os aminoácidos dos receptores transmembrana, diminuem a resposta a acetilcolina dependente do cálcio e esse efeito promove a excitabilidade durante o sono, o que pode gerar crises epiléticas (George 2004, Hirose 2006, Heron et al 2007).

O quadro 4 mostra algumas síndromes epiléticas causadas pelos canais iônicos clássicos, segundo dados revisados por: George (2004) e Hirose (2006).

Quadro 4 - Síndromes Epiléticas associadas às mutações gênicas que codificam os canais iônicos (ver revisão de :George, 2004; Hirose, 2006, Herrmann et al, 2007):

SÍNDROME	GENE	CANAL IÔNICO
Epilepsia generalizada e crises febris 1	SCN1B	Canal de Sódio
Epilepsia generalizada e crises febris 2	SCN1A	Canal de Sódio
Epilepsia Mioclonica severa na infância	SCN1A	Canal de Sódio
Crises Febris e Epilepsia	SCN2A	Canal de Sódio
Epilepsia Mioclonica severa na infância	SCN2A	Canal de Sódio
Crises neonatais-infantis benignas familiar	SCN2A	Canal de Sódio
Ataxia Paroximais 2 e epilepsia de ausência	CACNA1A	Canal de Cálcio
Epilepsia de ausência na infância	CACNA1H	Canal de Cálcio
Epilepsia mioclônica juvenil	CACNB4	Canal de Cálcio
Epilepsia idiopática generalizada	CACNB4	Canal de Cálcio
Convulsões neonatais benignas familiar 1	KCNQ2	Canal de Potássio
Convulsões neonatais benignas familiar 2	KCNQ3	Canal de Potássio

Ataxia Paroximais 1 e crises parciais	KCNA1	Canal de Potássio
Epilepsia generalizada e disgenesia paroximal	KCNMA1	Canal de Potássio
Epilepsia do lobo frontal autossômica dominante 1	CHRNA4	Receptor de ACh
Epilepsia do lobo frontal autossômica dominante 3	CHRNA2	Receptor de ACh
Epilepsia mioclonica autossômica dominante	GABRA1	Receptor GABA A
Epilepsia generalizada com crises febris 3	GABRG2	Receptor GABA A
Epilepsia mioclonica severa na infancia	GABRG2	Receptor GABA A
Crises febris mais epilepsia de ausência	GABRG2	Receptor GABA A
Epilepsia idiopatica generalizada	CLCN2	Canal de Cloro
Epilepsia de ausência	HCN2	Canal H

2.3. Farmacorresistência das Epilepsias:

Cerca de 10-20% dos pacientes com epilepsia tem suas crises inadequadamente tratadas e em torno de 30% apresentam resistência à terapia medicamentosa (Regesta e Tanganelli, 1999; Remy e Beck, 2006, Beck, 2007). Entre as epilepsias refratárias ao tratamento clínico as crises parciais complexas com origem no lobo temporal são as mais freqüentes (Regesta e Tanganelli, 1999; Remy e Beck, 2006).

As causas e mecanismos responsáveis por essa multi-resistência não são totalmente compreendidos, podendo ocorrer devido a alterações nos alvos das drogas ou devido a um decréscimo na penetração das drogas antiepilépticas no cérebro. É aceito que a eficácia de uma droga antiepiléptica é determinada pela habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar a sítios-alvo.

Existem diferentes hipóteses que tentam explicar a fármaco-resistência entre elas a HIPÓTESE DA ALTERAÇÃO DO ALVO e HIPÓTESE DO TRANSPORTADOR (revisado por Remy e Beck, 2005)(figura 6).

Na hipótese da alteração do alvo, a fármaco-resistência pode ser causada por modificações das moléculas onde o FAE irá atuar. Em condições normais, o FAE penetra no parênquima e se liga a moléculas transportadoras, localizadas nas células endoteliais, que exercem suas funções nos seus respectivos alvos. Na hipótese da alteração do alvo, existem relatos de modificações de alguns desses alvos como, por exemplo: alteração da expressão das subunidades alfa dos canais de sódio voltagem dependentes e diminuição das subunidades $\alpha 1$ dos receptores GABAérgicos respectivamente de CA1 e giro denteado do tecido humano; aumento da expressão de canal do tipo T ativado por cálcio e ativado por cálcio e diminuição dendrítica da corrente catiônica mista, I_H em modelos experimentais (Remy e Beck, 2006, Beck, 2007)

A segunda hipótese, a do transportador, há um aumento da expressão ou função de transportador de múltiplas drogas, diminuindo a concentração da FAE para os seus respectivos alvos. Foram descobertas diversos genes que codificam as proteínas transportadoras.

Esses genes estão associados à proteínas transportadoras ABC (do inglês *ATP-binding cassett*). Foram identificadas em humanos pelo menos 7 subfamílias (ABCA, ABCB, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG) (Dean et al. 2001, rev. por Remy e Beck, 2005). Estudos recentes têm direcionado a função do transportador MDR1 (pertencente a família ABCB1) que codifica a glicoproteína P (PGP- Silverman et al, 1991) no desenvolvimento da farmacoresistência. Além disso, a família de genes, da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (PRMD) -pertencente subfamília ABCC- transporta várias substâncias parcialmente sobrepostas com aquelas transportadas pelo PGP.

A maioria das proteínas codificadas pelo PRMD são expressas nas células endoteliais na barreira hematoencefálica (Zhang et al, 1999). Adicionalmente a PRMD e uma das duas isoformas de PGP de roedores estão presentes em astrócitos (Pardridge et al., 1997; Decleves et al., 2000). Existe também um aumento da expressão da MDR1 no mRNA e no nível protéico em pacientes com diferentes formas de epilepsia.

Pertencente a uma outra classe de moléculas transportadoras de drogas, o gene *MVP* (do inglês *Major Vault Protein*) (Scheffer et al., 1995), parece ser relevante na resposta a drogas antiepilépticas e mostrou ter expressão aumentada em várias formas de epilepsia resistente ao tratamento (Sisodiya et al, 2003). Até o momento, não foram relatados estudos associando polimorfismos em *MVP* e a resposta a drogas antiepilépticas.

Resultados experimentais indicam a coexistência tanto de alterações relacionadas com o alvo quanto aos transportadores. O quadro 6 mostra algumas das modificações observadas nos alvos das FAEs ou transportadores na epilepsia experimental ou em humanos.

Quadro 5 - Modificações observadas nos alvos das FAEs ou transportadores na epilepsia experimental ou em humanos (revisado por Remy e Beck, 2005):

ALVO OU TRANSPORTADOR	MODIFICAÇÃO	TIPO DE CÉLULA	DADOS EM HUMANOS
Canais de Sódio Voltagem-dependente	⇒ Baixa-regulação das subunidades acessórias	Células granulares Neurônios piramidais de CA1	Sim
	⇒ Alteração da expressão subunidade alfa, indução das isoformas neonatais	Neurônios piramidais de CA1 Neurônios piramidais de CA3 Células granulares	Sim
Canais de Cálcio	Aumento da expressão dos canais tipo T	Neurônios piramidais de CA1	Não
Corrente I_H	Perda da I _H dendrítica	Neurônios piramidais da camada III do córtex Entorrinal	Não
Receptores GABA Glicoproteína P (MDR1)	⇒ Diminuição da subunidade α 1	Células granulares	Sim
	⇒ Aumento da subunidade α 4 Aumento da expressão	Astrócitos Células endoteliais dos capilares neurônios	Sim
MRP1	Aumento da expressão	Astrócitos neurônios	Sim
MRP2	Aumento da expressão	Astrócitos Células endoteliais dos capilares	Sim
MVP	Aumento da expressão	Células da microglia	Não

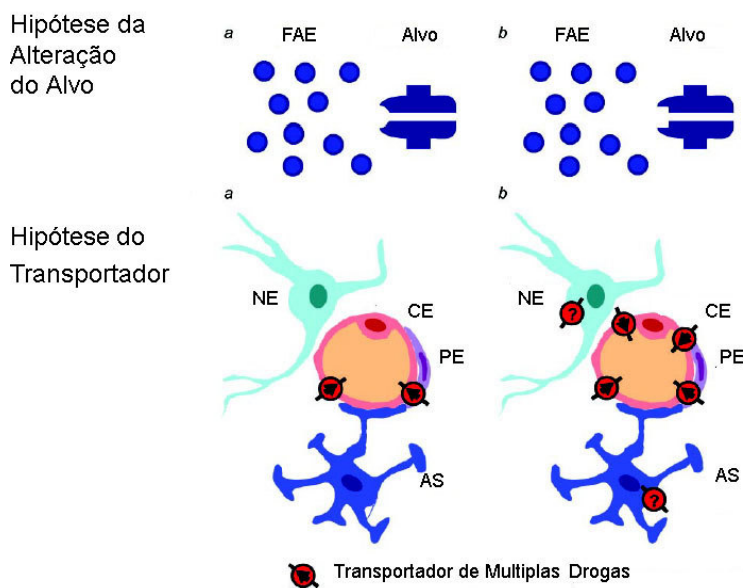


Figura 6- Hipóteses para a Farmacorresistência: Em a mostra a resposta farmacológica em indivíduos normais .e b mostra a resposta farmacológica em indivíduos fármaco-resistentes. Na HIPÓTESE DA ALTERAÇÃO DO ALVO, o receptor do fármaco sofre uma modificação na sua estrutura impossibilitando a ligação com o fármaco. Na HIPÓTESE DO TRANSPORTADOR mostra que nos indivíduos com epilepsia há um aumento da expressão dos transportadores diminuindo a concentração dos fármacos nos seus efetivos alvos (*adaptado de Remy e Beck, 2005*).

2.4. Modelos experimentais no estudo da epilepsia:

Grande parte do conhecimento acerca dos mecanismos básicos das epilepsias provém de estudos em modelos animais. Com isto, existe a necessidade do entendimento entre estes modelos e a situação crítica real. A relevância de um modelo experimental é determinada pelo grau de similaridade com que o modelo serve como testemunha do fenômeno natural. Apesar do freqüente aparecimento de diferentes modelos experimentais, poucos são aqueles que resistem a um exame

rigoroso e a prova do tempo. Entre os modelos existentes, a epilepsia induzida pela pilocarpina constitui-se numa ferramenta importante para o estudo da epilepsia do lobo temporal humana, visto que, achados histopatológicos e eletrográficos, manifestações comportamentais e padrão de resposta à terapêutica farmacológica assemelham-se aos encontrados na patologia (Mello *et al*, 1993)

2.4.1. Modelo da Pilocarpina :

A pilocarpina é um agonista colinérgico do subtipo muscarínico extraído de uma planta brasileira, o *Pilocarpus jaborandi*. Inicialmente foi utilizada na investigação experimental de mecanismos colinérgicos agudos envolvidos na geração de crises convulsivas (Turski *et al*. 1983a,b, Cavaleiro *et al*, 1991, Arida *et al*, 1998) em ratos e camundongos.

A injeção sistêmica de pilocarpina induz o *status epilepticus* em ratos. Isso é causado, provavelmente, pela ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina, do subtipo M1 nos neurônios da camada II do córtex entorrinal. A ativação dos receptores M1 é ampliada por influxo de íons de cálcio. Essa propriedade introduz um mecanismo Hebbiano, onde a ativação do receptor muscarínico causa uma despolarização robusta da membrana e disparo repetitivo dos neurônios somente se acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (Klink & Alonso, 1997). A hiperatividade dos neurônios hipocampais também pode ser resultado da inibição dos interneurônios hipocampais por neurônios GABAérgicos septo-hipocampais que são sensíveis à agonistas muscarínicos (Wu *et al*, 2000).

A injeção de pilocarpina (300-380mg/Kg) dá início a uma seqüência de comportamentos, caracterizando o **período agudo** do modelo. Acinesia, ataxia, automatismos faciais e tremores manifestam-se imediatamente após a injeção; progredindo, dentro de 15 a 25 minutos, para crises motoras límbicas recorrentes, com levantar, clônus de patas anteriores, salivação, movimentos mastigatórios e queda, que evoluem para um estado de crises contínuas, após 50 ou 60 minutos, caracterizando o SE. A duração do SE pode ser de 2-12 horas, havendo a possibilidade de abreviá-lo através do uso de fenobarbital ou benzodiazepínicos (Turski et al., 1983a; Leite et al., 1990). Segue-se o **período latente**, com duração média de 15 dias, durante o qual não há evidências de manifestação comportamental convulsiva e a análise eletrocorticográfica não revela anormalidades.

O **período crônico** caracteriza-se pelo surgimento de crises espontâneas recorrentes que variam desde automatismos faciais, clônus bilateral de patas anteriores, levantar e perda do equilíbrio, seguido de crise clônica generalizada, durando 40-60 segundos. As crises ocorrem, com maior freqüência, durante o período diurno (Leite et al., 1990; Cavalheiro et al., 1991).

2.4.2. Expressão gênica em modelos experimentais de epilepsia:

O principal objetivo do estudo da expressão gênica em modelos experimentais, como pilocarpina, é a identificação de genes expressos diferencialmente bem como transcritos raros ou não identificados em tecido neural. Para tanto, pode-se preparar bibliotecas de cDNA a partir do RNA obtido do hipocampo de animais correspondentes aos períodos agudo, latente e crônico. A estratégia para preparação das bibliotecas de cDNA é a técnica de ORESTES - Open Reading Frame Expressed Sequence Tags. As seqüências obtidas a partir de tecidos de ratos normais ou com epilepsia induzida por pilocarpina são analisadas por agrupamento e comparação por programas de bioinformática permitindo a identificação de genes e processos envolvidos na epileptogênese. As análises dos padrões de expressão gênica dos diferentes genes identificados são estudados por meio de técnicas de Reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (RT-PCR), northern blot, western blot, imuno-histoquímica, entre outras.

2.4.2.1. PCR e PCR em Tempo Real :

A técnica de PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis que recebeu em 1994, o prêmio Nobel (Novaes e Pires-Alves, 2003).O objetivo da PCR é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. A

técnica de PCR consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região de ácido nucléico com a utilização de “primers” ou iniciadores.

A amplificação da amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), íons magnésio ($MgCl_2$), que devem estar em maior concentração que os dNTPs e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA. As concentrações do iniciador dNTP e magnésio são variáveis de acordo com a reação. Três eventos distintos ocorrem durante a reação de PCR, a cada ciclo. desnaturação do DNA molde (a $95^\circ C$), ligação (“annealing”) dos *primers* (a $64^\circ C$) e polimerização do DNA (a $72^\circ C$).

A primeira fase é a desnaturação da fita de DNA que acontece quando a reação é aquecida a $92-96^\circ C$. E o tempo necessário para que isso ocorra depende de vários fatores como, por exemplo, a geometria do tubo do termociclador, do volume da reação e da proporção de C+G (citosina +guanina) da seqüência de DNA. Esta separação é essencial para que, na 2ª fase, dois *primers* de oligonucleótidos se liguem às seqüências dos pares de bases complementares da cadeia molde. Estes *primers* são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar. Os *primers* servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA e, na última etapa, faz-se a sua extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termo-estável (Taq), tendo sido isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos de PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os $64^\circ C$ e $95^\circ C$. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo.

Normalmente são repetidos cerca de 30 ciclos, o que demora apenas algumas horas.

Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo de PCR logo dá-se um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos 2^n vezes mais cópias do que no início.

O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*. É uma técnica rápida, barata e segura.

Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos. Outras desvantagens são a relativa facilidade com que ocorre contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) e a limitada extensão da sequência que é possível amplificar (é difícil aplicar a PCR a sequências maiores do que 5kb). Pode também ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.(Dieffembach, 1995)

O primeiro relato da técnica de RT-PCR foi feita por Higushi em 1993. A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação dos fragmentos, pois identifica o DNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação de fluorescência. Esta técnica apresenta também maior especificidade devido à utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. A amplificação e a detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado,

dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e foto-documentação. Com a eliminação destas etapas, os resultados são obtidos mais precocemente pela PCR em tempo real quando comparada à convencional.

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (C_T). Este ponto permite a quantificação exata fundamentada na fluorescência. A emissão da luz pelos compostos fluorescentes (moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específico) gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Com isso, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade do produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR Green® e TaqMan®. O SYBR Green® se liga entre a fita dupla do DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma luz verde. No entanto, a ligação à fita de DNA não é específica, podendo se ligar a dímeros dos primers e outros produtos inespecíficos, podendo alterar a concentração do fragmento alvo. No início da amplificação, a reação contém DNA desnaturado, primers e o SYBR Green®. As moléculas não ligadas ao SYBR Green® apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo (ruído), o qual é subtraído durante a análise instrumental. Após o reconhecimento dos primers, ocorre a polimerização do DNA (mediada pela enzima Taq polimerase) e os compostos fluorescentes (SYBR Green®) se ligam ao DNA polimerizado, e a reação é monitorada continuamente, e o aumento de fluorescência é observado em Tempo Real. No ciclo da desnaturação do DNA, as moléculas de SYBR Green® são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da

fluorescência no fim da etapa de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (Boxer, M, 2000, Bustim e Mueller, 2005)

2.5. A Utilização de técnicas da Biologia Molecular no estudo da Epilepsia

A recente tecnologia da biologia molecular tem permitido o estudo de diversas facetas das bases celulares das epilepsias. A ampla maioria destes estudos faz uso de modelos experimentais como ácido caínico, *kindling* (Powel et al, 2008) pilocarpina (Brooks-Kayal, 1998, Bender et al, 2003). Através de técnicas como PCR, hibridização in vitro foi possível identificar anormalidades na estrutura dos canais iônicos (Brooks-Kayal, 1998) e alteração da expressão de mRNAs e da sua respectiva proteína formada (Bender et al, 2003).

A biologia molecular, permitiu ainda que fossem apontados fatores genéticos predisponentes ou responsáveis por muitos casos de epilepsia. Muitos desses genes estão envolvidos com os canais iônicos (Sheffer e Berkovic, 2003). Além disso, vários estudos têm mostrado alterações na expressão de mRNAs para diferentes fatores neurotróficos envolvidos na epileptogênese.

Recentemente, Schridde e colaboradores (2006) comprovaram, em modelos animais, que a intervenção precoce, mesmo em casos geneticamente determinados de crises convulsivas, permite o controle funcional e desenvolvimental com impacto no número de crises convulsivas ao longo da vida, salientando a importância da elucidação dos mecanismos celulares e moleculares, e as bases genéticas da epileptogênese que poderão propiciar novas estratégias terapêuticas visando à prevenção e/ou o controle adequado da doença.

3. OBJETIVOS:

3.1. Geral:

Determinar o padrão de expressão gênica da família HCN (codificadora dos canais-H) no córtex temporal, subiculum, CA1, CA2 e cerebelo de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina e hipocampus e córtex humanos após cirurgia

3.2. Específicos:

3.2.1. Verificar e comparar o perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epiléticos dos grupos agudo e crônico

3.2.2. Verificar o perfil de expressão dos genes hcns em hipocampo humano submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e hipocampo e córtex humano de pacientes submetidos à lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. GRUPOS DE ESTUDO:

A expressão dos genes HCN1-HCN4 foram analisadas em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos e de tecido humano, distribuídos conforme descrito no quadro 7:

Quadro 6- Origem do tecido cerebral e grupos de tratamento

Espécie	Grupos de Estudo	Tratamento	n
Ratos	Controle	Salina	10
	Epilépticos	Pilocarpina- Agudo	10
		Pilocarpina- Crônico	10
Humano	Pacientes com epilepsia		10
	Pacientes com traumatismos cranioencefálico		10

4.2. Animais Experimentais :

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com idade de 30-35 dias, distribuídos em dois grupos (quadro 6). Estes animais foram mantidos ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A linhagem utilizada não apresentou nenhuma propensão genética a crises convulsivas espontâneas.

4.2.1. Indução da Epilepsia: Modelo da Pilocarpina

No grupo dos ratos tratados com pilocarpina, foi utilizado o modelo de epilepsia descrito por Cavalheiro (1991) em 40 animais, como mostra o diagrama da figura 7. O protocolo consistiu na administração de metilscopolamina (MS) (1mg/kg) injetada intraperitonealmente, trinta minutos antes da pilocarpina (250 mg/Kg), que induziu *status epilepticus* (SE): O pré-tratamento com MS, um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, serviu como atenuador das manifestações periféricas da pilocarpina.

O animal é acometido do *status epilepticus* (SE) logo após a administração da pilocarpina (figura 8). Essa condição, determina a fase aguda, que perdura em média, doze horas até a regressão do quadro de prostração do animal. As manifestações comportamentais do SE (MCs) podem ser interrompidos com o uso de benzodiazepínicos ou barbitúricos. O SE mimetiza uma injúria precipitadora inicial, pois, após um período silencioso de quinze dias, o animal é acometido por crises espontâneas recorrentes (CER) com frequência de 2 a 5 vezes por semana. Esta é dita a fase crônica do modelo que perdura por vários meses, presumivelmente por toda a vida do animal (Cavalheiro et al., 1991). Mesmo durante a fase do período silencioso, embora não sejam observadas as MCs durante o período silencioso a atividade eletroencefálica pode ser verificada (Arida et al, 1999).

Com a administração da pilocarpina foram observadas modificações comportamentais das primeiras manifestações da crise. Os animais apresentaram acinesia, ereção do pelo, automatismos orofaciais e de extremidades, tremores e clonias nas 4 patas, elevação das patas dianteiras e queda, estes comportamentos límbicos foram medidos mediante a utilização da escala de Racine (Racine, 1972).

Além disso, os animais apresentaram salivação, incontinência urinária. Considerou-se, como critério de SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo trinta minutos (Cavalheiro et al, 1991, Mello 1993). Duas horas após a instalação do SE, injetou-se 10 mg/kg de diazepam (valium) intraperitonealmente para a interrupção da crise. Os animais ainda receberam uma dose de soro fisiológico e nos dois dias seguintes adicionou-se na dieta alimentar banana esmagada para a reposição do potássio.

Dos 40 ratos injetados, somente os animais que atingiram os graus 4 e 5 de Racine foram incluídos neste estudo (n:20) distribuídos nos dois grupos tratados com pilocarpina. (quadro 6) . Durante este período, os animais permaneceram no alojamento de animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sendo filmados para análise das crises.

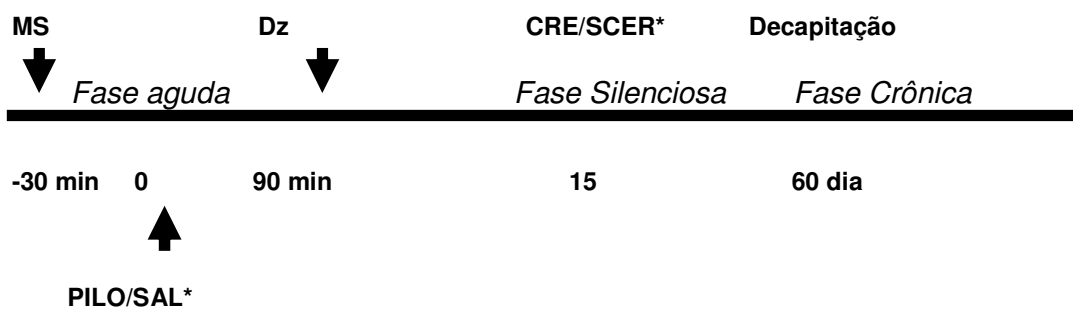


Figura 7- Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina e do Grupo Controle: MS- Metil Escopolamina, DZ- Diazepam, Pilo- Pilocarpina; CER- Crises Espontâneas Recorrentes. No caso dos animais controles (*): SAL-solução salina, SCER- sem crises espontâneas recorrentes



Escala de Racine (1972)

0. Imobilidade
1. Automatismos Faciais
2. Mioclonias da cabeça e pescoço
3. Clonias de patas anteriores
4. Clonias de patas posteriores
5. Elevação e Queda

Figura 8 - Alterações comportamentais em um rato após a injeção de pilocarpina – a) fase de imobilidade e b) fase de elevação na escala de Racine

4.2.2. Ratos Controles:

No caso dos **ratos controles**, os procedimentos utilizados foram semelhantes aos realizados com os animais tratados, excetuando-se pela aplicação de solução salina 0,9% em substituição da pilocarpina. Outra observação importante é o fato dos animais não apresentarem crises espontâneas recorrentes.

Decorridos 15 dias para o grupo agudo e 60 dias, período em que se verificou através de observações comportamentais o surgimento de manifestações de CER, os animais foram mortos para o estudo molecular.

4.3. Seleção de pacientes doadores de tecido cerebral incluídos neste estudo:

4.3.1. Tecido hipocampal de pacientes com epilepsia refratária (THET):

Após a assinatura do termo de consentimento esclarecido, os fragmentos de tecido hipocampal foram obtidos de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, cuja investigação, no Programa de Cirurgia da Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS, apresentaram origem temporal das crises.

Os pacientes foram selecionados no Programa de Cirurgia da Epilepsia para avaliação de candidatos à cirurgia, sendo todos portadores de epilepsia com refratariedade ao tratamento medicamentoso.

A farmacorresistência é estabelecida pela comprovação da persistência das crises ou de efeitos colaterais intoleráveis após o uso de, no mínimo, 3 antiepilépticos em dose máxima tolerada por pelo menos 2 anos de epilepsia, exceto nas epilepsias catastróficas da infância, quando é necessária a comprovação da deterioração do desenvolvimento psicomotor independente da duração da epilepsia.

O processo de avaliação pré-cirúrgica incluiu os procedimentos padronizados no serviço de neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS e que estão de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Saúde e Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola *et al*, 2001). A indicação cirúrgica seguiu critérios como: a área de origem dos estímulos epileptogênicos deve ser localizada e unilateral, e deve permitir a ressecção sem causar danos neurológicos importantes, as epilepsias do lobo temporal são as que mais freqüentemente

preenchem estes critérios. Esta avaliação é fundamental para determinar se a área afetada pode ser retirada adequadamente. Para isto existe um protocolo mínimo de avaliação que inclui de acordo com a Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola *et al*, 2001): 1) EEG monitorizado por vídeo por no mínimo 24 horas com registro inequívoco de pelo menos 1 crise epiléptica habitual 2) ressonância magnética encefálica, 3) testes neuropsicológicos.

4.3.2. Tecido de pacientes com traumatismo cranioencefálico (TTC):

Após a assinatura do termo de consentimento esclarecido pelos familiares, os fragmentos de tecido cortical e hipocampal foram obtidos de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico internados sob os cuidados do serviço de neurocirurgia do Hospital Pompéia, Caxias do Sul, Brasil.

4.4. Obtenção e preparo dos tecidos cerebrais :

4.4.1. Obtenção das regiões encefálicas de ratos controles e epiléticos:

A figura 8 mostra um esquema das principais etapas deste procedimento. Os animais foram pesados, anestesiados com Tiopental (40 mg por Kg) e imediatamente decapitados com uma guilhotina. Após a decapitação foi feita a craniotomia para a remoção do encéfalo.

