

GENES E EPILEPSIA II: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

RODRIGO N. ROMCY-PEREIRA*, DANIEL L. G. GITAI, LÍVIA L. G. GITAI, JOÃO P. LEITE, NORBERTO GARCIA-CAIRASCO AND MARIA LUISA PAÇÓ-LARSON

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

RESUMO

Nesta revisão, introduzimos abordagens investigativas, assim como discutimos os principais achados de expressão gênica diferencial em tecido epilético humano e em modelos experimentais. As alterações observadas no cérebro de indivíduos epiléticos sugerem que eventos moleculares específicos refletem diferentes expressões do quadro fisiopatológico. É possível que diferentes combinações da expressão de genes associados à morte celular, metabolismo de radicais livres, transmissão sináptica, resposta imune e de neurotrofinas reflitam propriedades características de diferentes populações neuronais e gliais, que determinam as distintas respostas de cada área cerebral. A compreensão dessas particularidades moleculares será muito importante para o desenvolvimento de uma estratégia de intervenção visando reduzir neurotoxicidade e disfunções sinápticas que ocorrem durante a epileptogênese e a fase crônica em pacientes epiléticos.

UNITERMOS: Epilepsia. Esclerose hipocampal. Hipocampo. Expressão gênica. Microarranjos. Neuroproteção.

*Correspondência

Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3900
Monte Alegre
Ribeirão Preto - SP
CEP 14049-900
Tel/Fax: 1-55-(16)3602-2556
rnpereira@rnp.fmrp.usp.br

INTRODUÇÃO

Muitos dos aproximadamente 30.000 genes humanos podem estar associados à epilepsia¹. De um lado estão as alterações que ocorrem na estrutura física dos genes, tais como as mutações ou polimorfismos, que contribuem para a epileptogênese, agindo direta ou indiretamente no estabelecimento do limiar de susceptibilidade. A maior parte delas é transmitida hereditariamente. De um lado podemos encontrar alterações no controle da expressão gênica que interferem estritamente na atividade dos transcritos e proteínas codificadas, sem o envolvimento de mudanças físicas no DNA. Esse tipo de alteração pode promover alterações nos níveis ou na localização de mRNAs e proteínas, deflagradas por insultos epileptogênicos.

As epilepsias sintomáticas são epilepsias geneticamente complexas e geralmente estão associadas a lesões adquiridas ou congênitas. Tais lesões provocam uma série de alterações em circuitos cerebrais envolvidos no surgimento de crises epiléticas recorrentes. Como consequência dessas alterações, o aumento ou diminuição de certas moléculas no tecido afetado pode contribuir para um ambiente bioquímico patofisiologicamente característico do processo epilético. Essas alterações envolvem modificações do controle transcricional e traducional de diversos genes, afetando os níveis de RNAs transcritos (principalmente mRNAs) e os subtipos de proteínas sintetizadas, assim como a atividade das proteínas sintetizadas. A identificação dessas moléculas cuja expressão é modulada durante o processo epilético, é de fundamental importância para o entendimento das vias moleculares associadas tanto aos mecanismos de epileptogênese quanto a alterações secundárias às crises recorrentes.

Em adultos, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia focal, em que aproximadamente dois terços dos pacientes apresentam esclerose hipocampal (epilepsia mesial

temporal, EMT). Nas ELTs, o hipocampo é uma região crítica na manutenção das crises epiléticas e sua fisiopatologia está associada a um padrão bem definido de perda neuronal nos subcampos CA1 e CA3, infiltração de células da glia (astrogliose) e plasticidade axonal com brotamento de fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado². Devido a sua citoarquitetura e conectividade, o hipocampo apresenta baixo limiar para indução de crises convulsivas, sendo altamente reativo a uma variedade de tratamentos³. Descargas epileptiformes repetidas durante crises sustentadas (*status epilepticus*, SE) induzem danos neuronais e reorganização axonal que podem variar de acordo com a intensidade e duração do SE. Outras estruturas do lobo temporal, incluindo a amígdala e o córtex para-hipocampal, também participam do quadro epilético e podem sofrer alterações de seu funcionamento em pacientes epiléticos.

Alterações de expressão gênica em epilepsia

Alteração na expressão gênica é uma das principais respostas do tecido cerebral a insultos epileptogênicos⁴. As abordagens de investigação baseiam-se na análise individual da expressão de determinados genes ou na análise de expressão de múltiplos genes simultaneamente. Nas análises individuais, os genes são selecionados por estarem envolvidos em processos de excitabilidade neuronal, sinaptogênese, morte e proliferação celular, regulação transcricional da expressão gênica, transdução de sinal, dentre outros. Nas análises em larga escala, utilizando técnicas analíticas mais modernas como os microarranjos (*microarrays*), a estratégia reduz o viés dos genes avaliados possibilitando a descoberta de novos transcritos.

Nas investigações de genes individuais, cuja expressão é modulada em resposta a epilepsia, níveis de mRNA são comparados entre os tecidos epiléticos e normais através de metodologias como *RT-PCR*,

Northern blot e hibridação *in situ*. Estudos de expressão diferencial de genes envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, principais mediadores excitatórios e inibitórios do sistema nervoso central, mostram alterações significativas na expressão gênica hipocampal. Tais genes codificam proteínas que compõem receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA (rAMPA), NMDA (rNMDA), cainato (rKA) assim como receptores metabotrópicos de glutamato (rMGlu)⁵⁻⁸; receptores de GABA (rGABA A e B)⁹⁻¹¹; enzimas que participam da síntese de GABA (GAD65 e GAD67)¹²; transportadores de glutamato (EAAT1, EAAT2 e EAAT3)¹³⁻¹⁶. Outros genes também investigados foram os neuropeptídeos pró-convulsivantes como o CRH^{17,18} e neuropeptídeos anticonvulsivantes como GAL, TRH, NPY, SS. Esses estudos têm verificado que genes com atividade facilitadora de vias excitatórias apresentam níveis aumentados no hipocampo epilético, o que é compatível com uma situação pró-convulsivante. Entretanto, nem sempre os genes que participam do processo inibitório apresentam uma expressão diminuída nesses tecidos. Ao contrário, vários estudos têm relatado um aumento da expressão de genes com atividade inibitória após crises epiléticas. Este achado, aparentemente paradoxal, pode estar relacionado a mecanismos compensatórios do fenômeno de hiperexcitabilidade neuronal¹⁹. Os resultados da expressão diferencial de genes não diretamente relacionados ao processo de hiperexcitabilidade neuronal são de interpretação ainda mais complexa. Uma categoria muito investigada é das neurotrofinas, que são proteínas que promovem a sobrevivência de neurônios juvenis e estão envolvidas nos processos de sinaptogênese e potenciação de sinapses centrais. Inúmeros trabalhos mostram que a expressão hipocampal de várias neurotrofinas sofre modulação durante o processo epileptogênico. Dentre elas destacam-se a NGF, BDNF, NT-4, NT-3 e seus respectivos receptores TrkA, TrkB e TrkC²⁰⁻²³, além do GDNF²⁴ e dos fatores de direcionamento axonal (neuropilinas e ephrinas)^{25, 26}.

Com relação ao processo de esclerose hipocampal, muitos estudos têm focalizado na expressão diferencial de genes envolvidos com os mecanismos de morte celular. Tem-se demonstrado que genes que participam diretamente do processo apoptótico apresentam a expressão alterada no hipocampo epilético. Tais genes agem na via apoptótica extrínseca (caspase 2 e 8, FADD)^{27, 28} ou intrínseca²⁹. Nesta última, destacam-se as caspases efetoras (caspase 3 e 6), família das proteínas bcl-2 pró-apoptóticas (bax, bcl-x, bim, bid) e anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-xl, bcl-w). Estes estudos tem verificado não apenas que a deflagração de programas de apoptose é um dos principais responsáveis pela morte neuronal associada à epilepsia, mas também que existe uma correlação entre a expressão diferencial de genes envolvidos na via apoptótica e o perfil histológico de morte neuronal. No hipocampo epilético, os genes pró-apoptóticos geralmente são mais expressos nas regiões CA1 e CA3, enquanto os genes anti-apoptóticos são mais expressos nas células granulares do giro denteado³⁰.