Com auxílio de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi removido utilizando-se de uma espátula curva. O encéfalo foi então imerso numa solução de NaCl (0,9%) mantida sob temperaturas de 4°C, por aproximadamente 20 segundos para aumentar a consistência do tecido, tornando-o mais apto para isolamento das estruturas de um dos hemisférios (figura 9): CA1, CA2, subiculum, córtex temporal e cerebelo . Todo o material foi imerso em tubos contendo RNA holder (BioAgency Biotecnologia) que é indicado para preservar e estabilizar o RNA celular de amostras frescas. As amostras foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido.

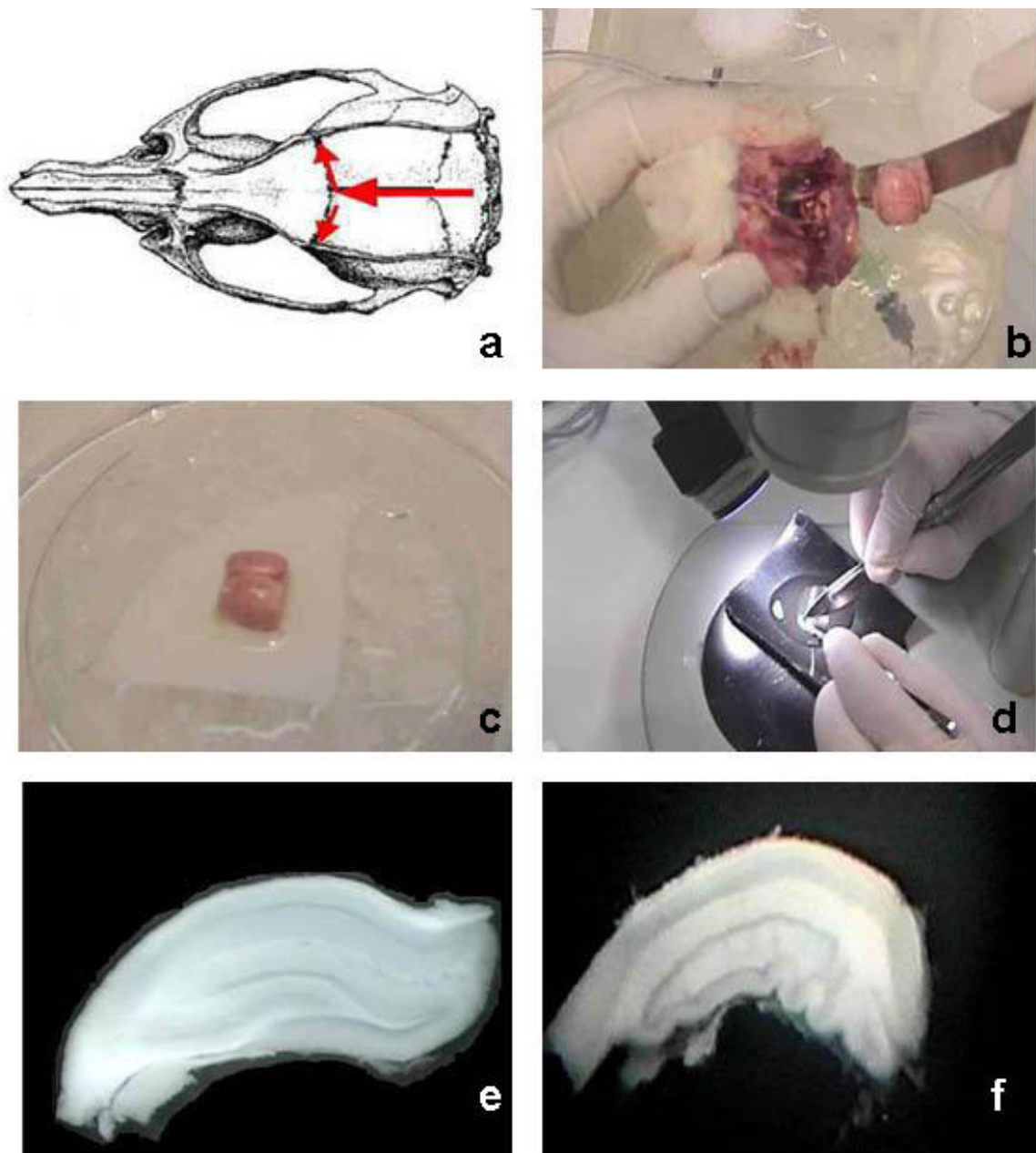


Figura 9 - Obtenção das regiões encefálicas de ratos controles e epiléticos: a) As setas mostram o sentido da craniotomia do animal; b) Remoção do encéfalo, com auxílio de uma espátula; o mesmo foi imerso numa solução salina, c) encéfalo isolado d) Isolamento das estruturas do sistema nervoso central, sob microscópio estereoscópico. e e f) Fatia do hipocampo de rato controle e tratado com pilocarpina. Notar atrofia do hipocampo de ratos com epilepsia.

4.4.2. Obtenção das amostras de tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET):

No grupo Tecido Hipocampal de Pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET) foi adotado o procedimento cirúrgico para o tratamento da ELT: amigdalohipocampectomia seletiva. A abordagem utilizada foi transcortical transventricular expondo o hipocampo e amígdala. Esta técnica foi empregada originalmente por Niemeyer (Niemeyer, 1959) e modificada para a obtenção de peças viáveis (figura 10)

A amígdala e a cabeça do hipocampo foram aspirados e a retirada do hipocampo foi em bloco (sentido póstero-anterior). A vascularização do hipocampo foi preservada ao máximo com o intuito de viabilizar o estudo *in vitro*. Durante a retirada do bloco hipocampal, o sulco hipocampal e uma pequena porção da eminência colateral foram preservados, pois fornecem um referencial anatômico para a realização dos cortes coronais, sendo imprescindíveis para a identificação do campo CA1 .

Imediatamente após a ablação, no próprio bloco cirúrgico, o hipocampo foi seccionado em sentido coronal para a obtenção de um fragmento para exame anátomo patológico. A peça principal foi inicialmente imersa em Ringer de dissecação continuamente oxigenado (figura 11).

Após a identificação do sulco e eminência colateral o hipocampo foi fixado, com metacrilato, num bloco para adaptação no vibrátomo, onde foram seccionados em fatias coronais com 500 μm de espessura. As fatias assim obtidas foram colocadas em tubos contendo RNA holder e levadas imediatamente ao laboratório para serem armazenadas em nitrogênio líquido.

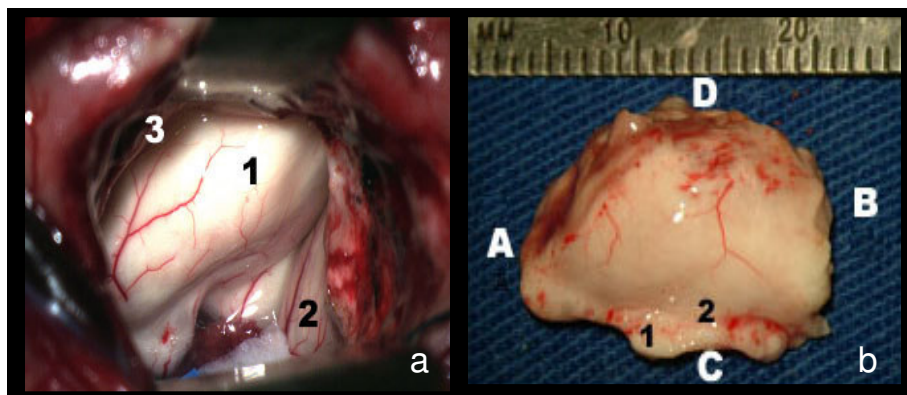


Figura 10 - Hipocampo Esquerdo antes (a) e depois (b) da ressecção cirúrgica. a) visão cirúrgica do lobo temporal: hipocampo (1); amígdala (2) e sulco colateral (3). b) Bloco hipocampal esquerdo, vista cranial: posterior (A); anterior (B), lateral (C), mesial (D), Eminência colateral (1) Sulco colateral (2)

4.4.3. Obtenção das amostras de tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico (THTC):

No grupo Tecido Hipocampal e Cortical de Pacientes Com Traumatismo Cranioencefálico (THTC) foi adotado o procedimento padrão para Lobectomia Temporal Antero-lateral.

A técnica consiste em uma incisão feita ao longo do giro temporal superior aproximadamente 2 cm do polo temporal através da substância branca do córtex temporal. A seguir, a incisão no giro temporal médio é tipicamente direcionada ortogonalmente para projetar o corno temporal e a incisão no giro temporal superior é inclinada lateralmente. A remoção de tecido e LCR permite uma melhor visualização do polo temporal; a incisão agora estende-se anteriormente em direção ao polo temporal. O lobo temporal lateral é então removido por dissecação paralela à

superfície cortical da substância branca ao nível do corno temporal até encontrar a fissura colateral e o giro fusiforme na base da fossa média. Após esse momento, o processamento das amostras seguiu os procedimentos descritos no item 4.4.2 (figura 10 e 11).

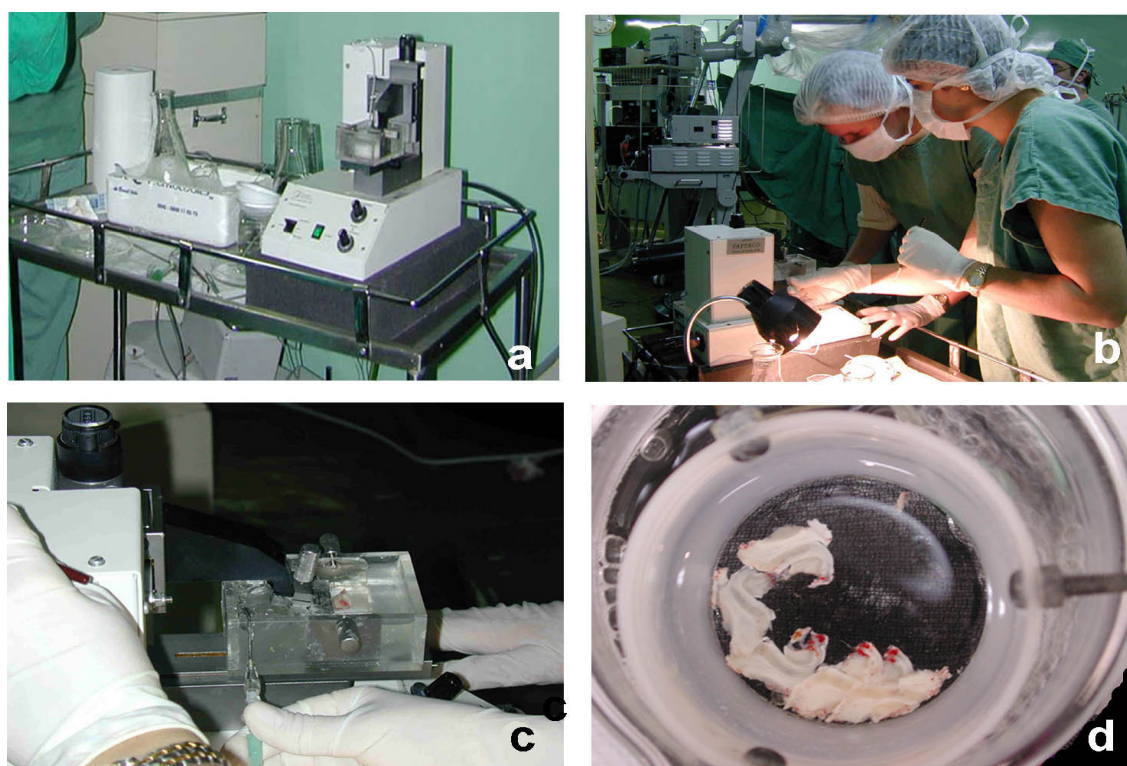


Figura 11 - Obtenção das amostras de tecido humano. a) Carrinho adaptado para o procedimento no bloco cirúrgico contendo os equipamentos e instrumentos necessários para a obtenção das amostras de tecido. b) Obtenção das fatias de tecido humano c) fatiamento em detalhe; d) Incubação das fatias em Ringer Normal

4.5. Procedimentos para análise da expressão dos genes HCN1-4:

A técnica da PCR em tempo real utilizada neste estudo baseou-se na amplificação do cDNA com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada espécie (ratos e humanos) e para cada gene e detecção por um feixe de laser capaz de capturar a fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBER[®] Green a cada síntese. Este processo permitiu quantificar os níveis das seqüências complementares ao mRNA para esse genes presentes nos tecidos analisados.

4.5.1. Obtenção do RNA total das amostras:

O RNA total dos tecidos de ratos e humanos foi obtido utilizando-se o kit de purificação RNeasy Mini Kit (Qiagen[®] Inc., CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

4.5.2. Transcrição reversa para obtenção dos cDNAs:

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, procedeu-se a uma reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se a enzima Superscript II e os oligonucleotídeos iniciadores oligos-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA). Para cada reação utilizou-se 22 µl da extração de RNA total, 0,5 µl da enzima Superscript II (200 U/µl; Invitrogen, USA), 0,2 µl de oligos-dT₁₂₋₁₈, 4,5 µl de DTT (0,1M; Invitrogen, USA), 4,5 µl de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 9 µl de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), e H₂O-MQ até completar 45 µl de solução de reação. As reações foram incubadas no termociclador (Peltier Thermocycler, MJ Research, USA) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C, e 3 minutos a 99°C, em um termociclador. (figura 12). Após o término da transcrição reversa foram adicionados a cada tubo 5 U de ribonuclease H (2 U/µl; Invitrogen, USA) e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso para a reação da PCR.

4.5.3. Técnica da PCR em tempo real (QT-PCR):

A síntese de cDNA foi feita primeiramente usando o RNAtotal associado com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) obtido no processo gene específico. Estes foram desenhados a partir de pesquisas em bancos de dados já publicados. Os pares dos oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados para a amplificação do RNA dos genes HCNs. Nos quadros 7 e 8 mostram respectivamente os oligonucleotídeos

iniciadores das famílias de genes para os HCNs para ratos e tecido humano (Thollon et al, 2007).

O método de quantificação utilizado neste estudo foi Syber Green . O quadro 9 mostra o mix de reação para o qPCR utilizado neste estudo.

Quadro 7- Caracterização dos pares oligonucleotídeos iniciadores das Famílias de genes para os HCNs para ratos

	Forward primer	Primer reverso
HCN1	CACCAGCAGCTGTGCAGAGA	CAAGAATCATAAATTCGAAGCAAAAC
HCN2	GGGATCGACTCCGAGGTCTAC	AGACTGAGGATCTTGGTGAAACG
HCN3	AACGTGGCCATAGCCTTGAC	GCTGAGCGTCTAGCAGATCGA
HCN4	GCTCCAAACTGCCGTCTAATTT	GAAGAAGGGAGCAAGAAAAAGAAGA
β-Actina	TAGCCATCCAGGCTGTGTTG	GGAGCGCGTAACCCTCATAG

Quadro 8 - Caracterização dos pares oligonucleotídeos iniciadores das famílias de genes para os HCNs para o tecido Humano

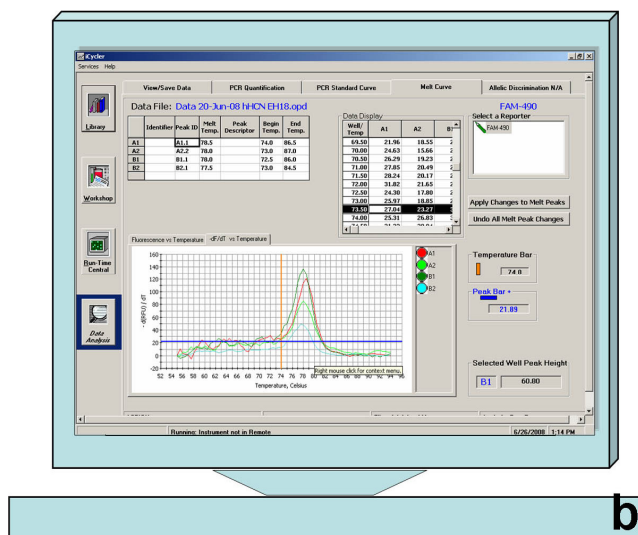
	Forward primer	Primer reverso
HCN1	GCTTCACAACACCAACCTGACC-	<i>AATCGTGGCTTTTCTGCGTCTG</i>
HCN2	CGCCTGATCCGCTACATCCAT	<i>AGTGCGAAGGAGTACAGTTCACT</i>
HCN3	GCTCCAGCCTACGGTCAACAAG	<i>'ATCTCAGCACCCCTCCTCCACCA</i>
HCN4	CCCGCCTCATTGATATATTCAC	<i>GAGCGCGTAGGAGTACTGCTTC'</i>
β-Actina	TAGCCATCCAGGCTGTGTTG	GGAGCGCGTAACCCTCATAG

(Adaptado de Thollon, 2007)

Quadro 9 - Mix para a reação de qPCR, conforme o número de amostras

	N° de amostras			
	1	25	50	100
cDNA (2,5 ng)	10	10X25	10x50	10x100
Primer (F+R) (*) 10µM cada	0,4	10	20	40
dTNTPs	0,10	2,5	5	10
Tampão PCR (10 X)	2,00	50	100	200
MgCl2 50 µM cada	1,20	30	60	120
Syber green (100X)	2,00	50	100	200
Platinun Taq DNA (5U/µl)	0,005	1,25	2,5	5
H₂O	4,25	106,25	212,5	425

(*) ver tabelas 8 e 9

**Figura 12** – a) Aparelho ICYCLER (BIO-RAD) para amplificação do cDNA do qRT-PCR e b) software para a leitura da amplificação ICYCLER 3.0.

4.6. Análise dos resultados:

4.6.1 Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo:

Para cada grupo e região do sistema nervoso estudado foram avaliados os diferentes $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo da expressão de cada gene HCN.

A abundância relativa dos transcritos foi determinada pela comparação dos valores de C_T definido como o ciclo na qual há um aumento significativo na magnitude do primeiro sinal gerado pela reação de PCR. O valor de C_T foi expresso como média e erro padrão da média, n =número de amostras de cDNA usado. Foi empregado o método de quantificação relativa utilizando-se o gene da β -actina como controle. Desta forma, os níveis de expressão relativa de cada gene HCN foi normalizada com a expressão do gene da β -actina na relação $(C_{T(\beta\text{-actina})}/C_{T(\text{HCNx})})$. A normalização realizada permitiu uma análise independente de fatores como a morte celular, onde $N_{CT} = C_{T(\beta\text{-actina})}/C_{T(\text{HCNx})}$. A partir da normalização foi calculado o ΔC_T (diferença comparativa entre $N_{CT \text{ HCN1}} - N_{CT \text{ HCN1}}$ e um outro subtipo foi calculado separadamente. A seguir obtivemos o $\Delta\Delta C_{T(\text{HCNx})} = \Delta C_{T(\text{HCN1})} - \Delta C_{T(\text{HCNoutro subtipo})}$. O ΔC_T é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de mRNA. A expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para comparar os níveis de 2 subtipos de HCNs. Diferenças significativas do valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os HCNs de cada estrutura foram analisada pela ANOVA de uma via. Um $P < 0,05$ foi considerado significativo. Em caso de significância, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey's para identificar as diferenças de expressão nas regiões estudadas.

4.6.2. Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo entre as amostras de ratos:

Diferenças significativas do valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre os HCNs de cada estrutura e grupo foram analisadas pela ANOVA de uma via, tomando como referencial o grupo controle. Um $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4.6.3. Análise do $2^{-\Delta\Delta CT}$ do limiar do ciclo relativo no tecido hipocampal humano:

Os valores encontrados dos diferentes $2^{-\Delta\Delta CT}$, foram comparados entre os grupos (hipocampo de THTC *versus* hipocampo THET) e analisados pelo *test t*, onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4.7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art.94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do conselho Nacional de Saúde - Resolução n.º 1, de 13 de junho de 1998, e em observância da lei 6688, de 08 de maio de 1979.

Os protocolos experimentais para a utilização de ratos e tecido humano oriundos da cirurgia foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

5. RESULTADOS:

Um estudo sistemático da distribuição dos quatro genes codificadores dos C_{HCNs} nos diferentes grupos de estudo fez-se necessário.

Dessa forma, os resultados desse estudo foram divididos em 4 partes:

- 5.1. Perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epilepticos dos grupos agudos e crônicos.**
- 5.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de em ratos controles e epiléticos (grupos agudo e crônico).**
- 5.3. Perfil de expressão dos genes HCNs em hipocampo humano submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e hipocampo e córtex humano de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico.**
- 5.4. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em hipocampus humanos submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico.**

5.1. Perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epiléticos dos grupos agudos e crônicos:

No presente estudo todos os animais tratados com pilocarpina apresentaram grau 5 de Racine (1972) durante o status epiléticos. Observações macroscópicas dos hipocampus destes animais no dia do sacrifício, aos 15 (RTPA) e 60 (RTPC) dias após injeção de pilocarpina, apresentaram atrofia hipocampal. Além disso, os animais do grupo RTPC desenvolveram crises espontâneas recorrentes (as crises não foram avaliadas)

Inicialmente será apresentado o perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e com epilepsia induzida pela pilocarpina dos grupos agudos e crônicos. Neste estudo, comparou-se a expressão relativa do HCN1 com os demais subtipos (HCN2, HCN3 e HCN4) de acordo com $2^{-\Delta\Delta C_{THCN}}$ (ver materiais e métodos).

Os valores dos $2^{-\Delta\Delta C_{T}}$ foram comparados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, em caso de significância ($P < 0.005$) aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey's para identificar as diferenças de expressão nas regiões estudadas.

Para determinar o percentual de aumento (ou redução) da expressão de um determinado HCN consideramos 1, o $2^{-\Delta\Delta C_{T}}$ do gene HCN1, sendo 100% e a partir disto os valores $2^{-\Delta\Delta C_{T}}$ dos demais HCNs foram expressos em porcentagem.

A figura 13 mostra exemplos de curvas de expressão dos genes HCNs mostrando que os 4 tipos de HCNs foram expressos. Os resultados a seguir mostrarão o perfil de expressão dos HCNs mRNA em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epilepticos dos grupos agudos e crônicos

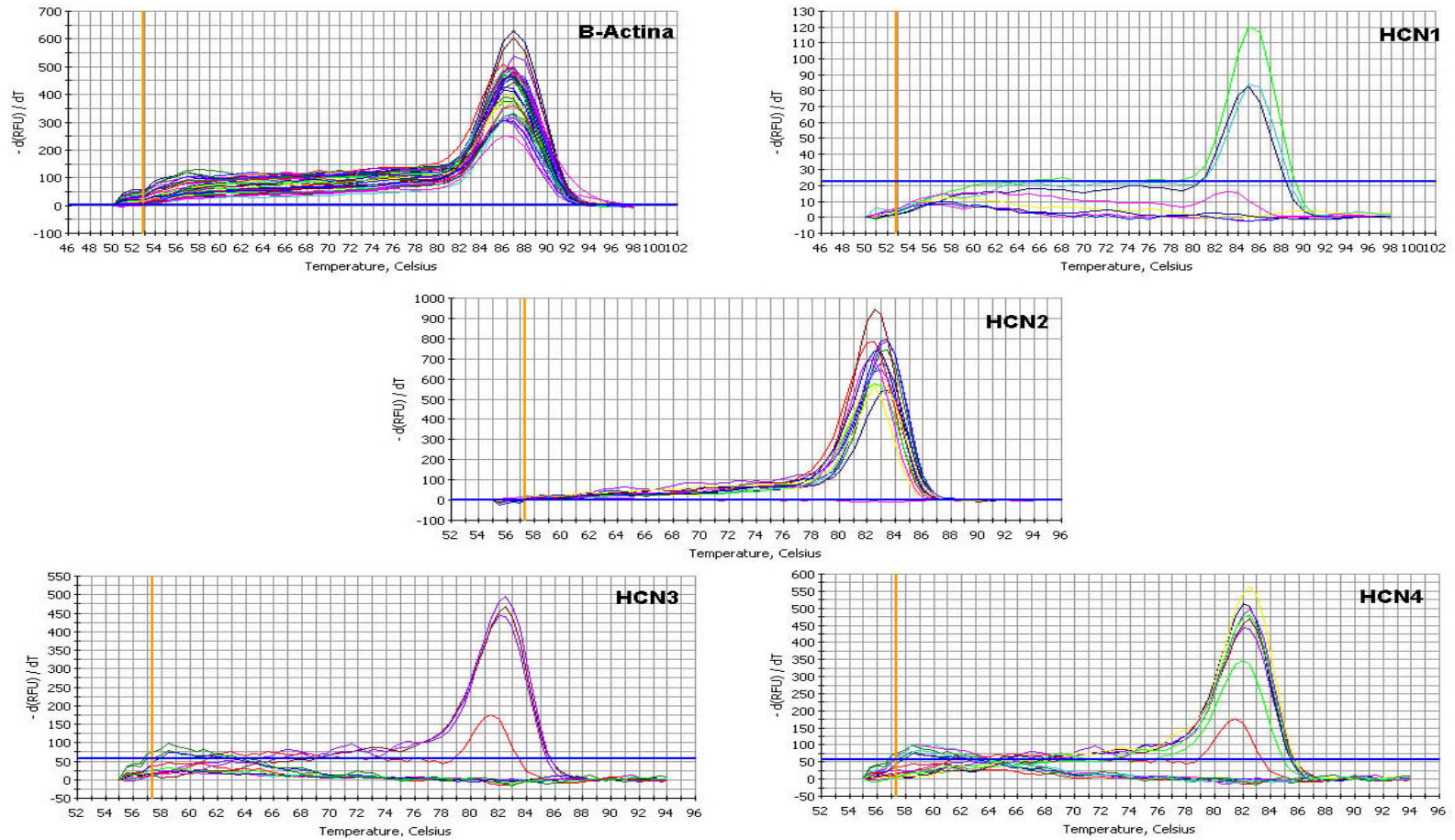


Figura 13- Exemplos de curvas de amplificação obtidas dos genes HCNs e β -actina no set-up de PCR em tempo real.

5.1.1. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de Ratos Controles (RC):

Neste estudo verificou-se que os 4 genes, HCN1-4, estavam expressos nas regiões estudadas nos ratos controles. Na tabela 1 são apresentados as médias dos valores dos parâmetros analisados nas diferentes regiões dos ratos controles.