Evidências de respostas inflamatórias em certas epilepsias motivaram estudos da expressão diferencial de genes envolvidos com o sistema imune³¹. Entre esses, destacam-se as citocinas (IL-1 β , TNF- α and IL-6 e seus respectivos receptores neuronais rIL-1, rTNF e Gp130), mediadores antiinflamatórios (antagonista Ra do receptor IL-1), quimiocinas (MIP-1 α e MCP-1), mediadores inflamatórios (COX-2), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) e

metaloproteinases (mmp9). Crises epiléticas induzidas química ou eletricamente aumentam os níveis de citocinas e mediadores antiinflamatórios no cérebro de roedores³²⁻³⁴. Devido à interação funcional que existe entre citocinas e neurotransmissores, o aumento desses mediadores inflamatórios pode influenciar a excitabilidade neuronal e a resposta do cérebro a injúrias³⁵. De fato, estudos experimentais em roedores mostram que reações inflamatórias podem levar a uma maior excitabilidade e injúrias neuronais. Além disso, alguns tratamentos com antiinflamatórios reduzem crises epiléticas em modelos experimentais³¹. Associado ao processo de astrogliose que acompanha insultos epileptogênicos, tem sido observado um aumento da proteína GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), marcadora de astrócitos maduros, no hilo do giro denteado, uma semana e um mês após o abrasamento elétrico da via perfurante. Seus níveis retornam às condições normais somente após dois meses³.

Outra categoria de genes extensivamente estudada quanto ao perfil de expressão hipocampal em resposta à epilepsia é a classe dos fatores de transcrição. O proto-oncogene *c-fos* foi o primeiro a ser descrito com modulação da expressão associada a crises epiléticas³⁶. Em diversos modelos experimentais tem sido demonstrado que tanto os níveis de mRNA para *c-fos* (pico entre 15-30 minutos) quanto da proteína Fos (pico entre 1-2 horas) estão aumentados durante a primeira hora após a indução das crises. Este mesmo fenômeno também foi observado para a proteína Jun, codificada pelo proto-oncogene *c-jun*, que juntamente à proteína Fos formam o complexo ligante de DNA AP-1, sabidamente caracterizado como regulador transcricional^{37, 38}. Outro fator de transcrição, cuja expressão hipocampal é alterada nas epilepsias, é a proteína CREB que se liga a sítios CRE localizados na região promotora de muitos genes³⁹. Esses achados indicam que a condição epilética, em sua fase inicial, deflagra uma cascata de alterações moleculares envolvidas na regulação da expressão de uma variedade de genes-alvo (*target genes*)⁴⁰. A ativação desses fatores de transcrição ocorre através da estimulação de vias de transdução de sinal desencadeadas pela interação de neurotransmissores e seus receptores de membrana. De fato, vários genes que intermedeiam esse processo, como a adenilato ciclase tipo II, membros da família das *mitogen-activated protein kinases-MAPK*, neurogranina, *calcium/calmodulin binding protein-CaMBP*, também apresentam alterações no padrão de expressão hipocampal provocadas pelas crises epiléticas^{3, 41}.

Nas investigações de expressão gênica em larga escala, o uso de metodologias como microarranjos, análise serial de expressão gênica (do inglês, *serial analyses of gene expression-SAGE*), hibridações subtrativas e *differential display*, possibilita a avaliação da expressão de milhares de genes simultaneamente. Nestes casos, busca-se identificar genes associados à epilepsia independente do conhecimento prévio de suas identidades e funções. Essas ferramentas têm levado à descoberta de inúmeros genes que estão envolvidos em diferentes estágios do quadro epilético. A metodologia SAGE baseia-se na obtenção de uma coleção de ESTs (*Expressed Sequence Tag*; pequenos fragmentos da região 3' dos mRNA) teoricamente referente a todos os transcritos de um tecido. A comparação entre o conjunto de ESTs proveniente de duas amostras diferentes (p.ex., hipocampo epilético vs. hipocampo normal) pode identificar os genes com expressão diferencial entre os