Nas áreas de CA1, CA2 e subiculum, foram detectadas diferenças significativas na expressão de: HCN1 *versus* HCN2, HCN1 *versus* HCN3; HCN1 *versus* HCN4; HCN2 *versus* HCN3 e HCN2 *versus* HCN4 ($P < 0.001$). Entre HCN3 *versus* HCN4, nestas regiões não houve diferença estatística ($P > 0.05$) (Figura 13)

Já no neocórtex, verificamos que entre HCN1 *versus* HCN2; HCN1 *versus* HCN3, HCN2 *versus* HCN3 não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao $2^{-\Delta\Delta CTs}$ ($P > 0,05$). Porém observou-se que HCN1 *versus* HCN4 ; HCN2 *versus* HCN4 e HCN3 *versus* HCN4 apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo respectivamente $P < 0.001$, $P < 0.05$ e $P < 0.001$ (Figura 14)

No cerebelo, HCN1 *versus* HCN2, HCN1 *versus* HCN3; HCN1 *versus* HCN4; HCN2 *versus* HCN3, HCN3 *versus* HCN4 ($P < 0.001$). Entretanto, HCN2 *versus* HCN4 não houve diferença estatística ($P > 0.05$) (Figura 14)

Quanto ao percentual de expressão dos HCNs, os resultados obtidos mostraram que na região de CA1, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais seguido por HCN2 (54% do nível de HCN1) e HCN3 e HCN4 cujas expressões representaram respectivamente 12.8 % e 10.2% (Figura 15)

De forma semelhante na região de CA2, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa em relação aos demais, seguida por HCN2 que representou 72%

do nível de HCN1. Por outro lado, a expressão de HCN4 representou 15.39 %, sendo portanto mais elevado do que HCN3, 10.2% (Figura 15)

A expressão relativa dos genes HCNs no subíctulum foi muito semelhante às regiões de CA1 e CA2, o gene HCN1 apresentou maior expressão relativa que os demais seguido por HCN2 que representou 73% do nível de HCN1, a seguir foi HCN3 que representou 14.21 % e por fim HCN4, 12%(Figura 15)

No neocórtex, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa entretanto, HCN2 e HCN3 estiveram próximos a HCN1, apresentando percentuais de 74% e 96% respectivamente. O gene HCN4 representou 37%(Figura 15).

No cerebelo, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa entretanto, HCN4 e HCN2 estiveram próximos à HCN1, apresentando percentuais de 77% e 64 % respectivamente. O gene HCN3 representou 2%(Figura 15).

Tabela 1 - Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (n:10):

Gene	Parâmetros	CA1	CA2	SUB	NEO	CER
HCN1	NC _T	0.553	0.684	0.684	0.705	0.587
		(±0.055)	(±0.079)	(±0.081)	(±0.082)	(±0.058)
	ΔC_T	0	0	0	0	0
		(± 0.0)	(± 0.0)	(± 0.0)	(± 0.0)	(± 0.0)
	$\Delta\Delta_{CT}$	0	0	0	0	0
	(± 0.0)	(± 0.0)	(± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	1	1	1	1	1
HCN2	NorC _T	1.649	1.220	1.186	1.252	1.348
		(±0,255)	(±0.136)	(±0.137)	(±0.160)	(±0.184)
	ΔC_T	-1.095	-0.535	-0.501	-0.546	-0.760
		(±0.279)	(±0.154)	(±0.126)	(±0.196)	(±0.213)
	$\Delta\Delta_{CT}$	1.095	0.535	0.501	-0.546	0.760
	(±0.279)	(±0.154)	(±0.126)	(±0.196)	(±0.213)	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.544	0.725	0.730	0.741	0.641
		(±0.092)	(±0.075)	(±0.060)	(±0.097)	(±0.076)
HCN3	NC _T	5.146	5.417	4.341	0.837	5.059
		(±0,834)	(±0.722)	(±0.686)	(±0.113)	(±1.803)
	ΔC_T	-4.592	-4.732	-3.656	-0.1317	-4.680
		(±0.878)	(±0.764)	(±0.679)	(±0.170)	(±1.752)
	$\Delta\Delta_{HCN3}$	4.592	4.732	3.656	0.1317	4.680
	(±0.878)	(±0.764)	(±0.679)	(±0.170)	(±1.752)	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.127	0.1128	0.142	0.965	0.021
		(±0,045)	(±0.054)	(±0.034)	(±0.099)	(±0.013)
HCN4	NorC _{THCN4}	3.341	3.417	3.930	2.732	0.996
		(±0,762)	(±0.570)	(±0.723)	(±0.467)	(±0.110)
	ΔC_{THCN4}	-2.90	-2.770	-3.285	-2.026	-0.409
		(±0.700)	(±0.540)	(±0.653)	(±0.509)	(±0.120)
	$\Delta\Delta_{HCN4}$	2.90	2.770	3.285	2.026	0.409
	(±0.700)	(±0.540)	(±0.653)	(±0.509)	(±0.120)	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.102	0.1539	0.127	0.371	0.777
		(±0.032)	(±0.041)	(±0.046)	(±0.089)	(±0.066)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_T= normalização entre C_{Tβ-actina}/C_{T HCNx};

$\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta_{CT} = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

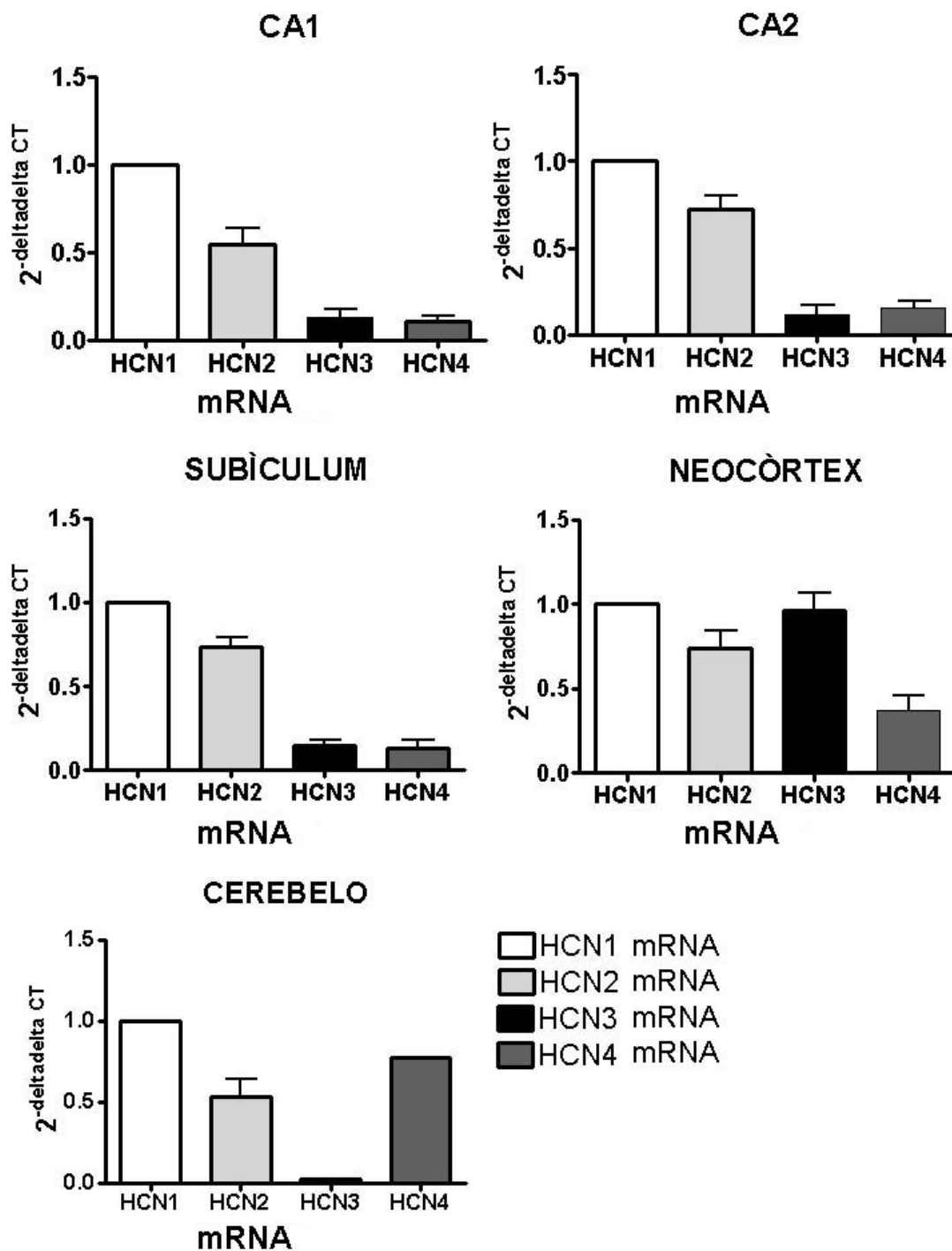


Figura 14 - Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de Ratos Controles .

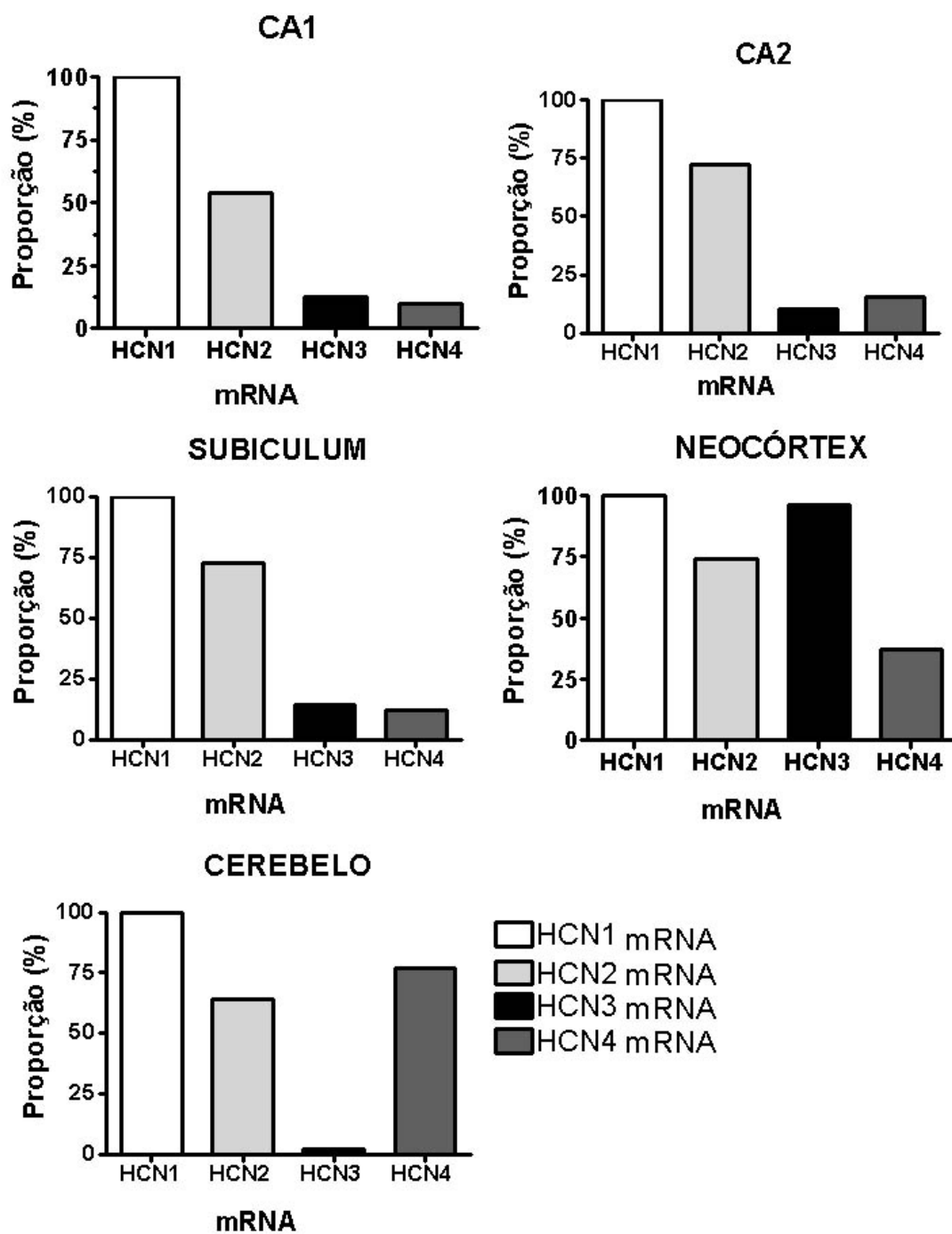


Figura 15- Expressão relativa dos genes HCNs comparados com a expressão do gene HCN1 em tecidos cerebrais de ratos controles

5.1.2. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos tratados com pilocarpina – Grupo Agudo (RTPA):

Assim como nos animais controles, verificamos nos RTPA, a expressão das 4 subunidades dos genes HCN1-4, na tabela 2 são apresentados as médias e erros padrão dos parâmetros mensurados.

Na área de CA1, foram detectadas diferenças significativas entre as médias dos $2^{-\Delta\Delta CTs}$ na comparação entre: HCN1 *versus* HCN3; HCN1 *versus* HCN4; HCN2 *versus* HCN3, HCN2 *versus* HCN4 ($P < 0.001$). Mas não houveram diferenças entre HCN1 *versus* HCN2 e HCN3 *versus* HCN4 não houve diferença estatística ($P > 0.05$) (Figura 16).

Por outro lado, na área de CA2, foram constatadas diferença significativas ($P < 0,001$) entre HCN1 e HCN2, HCN1 e HCN3; HCN1 e HCN4; HCN2 e HCN3, HCN2 e HCN4, mas não entre HCN3 e HCN4 ($P > 0.05$) (Figura 16).

O mesmo comportamento observado na região de CA2, em termos de expressão relativa dos genes HCNs foi observado na área do Subículum (Figura 16)

No neocórtex foi observado diferenças significativas ($P < 0,001$) na expressão dos genes HCN1 e HCN3, HCN1 e HCN4 ; HCN2 e HCN3, HCN2 e HCN4; e HCN3 e HCN4 (Figura 16). Por outro lado, entre HCN1 e HCN2 não foram estatisticamente significativos ($P > 0,05$).

No cerebelo, a expressão do HCN foi estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre HCN1 *versus* HCN3; HCN2 *versus* HCN3 e HCN3 *versus* HCN4 ($P < 0.001$). Entre HCN1 *versus* HCN2, HCN1 *versus* HCN4; e HCN2 *versus* HCN4 não foram significativos ($P > 0.05$) (Figura 16).

Considerando o percentual de expressão dos HCNs, observamos que, na região de CA1 de animais tratados com pilocarpina no grupo agudo, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais seguido por HCN2 que representou (84% do nível de HCN1) e HCN3 e HCN4 representaram cada um respectivamente 11 % e 18% (Figura 17).

O percentual de expressão dos genes HCNs na região de CA2 foi semelhante à CA1, o gene HCN1 também apresentou maior expressão relativa que os demais. O gene HCN2 representou 78% do nível de HCN1, os genes HCN4 e HCN3 representaram respectivamente 16 % e 10 % (Figura 17).

Na região do subíctulum, a expressão dos genes HCNs foi similar as áreas de CA1 e CA2 hipocámpais de ratos tratados com pilocarpina do grupo agudo. O gene HCN1 apresentou maior expressão relativa, HCN2 representou 73% do nível de HCN1, a seguir foi HCN4 representando 10 % e por fim HCN3, 8%(Figura 17).

Já no neocórtex, a expressão dos genes HCN1 e HCN2 foram muito próximas, 100 e 95% respectivamente. O gene HCN4 representou 45% e por fim, HCN3, 13% (Figura 17).

Como ocorrem no hipocampo, no cerebelo a maior expressão foi do gene HCN1. Entretanto, a expressão de HCN4 e HCN2 estavam elevadas apresentando percentuais de 95% e 90 % respectivamente. O gene HCN3 representou apenas 4%(Figura 17).

Tabela 2 Parâmetros Analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais

Tratados com pilocarpina: Grupo Agudo

Gene	Parâmetros	CA1 (N:10)	CA2(N:10)	SUB(N:10)	NEO(N:10)	CER(N:10)	
HCN1	NC _T	1.128 (±0.105)	0.886 (±0.033)	0.8369 (±0.033)	1.061 (±0.099)	0.999 (±0.112)	
	Δ C _T	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	
	ΔΔC _T	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	
	2 ^{-ΔΔCT}	1	1	1	1	1	
	HCN2	NC _T	1.438 (±0.117)	1.273 (±0.085)	1.353 (±0.156)	1.228 (±0.174)	1.254 (±0.184)
HCN2	Δ C _T	-0.310 (±0.151)	-0.3865 (±0.099)	-0.516 (±0.153)	-0.167 (±0.190)	-0.255 (±0.186)	
	ΔΔC _T	0.310 (±0.151)	0.3865 (±0.099)	0.516 (±0.153)	0.167 (±0.190)	0.255 (±0.186)	
	2 ^{-ΔΔCT}	0.849 (±0.096)	0.781 (±0.053)	0.735 (±0.078)	0.956 (±0.112)	0.902 (±0.116)	
	HCN3	NC _T	4.473 (±1.228)	4.586 (±1.048)	1.460 (±0.644)	1.889 (±.731)	1.872 (±0.771)
	HCN3	Δ C _T	-3.632 (±1.144)	-3.804 (±1.004)	-1.096 (±0.506)	-1.314 (±0.553)	-1.401 (±0.598)
ΔΔC _T		3.632 (±1.144)	3.804 (±1.004)	1.096 (±0.506)	1.314 (±0.553)	1.401 (±0.598)	
2 ^{-ΔΔCT}		0.1155 (±0.048)	0.101 (±0.028)	0.081 (±0.048)	0.136 (±0.084)	0.041 (±0.021)	
HCN4		NC _T	2.323 (±0.559)	2.848 (±0.903)	1.681 (±0.607)	2.267 (±0.227)	1.170 (±0.080)
HCN4		Δ C _T	-1.450 (±0.368)	-2.208 (±0.828)	-1.266 (±0.485)	-1.206 (±0.166)	-0.1707 (±0.173)
	ΔΔC _T	1.450 (±0.368)	2.208 (±0.828)	1.266 (±0.485)	1.206 (±0.166)	0.1707 (±0.173)	
	2 ^{-ΔΔCT}	0.185 (±0.052)	0.163 (±0.058)	0.107 (±0.045)	0.459 (±0.051)	0.953 (±0.130)	

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{\beta\text{-actina}}/C_{THCNx}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

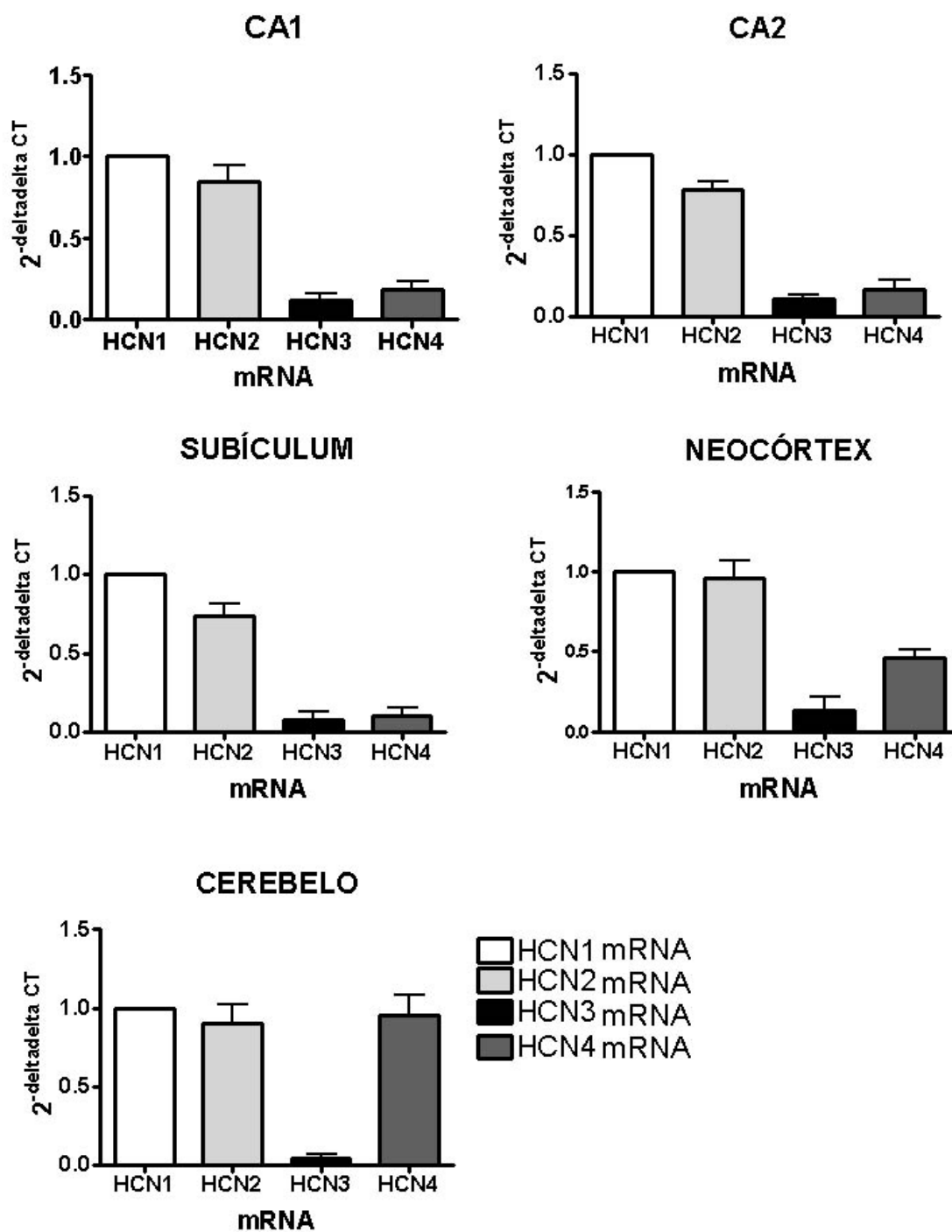


Figura 16 - Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de Ratos com epilepsia aguda.

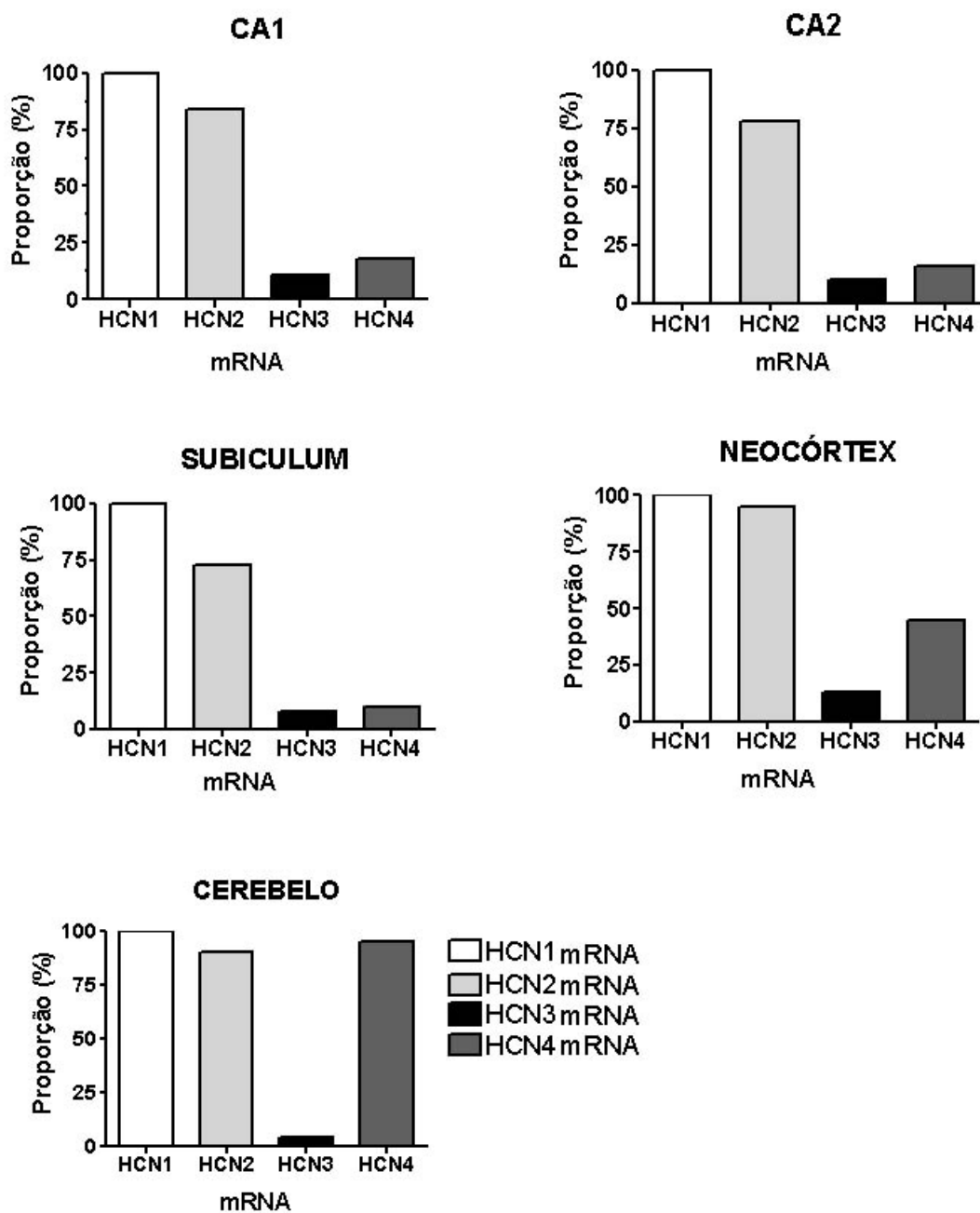


Figura 17 - Expressão relativa dos genes HCNs comparados com a expressão do gene HCN1 em tecidos cerebrais de ratos com epilepsia aguda.

5.1.3. Expressão dos genes HCN1-4 em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos tratados com pilocarpina – Grupo Crônico (RTPC):

Verificamos nos RTPC, da mesma forma que nos grupos anteriores, as áreas de CA1, CA2, Subiculum, neocórtex e cerebelo expressaram os 4 genes HCN1-4. As médias dos parâmetros mensurados foram apresentados na tabela 3.

Na área de CA1 e CA2 a maior expressão relativa foi do gene HCN1, sendo esta significativamente distinta da expressão de HCN2, HCN3 e HCN4. Entretanto não foram observadas diferenças significativas na expressão de HCN2, HCN3 e HCN4. (figura 18).

Já na área do subiculum, foram detectadas diferenças significativas ($P < 0,001$) na expressão de HCN1 *versus* HCN3; HCN1 *versus* HCN4, HCN2 *versus* HCN3, HCN2 *versus* HCN4. Por outro lado não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as médias da expressão HCN1 *versus* HCN2; HCN3 *versus* HCN4 (figura 18).

Nas amostras de neocórtex de ratos do grupo crônico, foi evidenciado diferenças significativas ($P < 0,001$) na expressão relativa de HCN1 *versus* HCN3; HCN1 *versus* HCN4, HCN2 *versus* HCN3 e HCN4 *versus* HCN4. O mesmo não ocorrendo nas comparações HCN1 *versus* HCN2 e HCN2 *versus* HCN4 (figura 18).

No caso do cerebelo, valores médios de expressão semelhantes e estatisticamente não significativos ($P > 0,05$) dos genes HCN1, HCN2 e HCN4. Já a expressão de HCN3 foi a menor ($P < 0,001$) do que os outros genes da família HCN.

Quanto ao percentual de expressão dos genes HCNs, observamos que, na região de CA1 de animais tratados com pilocarpina-crônico, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais, a seguir foi HCN2 que

representou 47% do nível de HCN1 e HCN4 e HCN3 representaram cada um respectivamente 44 % e 14% (figura 19).

Em CA2, dos animais tratados com pilocarpina-crônico, o gene HCN1 apresentou maior expressão relativa, seguido por HCN4 com 47% do nível de HCN1, a seguir foi HCN2 que representou 36 % e por fim HCN3, 12 % (figura 19)

Na região do subículum, o gene com maior expressão relativa foi o HCN1 foi seguido por HCN2 que representou 80% do nível de HCN1, a seguir foi HCN4 que representou 26% e por fim HCN3, 8% (figura 18).

No neocórtex, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa, HCN2 apresentou um percentual de 67%seguido por HCN4 com 51% e por fim, HCN3 que representou 9%(figura 19).

No cerebelo, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa, entretanto, HCN2 esteve próximo à HCN1, apresentando percentual de 97%, HCN4 com 70% . O gene HCN3 representou 14% (figura 19).

Tabela 3 Parâmetros Analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais tratados com pilocarpina: Grupo Crônico(N:10)

Gene	Parâmetros	CA1	CA2	SUB	NEO	CER	
HCN1	NC _T	1.645 (±0.230)	1.786 (±0.274)	2.288 (±0.213)	1.777 (±0.211)	1.804 (±0.168)	
	Δ C _T	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	
	ΔΔC _T	0 (± 0.0)	0 (± 0.00)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)	
	2 ^{-ΔΔCT}	1	1	1	1	1	
	HCN2	NC _T	1.473 (±0.334)	1.165 (±0.416)	2.801 (±0.210)	2.406 (±0.259)	1.775 (±0.356)
HCN2	Δ C _T	-0.245 (±0.139)	-0.1292 (±0.173)	-0.5132 (±0.251)	-0.6293 (±0.152)	-0.1929 (±0.340)	
	ΔΔC _T	0.245 (±0.139)	0.1292 (±0.173)	0.5132 (±0.251)	0.6293 (±0.152)	0.1929 (±0.340)	
	2 ^{-ΔΔCT}	0.478 (±0.149)	0.365 (±0.173)	0.8066 (±0.156)	0.6765 (±0.062)	0.9713 (±0.216)	
	HCN3	NC _T	3.742 (±1.617)	2.048 (±0.988)	3.657 (±1.016)	2.410 (±0.892)	2.900 (±1.238)
	HCN3	Δ C _T	-2.815 (±1.432)	-1.081 (±0.606)	-2.081 (±0.745)	-1.646 (±0.703)	-1.910 (±0.997)
ΔΔC _T		2.815 (±1.432)	1.081 (±0.606)	2.081 (±0.745)	1.646 (±0.703)	1.910 (±0.997)	
2 ^{-ΔΔCT}		0.145 (±0.097)	0.1276 (±0.078)	0.222 (±0.112)	0.09394 (±0.049)	0.1414 (±0.080)	
HCN4		NC _T	3.124 (±0.963)	2.208 (±0.442)	2.986 (±0.750)	2.258 (±0.528)	1.921 (±0.394)
HCN4		Δ C _T	-0.687 (±0.330)	-0.7139 (±0.362)	-1.313 (±0.450)	-0.8413 (±0.366)	-0.3769 (±0.268)
	ΔΔC _T	0.687 (±0.330)	0.7139 (±0.362)	1.313 (±0.450)	0.8413 (±0.366)	0.3769 (±0.268)	
	2 ^{-ΔΔCT}	0.445 (±0.144)	0.474 (±0.184)	0.266 (±0.099)	0.5103 (±0.166)	0.7013 (±0.210)	

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{\beta\text{-actina}}/C_{T\text{HCNx}}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

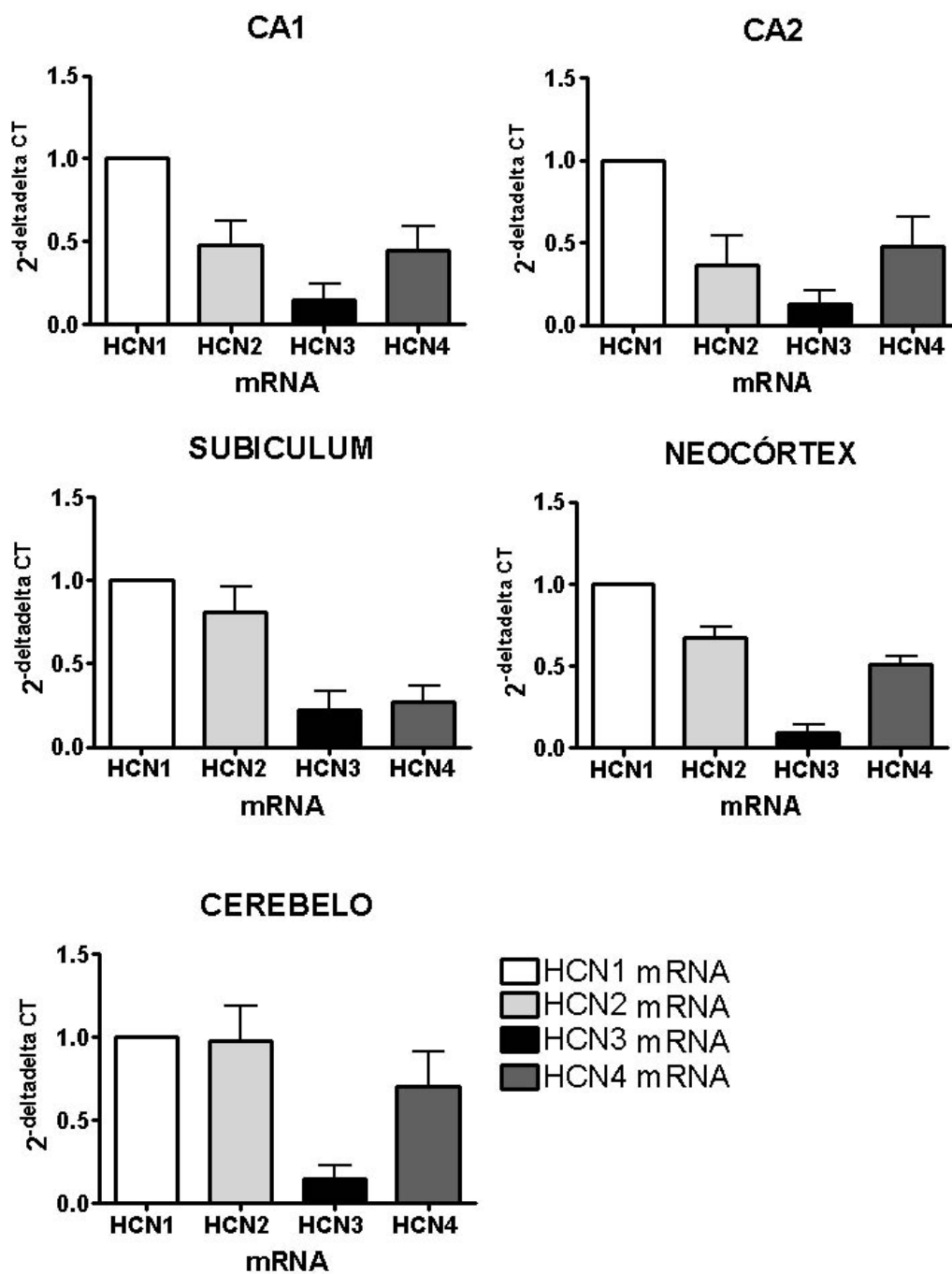


Figura 18 - Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em tecidos cerebrais de ratos com epilepsia crônica.

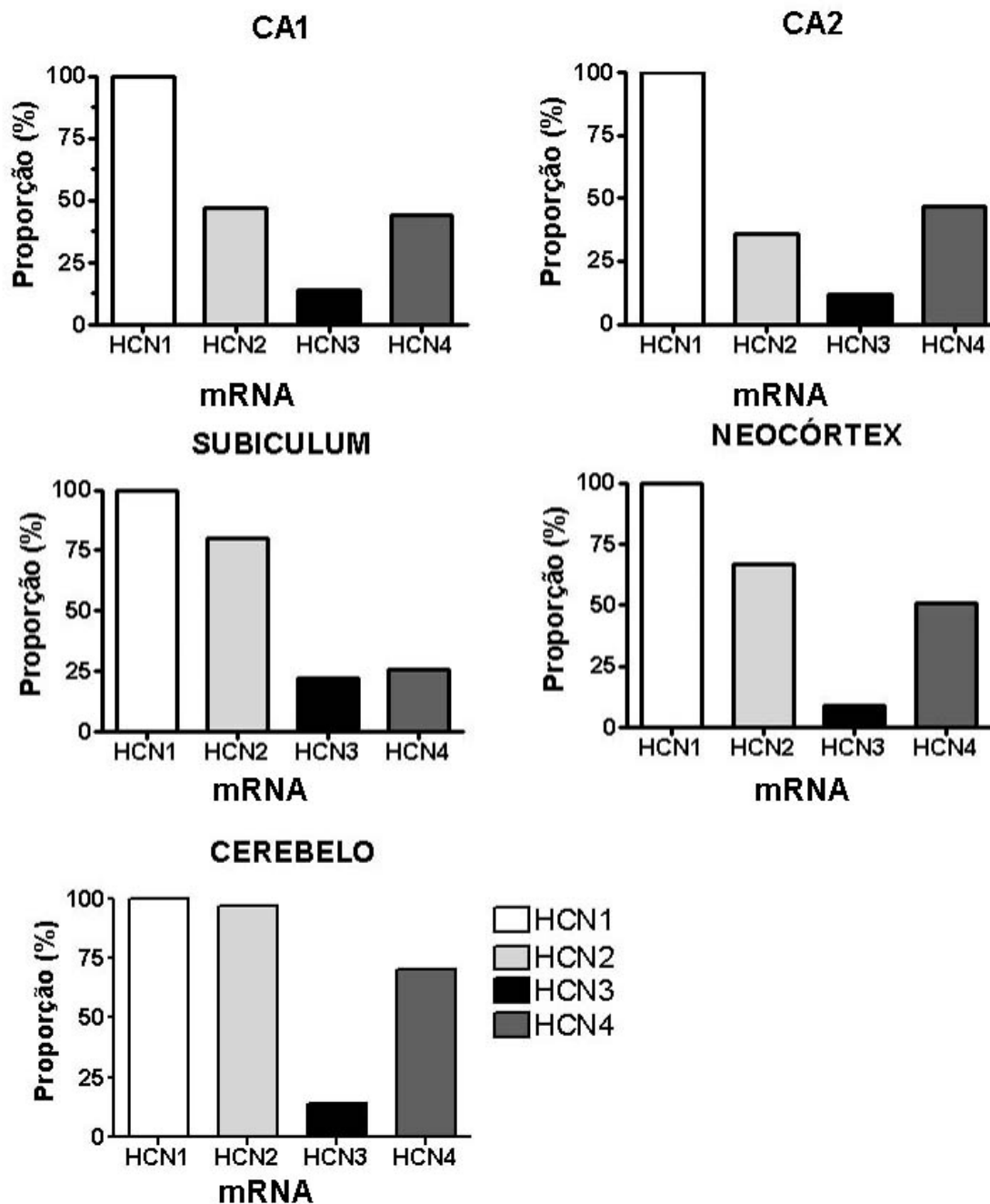


Figura 19 - Expressão relativa dos genes HCNs comparados com a expressão do gene HCN1 em tecidos cerebrais de ratos com epilepsia Crônica.

5.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de em ratos controles e epiléticos (grupos agudo e crônico):

Neste estudo serão apresentados os resultados da análise comparativa da expressão relativa dos genes HCN1-4 entre as diferentes áreas, do sistema nervoso central, estudadas dos grupos ratos controles (RC) e tratados com pilocarpina (agudo- RTPA; crônico- RTPC).

Nas áreas de CA1, CA2 e Subículum não foi possível comparar os níveis de expressão relativa de HCN3 e HCN4 devido a baixa expressão relativas nestas áreas. No cerebelo também não foi possível estudar os níveis de expressão relativa de HCN3. Assim, foram avaliados os genes HCN1 e HCN2 nas áreas de CA1, CA2 e subículum; neocórtex e cerebelo; neocórtex para o gene HCN3 e neocórtex e cerebelo para HCN4 no (neocórtex e cerebelo).

Para determinar o percentual de aumento (ou redução) da expressão de um determinado HCN consideramos 1 , o $2^{-\Delta\Delta CT}$ de HCNX do grupo controle, sendo 100% e a partir disto os valores $2^{-\Delta\Delta CT}$ dos demais HCNXs foram expressos em porcentagem.

5.2.1. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em CA1 de ratos controles *versus* epiléticos (agudo e crônicos):

Na área de CA1, verificamos uma diferença significativa quanto a expressão relativa de HCN1 ($P < 0,001$). Foi observado uma diferença na expressão nas amostras de ratos controles (RC) quando comparado com as amostras dos grupos com epilepsia (RTPA e RTPC) e também entre os grupos epiléticos (RTPA e RTPC). Com relação a expressão do gene HCN2, da mesma região foi observado diferença estatística entre os grupos RC *versus* RTPA, RC *versus* RTPC e RTPA *versus* RTPC ($P < 0,001$). (figura 20).

Em relação ao comportamento de perda da expressão dos HCN1, em termos percentuais, verificou-se que na região de CA1, tomando como referencia o grupo controle, houve uma redução de 29% no RTPA e uma redução de 61% no grupo RTPC. Foi observado um aumento de 47% na expressão do gene HCN2 nos RTPA em relação à RC. No grupo RTPC houve uma queda brusca da proporção de HCN2, 69%, em relação ao grupo RC. (figura 21).

Tabela 4 - Parâmetros analisados em CA1 para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC) (N:10):

Gene	Parâmetros	RC	RTPA	RTPC
HCN1	NC_T	0,553 (±0,055)	1,061(±0,999)	1,645 (±0,230)
	Δ C_T	0 (± 0,000)	-0,507(±0,093)	-0,667 (±0, 149)
	ΔΔC_T	0 (± 0,000)	0,507(±0,093)	1,147(±0,190)
	2^{-ΔΔCT}	1	0,7164 (±0,043)	0,389(±0,057)
HCN2	NC_T	1,649 (± 0,25)	1,228 (± 0,174)	1,325(± 0,365)
	Δ C_T	0 (± 0,0)	0,420 (±0,213)	-0,604 (±0.205)
	ΔΔC_T	0 (± 0,0)	-0,420 (±0,213)	0,604 (±0.205)
	2^{-ΔΔCT}	1	1,460 (±0,182)	0.314 (±0.094)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{T\beta\text{-actina}}/C_{T\text{HCNx}}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

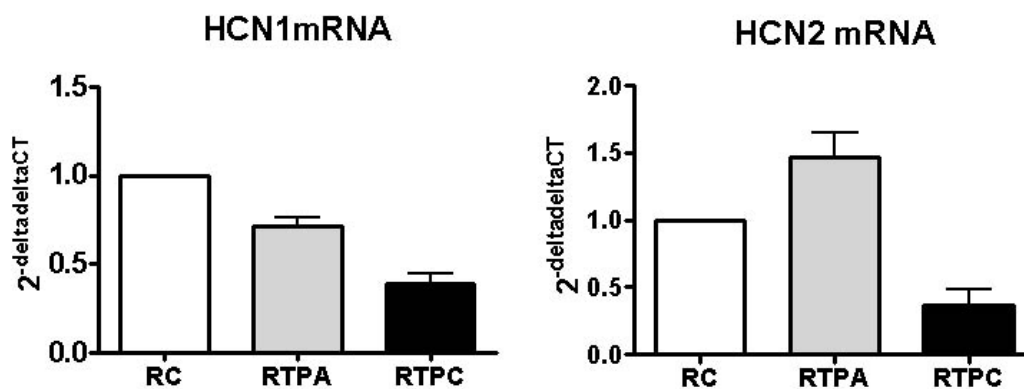


Figura 20 – Comparação da expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

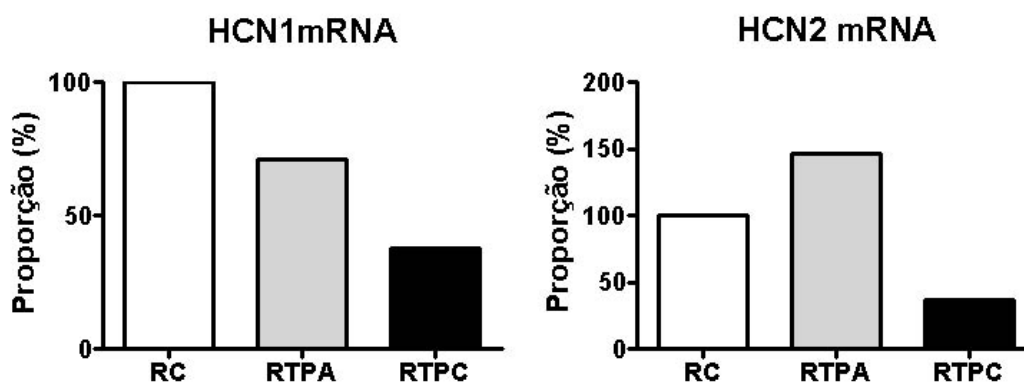


Figura 21 – Comparação da expressão dos HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

5.2.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em CA2 de ratos controles *versus* epilépticos (agudo e crônicos):

Na área de CA2 (tabela 2), verificou-se uma diferença significativa na expressão relativa de HCN1 ($P < 0,001$). Houve diferença na expressão desse gene no grupo RC quando comparado com o grupo RTPC e entre os grupos epilépticos (RTPA e RTPC). Não foi observado diferença na expressão de HCN1 entre RC e RTPA (figura 22). As amostras do grupo controle e com epilepsia agudo não apresentaram diferença estatística com relação a expressão do gene HCN2 ($P > 0,05$).

Em CA2, observamos houve redução da proporção de HCN1 em RTPA em 12% deste gene em relação ao grupo controle, contudo esta redução não foi estatisticamente significativa. Em RTPC, a redução na expressão de HCN1 foi de 59% (figura 23). Quanto ao gene HCN2, houve redução na expressão de 62% nos RTPC em relação a RC. A redução da expressão do gene HCN2 no grupo RTPA foi menor que 10%.

Tabela 5 - Parâmetros analisados em CA2, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC) (N:10):

Gene	Parâmetros	RC	RTPA	RTPC
HCN1	NC_T	0.684(±0,251)	0.886 (±0,033)	1.786 (±0,274)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0,201(±0,094)	-1.139 (±0.236)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0,201 (±0,094)	1.139 (±0.236)
	2^{-ΔΔCT}	1	0,888(±0,669)	0,410(±0,075)
HCN2	NC_T	0.684(± 0.08)	0.836(±0,033)	2.288 (±0,213)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.152(±0,061)	-1.603 (±0,257)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.152(±0,061)	1.603 (±0,257)
	2^{-ΔΔCT}	1	0,907(±0,04)	0,380(±0,006)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{T\beta\text{-actina}}/C_{T\text{HCNx}}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

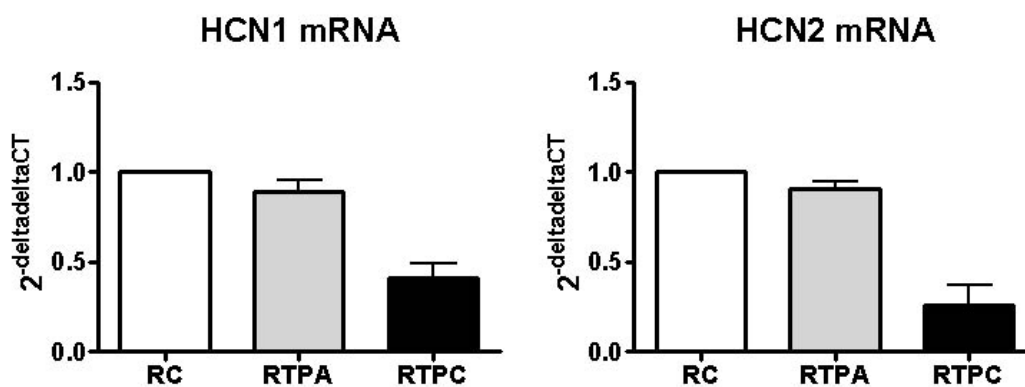


Figura 22 - Expressão dos HCNs em CA2 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

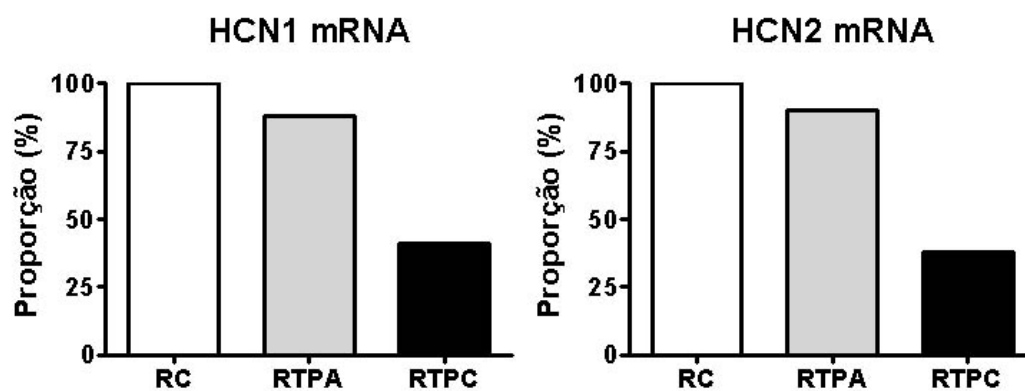


Figura 23 - Proporção da expressão dos HCNs em CA1 de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

5.2.3. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs subiculum de ratos controles *versus* epilépticos (agudo e crônicos):

A tabela 6 apresenta as médias dos parâmetros analisados na determinação da expressão relativa dos genes HCNs em amostras de subiculum avaliado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Quanto a expressão relativa de HCN1, houve diferença significativa na expressão deste gene entre os grupos controles e com epilepsia crônica e subiculum com epilepsia ($P < 0,001$). Entretanto a expressão de HCN1 não diferiu entre os grupos controles e com epilepsia aguda ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos com relação a expressão do gene HCN2 (figura 24).

No subiculum, observamos que a redução da expressão de HCN1 em ratos com epilepsia crônica foi de 62% em relação ao controle. Da mesma forma que HCN1 a redução da expressão do gene HCN2 do grupo ratos com epilepsia crônica foi de 84%, em relação a RC (figura 25).

Tabela 6 – Parâmetros, analisados em subiculum, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC) (N:10) :

Gene	Parâmetros	RC	RTPA	RTPC
HCN1	NC_T	0.684 (±0.081)	0.836 (±0,033)	2.288 (±0,213)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.152 (±0.061)	-1.603 (±0,257)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.152 (±0.061)	1.603 (±0,257)
	2^{-ΔΔCT}	1	0.907(±0,040)	0.380(±0,068)
HCN2	NC_T	1.186 (±0,137)	1.353 (±0.156)	2.801 (±0.210)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.167 (±0,215)	-1.615 (±0.269)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.167 (±0,215)	1.615 (±0.269)
	2^{-ΔΔCT}	1	0.985 (±0,150)	0.156(±0,047)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{T\beta\text{-actina}}/C_{THCNx}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

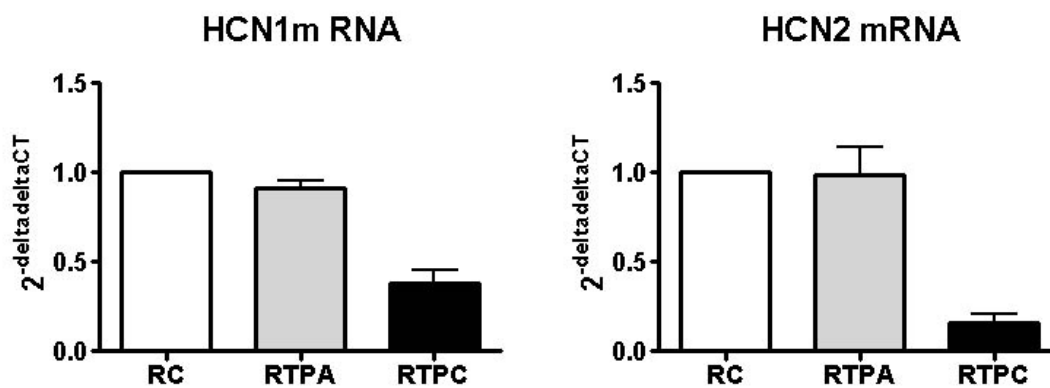


Figura 24 – Comparação da expressão dos HCNs em subiculum de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

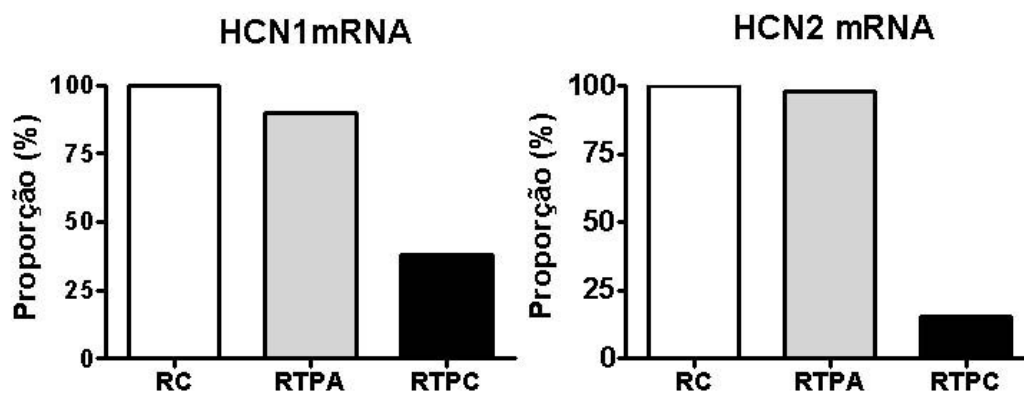


Figura 25 - Comparação da expressão relativa dos HCNs em subiculum de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

5.2.4. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs do neocórtex de ratos controles *versus* epilépticos (agudo e crônicos):

No neocórtex (tabela 7), verificamos diferença significativa quanto a expressão relativa de HCN1, tanto entre o grupo controle e os grupos com epilepsia, quanto entre os grupos epilépticos (RTPA e RTPC) ($P < 0,05$). (figura 26) .