tecidos. Através da SAGE foram avaliadas alterações de expressão gênica no hipocampo de ratos submetidos a SE elétrico da via perfurante. A maior parte dos genes alterados está envolvida em vias metabólicas não-associadas previamente a crises convulsivas. Em particular, o gene da cistatina C, um inibidor de proteases, apresentou-se aproximadamente cinco vezes mais expresso em hipocampus de ratos submetidos às crises^{42,43}. Nas análises de hibridação subtrativa, cDNAs provenientes de uma amostra A (hipocampo epiléptico) são subtraídos de cDNAs provenientes de uma amostra B (hipocampo normal). Isto resulta na formação de uma biblioteca de cDNAs referentes a genes mais expressos em uma das amostras. Em um estudo da expressão gênica diferencial quatro horas após indução de electroconvulsões foi identificado um grande número de novas moléculas envolvidas com crises epiléticas, incluindo os genes *Rheb* e *Arc* que codificam uma GTPase tipo Ras e um gene de resposta inicial associado ao citoesqueleto, respectivamente⁴⁴⁻⁴⁶.

A tecnologia de microarranjos tem como princípio básico o processo de hibridação de cDNAs ou RNAs marcados provenientes do tecido de interesse com cDNAs completos ou oligonucleotídeos (sonda ou *probes*) pré-sintetizados e presentes em alta densidade numa superfície sólida (p. ex. lâmina de vidro). A intensidade do sinal de hibridação para um determinado gene presente nos microarranjos reflete a quantidade do seu respectivo mRNA no tecido de interesse. O uso de microarranjos comerciais, como alternativa às outras metodologias, apresenta várias vantagens: 1) testar milhares de genes em uma ou múltiplas amostras simultaneamente e com muito menos trabalho; 2) alta reprodutibilidade e 3) significativa sensibilidade de detecção – até uma cópia de mRNA/célula/milhão de células⁴⁷⁻⁴⁹. A hibridação em microarranjos tem sido muito usada para avaliar o processo epileptogênico tanto em modelos experimentais como em tecido epiléptico humano⁵⁰. Em modelos experimentais, a maior parte dos trabalhos concentra-se no processo de epileptogênese (período compreendido entre a indução do insulto e a emergência das crises espontâneas). Nesses estudos, dois intervalos de tempo têm sido focalizados: a) as primeiras 24 horas após a indução do insulto: para avaliar as alterações moleculares iniciais que atuam como gatilho do processo epiléptico; b) o período entre 1-2 semanas após o insulto inicial: para avaliar as alterações imediatamente anteriores ao aparecimento das crises espontâneas. Nos estudos em humanos, a análise do hipocampo epiléptico após ressecção cirúrgica é realizada após um período variável de crises refratárias ao tratamento medicamentoso.

Cinco estudos independentes analisaram mudanças na expressão gênica hipocampal durante as primeiras 24 horas após o insulto epileptogênico (Tabela 1): 1) Lukasiuk et al. (2003) detectaram alteração na expressão de 37 genes no hipocampo e de 29 genes no lobo temporal em ratos sacrificados 24 horas após indução de SE por estimulação elétrica da amígdala⁵¹; 2) Matzilevich et al. (2002) analisaram hipocampus de ratos 3 ou 24 horas após a indução de traumatismo cortical. Dos 8.800 genes analisados, foi observada expressão diferencial em 308 genes no período de três horas e 261 genes no período de 24 horas após o insulto⁵²; 3) Long et al. (2003) observaram alteração em 253 genes no hipocampo de camundongos sacrificados 4 ou 24 horas após indução de traumatismo cortical. Seus resultados mostraram que genes relacionados

à homeostase celular e sinalização de cálcio foram preferencialmente superexpressos enquanto genes envolvidos com metabolismo mitocondrial, celular e proteínas estruturais foram subexpressos⁵³; 4) French et al. (2001) avaliaram hipocampus de camundongos uma hora após crises induzidas por eletrochoque. Apenas 14 dos 9.000 genes apresentaram expressão alterada, sendo que apenas o gene *NGFI-B* foi confirmado estar superexpresso no giro denteado e em *CAI*⁵⁴ e (5) Avedissian et al. (2007) observaram superexpressão de *homer-1a* oito horas após SE induzido por administração do agonista muscarínico pilocarpina, em ratos. Nesses estudos, muitos dos genes detectados pertencem à classe dos fatores de transcrição e dos efetores de expressão imediata, tendo significativa alteração de expressão nas primeiras quatro horas após o insulto. Outros genes identificados são genes de fatores de crescimento, de resposta ao estresse, de componentes sinápticos, de receptores e de citocinas.

Dois estudos analisaram alterações da expressão gênica entre a primeira e segunda semana após o insulto inicial: 1) Lukasiuk et al. (2003) detectaram expressão diferencial em 14 genes no hipocampo de ratos sacrificados 14 dias após a indução de SE através de estimulação elétrica da amígdala⁵¹; 2) Elliott et al. (2003) caracterizaram o padrão de expressão gênica no hipocampo de ratos submetidos ao protocolo de indução de SE através de injeção intraperitoneal de pilocarpina. Quatorze dias após o SE, de 8.000 genes analisados, 129 apresentaram expressão diferencial no giro denteado quando comparados a ratos controle⁵⁵. Em ambos os estudos, muitos dos genes identificados estão envolvidos em processos metabólicos, incluindo metabolismo energético, síntese e degradação protéica, além de transdução de sinal. Um grande número de ESTs ainda não caracterizados também apresentou expressão alterada.

Dois estudos com microarranjos avaliaram alterações de expressão gênica após o estabelecimento das crises recorrentes espontâneas: um em tecido humano epiléptico e um em modelo animal. Lukasiuk et al. (2003) observaram expressão diferencial em 42 dos 5.000 genes analisados (30 subexpressos e 12 superexpressos) em hipocampo de ratos com crises espontâneas após a indução de SE por estimulação elétrica da amígdala. Becker et al. (2002) compararam hipocampus provenientes de pacientes com epilepsia do lobo temporal associada a esclerose mesial com hipocampus destituídos de anormalidades histopatológicas, provenientes de pacientes com ELT com lesão focal neocortical e/ou pacientes não-epilépticos. Neste estudo, dos 588 genes analisados, 21 apresentaram expressão diferencial, nove com expressão aumentada e 12 com expressão reprimida³⁰.

Recentemente, Lukasiuk et al. (2004) mostraram que as primeiras horas após o insulto epileptogênico são marcadas pela expressão alterada de genes envolvidos na regulação transcricional. Os autores também observaram que em todos os tempos analisados houve alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo básico, transdução de sinal e proteínas estruturais. Embora da mesma classe funcional, os genes identificados nos diferentes estudos apresentaram pouca sobreposição. Parte disto possivelmente se deve aos diferentes modelos e desenhos experimentais utilizados.

Em nossos laboratórios estamos utilizando análise de expressão gênica diferencial em pequena e larga escala no estudo de modelos experimentais de crises tônico-clônicas generalizadas e límbicas, assim

Tabela I - Alterações de expressão gênica no cérebro epiléptico e após trauma encefálico

Fase	Paradigma	Tempo	Alterações Gênicas	Genes confirmados ¹	Área Cerebral Analisada ²	Refs.
Aguda (até 24 h)	SE - Estimulação elétrica da amígdala	24 h	* 37 genes > ↓ 8; ↑ 29 29 genes > ↓ 13; ↑ 16	* n.d. n.d.	Hipocampo / Lobo Temporal (r.)	(51)
	Trauma encefálico	3 h/24 h	* 308/261 genes alterados	* Cox-2, BDNF (3 h;↑) / Cox-2, Vimentina (24 h;↑)	Hipocampo (r.)	(52)
	Trauma encefálico	4 h/24 h	* 253 genes > ↓ 147; ↑ 106	* TTR, ECalc, ISP (↑) / AOP-1, CAK, IPE (4 h;↓) TTR, ECalc, PLA2, MAF-2 (↑) / PAO-1, CAK, IPE, Dehydrogenase (24 h;↓)	Hipocampo (c.)	(53)
Epileptogênese (até 14 d)	Eletrochoque	1 h	* ↑ 14 genes	* ↑ NGFI-B (<i>nurr77</i>)	Hipocampo (c.)	(54)
	SE - Pilocarpina	8 h	* 668 genes alterados	* ↑ Homer-1a	Hipocampo (r.)	(60)
	SE - Estimulação elétrica da amígdala	14 d	* 14 genes > ↓ 11; 3 ↑ 32 genes > 15 ↓; 17 ↑	* ↑ Catepsina-E, nucleobindina SD3, Bcl-x, catepsina-S, NF-H, α-enolase	Hipocampo / Lobo Temporal (r.)	(51)
Crônica (CREs)	SE - Pilocarpina	14 d	* 129 genes alterados	* ↑ CD24, hipocalcina	Hipocampo (r.)	(55)
	SE - Estimulação elétrica da amígdala	14 d pós-SE	42 genes > 12 ↓; 30 ↑ 62 genes > 4 ↓; 58 ↑	* ↑ Citocromo P450 I4-3-3, SD3, biglicana, Bcl-x, ciclofilina	Hipocampo / Lobo Temporal (r.)	(51)
	EMT – humano	crônico	21 genes > 12 ↓; 9 ↑	* ↑ MABP, transferrina, sinapsina II	Hipocampo (h.)	(30)