Por outro lado, não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$) na expressão de HCN2 entre o grupo controle e RTPA em amostras de neocórtex, mas ocorreu redução significativa na expressão deste gene em ratos do grupo epiléptico crônico (figura 25).

No Neocórtex foi possível comparar a expressão relativa de HCN3, verificando que os valores medidos de ratos controles e RTPA e ratos controles e RTPC diferiram estatisticamente ($P < 0,05$). Entretanto não foi constatada alteração significativa na expressão deste gene entre os grupos epilépticos (RTPA e RTPC) ($P > 0,05$) (figura 26).

Não foram observadas diferenças significativas do $2^{-\Delta\Delta CTs}$ de HCN4 de RC e RTPA e RTPC ($P > 0,05$). As médias dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para RTPA foi de 2,57 e para RTPC, 1,66, entretanto os valores do desvio padrão foram respectivamente 3.363 e 2.292, justificando o resultado do teste estatístico aplicado.

No neocórtex observamos que a redução da proporção de HCN1 em RTPA foi de 19% e em RTPC houve uma redução de 87% (figura 26). Quanto ao gene HCN2 do neocórtex foi observado um aumento de 15% na expressão em RTPA em relação a RC , no grupo RTPC houve uma queda brusca da proporção deste gene, 47%. Em relação a proporção de HCN3, houve redução de 79% e 95% em RTPA e RTPC respectivamente (figura 27).

Tabela 7 – Parâmetros, analisados em neocórtex, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC): (N:10)

Gene	Parâmetros	RC	RTPA	RTPC
HCN1	NC_T	0.705 (±0,082)	1.061(±0,099)	2.406(±0,259)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.355 (±0,125)	-1.701 (±0,201)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.355 (±0,125)	1.701 (±0,201)
	2^{-ΔΔCT}	1	0,808(±0,069)	0.128 (±0,031)
HCN2	NC_T	1.252 (±0,507)	1.228(±0.174)	2.406 (±0,259)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	0.024 (±0.243)	-1.154 (±0.301)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	-0.024 (±0.243)	1.154 (±0.301)
	2^{-ΔΔCT}	1	1.151 (±0,188)	0.533(±0.094)
HCN3	NC_T	0.837(±0,113)	1.889 (±0,731)	2.410(±0,892)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-1.521 (±0,639)	-1.997 (±0,758)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	1.521 (±0,639)	1.997 (±0,758)
	2^{-ΔΔCT}	1	0.214 (±0,112)	0.051(±0,028)
HCN4	NC_T	2.732 (±0,467)	2.267 (±0,227)	2.258 (±0,528)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	0.464 (±0,511)	0.141(±0,495)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	-0.464 (±0,511)	-0.141(±0,495)
	2^{-ΔΔCT}	1	2.570 (±1,064)	1.667 (±0,724)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{T\beta-actina}/C_{THCNx}$;

Δ_{CT} = $NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta_{CT}$ = $\Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

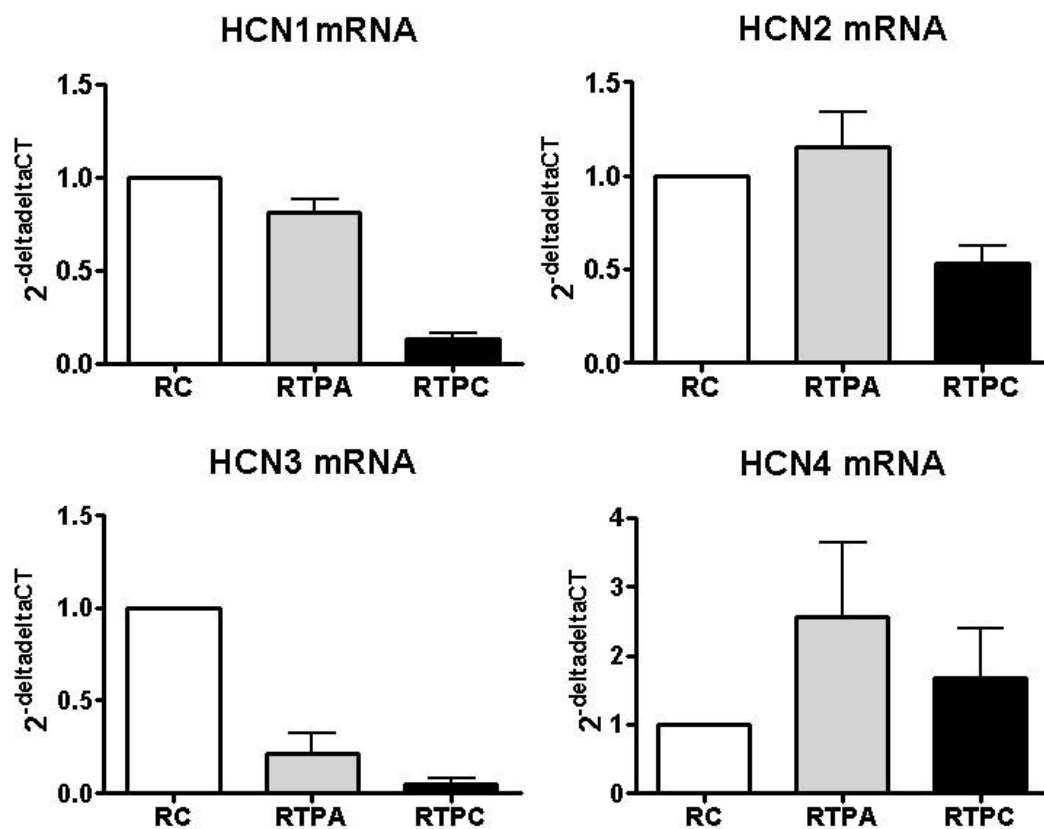


Figura 26 – Comparação da expressão dos HCNs em neocórtex de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

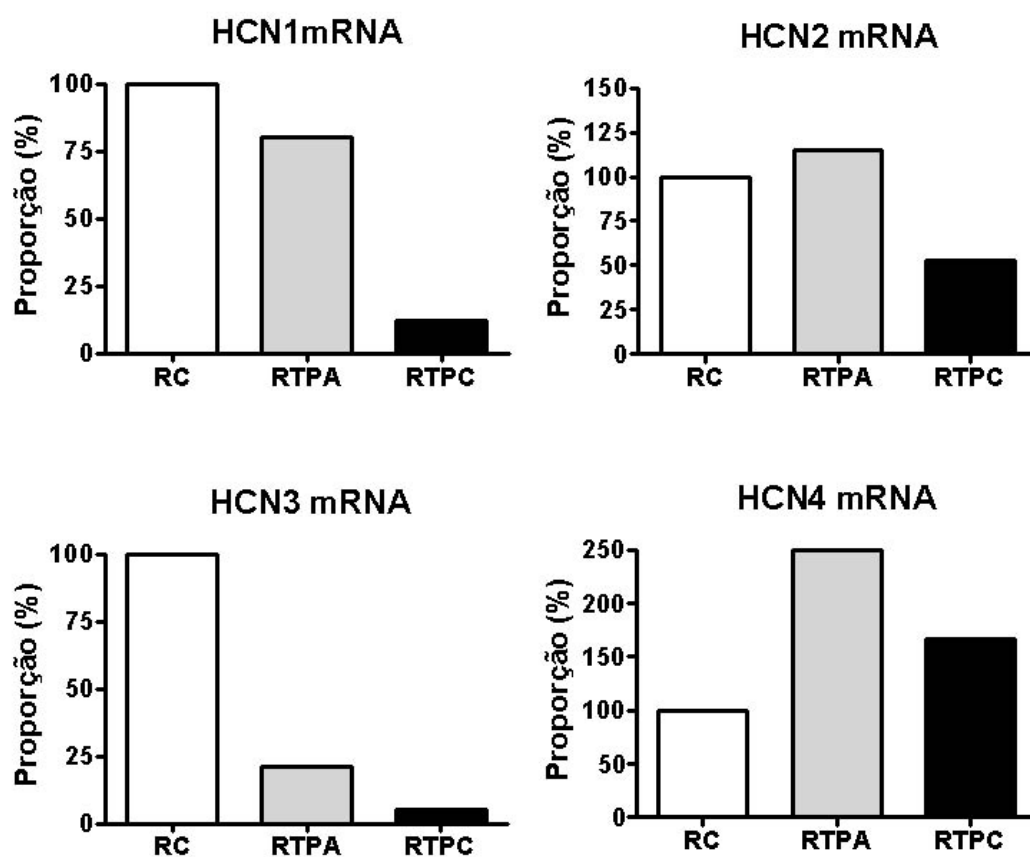


Figura 27 – Comparação da expressão dos HCNs em neocórtex de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

5.2.5. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs no cerebelo de ratos controles *versus* epiléticos (agudo e crônicos):

No cerebelo (tabela 8), verificou-se diferença significativa ($P < 0,001$) quanto a expressão relativa de HCN1 entre os grupos RC e com epilepsia (RTPA e RTPC), e também entre os grupos epiléticos (RTPA e RTPC) (figura 28) .

Não foram observadas diferenças significativas quanto a expressão de HCN2 entre ratos do grupo RC e os grupos epiléticos (RTPA e RTP) ($P > 0,05$) (figura 28)

Já os valores mensurados para o gene HCN4 de RC foi estatisticamente distinto daquele do grupo RTPC , o mesmo acontecendo na comparação entre os grupos epiléticos (RTPA e RTPC) com $P < 0,001$. Por outro lado, não foi constatada diferença significativa na expressão de HCN4 ($P > 0,05$) (figura 28) entre RC e RTPC.

No cerebelo, a redução na proporção de HCN1 foi de 23% no RTPA e 54% no RTPC. Quanto ao HCN2 houve um aumento da expressão no RTPA, 30%, seguido por uma redução de 13%. No HCN4, verificamos uma redução proporcional de 4% no RTPA e 65% em RTPC em relação ao HCN4 controle. (figura 29) .

Tabela 8 – Parâmetros analisados no cerebelo, para determinar a expressão relativa dos genes HCNs dos animais controles (RC) em relação aos ratos tratados com pilocarpina- agudo (RTPA) e ratos tratados com pilocarpina-crônico (RTPC):

Gene	Parâmetros	RC (N:10)	RTPA(N:10)	RTPC (N:10)
HCN1	NC_T	0.587 (±0,058)	0.999 (±0,112)	1.804 (±0.168)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.412(±0,118)	-1.217 (±0,180)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.412(±0,118)	1.217 (±0,180)
	2^{-ΔΔCT}	1	0.773(±0,057)	0.462(±0,062)
HCN2	NC_T	1.348 (±0,184)	1.254 (±0,184)	1.775 (±0,356)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	0.093(±0.295)	-0.459 (±0.370)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	-0.093(±0.295)	0.459 (±0.370)
	2^{-ΔΔCT}	1	1.305 (±0,312)	0.870 (±0,281)
HCN4	NC_T	0.996 (±0,110)	1.170 (±0.080)	1.921 (±0,394)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	-0.173(±0,171)	-1.144 (±0,314)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0.173(±0,171)	1.144 (±0,314)
	2^{-ΔΔCT}	1	0.952 (±0,136)	0.346 (±0,087)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{\beta\text{-actina}}/C_{THCNx}$; $\Delta CT = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta CT = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

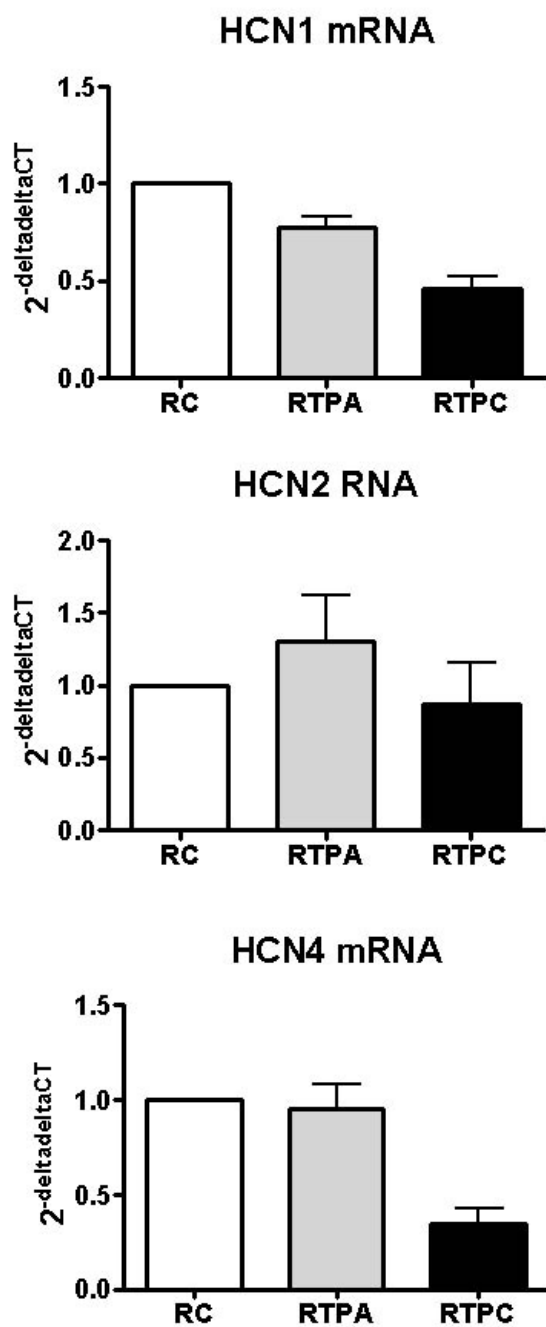


Figura 28 – Comparação da expressão dos HCNs em Cerebelo de de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

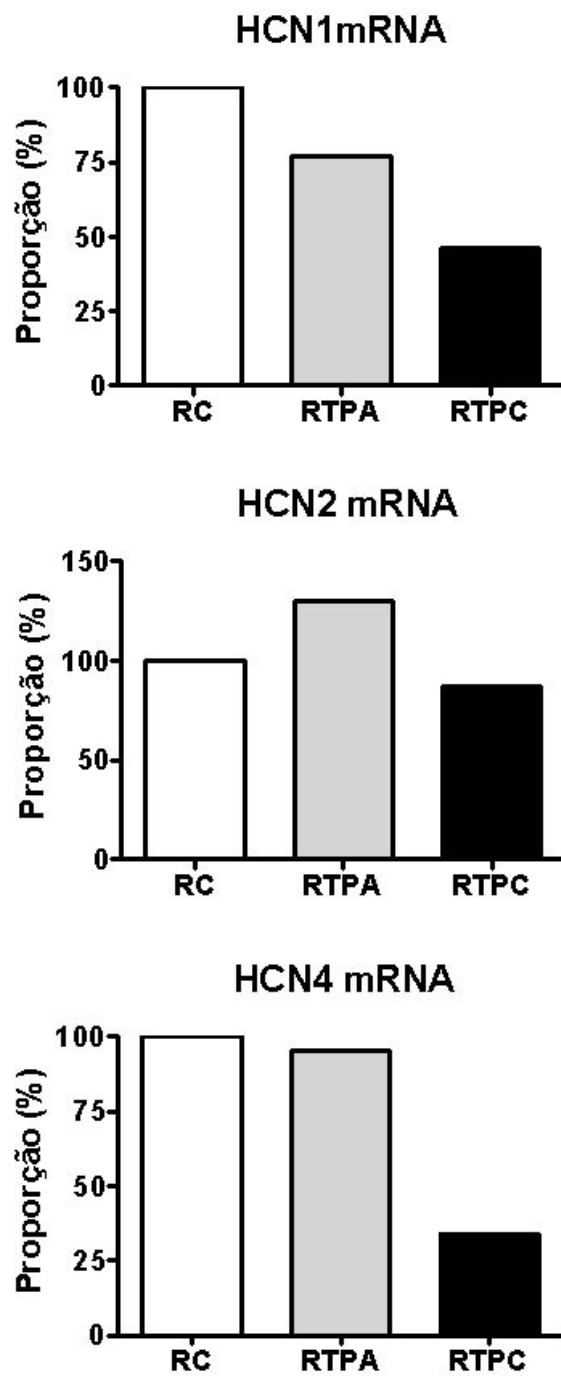


Figura 29 – Comparação da expressão dos HCNs no cerebelo de ratos controles (RC) versus Ratos tratados com pilocarpina agudo (RTPA) e Crônico (RTPC).

5.3. Perfil de expressão dos genes HCNs em hipocampo humano submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e hipocampo e córtex humano de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico:

Neste estudo apresentaremos o perfil de expressão dos genes HCNs em hipocampo humano de pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e hipocampo e córtex humano de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico. Foram comparados a proporção relativa do HCN1 com os demais subtipos (HCN2, HCN3 e HCN4).

5.3.1. Expressão dos genes HCN1-4 no tecido hipocampal e cortical humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico (THTC):

Os parâmetros mensurados no tecido hipocampal e cortical humano estão apresentados na tabela.

A análise de comparação de médias da expressão dos genes HCNs no hipocampo permitiu evidenciar diferenças significativas ($P < 0,001$) na expressão de HCN1 e HCN2; HCN1 e HCN3, HCN1 e HCN4, HCN2 e HCN3 e HCN2 e HCN4. Não foram detectadas diferenças significativas entre HCN3 e HCN4 ($P > 0,05$).

Já no córtex, não foi evidenciado diferença significativa da expressão de HCN1 e 2. Entretanto, diferença estatística foi confirmada para todas as outras comparações (figura 30).

Quanto ao percentual de expressão dos HCNs, observamos que no hipocampo de pacientes com traumatismo cranio-encefálico, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais seguido por HCN2 que representou 55% do nível de HCN1 e HCN4 e HCN3 representaram cada um respectivamente 27 % e 10,8% (figura 31).

No neocórtex, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa seguido por, HCN2 com 82% e HCN4 com 47%. O gene HCN3 representou a menor expressão relativa 21% (figura 31).

Tabela 9 - Parâmetros analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs de tecido humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico (N:10)

Gene	Parâmetros	CA1	Neocórtex
HCN1	NC_T	0.768 (±0.012)	0.981 (±0.037)
	Δ C_T	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)
	ΔΔC_T	0 (± 0.0)	0 (± 0.0)
	2^{-ΔΔCT}	1	1
HCN2	NC_T	1.623 (±0.068)	1.305 (±0.101)
	Δ C_T	-0.854 (±0.063)	-0.324(±0.132)
	ΔΔC_T	0.854 (±0.063)	0.324(±0.132)
	2^{-ΔΔCT}	0.557 (±0.02)	0.829 (±0.074)
HCN3	NC_T	3.006 (±0.879)	1.938(±0.455)
	Δ C_T	-2.471(±0.793)	-1.290 (±0.323)
	ΔΔC_T	2.471(±0.793)	1.290(±0.323)
	2^{-ΔΔCT}	0.108 (±0.037)	0.211 (±0.058)
HCN4	NC_T	1.161 (±0.324)	1.784 (±0.251)
	Δ C_T	-0.699 (±0.203)	-0.893(±0.186)
	ΔΔC_T	0.699 (±0.203)	0.893 (±0.186)
	2^{-ΔΔCT}	0.271 (±0.076)	0.476 (±0.070)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{\beta\text{-actina}}/C_{THCNx}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

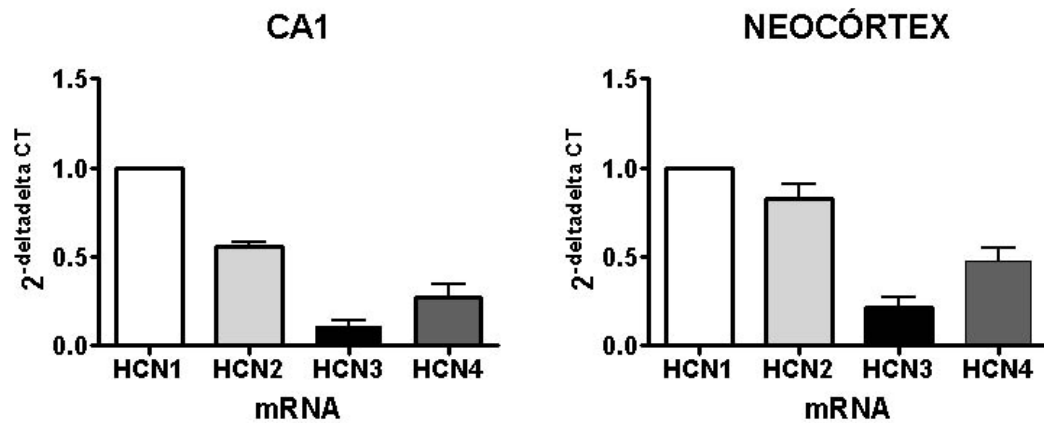


Figura 30 - Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs no hipocampo e córtex humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico .

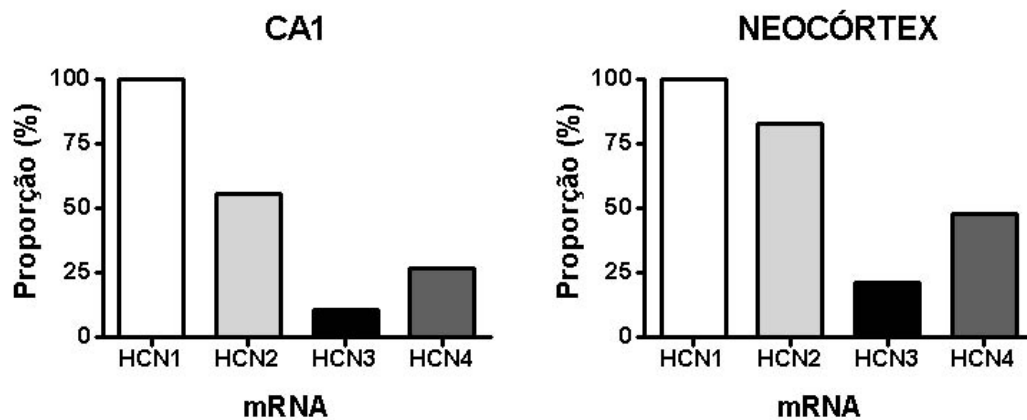


Figura 31 - Expressão dos HCNs em relação ao HCN1 no hipocampo e córtex humano de Pacientes com Traumatismo Cranioencefálico .

5.2.2. Expressão dos genes HCN1-4 no tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET):

No hipocampo de pacientes com epilepsia (Tabela 10) foram detectadas diferenças estatísticas ($P < 0,001$ entre os genes HCN1 e HCN3), HCN1 e HCN4, HCN2 e HCN3, e HCN2 e HCN4. Entretanto não foi evidenciado diferença estatística ($P > 0,05$) entre HCN1 e HCN2, e HCN3 e HCN4 (Figura 32).

Quanto ao percentual de expressão dos HCNs, observamos que, nestes hipocampos, o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais seguido por HCN2 que representou 55% do nível de HCN1 e HCN4 e HCN3 representaram cada um respectivamente 27 % e 10% (Figura 33).

Tabela 10 Parâmetros Analisados para determinar a expressão relativa dos genes HCNs no Tecido Hipocampal Humano de Pacientes com Epilepsia do lobo temporal(N:10)

Gene	Parâmetros	CA1
HCN1	NC _T	1,82 (±0.11)
	ΔC_T	0 (± 0.0)
	$\Delta\Delta C_T$	0 (± 0.0)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	1
HCN2	NC _T	2,004 (±0.23)
	ΔC_T	-0,17 (±0.019)
	$\Delta\Delta C_T$	0. 0,17 (±0.019)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.557 (±0.214)
HCN3	NC _T	1,65(±0.89)
	ΔC_T	-1,11 (±0.71)
	$\Delta\Delta C_T$	1,11 (±0.71)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.102 (±0.05)
HCN4	NC _T	0,95(±0.41)
	ΔC_T	-0.24 (±0.203)
	$\Delta\Delta C_T$	0.24 (±0.203)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	0,251(±0.07)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{Tx}= normalização entre $C_{T\beta\text{-actina}}/C_{T\text{HCNx}}$; $\Delta C_T = NC_{\text{THCN1}} - NC_{\text{THCNx}}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{\text{THCN1}} - \Delta C_{\text{THCNx}}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ valor que expressa a expressão relativa do gene.

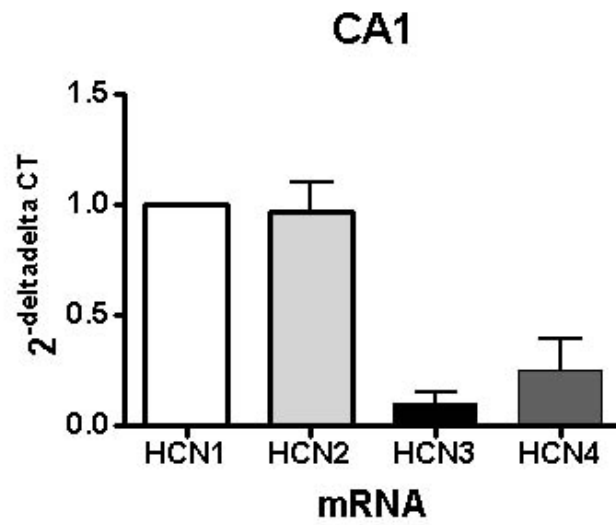


Figura 32 - Expressão relativa dos mRNAs dos genes HCNs no hipocampo humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal .

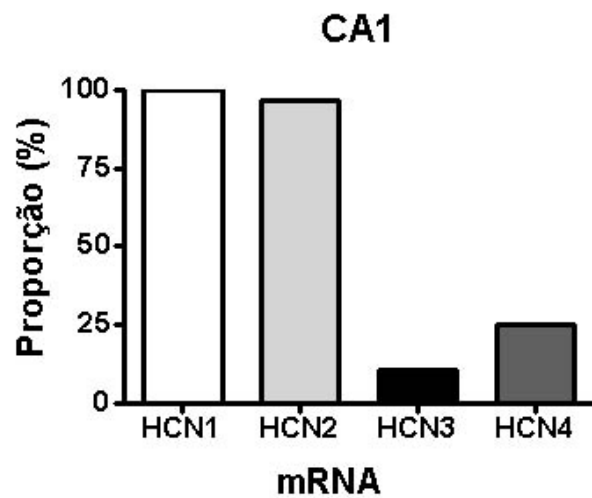


Figura 33 – Expressão dos HCNs em relação ao HCN1 de HCNs no hipocampo humano de pacientes com epilepsia do lobo temporal.

5.4. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em hipocampus humanos submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico

Neste estudo serão apresentados os resultados da análise comparativa da expressão relativa dos genes HCN1,2 e 4 no tecido hipocampal humano de submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária e de pacientes submetidos a lobectomia temporal por traumatismo cranioencefálico. Devido a baixa expressão de HCN3, não foi possível realizar a análise comparativa deste gene.