¹ Cox-2, ciclooxigenase-2; BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*; TTR, transtirretina; ECalc, estaniocalcina; ISP-1, inibidor de serino-protease 1; PAO-1, proteína anti-oxidante 1; CAK, *cell adhesion kinase*; IPE, inibidor de protease extracelular; PLA2, fosfolipase A2; MAF-2, *macrophage activator factor 2*; SD3, superóxido dismutase 3; NF-H, neurofilamento cadeia pesada; I4-3-3, MABP, proteína de ligação à proteína associada a mielina. ² c., camundongo; r., rato; h., humano.

como no processo de neuroproteção após pré-condicionamento por crises convulsivas curtas ou por hipóxia^{56,57}. Dados recentes indicam que no modelo de recrutamento límbico, durante crises audiogênicas crônicas (*kindling*) em ratos geneticamente selecionados (*Wistar Audiogenic Rats, WARs*), há um aumento nos níveis da isoforma flip do receptor de glutamato GluR2 e redução do inibidor de tradução BCL ao abrasamento audiogênico⁵⁸. Além disso, também observamos um aumento significativo da expressão dos receptores B1 e B2 de bradicinina no hipocampo⁵⁹. Portanto, a caracterização das alterações moleculares endógenas, e secundárias às crises, em diversos modelos experimentais é fundamental importância tendo em vista que diferentes tipos de epilepsias humanas, inclusive as do lobo temporal, resultam da interação entre o *background* genético e insultos epileptogênicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a todos os membros dos laboratórios envolvidos, assim como às agências financiadoras FAPESP, CNPq, CAPES, FAEPA e PROEX pelos auxílios destinados a pesquisa e ensino.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

GENES AND EPILEPSY II: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN EPILEPSY

We introduce some investigative approaches and findings on differential gene expression in human epileptic time as well as in animal models of epilepsy. Molecular alterations observed in the epileptic brain suggest that they may disclose different psychopathological stages. It is possible that different gene expression combinations involved in cell death, reactive oxygen metabolism, synaptic transmission and immune response and of neurotrophins reflect distinct functional properties of different neuronal and glial populations, which determine specific brain region responses. Understanding the molecular patterns of gene expression following epileptogenic insults will be of great importance for the development of treatments aiming to reduce neurotoxicity and subtle synaptic dysfunctions present in the early stages as well as during the chronic phase of epilepsy. [Rev Assoc Med Bras 2008; 54(5): 461-6]

KEY WORDS: Epilepsy. Gene expression. Hippocampus. Cortex. Differential display. Microarray. RT-PCR. In Situ hybridization.