Escolhemos HCNX do grupo controle para comparar com HCNX dos grupos RTPA e RTPC, onde $2^{-\Delta\Delta\text{CTHCN}}$ do HCNX do grupo THTC foi determinado como 1. Os valores calculados dos $2^{-\Delta\Delta\text{CTHCN}}$ foram comparados pelo *teste t* de student, a significância foi determinada com $P < 0,05$.

No hipocampo humano, verificamos diferença significativa quanto à expressão relativa de HCN1 entre tecido hipocampal humano de pacientes THTC versus THET ($P < 0,0001$). Quanto a expressão do gene HCN2, da mesma região não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$) entre THTC e THET. No gene HCN4 também foi verificado diferença estatística ($P < 0,001$) entre THTC e THET (figura 34) Quando observamos o comportamento de perda da expressão dos HCN1 em termos percentuais, no hipocampo com epilepsia, tomando como referencia o grupo THTC verificamos uma redução de 51% nos hipocampus de pacientes com epilepsia. A redução de HCN4 chegou à 85% no THER em relação THTC (figura 35).

Tabela 11 – Parâmetros, analisados no tecido hipocampal humano para comparar a expressão relativa dos genes HCNs de pacientes Submetidos a Lobectomia Temporal por Traumatismo Cranioencefálico (THTC) (N:10) em relação aos pacientes Submetidos à Cirurgia Para O Tratamento Da Epilepsia Refratária (THET) (N:11)

Gene	Parâmetros	THTC	THET
HCN1	NC _T	0.768 (±0.012)	1.846 (±0.123)
	Δ C _T	0 (± 0.0)	-1.07 (±0.123)
	ΔΔC _T	0 (± 0.0)	1.07 (±0.123)
	2 ^{-ΔΔCT}	1	0.489 (±0.039)
HCN2	NC _T	1.623 (±0.068)	2.104 (±0.23)
	Δ C _T	0 (± 0.0)	-0.4804 (±0.210)
	ΔΔC _T	0 (± 0.0)	0.4804 (±0.210)
	2 ^{-ΔΔCT}	1	0.783 (±0.103)
HCN4	NC _T	1.161 (±0.324)	1.050 (±0.444)
	Δ C _T	0 (± 0.0)	-0.096 (±0.114)
	ΔΔC _T	0 (± 0.0)	0.096 (±0.114)
	2 ^{-ΔΔCT}	1	0.157(±0.115)

Os dados foram expressos em médias (±erro padrão), NC_{THCNx} = normalização entre $C_{\beta\text{-actina}}/C_{T\text{ HCNx}}$; $\Delta C_T = NC_{THCN1} - NC_{THCNx}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{THCN1} - \Delta C_{THCNx}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$, valor que expressa a expressão relativa do gene.

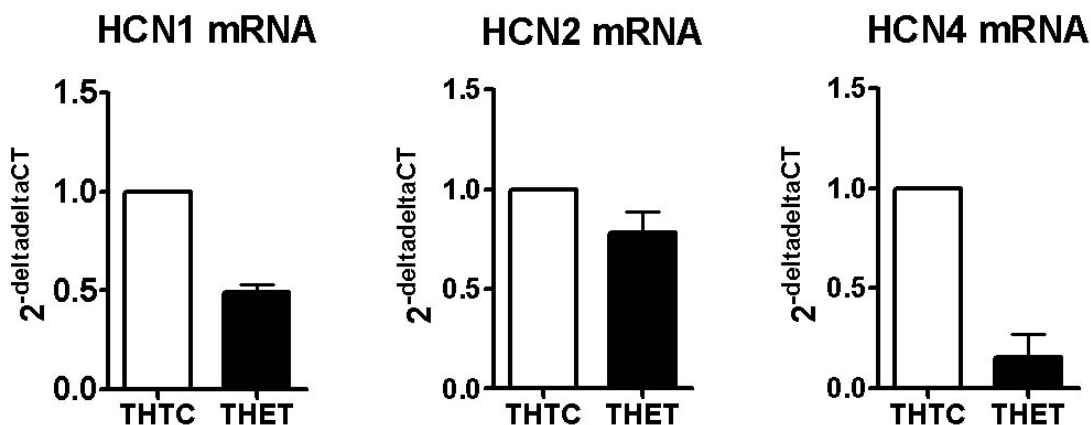


Figura 34- Comparação da expressão relativa dos HCNs do Tecido hipocampal humano de pacientes Submetidos à Cirurgia Para O Tratamento Da Epilepsia Refratária (THET) em relação aos pacientes Submetidos a Lobectomia Temporal por Traumatismo Cranioencefálico (THTC) .

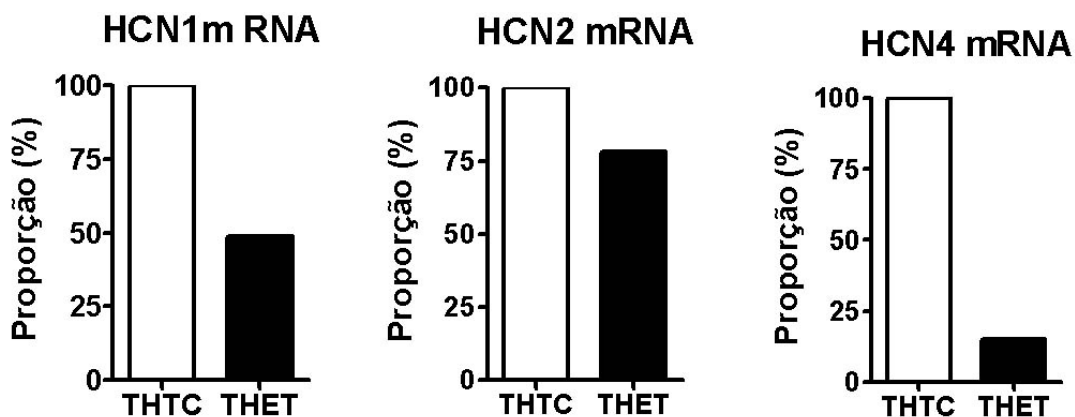


Figura 35- Comparação da expressão dos genes HCNs no tecido hipocampal humano de pacientes submetidos à cirurgia para o tratamento da epilepsia refratária (THET) versus Submetidos a Lobectomia Temporal por Traumatismo Cranioencefálico (THTC).

6. DISCUSSÃO:

Mutações em mais de 70 genes, que formam os canais iônicos, tem sido relacionado a doenças humanas como: arritmia, ataxia, dores crônicas, neuropatias e epilepsia (Noebels, 2003; Jentsch *et al.*, 2004; Waxman e Hains, 2006). A partir destas observações, surgiu o conceito de canalopatia como base da disfunção neuronal que culmina em doenças (Noebels, 2003; Waxman e Hains, 2006). Um tema recente e excitante das canalopatias é o estudo dos canais HCN (ou canais ativadas pela hiperpolarização- C_{HCN}), os quais fazem parte de uma família cuja expressão é correlacionada fortemente com a excitabilidade neuronal (Poolos, 2005, Herrmann *et al*, 2007).

Os canais-H são codificados por uma família de 4 genes HCN1-HCN4 da família de canais catiônicos ativados pela hiperpolarização e nucleotídeos cíclicos (do inglês *hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated cation channels*). Estes canais são formados por uma classe de proteínas trans-membrana com seletividade para os íons Na^+ e K^+ . Dentre os diversos canais iônicos, os C_{HCN} são únicos pois possuem função de marcapasso sendo importantes em várias atividades rítmicas. Sendo modulados por segundos mensageiros como AMPc, possuem grande sensibilidade a alterações na atividade neuronal mostrando mudanças na expressão após algum tempo de atividade elétrica anormal (Chen *et al*, 2001, 2002, Poolos, 2005).

Uma característica fundamental da corrente iônica produzida por estes canais, I_H , é que ela é ativada lentamente em resposta a hiperpolarização ou despolarização da membrana. Elas permanecem ativas por períodos mais longos, regulando as propriedades elétricas neuronais como potencial de membrana e resistência de

entrada. Além disso, a corrente tende a diminuir tanto os potenciais pós-sinápticos excitatórios quanto os inibitórios (Chen *et al*, 2003).

Assim, os C_{HCN} e a sua respectiva corrente, a I_H , são importantes determinantes de como a excitabilidade neuronal pode ser modificada, influenciando como os impulsos de entrada sináptica podem ser transformados até as saídas axonais (Zhang e Linden, 2003).

Os C_{HCNs} pertencem às poucas famílias de canais conhecidas por serem profundamente alteradas no nível transcripcional em resposta a breves períodos de atividade elétrica neuronal anormal. A expressão anormal desses canais pode influenciar na excitabilidade neuronal, como é típico da epilepsia, além disso, têm sido alvo de fármacos antiepilépticos (Losher, 2002, Poolos 2004). Dessa forma, existe o interesse permanente de como estes canais alteram as redes neuronais pós-lesão.

O presente estudo procurou inicialmente traçar o perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos com epilepsia induzida experimentalmente e de indivíduos com epilepsia mesotemporal refratária.. A partir desses achados comparamos a expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos controles e epilépticos (grupos agudo e crônico) e tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia e traumatismo cranioencefálico. Discutiremos nossos achados abordando os três itens abaixo:

- 1- Alteração na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina e em tecido humano .
- 2- Modificações plásticas da expressão gênica relacionada aos HCNs e excitabilidade neuronal.
- 3- Padrão de expressão relacionada ao Darwinismo neural.

6.1. Perfil de expressão dos genes HCNs em diferentes regiões do sistema nervoso central em ratos:

De um modo geral, os 4 transcritos da família HCN foram expressos nas regiões estudadas do sistema nervoso central de ratos, o que não ocorre em todo o sistema nervoso. Por exemplo na retina, havia uma alta expressão do transcrito HCN1 nos fotorreceptores e baixa expressão no interior da camada de células nucleares e nas células ganglionares. Entretanto, tanto HCN2 quanto HCN3 estavam ausentes nos fotorreceptores. Já em relação ao HCN4 não foi detectado nas camadas da retina (Moosmang *et al*, 2001). Os padrões de expressão obtidos foram, de modo geral, consistentes com resultados encontrados em outros roedores (Santoro e Tibbs, 1999, Moosmang *et al*, 1999, Notomi e Shigemoto, 2004). Em ratos controles (RC) observamos que no hipocampo (CA1, CA2, Subiculum), neocórtex e cerebelo o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa que os demais. Em outras áreas, como músculo, pulmão ou músculo esquelético HCN1 e HCN4 encontravam-se reduzida (Santoro e Tibbs, 1999). Dependendo da área estudada houve alternância de expressão para o segundo gene que mais se expressou.

No hipocampo dos animais controles, (CA1, CA2 e Subiculum) estudados aqui, o gene HCN2 foi o segundo transcrito que mais se expressou atrás de HCN1, já no neocórtex, HCN2 e HCN3 não diferiram e no cerebelo; HCN2 e HCN4 não diferiram, expressando da mesma forma. Quanto aos níveis de expressão dos genes HCN3 e HCN4, no hipocampo, foram muito abaixo do que HCN1 e HCN2.

A expressão de HCN3 e 4 no hipocampo foram inexpressivas, abaixo de 20 % no hipocampo. A predominância de um determinado tipo de HCN varia com a localização, com HCN1 e HCN2 mais prevalentes no córtex e hipocampo. Devido a propriedades biofísicas dos subtipos dos HCNs a distribuição varia (HCN1 apresenta uma cinética mais rápida e menor modulação do AMPc do que HCN2 ou 4). A localização do canal H no próprio neurônio pode também influenciar no comportamento da I_H (Poolos 2004). A distribuição e a proporção das subunidades suportam a idéia de que estes canais não só contribuem para a modulação do potencial de membrana ou resposta neuronal, mas também para a ritimicidade oscilatória do circuito neuronal (Pape, 1996).

6.1.1. Expressão dos HCNs na formação hipocampal em ratos :

Nas regiões de CA1, CA2 e subíulum de ratos controles verificamos que o gene HCN1 apresentou maior expressão relativa que os demais, seguido por HCN2 e HCN3 e 4 tiveram baixa expressão. No grupo pilocarpina agudo (RTPA) houve um ligeiro aumento de HCN2 e desta forma HCN1 e HCN2 se expressaram de maneira igual em CA1 enquanto para os demais HCNs o percentual de expressão foi similar ao percentual de expressão relativa dos animais controles. O aumento de HCN2 será abordado no item 6.2.2. O padrão de expressão dos HCNs das regiões de CA2 e subíulum foi similar aos RC. O padrão de expressão dos HCNs das regiões de CA1, CA2 e subíulum nos ratos tratados com pilocarpina- crônico (RTPC) foi similar aos RC. O padrão observado nos grupos, excetuando-se HCN2 em RTPA, seguiu a

mesma distribuição da expressão de ratos (Santoro e Tibbs, 1999, Notomi e Shigemoto, 2004). Em CA2 de camundongos, HCN1 foi inexpressivo quando comparado com HCN2 utilizando técnicas de hibridização *in vitro* (Moosmang *et al*, 1999). Entretanto a diferença dos níveis de HCN1 na região de CA2 pode ser consequência de diferentes metodologias empregadas ou diferença entre espécies (ratos versus camundongos). Segundo Notomi e Shigemoto (2004) utilizando técnicas de imunoblotting e imuno-histoquímica determinaram que HCN1 e HCN2 se expressavam mais nos dendritos apicais dos neurônios piramidais mas não nos espinhos dendríticos. Além disso, no mesmo estudo foi determinado que no *stratum lacunosum-moleculare* encontrava-se a maior concentração de HCN1 e HCN2 do que o *stratum pyramidale, oriens* ou *radiatum*. Neste foi verificado a menor concentração de HCN1 e 2 e inexistência de HCN3 e 4. Outros estudos relatam marcação intensa para HCN1, em CA1, tanto no soma neuronal, quanto dendritos e esta marcação caía drasticamente em animais com o córtex entorrinal lesionado (Brauer *et al*, 2001). No presente estudo, a técnica utilizada não permitiu discriminar a sublocalização neuronal da expressão do HCN. Entretanto, os relatos sobre esta distribuição apresentados por Notomi e Shigemoto (2004) respaldam as observações de eventuais modificações na expressão do HCN em função da perda ou reorganização neuronal.

6.1.2. Expressão dos HCNs no neocórtex de ratos :

No neocórtex de ratos controles (RC), verificamos que entre HCN1 versus HCN2; HCN1 versus HCN3 não apresentaram diferenças estatísticas quanto a sua

expressão. No neocórtex, embora o gene HCN1 tenha apresentado maior expressão relativa as expressões de HCN2 e HCN3 estiveram próximas. Nos ratos epilépticos (RTPA e RTPC), a expressão relativa de HCN1 também não diferiu da expressão de HCN2. A literatura tem mostrado através de outras técnicas (técnicas de imunoblotting, imunohistoquímica ou hibridização in vitro) que nesta área existem altas concentrações de HCN1 e HCN2, (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999, Notomi e Shigemoto,2004), mas não de HCN3 que no nosso estudo apresentou forte expressão nos RC (>80%) em relação à HCN1. Entretanto a discrepância de resultados pode ser consequência de diversos fatores como as diferentes metodologias empregadas, idade e espécies de animais, como camundongos (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999) e porquinho-da-india (Notomi e Shigemoto,2004) que poderiam interferir na expressão dos HCNs. Segundo Notomi e Shigemoto (2004) utilizando técnicas de imunoblotting e imunohistoquímica determinaram HCN1 e HCN2 se expressavam, igualmente, intensamente nas camadas superficiais do córtex, camada I, especificamente nos dendritos distais. Técnicas de microscopia eletrônica revelaram partículas de HCN1 e HCN2 estavam difusas na membrana plasmática dos neurônios piramidais (Lorincz *et al*, 2002).

6.1.3. Expressão dos HCNs no Cerebelo:

No cerebelo de RC, verificamos que somente a combinação comparativa da expressão relativa de HCN2 *versus* HCN4 não foi estatisticamente significativa. O gene HCN1 foi o que apresentou maior porcentagem de expressão relativa e o gene HCN3 apresentou baixa expressão. Nos grupos de ratos tratados com pilocarpina

(RTPA e RTPC) a expressão de HCN2 foi similar ao HCN1. Moosmang et al, (1999), Santoro e Tibbs, (1999), Notomi e Shigemoto, (2004) demonstraram que HCN1 era o que mais se expressava seguido por HCN2, já os genes HCN3 e 4 se expressavam fracamente no cerebelo em animais sem qualquer tipo de neuropatia. Nossos resultados, ao contrario, revelaram que HCN4 se expressa de moderadamente a alto (>70%) nos animais controles, RTPA e RTPC. Esta questão pode ser interpretada , assim como para as outras áreas, pela diferença de metodologias e espécies diferentes.

Na camada de Purkinje, estudos mostraram intensa marcação para HCN1 através de técnicas de imunohistoquímica e a microscopia eletrônica revelou que a expressão elevada de HCN1 estava localizada na membrana celular dos axônios das células em cesto e raramente na porção terminal (Notomi e Shigemoto,2004). Em neurônios, o HCN1 estaria localizado nos terminais perisomáticos (Kwon e Kin, 2007). As células HCN2 positivas foram observadas na camada granular. HCN3 só foi observado no flocculo cerebelar (Notomi e Shigemoto,2004). Essa restrição de HCN3 a uma determinada região do cerebelo poderia explicar a baixa expressão relativa observada em nosso estudo.

6.2. Estudo comparativo da expressão dos genes HCNs em ratos - ratos controles versus epiléticos:

6.2.1. Expressão dos HCNs no Hipocampo de ratos:

Em nosso estudo comparamos a expressão de HCN1 dos grupos RTPA e RTPC em relação ao HCN1 controle e verificamos que na região no hipocampo (CA1, CA2 e subiculum) houve uma redução significativa dos níveis de HCN1, principalmente no grupo com epilepsia crônica. Os resultados de Powel *et al* (2008) mostraram redução nos níveis de HCN1 e HCN2 no modelo do ácido caínico comparado com os controles na região de CA1. A expressão de HCN1 estava reduzida em dois momentos mensurados, 7 dias e 6 semanas após a indução do SE, sendo estatisticamente significativas. Estes dados podem ser considerados equivalendo aos períodos agudo e crônicos. Em nosso estudo a redução dos níveis de HCN1 foi mais perceptível comparando o período crônico do modelo da pilocarpina, o que sugere que a redução de HCN1 esteve associada ao aparecimento das crises espontâneas recorrentes que acompanham a fase crônica (ver item 6.2.4).

Powel *et al* (2008) observaram que em outras áreas do hipocampo como CA3, também mostraram redução nos níveis de HCN1 e HCN2 em momentos isolados nos modelos estudados comparado com os controles na região de CA3. A expressão de HCN1 nesta região, foi significativamente reduzida 7 dias após a indução do *status epilepticus* (SE) no modelo do ácido caínico. No giro denteado dos animais com SE induzido pelo cainato foi observado redução significativa nos níveis

de HCN1 aos 7 dias mas não as 24 horas ou 6 semanas. No modelo do *kindling* não houve alteração dos níveis de HCN1 em nenhuma área da formação hipocampal (Powel *et al*, 2008). Em animais com lesão no córtex entorrinal também foi observado redução dos níveis de HCN1, mas não HCN2, 3 ou 4 (Brauer *et al*, 2001).

Em CA1 verificamos redução dos níveis de expressão relativa de HCN2 no grupo crônico, mas não no grupo agudo. No estudo realizado por Powel (2008). A expressão de HCN2 estava reduzida tanto no período agudo quanto crônico após a indução do SE, sendo estatisticamente significativas no modelo do ácido caínico. No modelo do *kindling* não foram detectadas diferenças nos níveis de HCN2 em CA1 e GD, somente em CA3 (Powel *et al*, 2008).

6.2.2. Expressão dos HCNs no Neocórtex :

Comparando a expressão relativa dos transcritos em relação aos seus HCNs controles no neocórtex, verificamos diferenças significativas nos níveis de expressão entre o HCN1 de ratos controles e epiléticos (agudo e crônico). Podemos supor que nestes animais ocorra alteração da localização destes genes nos neurônios. Normalmente, os genes HCN1 e HCN2 encontram-se colocalizados nos dendritos distais (Notomi e Shigemoto, 2004) e considerando a alteração dos níveis de expressão como expressão da própria canalopatia (Richichi *et al*, 2008) não se surpreende que as nossas observações revelem que nos nossos animais possam estar alterados os locais de expressão desses transcritos. Esta condição de alteração não estaria restrita ao néocortex, mas em todas as áreas epileptogênicas.

6.2.3. Expressão dos HCNs no Cerebelo:

No cerebelo, a redução na expressão de HCN1 foi da ordem de 23% no RTPA e 54% no RTPC. Quanto ao HCN2 houve um aumento da expressão no RTPA, 30%, seguido por uma redução de 13%. O comportamento de redução progressiva de HCN1 de RC , RTPA e RTPC e aumento súbito e queda de HCN2 em relação aos grupos estudados é similar ao observado na região de CA1 hipocampal. Uma hipótese para a similaridade do comportamento de HCN1 observações seja devido ao insulto inicial provocado pela injeção de pilocarpina que provoque alterações no hipocampo mas que se refletem no cerebelo. Outra possibilidade, independente de qualquer lesão inicial, esteja relacionada à relação existente entre o hipocampo e o cerebelo. A relação cerebelo/hipocampo é conhecida desde a década de 50 do século 20, quando através de estimulações no cerebelo pesquisadores demonstraram haver efeito inibitório, suprimindo as crises límbicas induzidas (Iwatar e Snider, 1959). Nestes estudos, foram investigados a influência do cerebelo no hipocampo de gatos, com crises induzidas pela aplicação da solução de cloreto de cobalto hexahidratado diretamente no hipocampo, Babb e colaboradores, (1974) verificaram a atuação de diversas vias cerebelares (vermis, fastigial, núcleos reticulares gigantocelulares) que poderiam ser interpretadas como inibitórias da atividade eletrencefalográfica desses animais.

Em contrapartida, Newman e Reza (1979) estudaram a posição e a extensão da influência hipocampal no cerebelo de gatos, onde a área estimulada foi o hipocampo. Neste estudo o objetivo foi traçar a presença ou a ausência de uma resposta no local estimulado, Com isto, os autores verificaram que o hipocampo influenciava, aumentando as descargas cerebelares, principalmente no lóbulo VI do

lobo posterior do cerebelo. O aumento da intensidade do estímulo aumentou o número de espículas em cada descarga.

Os resultados de Newman e Reza (1979) ainda indicaram a existência das projeções descendentes bilaterais contendo componentes rápidos e lentos em conformidade com as propriedades conhecidas da condução da fibra musgosa e de entrada das trepadoras. Quanto ao significado e possível mecanismo dessas alterações será abordado a seguir no item 6.2.4.

6.2.4. Alteração na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina em relação aos seus controles- regulação na expressão de HCN1 e HCN2 diferencialmente na epilepsia aguda:

Curiosamente, no que diz respeito à expressão do gene HCN2 em CA1 e cerebelo, foi observado um aumento de 40% na expressão relativa em RTPA seguido por uma queda brusca no grupo RTPC. Estes dados contrastam com estudos realizados com outros modelos experimentais os quais, mostraram redução nos níveis de HCN2 no modelo do caínico e estabilidade no modelo do *kindling* (Powel et al 2008) após a indução do SE. Apesar de serem modelos de ELT, estes exibem diferenças importantes incluindo a presença de perda celular, período latente, presença de crises espontâneas recorrentes (CER). O modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, como o do ácido caínico, é um modelo de epilepsia verdadeiro, onde após um período latente o animal apresenta CER.

Adicionalmente, o modelo da pilocarpina, apresenta uma perda celular seletiva em diferentes graus, similar às observadas na ELT humana (Brandt, 2003). Em contraste com o modelo do *kindling*, que é um modelo controverso que apresenta uma perda celular mínima (Morimoto, 2004), exceto no *overkindling* (>300 estimulações) (Sutula, 2004). O modelo do *kindling* representa os 30 % dos pacientes com ELT que não apresentam esclerose hipocampal, além disso, os animais não apresentam CER.

Tanto o modelo da pilocarpina, quanto o *kindling* induzem a alterações permanentes na excitabilidade. Segundo Powel *et al*, (2008) os pontos em comum entre os modelos experimentais, aumenta a confiança de que estas alterações são antes de tudo mais prováveis a serem específicas para o epileptogênese límbica do que aquelas associadas com os métodos utilizados.

Entretanto, as alterações nos níveis dos HCNs são maiores do que poderia ser explicada exclusivamente pela morte celular. Por exemplo, a diminuição da expressão de HCN1 mRNA de 76%, no estudo de Powel *et al* (2008), foi mostrada na região CA1 aos 7 dias após a indução do SE pelo ácido caínico quando o grau de perda neuronal era de 40% .Em alguns casos a perda neuronal poderia esclarecer a diminuição observada no HCN mRNA observado (por exemplo, redução de 25% de HCN2 mRNA em CA1 após aos 7 dias do insulto com ácido caínico). Entretanto, é importante notar que por causa da expressão ribossomal do gene constitutivo (RNAm 18S) que igualmente diminuirá quando os neurônios morrerem, a perda neuronal não pode ser usada para estimar diretamente uma redução do mRNA do HCN (isto é, a perda celular de 40% conduzirá a redução de 40% nas medidas do qPCR da expressão do mRNA do HCN). Powel *et al* (2008) igualmente demonstraram uma redução em HCN1 e de HCN2 mRNA, nos animais com

epilepsia induzida pelo ácido caínico, em CA3 e células granulares do DG onde a perda celular foi menor. Esses dados suportam a idéia da redução dos níveis de RNAm HCN ocorrerem em ambos modelos experimentais além da perda neuronal..

Recentemente foi relatado que a indução de crises de 20 minutos e 3 horas são o suficiente para determinar redução tanto da expressão de RNAm de HCN1 quanto da proteína. e um aumento da expressão de HCN2, sem alteração dos níveis de proteína. As alterações dos níveis de HCN1 e HCN2 são detectáveis por 48 horas (Brewster e outros, 2002, 2005). Estudos *in vitro*, utilizando culturas organotípicas expostas ao ácido caínico também provocaram a redução dos níveis de mRNA de HCN1, acompanhada por redução nos níveis de proteína, e um aumento de HCN2 tanto em CA1 quanto CA3 e a regulação transcripcional persistiu por pelo menos 1 semana. A atividade de ictal-símile induzida, em estudos *in vitro*, provoca redução dos níveis desses transcritos similares aos eventos de crise que ocorrem no modelo do ácido caínico e hipertermia. (Richichi *et al*, 2008).