REFERÊNCIAS

1. Ottman R. Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*. 2005;46(Suppl 10):7-14.
2. Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1984;25(6):729-40.
3. Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*. 2004;73(1):1-60.
4. Elliott RC, Lowenstein DH. Gene expression profiling of seizure disorders. *Neurochem Res*. 2004 Jun;29(6):1083-92.
5. Akiyama K, Yoneda Y, Ogita K, Itoh T, Daigen A, Sora I, et al. Ionotropic excitatory amino acid receptors in discrete brain regions of kindled rats. *Brain Res*. 1992;587(1):73-82.
6. Kraus JE, McNamara JO. Measurement of NMDA receptor protein subunits in discrete hippocampal regions of kindled animals. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;61(1-2):114-20.
7. Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, et al. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*. 1998;32(1-2):154-71.
8. Mikuni N, Babb TL, Wylie C, Ying Z. NMDAR1 receptor proteins and mossy fibers in the fascia dentata during rat kainate hippocampal epileptogenesis. *Exp Neurol*. 2000;163(1):271-7.
9. Clark M, Massenburg GS, Weiss SR, Post RM. Analysis of the hippocampal GABAA receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;26(1-2):309-19.
10. Rice A, Rafiq A, Shapiro SM, Jakoi ER, Coulter DA, DeLorenzo RJ. Long-lasting reduction of inhibitory function and gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNA expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(18):9665-9.
11. Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Kandlhofer S. Expression of GABA(A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. *Epilepsy Res*. 1998;32(1-2):129-39.
12. Nader L, Valente V, Carlotti CG Jr, Leite JP, Assirati JA, Paco-Larson ML, et al. Glutamate NMDA receptor subunit RI and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. *Cell Mol Neurobiol*. 2002;22(5-6):689-98.
13. Akbar MT, Torp R, Danbolt NC, Levy LM, Meldrum BS, Ottersen OP. Expression of glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fully kindled rats. *Neuroscience*. 1997;78(2):351-9.
14. Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int*. 2002;41(5):313-8.
15. Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, et al. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1999;52(3):453-72.
16. Simantov R, Crispino M, Hoe W, Broutman G, Tocco G, Rothstein JD, et al. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in rat hippocampus following kainate-induced seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;65(1):112-23.
17. Baram TZ, Hatalski CG. Neuropeptide-mediated excitability: a key triggering mechanism for seizure generation in the developing brain. *Trends Neurosci*. 1998;21(11):471-6.
18. Wang W, Dow KE, Fraser DD. Elevated corticotropin releasing hormone/corticotropin releasing hormone-R1 expression in postmortem brain obtained from children with generalized epilepsy. *Ann Neurol*. 2001;50(3):404-9.
19. Esclapez M, Houser CR. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. 1999;412(3):488-505.
20. Bengzon J, Kokaia Z, Ernfors P, Kokaia M, Leanza G, Nilsson OG, et al. Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. *Neuroscience*. 1993;53(2):433-46.
21. Gall C, Lauterborn J, Bundman M, Murray K, Isackson P. Seizures and the regulation of neurotrophic factor and neuropeptide gene expression in brain. *Epilepsy Res Suppl*. 1991;4(2):225-45.
22. Gall CM, Isackson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science*. 1989;245(4919):758-61.
23. Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*. 1991;6(6):937-48.
24. Kokaia Z, Airaksinen MS, Nanobashvili A, Larsson E, Kujamaki E, Lindvall O, et al. GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. *Eur J Neurosci*. 1999;11(4):1202-16.
25. Barnes GN, Slevin JT. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Curr Med Chem*. 2003;10(20):2059-72.
26. Shimakawa S, Suzuki S, Miyamoto R, Takitani K, Tanaka K, Tanabe T, et al. Neuropilin-2 is overexpressed in the rat brain after limbic seizures. *Brain Res*. 2002;956(1):67-73.
27. Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski SL, Lan JQ, Meller R, Simon RP. Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis*. 2001;8(4):568-80.
28. Henshall DC, Skradski SL, Bonislawski DP, Lan JQ, Simon RP. Caspase-2 activation is redundant during seizure-induced neuronal death. *J Neurochem*. 2001;77(3):886-95.
29. Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(12):1557-72.
30. Becker AJ, Chen J, Paus S, Normann S, Beck H, Elger CE, et al. Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. *Neuroreport*. 2002;13(10):1327-33.
31. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005;46(11):1724-43.
32. De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*. 2000;12(7):2623-33.
33. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*. 2001;63(2):125-49.
34. Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;176(2):593-8.
35. De Simoni MG, Imeri L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. *Biol Signals*. 1998;7(1):33-44.
36. Morgan JJ, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 1987;237(4811):192-7.
37. Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures: differential expression of KROX-24, FOS and JUN proteins. *Neuroscience*. 1992;48(2):315-24.
38. Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JJ. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron*. 1989;3(3):359-65.
39. Kashiwara K, Sato K, Akiyama K, Ishihara T, Hayabara T, Abe K. Temporal profile of CRE DNA-binding activity in the rat hippocampus following a kindling stimulation. *Epilepsy Res*. 2000;40(2-3):171-7.
40. Hughes PE, Alexi T, Walton M, Williams CE, Dragunow M, Clark RG, et al. Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1999;57(4):421-50.
41. McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE*. 2006;2006(356):re12.
42. Hendriksen H, Datson NA, Ghijsen WE, van Vliet EA, da Silva FH, Gorter JA, et al. Altered hippocampal gene expression prior to the onset of spontaneous seizures in the rat post-status epilepticus model. *Eur J Neurosci*. 2001;14(9):1475-84.