A redução na expressão de HCN1 após a atividade ictal-símile produzida em estudos *in vitro* com culturas organotípicas expostas ao ácido caínico é dependente da ativação da proteína CaM quinase II. O mecanismo de redução envolve aumento da permeabilidade de Cálcio pelo receptor AMPA (corrente de cálcio mediada pelo receptor AMPA) . (Richichi *et al*, 2008). Os dados de Richichi e colaboradores (2008) demonstraram que a canalopatia transcripcional envolvendo os HCNs podem contribuir para certos tipos de epilepsia.

A dúvida permanece, quanto ao que provoca aumento de HCN2 nos animais com epilepsia aguda, onde tivemos um aumento do transcrito em quase 50% em relação ao HCN2 controle. Este mecanismo poderia ser uma tentativa celular de

restabelecer a funcionalidade do tecido após o insulto inicial provocado pelo SE induzido pela pilocarpina determinando *downregulation* da atividade neuronal.

6.2.5. Alteração na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina em relação aos seus controles - Diminuição de HCNs na epilepsia crônica:

Verificamos alterações na expressão relativa dos genes HCNs nos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina no hipocampo (CA1, CA2 e Subiculum), neocórtex e cerebelo desses animais. O modelo de epilepsia utilizado neste estudo apresenta aspectos patofisiológicos importantes da qual se aproxima da epilepsia humana, entre eles o aparecimento de crises espontâneas recorrentes. Embora o objetivo do nosso estudo não tenha sido estudar as crises recorrentes é inegável que a presença desta possa influenciar de alguma forma as alterações na expressão dos HCNs, onde o gene HCN1 parece ser o mais sensível.

Estudos recentes tem demonstrado alteração da expressão dos C_{HCNs} ou de suas propriedades biofísicas após o SE nos modelos animais durante o período agudo (Shah *et al*, 2004; Sánchez *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006), e crônicos após o estabelecimento das crises epilépticas recorrentes (CR) (SU *et al*, 2002; Ellerkmann *et al*, 2003; Bernard *et al*, 2004). Estes relatos forneceram evidências importantes de que a deficiência nos canais iônicos ocorre nos modelos de epilepsia adquiridas. Entretanto ainda é obscuro a correlação das alterações dos canais com o

aparecimento das CR. Isto se deve a diferentes critérios metodológicos empregados ou a falta de utilização de determinados recursos técnicos que impossibilitaram a visualização de alterações sutis. A compreensão dessa correlação é de suma importância para verificar o ponto onde a canalopatia é causa e onde passa a ser efeito das crises.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram evidenciar redução na expressão de HCN1, principalmente no hipocampo. Neste sentido, Jung *et al* (2007) investigaram as propriedades dos canais HCN em neurônios hipocámpais com técnicas eletrofisiológicas e bioquímicas em conjunto com o monitoramento do vídeo EEG e os resultados mostraram *downregulated* dos C_{HCNs} substancialmente nos dendritos na fase aguda e crônica após o SE induzida por pilocarpina. Além disso, evidenciaram dois mecanismos separados da *downregulation* dos C_{HCN} : um dependente e outro independente das crises recorrentes.

A redução de HCN1 observada em nosso estudo utilizando um modelo experimental de ELT pode ter um importante papel na definição da excitabilidade neuronal. Relatos na literatura corroboram esta idéia de redução do HCN e aumento da excitabilidade. (Magee, 1999; Poolos *et al*, 2002, 2006, Jung *et al*, 2007). Um exemplo disto, foi observado que em camundongos *knock-out* do canal -HCN2 apresentam epilepsia generalizada (Ludwig, 2003) e FAEs efetivos para crises epilépticas focais e generalizadas atuam aumentando a resposta de I_H entre outras ações (Poolos, 2002). Assim, a redução do C_{HCN} após o SE induzido por pilocarpina contribui para o fenótipo da epilepsia contribuindo para excitabilidade no hipocampo e neocórtex.

Os mecanismos que envolvem a redução da expressão do C_{HCN} , foram pouco explorados. Entretanto, estudos realizados por Brewster *et al* (2002) mostraram

redução nos níveis mRNA de HCN1 uma semana após SE sugerindo uma possível base transcripcional .

A redução na expressão dos HCN1 e 2 observada em nosso estudo no modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina (grupo crônico) é provavelmente devido a uma mudança transcriptional relativa durante processo de epileptogênese. Neste sentido, diversos estudos mostraram uma concordância quanto a alterações nos níveis de mRNA HCN e da proteína nos modelos de epilepsia e crises de ausência (Budde et al, 2005) e durante o desenvolvimento (Surges et al, 2006). No modelo de ELT induzida por pilocarpina, os níveis de I_H e dos canais-H estão reduzidos no hipocampo em diferentes fases temporais do processo da epileptogênese e a provável causa são as mudanças transcriptionais (Jung e outros, 2007). Powel *et al* (2008) especularam que mudanças nos níveis do mRNA HCN refletem na proteína e conseqüentemente na função da I_H . Powel *et al* (2008) identificou, durante estudos eletrofisiológicos, que a corrente I_H encontrava-se diminuída nos neurônios piramidais de CA3 de animais submetidos ao *kindling*. No modelo do ácido cainico, há redução nos níveis HCN1 e HCN2 estão reduzidos significativamente na região CA1. Como HCN1 e HCN2 estão co-expressos nos neurônios piramidais de CA1, está previsto redução da I_H neste modelo. Embora as diferentes regiões hipocâmpais possam estar envolvidas na epileptogênese, a redução de I_H é provável em ambos os modelos de TLE (Powel *et al*, 2008) .

Existem evidências que suportam um papel “mecanicista” na redução da I_H nos dendritos aumentando a excitabilidade celular dentro dos diversos modelos da epilepsia. Isto pode ser ocasionado pelo aumento na resistência de entrada da membrana resultando no aumento da somação temporal disparando potenciais de ação de forma anormal (Poolos *et al*, 2002; Shah *et al*, 2004) ou pode ser

ocasionado pelo aumento do número de potenciais de ação como o observado experimentalmente em resposta à injeção de corrente durante o estudo eletrofisiológico (Jung *et al.*, 2007).

Nos modelos genéticos de epilepsia com crises de ausência em ratos, existem relatos da perda dos canais HCN2 mediados pelo AMPc que são mais sensíveis do que HCN1 sendo responsabilizados pelas descargas em salva sustentadas durante a crise (Budde *et al.*, 2005; Kuisle *et al.*, 2006). Um aspecto interessante é a propensão aos potenciais de ação em salva em fenótipos associados às CER em neurônios piramidais de CA1 adulto (Sanabria *et al.*, 2001, Sue *et al.*, 2002). A redução de HCN2 pode contribuir para o aumento da excitabilidade e isto têm sido proposto aos canais HCN heteroméricos (HCN1:HCN2) (Ulens & Tytgat, 2001; Brewster *et al.*, 2005).

Em nosso estudo evidenciamos redução principalmente nas taxas de mRNA HCN1 e HCN2 no modelo da pilocarpina e que poderiam contribuir para a excitabilidade.

6.3. Perfil de expressão dos genes HCNs no tecido cortical e hipocampal humano:

Uma série de dificuldades precisa ser transposta quando se trabalha com tecido humano, envolvendo fatores éticos e técnicos como qualidade do material obtido e principalmente grupo controle. Na questão do grupo controle, alguns autores sugerem que existam neurônios saudáveis na porção cerebral removida e

que estes seriam os controles (Schwartzkroin, 1994, Schwartzkroin et al., 1983, Tasker et al., 1996) e outros se satisfazem com a utilização de modelos experimentais (Kohling e Avoli, 2006). No nosso caso tentaremos fazer correlação com os escassos trabalhos realizados com tecido humano associado com os relatos existentes com modelos animais.

Nos poucos estudos realizados em tecido humano, as amostras foram obtidas principalmente de autopsias (Bender *et al*, 2003) e de clonagem de cDNA humano (Stieber *et al*, 2005) Chamamos a atenção para a relevância de nossos resultados uma vez que ao contrário de outros estudos, utilizamos aqui a expressão relativa dos HCNs em amostras teciduais obtidas diretamente no bloco cirúrgico .

6.3.1. Expressão dos HCNs no Hipocampo :

Tanto o tecido hipocampal de pacientes com traumatismo cranioencefálico (THTC) que não apresentava atrofia ou mesmo esclerose hipocampal quanto o tecido hipocampal de pacientes com epilepsia do lobo temporal (THET), com atrofia e esclerose hipocampal, expressaram as 4 subunidades dos genes HCN1-4. O gene que mais se expressou no hipocampo desses pacientes foi o HCN1 seguido por HCN2, HCN4 e HCN3.

Estudos realizados utilizando técnicas de hibridização *in situ* com hipocampus obtidos de autópsias mostraram que HCN1 se expressavam intensamente em CA1 e no hilo. Já nas células granulares a expressão era menor. Os níveis de mRNA HCN1 em hipocampus de pacientes com epilepsia, mas sem esclerose, também semelhantes às amostras de autópsias, o mRNA HCN1 estava expresso em todos

os subcampos de CA1 e a análise quantitativa indicou que a expressão de mRNA em CA1 e camada granular do GD não diferiram do material de autópsia (Bender *et al*, 2003). Como no material de autópsia a expressão de mRNA HCN1 foi robusta e abundante nos neurônios hilares. A alta expressão do transcrito, observada em nosso estudo, também foi similar a encontrada para CA1 de roedores (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999, Bender *et al*, 2001).

Nossos dados mostram que o transcrito HCN2 se expressa moderadamente em relação a HCN1 nos hipocampos de pacientes THTC e THET. Da mesma forma que HCN1 estes dados foram compatíveis com estudos em tecidos hipocampais obtidos de autópsia (Bender *et al*, 2003).

O transcrito HCN4 se expressou fracamente, tanto no hipocampo THTC quanto THET. A baixa expressão do HCN4 foi semelhante as nossas observações de hipocampos (CA1, CA2, Subículum) de ratos neste estudo e semelhantes aos relatos de hipocampos de roedores (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999, Notomi e Shigemoto, 2004).

O transcrito HCN3 se expressou ainda mais fracamente que HCN4, tanto no hipocampo THTC quanto THET. Esta expressão foi semelhante as nossas observações de hipocampos (CA1, CA2, Subículum) de ratos controles e tratados com pilocarpina deste estudo e semelhantes aos relatos de hipocampos de roedores (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999, Notomi e Shigemoto, 2004).

Em um dos poucos estudos realizados com HCN3 humanos relatavam peculiaridades dos canais-HCN3. No estudo de Stieber *et al* (2005), o cDNA do HCN3 humano foi clonado de todo o sistema nervoso central humano e analisado pela técnica de *dot blot*. Neste estudo ficou evidenciado que o HCN3 se expressa fracamente na maioria das áreas exceto no cerebelo e tálamo. No cerebelo, HCN3

se expressa robustamente e no tálamo mais moderadamente. O canal HCN3 difere dos demais por não serem dependentes da modulação do AMPc intracelular. Os canais HCNs normalmente apresentam um domínio ligado ao nucleotídeo cíclico localizado no C- terminal. O C-terminal inibe a ativação do canal por um mecanismo ainda desconhecido de interação com a região central. A comparação da seqüência dos seguimentos transmembranas revelou que existe >80% de homologia na região do poro e nos domínios ligados aos nucleotídeos cíclicos dos canais HCN3 com os outros HCNs (Stieber *et al*, 2005).

6.3.2. Expressão dos HCNs no neocórtex :

Nas amostras de neocórtex de THTC , o gene HCN1 foi o que apresentou maior expressão relativa seguido por, HCN2 com 82% e HCN4 com 47%. O gene HCN3 representou a menor expressão relativa 21%. No caso do neocórtex humano a distribuição das expressões relativas dos HCNs se aproxima muito dos relatos em roedores (Moosmang *et al*, 1999, Santoro e Tibbs, 1999, Notomi e Shigemoto,2004).

6.4. Estudo comparativo da distribuição dos genes hcns hipocampal humano (THTC versus THET):

No hipocampo humano, verificamos diferença significativa quanto a expressão relativa de HCN1 e HCN4, mas não HCN2, em relação aos seus

respectivos controles, entre tecido hipocampal humano de pacientes THTC versus THET. A expressão relativa de HCN1 e HCN4 estavam reduzidas quando comparadas com os seus respectivos controles.

Em nosso estudo o grupo THET apresentou uma redução de quase 60% de HCN1 em relação ao THTC. Em hipocampos com esclerose (EH) já havia sido relatado alteração dos níveis de expressão de HCN1 tanto na forma de mRNA quanto na proteína nos hipocampos (Bender *et al*, 2003). Na camada piramidal de CA1, onde a perda celular é mais proeminente, os níveis de mRNA foram mais baixos, a perda só não foi maior por que há uma certa preservação dos interneurônios que sobreviveram (Babb *et al*, 1989). Na região do GD há uma robusta expressão dos HCN1, devido ao brotamento (*sprouting*) anormal da camada granular com redução visível da densidade celular (Bender *et al*, 2003).. Finalmente, no hipocampo humano com a patologia característica de EH era quase desprovido de mRNA HCN1 expresso nos neurônios hilares refletindo a perda celular nesta área (Bender *et al*, 2003).

A análise quantitativa do grupo EH revelou duas vias de integridade da camada granular e de expressão de mRNA HCN1. Quando há preservação relativa destas células (EH moderada) o de mRNA HCN1 se expressa de fraco-moderadamente. Quando a densidade neuronal é reduzida para menos que 50% da autópsia ocorre uma *upregulation* de mRNA HCN1 na camada granular.

A modificação dos níveis de mRNA HCN1 é acompanhado pelo aumento do sinal da proteína. Estes resultados sugerem que a perda celular severa no GD pode ser a causa do mecanismo do aumento do de mRNA HCN1. Entretanto não é o que acontece em CA1. O aumento de HCN1 no giro denteado também foi observado no modelo da pilocarpina.

No presente trabalho, a redução HCN2 não foi significativa entre THTC versus THET. Bender et al (2003) verificou que na camada granular não houve alteração dos níveis de mRNA HCN2 no tecido com esclerose hipocampal (EH) severa comparada com a EH moderada e sem EH, contudo houve um aumento significativo de 80% por célula na expressão de mRNA HCN2. No mesmo estudo, Bender et al (2003) observaram ratos epiléticos os níveis de mRNA HCN2 estavam reduzidos, assim como nossas observações em CA1, CA2 e subículum, nos animais com epilepsia crônica. Entretanto, Bender *et al* (2003), não evidenciaram redução na expressão em células individuais. Esses dados indicam que no hipocampo ocorrem mudanças modestas no mRNA HCN2 em face da perda neuronal, comparada com a *downregulation* nos níveis de mRNA HCN1. Este estudo mostrou que tanto HCN1-4 estão expressos no hipocampo humano e que mRNA HCN1 diminuído em hipocampus THET. Além disso, também foi observado diminuição de mRNA HCN1 no modelo de epilepsia crônica e um aumento de HCN2 em animais tratados com pilocarpina na fase crônica (Bender *et al* 2003).

Brewster et al (2002) demonstraram que as crises induzidas em fases precoces da vida modulam a expressão dos genes HCN. Além disso, em CA1, mesmo expressando as múltiplas isoformas de HCN, existe uma redução de mRNA HCN1 e um aumento de mRNA HCN2 (Brewster *et al* 2002). Essa mudança ocorre na presença de um aumento do input inibitório nesta região (Chen *et al*, 2001). No modelo de crises em fases precoces não há perda celular (Bender *et al*, 2003) e desta forma pode-se especular que as mudanças observadas nos níveis de mRNA HCN1 possa ocorrer ao aumento do *input* hiperpolarizante e conseqüente ativação desse canal.

Deve ser notado que a redução de mRNA HCN1 e em modelos de animais com cérebros imaturos é concorrente com o aumento de expressão de mRNA HCN2, acompanhada pela cinética lenta e mudanças na curva de ativação voltagem-dependente da IH na direção despolarizante (talvez atribuída a alteração celular do AMPc ou sensibilidade do canal) gerando as descargas em salva (Dubé *et al*, 2000, Chen *et al*, 2001, Brewster *et al* 2002). Não obstante, os dados sugerem que ocorra uma desregulação transcripcional em uma ou mais isoformas das subunidades HCNs e que esta condição possa estar envolvida na ELT humana. Além disso, essas alterações podem estar relacionadas à refratariedade. Entretanto, essas alterações, pode ser conseqüência pró-epileptogênica nos hipocampos com esclerose, um mecanismo compensatório ou simplesmente coincidência.

Finalmente, olhando o estágio final da epilepsia refratária humana, não nos permite extrapolar outras causas para a alteração de expressão. Assim, a expressão alterada de HCN1 mRNA pode ser conseqüência da perda de interneurônios, das células musgosas e das células granulares (CGs), gerando alteração do balanço da excitação/inibição das CGs sobreviventes, ou de outras combinações fatores não testados (Swanson *et al*, 1998; Williamson *et al*, 1999). Conseqüentemente, trabalhos adicionais em modelos *in vivo*, *in vitro*, e em modelos computacionais são importantes para decifrar o papel desta "canalopatia transcripcional" na patogênese da epilepsia hipocampal humana.

Os níveis de mRNA HCN1 e HCN2 foram expressos no tecido hipocampal humano, com distribuição similar com as descritas para roedores. A expressão de mRNA HCN1 foi robusta nas células piramidais de CA1 e presumivelmente nos interneurônios no hilo do giro denteado, contudo os níveis na camada granular eram inferiores. Os níveis de mRNA HCN2 eram inferiores na formação hipocampal.

Entretanto, a desregulação na expressão do mRNA HCN ocorrida no tecido hipocampal humano com epilepsia é diferente das mudanças que ocorrem em modelos de roedores com cérebros imaturos de roedores. Assim, no giro denteado, a expressão de HCN1 mRNA estava aumentada nas células granulares individuais em hipocampos com EH com perda celular na camada do giro denteado. Deve se levar em consideração que a perda celular no GD é menor se comparado com CA1 e CA3c(CA4) (Haas *et al*, 2002).

No estudo realizado por Bender (2003), a redução ~50% da densidade das CG do giro denteado foi um limiar aparente para o aumento drástico nos níveis de expressão do HCN1 mRNA. Especulou-se que a mudança nos níveis se deva à perda neuronal, e que esta provoque alterações no *input* inibitório e excitatório nas CG do giro denteado sobreviventes disparando desta forma um processo de neuroplasticidade na expressão de HCN mRNA. Certamente, ambos reduziram a inibição (Williamson, 1999) e aumentaram o *input* excitatório (Isokawa *et al*, 1997). Estes fatos sugerem que no primeiro caso pode ser conseqüência da destruição dos interneurônios no hilo e no segundo, conseqüência do brotamento das fibras musgosas. De acordo com este cenário, face o aumento do *input* hiperpolarizante nas populações interneurônios intactos (como no estudo de crises em fases precoces) (Chen *et al*, 2001; Brewster *et al*, 2002) a expressão de HCN1 mRNA pode declinar. Contrastantemente, a perda dos interneurônios e a redução da inibição perissomática na esclerose hipocampal humana severa, pode talvez aumentar a excitação dendrítica e com isto aumentar a expressão de HCN1 mRNA. Os resultados de Bender *et al*(2003) indicaram que o modelo da pilocarpina corrobora com este cenário. Como em humanos, eles encontraram *upregulation* de

HCN1 mRNA CG sobreviventes. Embora que, comparado com o material humano, a perda nas CG do GD neste modelo animal fosse relativamente modesto.

Entretanto, a perda do GC foi acompanhada pela redução dos neurônios hilares e isto geraria perda da inibição (Kobayashi e Buckmaster, 2003; Sloviter *et al*, 2003) o que poderia ser uma causa determinante para o aumento dos níveis do HCN1 mRNA nas CG.

Adicionalmente a inibição alterada, a excitação aumentada no GD e o brotamento das fibras musgosas contribuíram para a regulação do HCN1 mRNA. Em modelos experimentais umas séries de trabalhos associam o brotamento das fibras musgosas com a hiperexcitabilidade na epilepsia temporal (Isokawa *et al*, 1997). Teleologicamente, o aumento da densidade de HCN1 geraria um aumento da concentração da corrente I_H nos dendritos como “tentativa de proteção” à excitabilidade no soma (Magee, 1998; Poolos *et al*, 2002). Assim, o *upregulation* do HCN1 mRNA acrescida de mudanças morfológicas, fisiológicas e neuroquímicas têm sido relatadas nas CGs da formação hipocampal humana com HS (Isokawa *et al*, 1997; Jeub *et al*, 1999; Mathern *et al*, 1999; Nägerl *et al*, 2000). As mudanças plásticas similares, tais como aumento da expressão da enzima sintetizadora de GABA (glutamato descarboxilase) (Schwarzer e Sperk, 1995), têm sido relatadas nos modelos experimentais de ELT humano.

6.5. Modificações plásticas dos genes HCNs e excitabilidade neuronal:

Em nosso estudo, tanto nos modelos agudos como crônicos de epilepsia demonstraram alteração dos canais HCNs. Através da técnica utilizada neste estudo, verificamos uma redução drástica na expressão de HCN1 e HCN2 em animais com epilepsia induzida por pilocarpina e tecido hipocampal humano de pacientes com epilepsia. Estudos realizados em animais imaturos, mostraram alterações moleculares no HCN provocadas pelas crises (modelo do ácido caínico e hipotermia), produziram uma inversão nos níveis de mRNA de HCN1 e HCN2, levando a um aumento de HCN2 (Chen, 2002; Santoro e Baram, 2003). Nas células granulares do GD de pacientes com epilepsia a expressão de HCN1 (Bender *et al.*, 2003) está aumentada. Surge uma dúvida em relação a este aumento de HCN1, até que ponto o aumento HCN1 mostre que estes transcritos se traduzam em proteínas que por sua vez formem os C_{HCNs} funcionais que desempenhem sua função de controlar a excitabilidade. Neste caso, como o neurônio não consegue manter o potencial de membrana em repouso, pode haver um “descontrole” na síntese de HCN1 gerando unidades defeituosas não-funcionais. Um exemplo de canais-HCN1 não funcionais foi observado na camada V do córtex em animais com crises de ausência onde há perda da função (Kole *et al*, 2007). Outro exemplo, foi identificado em camundongos transgênicos *jans-1*, com predisposição a crises audiogênicas, e que apresentam anormalidades no gene HCN2 e conseqüentemente maior susceptibilidade a crises epilépticas (Shin *et al*, 2006).

O uso do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina promove alterações plásticas a curto e longo prazo nas redes neuronais similares à ELT humana. Estas

alterações modificam comunicações sinápticas ao nível pré e pós-sináptico. Os canais que estudamos são reguladores dos potenciais de membrana e excitabilidade neuronal participando do processo de epileptogênese. Os canais H dos neurônios de CA1 no modelo da pilocarpina sofrem modificações (Sanabria *et al*, 2001), onde a modificação do padrão de descarga neuronal influencia a expressão dos HCNs.

As diferenças de expressão gênica dos transcritos HCNs observados em nosso estudo pode estar relacionado com alterações da corrente I_H . Esta se manifesta nos registros eletrofisiológicos na forma de uma onda que pode ser despolarizante ou hiperpolarizante conhecida como SAG (Poolos, 2002). Estas características foram descritas originalmente por Schwindt *et al* (1988), e posteriormente observada por outros (Silva *et al*, 1991, Yang *et al*, 1996). Em outros estudos eletrofisiológicos foi verificado regionalização da SAG no cérebro, como por exemplo, expressão no córtex entorrinal onde a SAG foi mais freqüente na camada III do que na II (van der Linden e Lopes da Silva, 1998) e em diferentes colunas do córtex somato-sensorial onde a SAG está associada a camada infragranular (Gottlieb e Keller, 1997).

Uma consequência funcional da epilepsia pode estar relacionada à redução das subunidades HCN1 e HCN2 nos animais com epilepsia. O canal HCN1 apresenta cinética de ativação rápida durante a hiperpolarização e responsivo a níveis mínimos de AMPc, já o canal HCN2 apresenta uma cinética lenta e sua modulação depende de níveis elevados de de AMPc (Santoro e Tibbs, 1999). Os canais HCN1, localizados nos terminais pré-sinápticos das células cerebelares, teriam um importante função na plasticidade sináptica (Kwon e Kin, 2007).

Tanto na epilepsia experimental (Tavares *et al*, dados não publicados) quanto no tecido hipocampal humano com esclerose hipocampal (Tavares *et al*, artigo

submetido), os neurônios hipocampais de CA1 apresentaram redução no número de observações da SAG durante os registros eletrofisiológicos. Em neurônios hipocampais de CA1 de ratos controles e tecido hipocampal humano sem esclerose hipocampal a presença de SAG foi maior. Contudo as modificações das subunidades após a alteração na excitabilidade e a influência da I_H nos neurônios sobreviventes em condições patológicas como epilepsia ainda é puramente especulativa (Santoro e Baram, 2003).

6.6. Padrão de expressão de HCNs relacionada ao Darwinismo neuronal:

Nossos achados mostram a alteração do padrão de expressão dos HCNs inicial ao longo do processo epileptogênico, podendo representar um processo de seleção neuronal como o proposto Darwinismo neuronal . A teoria da seleção de grupos neuronais (TSGN) ou darwinismo neural (DN) é uma teoria neurocientífica proposta inicialmente por Gerald Edelman, no final da década de 1970 (Edelman 1988). Ela explica o funcionamento do sistema nervoso central com base em um processo de seleção populacional de grupos neuronais. As principais características compartilhadas entre o DN e a teoria da seleção natural são: repertório variado de elementos em que a fonte de variação dos elementos não está relacionada a eventos subseqüentes, interação com o ambiente e reprodução diferencial e herança de características de variantes.

Na medida em que os padrões de interconexão entre populações neuronais se tornam mais complexos, as informações são correlacionadas e categorizadas na

própria estrutura funcional do SNC. Para explicarmos o salto de níveis inferiores aos níveis superiores de função sináptica temos que ter em conta os conceitos de mapa neural e sinalização reentrante. Os mapas são séries inter-relacionadas de grupos neuronais. A sinalização reentrante refere-se ao mecanismo de ligação entre os grupos neuronais de diferentes mapas com correlação funcional (Edelman, 1987)

No presente estudo foi demonstrado que em algumas circunstâncias uma expressão alterada dos subtipos pode ser uma característica definitiva nestas redes neuronais levando à epilepsia. Os padrões de expressão são determinados não somente pelo tipo de crises, mas também pela localização, tipo celular e maturação do tecido. Talvez o processo de *up-* e *downregulations* e as expressões diferenciadas de subfamílias de HCN sejam decorrentes de um processo seletivo responsável pela “sobrevivência” de neurônios que expressam os mecanismos de controle da excitabilidade e “eliminação” daqueles que perderam a capacidade de auto-regulação da atividade elétrica neuronal. Por outro lado os fenômenos epigenéticos poderiam explicar a expressão seletiva de subfamílias de HCN determinando as modificações na equação gene-ambiente e conseqüentemente no funcionamento de uma rede neural envolvida no controle da excitabilidade.