43. Aronica E, van Vliet EA, Hendriksen E, Troost D, Lopes da Silva FH, Gorter JA. Cystatin C, a cysteine protease inhibitor, is persistently up-regulated in neurons and glia in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2001;14(9):1485-91.
44. Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, et al. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron.* 1995;14(2):433-45.
45. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron.* 1993;11(2):371-86.
46. Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, et al. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem.* 1994;269(23):16333-9.
47. Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, Thompson RC, Vreugdenhil E, De Kloet ER, et al. Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Serial Analysis of Gene Expression.* *Eur J Neurosci.* 2002;16(3):409-13.
48. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermilller B, Barbacioru CC, Boysen C, et al. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol.* 2006;24(9):1115-22.
49. Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, et al. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics.* 2006;7(1):59.
50. Lukasiuk K, Pitkanen A. Large-scale analysis of gene expression in epilepsy research: is synthesis already possible? *Neurochem Res.* 2004;29(6):1169-78.
51. Lukasiuk K, Kontula L, Pitkanen A. cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):271-9.
52. Matzilevich DA, Rall JM, Moore AN, Grill RJ, Dash PK. High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *J Neurosci Res.* 2002;67(5):646-63.
53. Long Y, Zou L, Liu H, Lu H, Yuan X, Robertson CS, et al. Altered expression of randomly selected genes in mouse hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurosci Res.* 2003;71(5):710-20.
54. French PJ, O'Connor V, Voss K, Stean T, Hunt SP, Bliss TV. Seizure-induced gene expression in area CA1 of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2001;14(12):2037-41.
55. Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DH. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci.* 2003;23(6):2218-27.
56. Bachiaga GL, Scanduzzi RC, Romcy-Pereira RN, Leite JP. Short-term effects of priming episodes of pentylenetetrazole-induced seizures on pilocarpine induced status epilepticus (SE). In: II Symposium of the International Institute of Neuroscience of Natal. Natal; 2007. Anais.
57. Gitai DLG, Valente V, Oliveira JAC, Doretto MC, Leite JP, Garcia-Cairasco N, et al. Identificação de genes associados a crise convulsiva em ratos da Cepa WAR (Wistar Audiogenic Rats). In: 50º Congresso Brasileiro de Genética; 2004. Florianópolis; 2004. Anais.
58. Gitai DLG. Expressão Gênica Diferencial em WAR (Wistar Audiogenic Rat) [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
59. Pereira MGAG, Gitai DLG, Paco-Larson ML, Pesquero JB, Garcia-Cairasco N, Costa-Neto CM. Up regulation of the B1 and B2 kinin receptors in the hippocampus of kindled Wistar audiogenic rat (WAR strain). In: Kinin 2007: 2nd International Symposium on Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators; 2007. Berlin; 2007. Abstracts. p. 105.
60. Avedissian M, Longo BM, Jaqueta CB, Schnabel B, Paiva PB, Mello LE, et al. Hippocampal gene expression analysis using the ORESTES methodology shows that homer 1a mRNA is upregulated in the acute period of the pilocarpine epilepsy model. *Hippocampus.* 2007;17(2):130-6.

Artigo recebido: 06/08/07
Aceito para publicação: 10/04/08