6.7. Considerações finais:

Os transcritos HCN1 e HCN2 mostraram forte vulnerabilidade quanto a sua expressão durante o processo de epileptogênese tanto na comparação entre controles e modelo experimental de epilepsia (agudo ou crônico), quanto na

comparação entre tecido hipocampal de pacientes sem epilepsia (THTC) quanto com THET. Os mecanismos dessas mudanças de expressão permanecem em aberto, mas tanto a curto ou longo prazo envolvem as modulações sinápticas, mecanismos hormonais entre outros.

Nossos dados reforçam a idéia de que os canais HCN estejam alteradas no nível transcricional em resposta a breves períodos de atividade elétrica neuronal anormal. Como consequência contribuindo para excitabilidade neuronal, como é típico da epilepsia.

7. CONCLUSÕES:

1. Foi demonstrada a expressão das 4 subunidades dos genes HCN1-4 em todas as regiões do sistema nervoso central estudados.
2. Em ratos controles, ratos tratados com pilocarpina (agudo e crônico) o gene HCN1 apresentou maior expressão em relação aos demais subtipos em CA1, CA2 e Subiculum.
3. Nos hipocampos humanos THTC e THET o gene HCN1 apresentou maior expressão relativa aos demais subtipos.
4. No estudo comparativo entre ratos houve redução significativa do transcrito HCN1 de ratos tratados com pilocarpina crônico em relação ao seu controle em todas as áreas do sistema nervoso central estudadas.
5. Aumento da expressão relativa do transcrito HCN2 em CA1 de ratos tratados com piocarpina- Agudo acompanhado por queda na expressão no grupo crônico;
6. No neocórtex de ratos tratados com pilocarpina (RTPA e RTPC) houve redução da expressão do HCN3 .
7. No cerebelo de ratos tratados com pilocarpina (RTPC) houve redução da expressão do HCN4 .
8. No estudo comparativo entre tecido hipocampal humano houve redução significativa do transcrito HCN1 do tecido hipocampal de pacientes com epilepsia em relação ao tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico .

9. No estudo comparativo entre tecido hipocampal humano houve redução significativa do gene HCN4 do tecido hipocampal de pacientes com epilepsia em relação ao tecido hipocampal humano de pacientes com traumatismo cranioencefálico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Affifi, A. K. e R. A. Bergman. **Functional Neuroanatomy: Text and Atlas**. New York: McGraw-Hill. 1998.

Amaral, D. G. e M. P. Witter. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience, v.31, n.3, p.571-91. 1989.

Araújo, D., R. A. Mafra, *et al.* N-Salicyloyltryptamine, a new anticonvulsant drug, acts on voltage-dependent Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ ion channels. Br J Pharmacol. 2003.

Arida, R. M., F. A. Scorza, *et al.* The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. Epilepsy Res, v.34, n.2-3, Apr, p.99-107. 1999.

Avoli, M., M. D'antuono, *et al.* Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. Prog Neurobiol, v.68, n.3, Oct, p.167-207. 2002.

Avoli, M., J. Louvel, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. Prog Neurobiol, v.77, n.3, Oct, p.166-200. 2005.

Babb, T. L., A. G. Mitchell, Jr., *et al.* Fastigiobulbar and dentatohalamic influences on hippocampal cobalt epilepsy in the cat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, v.36, n.2, Feb, p.141-54. 1974.

Babb, T. L., J. K. Pretorius, *et al.* Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. J Neurosci, v.9, n.7, Jul, p.2562-74. 1989.

Beck, H., R. Steffens, *et al.* Voltage-dependent Ca²⁺ currents in epilepsy. Epilepsy Res, v.32, n.1-2, Sep, p.321-32. 1998.

Bender, R. A., A. Brewster, *et al.* Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. Neuroscience, v.106, n.4, p.689-98. 2001.

Bender, R. A., S. V. Soleymani, *et al.* Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. J Neurosci, v.23, n.17, Jul 30, p.6826-36. 2003.

Bernard, C., A. Anderson, *et al.* Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. Science, v.305, n.5683, Jul 23, p.532-5. 2004.

Blumcke, I., W. Zschratler, *et al.* Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. J Comp Neurol, v.414, n.4, Nov 29, p.437-53. 1999.

Boxer, M. Molecular techniques: divide or share. J Clin Pathol, v.53, n.1, Jan, p.19-21. 2000.

Brandt, C., H. Potschka, *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience, v.118, n.3, p.727-40. 2003.

Brauer, A. U., N. E. Savaskan, *et al.* Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. Faseb J, v.15, n.14, Dec, p.2689-701. 2001.

Brewster, A., R. A. Bender, *et al.* Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. J Neurosci, v.22, n.11, Jun 1, p.4591-9. 2002.

Brewster, A. L., J. A. Bernard, *et al.* Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. Neurobiol Dis, v.19, n.1-2, Jun-Jul, p.200-7. 2005.

Brooks-Kayal, A. R., M. D. Shumate, *et al.* Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. Nat Med, v.4, n.10, Oct, p.1166-72. 1998.

Buckmaster, P. S., G. F. Zhang, *et al.* Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. J Neurosci, v.22, n.15, Aug 1, p.6650-8. 2002.

Budde, T., L. Caputi, *et al.* Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. J Neurosci, v.25, n.43, Oct 26, p.9871-82. 2005.

Bustin, S. A. e R. Mueller. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clin Sci (Lond), v.109, n.4, Oct, p.365-79. 2005.

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

Cavalheiro, E. A., N. F. Santos, *et al.* The pilocarpine model of epilepsy in mice. Epilepsia, v.37, n.10, Oct, p.1015-9. 1996.

Chang, B. S. e D. H. Lowenstein. Epilepsy. N Engl J Med, v.349, n.13, Sep 25, p.1257-66. 2003.

Chen, K., I. Aradi, *et al.* H-channels in epilepsy: new targets for seizure control? Trends Pharmacol Sci, v.23, n.12, Dec, p.552-7. 2002.

Chen, V. Channelopathy linked to epilepsy and paroxysmal dyskinesia. Lancet Neurol, v.4, n.8, Aug, p.462. 2005.

Cohen, I., V. Navarro, *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? Biol Cell, v.95, n.6, Sep, p.329-33. 2003.

Deckers, C. L., P. Genton, *et al.* Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. Epilepsy Res, v.53, n.1-2, Feb, p.1-17. 2003.

Decleves, X., A. Regina, *et al.* Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. J Neurosci Res, v.60, n.5, Jun 1, p.594-601. 2000.

Dieffembach, C. e G. Dueksler. PCR - Primers. A Laboratory Manual. 1995.

Difrancesco, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annu Rev Physiol, v.55, p.455-72. 1993.

Edelman, G. M. Neural Darwinism: The Theory of Neuronal Group Selection.: Basic Books. NewYork. 1987.

Ellerkmann, R. K., S. Remy, *et al.* Molecular and functional changes in voltage-dependent Na(+) channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. Neuroscience, v.119, n.2, p.323-33. 2003.

Fernandes, J. G. Epidemiologia das crises epilépticas em Porto Alegre: um estudo populacional. Curso de pós-graduação em Medicina., Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Porto Alegre, 1993.

Gastaut, H. Letter: 'Epileptic seizures'. Dev Med Child Neurol, v.15, n.5, Oct, p.688-9. 1973.

Gastaut, H., J. L. Gastaut, *et al.* Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. Epilepsia, v.16, n.3, Sep, p.457-61. 1975.

George, A. L., Jr. Inherited Channelopathies Associated with Epilepsy. Epilepsy Curr, v.4, n.2, Mar, p.65-70. 2004.

Gottlieb, J. P. e A. Keller. Intrinsic circuitry and physiological properties of pyramidal neurons in rat barrel cortex. Exp Brain Res, v.115, n.1, Jun, p.47-60. 1997.

Guerreiro, C. Aspectos Gerais. In: C. G. Guerreiro, M (Ed.). Epilepsia. São Paulo: Lemos, 1996. Aspectos Gerais, p.1-11.

Haas, C. A., Dudeck, O, Kirsch, M., Huszka, C., Kann, G., Pollak, S., Zentner, J., e M. Frotscher. Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. J Neurosci, v.22, p.5797-5802. 2002.

Hammond, C. Subliminal Voltage-Gated Currents of the Somato-Dendritic Membrane. In: C. Hammond (Ed.). Cellular and Molecular Neurobiology. Paris: Academic Press, 2000. Subliminal Voltage-Gated Currents of the Somato-Dendritic Membrane., p.358-373.

Herman, S. T. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. Neurology, v.59, n.9 Suppl 5, Nov 12, p.S21-6. 2002.

Heron, S. E., I. E. Scheffer, *et al.* Channelopathies in idiopathic epilepsy. Neurotherapeutics, v.4, n.2, Apr, p.295-304. 2007.

Herrmann, S., J. Stieber, *et al.* Pathophysiology of HCN channels. Pflugers Arch, v.454, n.4, Jul, p.517-22. 2007.

Hirose, S. A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: intracellular trafficking abnormality of channel molecules. Epilepsy Res, v.70 Suppl 1, Aug, p.S206-17. 2006.

Inaba, Y., G. Biagini, *et al.* The H current blocker ZD7288 decreases epileptiform hyperexcitability in the rat neocortex by depressing synaptic transmission. Neuropharmacology, Jun 24. 2006.

Isokawa, M., M. Levesque, *et al.* Glutamate currents in morphologically identified human dentate granule cells in temporal lobe epilepsy. J Neurophysiol, v.77, n.6, Jun, p.3355-69. 1997.

Iwata, K. e R. S. Snider. Cerebello-hippocampal influences on the electroencephalogram. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, v.11, n.3, Aug, p.439-46. 1959.

Jefferys, J. G. e H. L. Haas. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. Nature, v.300, n.5891, Dec 2, p.448-50. 1982.

Jentsch, T. J., C. A. Hubner, *et al.* Ion channels: function unravelled by dysfunction. Nat Cell Biol, v.6, n.11, Nov, p.1039-47. 2004.

Jeub, M., A. Lie, *et al.* Loss of dynorphin-mediated inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ currents in hippocampal granule cells isolated from epilepsy patients is associated with mossy fiber sprouting. Neuroscience, v.94, n.2, p.465-71. 1999.

Jung, S., T. D. Jones, *et al.* Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. J Neurosci, v.27, n.47, Nov 21, p.13012-21. 2007.

Kitayama, M., H. Miyata, *et al.* Ih blockers have a potential of antiepileptic effects. Epilepsia, v.44, n.1, Jan, p.20-4. 2003.

Klink, R. e A. Alonso. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. J Neurophysiol, v.77, n.4, Apr, p.1829-43. 1997.

Knowles, W. D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. J Clin Neurophysiol, v.9, n.2, Apr, p.252-63. 1992.

Kohling, R. e M. Avoli. Methodological approaches to exploring epileptic disorders in the human brain in vitro. J Neurosci Methods, v.155, n.1, Jul 15, p.1-19. 2006.

Kole, M. H., A. U. Brauer, *et al.* Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. J Physiol, v.578, n.Pt 2, Jan 15, p.507-25. 2007.

Kullmann, D. M. The neuronal channelopathies. Brain, v.125, n.Pt 6, Jun, p.1177-95. 2002.

Kullmann, D. M. e M. G. Hanna. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. Lancet Neurol, v.1, n.3, Jul, p.157-66. 2002.

Kwon, Y.-J. e T.-S. Kim. Distinct Regional and Cellular Localization. of Hyperpolarization-activated Cyclic. Nucleotide-gated Channel 1 in Cerebellar. Cortex of Rat. Korean Neurosurg Soc, v.42, p.205-210, 2007.

Lancaster, B. e P. R. Adams. Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. J Neurophysiol, v.55, n.6, Jun, p.1268-82. 1986.

Leite, J. P., Z. A. Bortolotto, *et al.* Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. Neurosci Biobehav Rev, v.14, n.4, Winter, p.511-7. 1990.

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

Lorincz, A., T. Notomi, *et al.* Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. Nat Neurosci, v.5, n.11, Nov, p.1185-93. 2002.

Loscher, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. Trends Pharmacol Sci, v.23, n.3, Mar, p.113-8. 2002.

Loscher, W., M. O. Poulter, *et al.* Major targets and mechanisms of antiepileptic drugs and major reasons for failure. Adv Neurol, v.97, p.417-27. 2006.

Ludwig, A., T. Budde, *et al.* Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. Embo J, v.22, n.2, Jan 15, p.216-24. 2003.

Ludwig, A., X. Zong, *et al.* Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. Embo J, v.18, n.9, May 4, p.2323-9. 1999.

Madison, D. V. e R. A. Nicoll. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. J Physiol, v.354, Sep, p.319-31. 1984.

Magee, J. C. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci, v.18, n.19, Oct 1, p.7613-24. 1998.

Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. Nat Neurosci, v.2, n.9, Sep, p.848. 1999.

Mathern, G. W., J. K. Pretorius, *et al.* Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. Ann Neurol, v.46, n.3, Sep, p.343-58. 1999.

Matsumoto, H. A. A. M., C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations. Exp Neurol, v.9, p.286-304. 1964.

Mcnamara, J. O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. Nature, v.399, n.6738 Suppl, Jun 24, p.A15-22. 1999.

Mcnamara, J. O., Y. Z. Huang, *et al.* Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. Sci STKE, v.2006, n.356, Oct 10, p.re12. 2006.

Meldrum, B. S. e M. A. Rogawski. Molecular targets for antiepileptic drug development. Neurotherapeutics, v.4, n.1, Jan, p.18-61. 2007.

Mello, L. M. A., E. A. Cavalheiro, *et al.* Circuit mechanisms of seizure in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fibers sprouting. Epilepsia, v.34, n.6, p.985- 994. 1993.

Mody, I. e U. Heinemann. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. Nature, v.326, n.6114, Apr 16-22, p.701-4. 1987.

Moosmang, S., M. Biel, *et al.* Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. Biol Chem, v.380, n.7-8, Jul-Aug, p.975-80. 1999.

Moosmang, S., J. Stieber, *et al.* Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. Eur J Biochem, v.268, n.6, Mar, p.1646-52. 2001.

Morimoto, K., M. Fahnstock, *et al.* Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. Prog Neurobiol, v.73, n.1, May, p.1-60. 2004.

Nagerl, U. V., I. Mody, *et al.* Surviving granule cells of the sclerotic human hippocampus have reduced Ca(2+) influx because of a loss of calbindin-D(28k) in temporal lobe epilepsy. J Neurosci, v.20, n.5, Mar 1, p.1831-6. 2000.

Newman, P. P. e H. Reza. Functional relationships between the hippocampus and the cerebellum: an electrophysiological study of the cat. J Physiol, v.287, Feb, p.405-26. 1979.

Noebels, J. L. Ion Channelopathies and Heritable Epilepsy. News Physiol Sci, v.13, Oct, p.255-256. 1998.

The biology of epilepsy genes. Annu Rev Neurosci, v.26, p.599-625. 2003a.

How a Sodium Channel Mutation Causes Epilepsy. Epilepsy Curr, v.3, n.2, Mar, p.70-71. 2003b.

Nolan, M. F., G. Malleret, *et al.* A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. Cell, v.119, n.5, Nov 24, p.719-32. 2004.

Notomi, T. e R. Shigemoto. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. J Comp Neurol, v.471, n.3, Apr 5, p.241-76. 2004.

Novais, C. M., Pires-Alves, M. PCR em Tempo Real. Rev. Biotecnol. Ciên. Desenv, p.33. 2004.

O'dell, T. J. e B. E. Alger. Single calcium channels in rat and guinea-pig hippocampal neurons. J Physiol, v.436, May, p.739-67. 1991.

O'mara, S. M., S. Commins, *et al.* The subiculum: a review of form, physiology and function. Prog Neurobiol, v.64, n.2, Jun, p.129-55. 2001.

Pape, H. C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. Annu Rev Physiol, v.58, p.299-327. 1996.

Pardridge, W. M., P. L. Golden, *et al.* Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. J Neurochem, v.68, n.3, Mar, p.1278-85. 1997.

Pitkanen, A., I. Kharatishvili, *et al.* Epileptogenesis in experimental models. Epilepsia, v.48 Suppl 2, p.13-20. 2007.

Poncer, J. C., R. A. Mckinney, *et al.* Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. Neuron, v.18, n.3, Mar, p.463-72. 1997.

Poolos, N. P. The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy. Epilepsy Curr, v.4, n.1, Jan, p.3-6. 2004.

The h-channel: a potential channelopathy in epilepsy? Epilepsy Behav, v.7, n.1, Aug, p.51-6. 2005a.

H-Channels and Seizures: Less Is More. Epilepsy Curr, v.5, n.3, May-Jun, p.89-90. 2005b.

H-channel dysfunction in generalized epilepsy: it takes two. Epilepsy Curr, v.6, n.3, May-Jun, p.88-90. 2006.

Porto, L. S., Jr; Seixas, Ln; Almeida, Jrg; Quintans-Júnior, Lj. O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas – Uma breve revisão. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v.13, n.4, p.169-175. 2007.

Powell, K. L., C. Ng, *et al.* Decreases in HCN mRNA expression in the hippocampus after kindling and status epilepticus in adult rats. Epilepsia, Apr 7. 2008.

Prince, D. A. e G. F. Tseng. Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. J Neurophysiol, v.69, n.4, Apr, p.1276-91. 1993.

Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, v.32, p.334-340. 1972.

Regesta, G. e P. Tanganelli. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. Epilepsy Res, v.34, n.2-3, Apr, p.109-22. 1999.

Remy, S. e H. Beck. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. Brain, v.129, n.Pt 1, Jan, p.18-35. 2006.

Ribak, C. E., P. H. Tran, *et al.* Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. J Comp Neurol, v.428, n.2, Dec 11, p.240-53. 2000.

Richichi, C., A. L. Brewster, *et al.* Mechanisms of seizure-induced 'transcriptional channelopathy' of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. Neurobiol Dis, v.29, n.2, Feb, p.297-305. 2008.

Sanabria, E. R., H. Su, *et al.* Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J Physiol, v.532, n.Pt 1, Apr 1, p.205-16. 2001.

Sander, J. W. e Y. M. Hart. Capítulo 1: O que é Epilepsia? In: J. W. Sander e Y. M. Hart (Ed.). Epilepsia: Um Guia Prático. Coral Springs: Merit-Publishing International, 1999. Capítulo 1: O que é Epilepsia? p.13

Santoro, B. e T. Z. Baram. The multiple personalities of h-channels. Trends Neurosci, v.26, n.10, Oct, p.550-4. 2003.

Santoro, B., S. Chen, *et al.* Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. J Neurosci, v.20, n.14, Jul 15, p.5264-75. 2000.

Santoro, B., S. G. Grant, *et al.* Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.26, Dec 23, p.14815-20. 1997.

Santoro, B. e G. R. Tibbs. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. Ann N Y Acad Sci, v.868, Apr 30, p.741-64. 1999.

Scheffer, G. L., P. L. Wijngaard, *et al.* The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. Nat Med, v.1, n.6, Jun, p.578-82. 1995.

Scheffer, I. E. e S. F. Berkovic. The genetics of human epilepsy. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.8, Aug, p.428-33. 2003.

Schridde, U., U. Strauss, *et al.* Environmental manipulations early in development alter seizure activity, Ih and HCN1 protein expression later in life. Eur J Neurosci, v.23, n.12, Jun, p.3346-58. 2006.

Schwartzkroin, P. A. Cellular electrophysiology of human epilepsy. Epilepsy Res, v.17, n.3, Mar, p.185-92. 1994.

Schwartzkroin, P. A., D. A. Turner, *et al.* Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the in vitro slice preparation. Ann Neurol, v.13, n.3, Mar, p.249-57. 1983.

Schwarzer, C. e G. Sperk. Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. Neuroscience, v.69, n.3, Dec, p.705-9. 1995.

Schwindt, P. C., W. J. Spain, *et al.* Influence of anomalous rectifier activation on afterhyperpolarizations of neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. J Neurophysiol, v.59, n.2, Feb, p.468-81. 1988.

Segal, M., M. A. Rogawski, *et al.* A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. J Neurosci, v.4, n.2, Feb, p.604-9. 1984.

Seifert, R., A. Scholten, *et al.* Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.16, Aug 3, p.9391-6. 1999.

Shah, M. M., A. E. Anderson, *et al.* Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. Neuron, v.44, n.3, Oct 28, p.495-508. 2004.

Shepherd G.M e K. C. Introduction to synaptic circuits. In: G. M. Shepherd (Ed.). Synaptic Organization of the Brain. New York: Oxford University Press, 1997. Introduction to synaptic circuits, p.1-36

Shin, M. e D. M. Chetkovich. Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Biol Chem, v.282, n.45, Nov 9, p.33168-80. 2007.

Silva, L. R., M. J. Gutnick, *et al.* Laminar distribution of neuronal membrane properties in neocortex of normal and reeler mouse. J Neurophysiol, v.66, n.6, Dec, p.2034-40. 1991.

Silverman, J. A., H. Raunio, *et al.* Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family. Gene, v.106, n.2, Oct 15, p.229-36. 1991.

Sisodiya, S. M., L. Martinian, *et al.* Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. Epilepsia, v.44, n.11, Nov, p.1388-96. 2003.

Sloviter, R. S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. C R Biol, v.328, n.2, Feb, p.143-53. 2005.

Steinlein, O. K. e J. L. Noebels. Ion channels and epilepsy in man and mouse. Curr Opin Genet Dev, v.10, n.3, Jun, p.286-91. 2000.

Stieber, J., G. Stockl, *et al.* Functional expression of the human HCN3 channel. J Biol Chem, v.280, n.41, Oct 14, p.34635-43. 2005.

Storm, J. F. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. J Physiol, v.385, Apr, p.733-59. 1987.

Strauss, U., M. H. Kole, *et al.* An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. Eur J Neurosci, v.19, n.11, Jun, p.3048-58. 2004.

Su, H., D. Sochivko, *et al.* Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. J Neurosci, v.22, n.9, May 1, p.3645-55. 2002.

Surges, R., A. L. Brewster, *et al.* Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. Eur J Neurosci, v.24, n.1, Jul, p.94-104. 2006.

Surges, R., T. M. Freiman, *et al.* Gabapentin increases the hyperpolarization-activated cation current Ih in rat CA1 pyramidal cells. Epilepsia, v.44, n.2, Feb, p.150-6. 2003.

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

Swanson, T. H., M. R. Sperling, *et al.* Strong paired pulse depression of dentate granule cells in slices from patients with temporal lobe epilepsy. J Neural Transm, v.105, n.6-7, p.613-25. 1998.

Tasker, J. G., N. W. Hoffman, *et al.* Electrical properties of neocortical neurons in slices from children with intractable epilepsy. J Neurophysiol, v.75, n.2, Feb, p.931-9. 1996.

Tavares, A. A. Azambuja N.A., Paglioli-Neto E. Salamoni S.D., e C. J. C. Palmieri A. L. F. Increased Proportion Of Intrinsically Bursting Neurons In Human Sclerotic Hippocampus. Epilepsia. submetido.

Tempel, B. L., Y. N. Jan, *et al.* Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. Nature, v.332, n.6167, Apr 28, p.837-9. 1988.

Thollon, C., S. Bedut, *et al.* Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. Br J Pharmacol, v.150, n.1, Jan, p.37-46. 2007.

Traub, R. D., C. Borck, *et al.* On the structure of ictal events in vitro. Epilepsia, v.37, n.9, Sep, p.879-91. 1996.

Traub, R. D. e R. Llinas. Hippocampal pyramidal cells: significance of dendritic ionic conductances for neuronal function and epileptogenesis. J Neurophysiol, v.42, n.2, Mar, p.476-96. 1979.

Treiman, D. M. GABAergic mechanisms in epilepsy. Epilepsia, v.42 Suppl 3, p.8-12. 2001.

Turner, D. A., E. H. Buhl, *et al.* Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. Prog Neurobiol, v.55, n.6, Aug, p.537-62. 1998.

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

Turski, W. A., S. J. Czuczwar, *et al.* Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. Experientia, v.39, n.12, Dec 15, p.1408-11. 1983.

Ulens, C. e J. Tytgat. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. J Biol Chem, v.276, n.9, Mar 2, p.6069-72. 2001.

Van Der Linden, S. e F. H. Lopes Da Silva. Comparison of the electrophysiology and morphology of layers III and II neurons of the rat medial entorhinal cortex in vitro. Eur J Neurosci, v.10, n.4, Apr, p.1479-89. 1998.

Van Hoesen, G. W. Anatomy of the medial temporal lobe. Magn Reson Imaging, v.13, n.8, p.1047-55. 1995.

Wainger, B. J., M. Degennaro, *et al.* Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. Nature, v.411, n.6839, Jun 14, p.805-10. 2001.

Wallace, R. Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. Lancet Neurol, v.1, n.4, Aug, p.212. 2002.

Waxman, S. G. e B. C. Hains. Fire and phantoms after spinal cord injury: Na⁺ channels and central pain. Trends Neurosci, v.29, n.4, Apr, p.207-15. 2006.

White, H. S. Animal models of epileptogenesis. Neurology, v.59, n.9 Suppl 5, Nov 12, p.S7-S14. 2002.

Wickenden, A. K(+) channels as therapeutic drug targets. Pharmacol Ther, v.94, n.1-2, Apr-May, p.157-82. 2002.

Wickenden, A. D. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. Neuropharmacology, v.43, n.7, Dec, p.1055-60. 2002.

Williamson, A., P. R. Patrylo, *et al.* Decrease in inhibition in dentate granule cells from patients with medial temporal lobe epilepsy. Ann Neurol, v.45, n.1, Jan, p.92-9. 1999.

Wittner, L., L. Eross, *et al.* Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. Brain, v.128, n.Pt 1, Jan, p.138-52. 2005.

Wu, M., M. Shanabrough, *et al.* Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. J Neurosci, v.20, n.10, May 15, p.3900-8. 2000.

Yaari, Y., A. Konnerth, *et al.* Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. Exp Brain Res, v.51, n.1, p.153-6. 1983.

Yang, C. R., J. K. Seamans, *et al.* Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. J Neurosci, v.16, n.5, Mar 1, p.1904-21. 1996.

Zhang, K., B. W. Peng, *et al.* Decreased IH in hippocampal area CA1 pyramidal neurons after perinatal seizure-inducing hypoxia. Epilepsia, v.47, n.6, Jun, p.1023-8. 2006.

Zhang, L., T. A. Valiante, *et al.* Contribution of the low-threshold T-type calcium current in generating the post-spike depolarizing afterpotential in dentate granule neurons of immature rats. J Neurophysiol, v.70, n.1, Jul, p.223-31. 1993.

Zhang, W. e D. J. Linden. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. Nat Rev Neurosci, v.4, n.11, Nov, p.885-900. 2003.

Zhang, Y., R. Oliva, *et al.* Overexpression of a hyperpolarization-activated cation current (I_h) channel gene modifies the firing activity of identified motor neurons in a small neural network. J Neurosci, v.23, n.27, Oct 8, p.9059-67. 2003.