



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Programa de Pós-Graduação *Strito Sensu* em Medicina

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE UCP2 NO ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE
EM RATOS SUBMETIDOS À EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA
PILOCARPINA**

Aluna: Marina Rascio Henriques Dutra

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Jr.

São Paulo

2019

MARINA RASCIO HENRIQUES DUTRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE UCP2 NO ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE
EM RATOS SUBMETIDOS À EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA
PILOCARPINA**

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Jr.

Coorientador:

São Paulo

2019

Dutra, Marina Rascio Henriques.

Análise da expressão de UCP2 no estresse oxidativo e apoptose em ratos submetidos à epilepsia experimental induzida pela pilocarpina. / Marina Rascio Henriques Dutra. 2019.

87 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Profª. Drª. José Antônio Silva Junior.

*1. Epilepsia. 2. UCP2. 3. ERO. 4. ASO. 5. Pilocarpina.
I. Silva Junior, José Antônio. II. Título*

CDU 616



Mestrado e Doutorado
em Medicina

São Paulo, 27 de fevereiro de 2019.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): **MARINA RASCIO HENRIQUES DUTRA**

Título da Dissertação: **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE UCP2 NO ESTRESSE OXIDATIVO E APOTOSE EM RATOS SUBMETIDOS À EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA PILOCARPINA.**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR

José Antônio S. Júnior

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Myriam F. and Dalton

Membro: PROF. DR. OVIDIU CONSTANTIN BALATATU

Ovidiu Constantine Baltatu

Dedico esse trabalho a Deus em primeiro lugar por me guiar sempre em todos os meus caminhos.

E a minha mãe Telma Rascio pelo exemplo de amor e perseverança, sempre disposta a me conduzir através de minhas incertezas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus sempre em primeiro lugar, principalmente por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho ao longo dessa caminhada. E espero que sua graça continue agindo em meu destino.

Agradeço também a minha mãe, Telma Rascio por todo apoio, encorajamento que ela sempre despendeu para mim desde sempre, se eu cheguei até aqui foi graças ao seu amor, dedicação e formação, que ela sempre buscou me dar, em todos momentos de minha vida. Espero poder continuar contando com esse apoio especial por ainda muito tempo.

Agradeço as minhas famílias Rascio e Dutra por todo carinho e desejos bons que sempre recebi tão gratuitamente.

Agradeço também ao Professor José Antônio Silva Jr. por toda orientação nesse mestrado, graças a sua orientação, com certeza aprendi a procurar outros modos de ver as coisas, de forma menos convencional, pois ele tem a visão aguçada para novas ideias de trabalho. Agradeço também a sua incrível paciência comigo e principalmente por acreditar em um potencial que eu mesma não conseguia ver.

Agradeço também a Professora Kátia De Angelis, pois foi com ela que com o seu incrível grupo de pesquisa que tive o privilégio de fazer parte, que comecei a conhecer e gostar da pesquisa e apreciar o modo como ela é conduzida.

Não poderia deixar de agradecer também as incríveis pessoas que conheci ao longo desse mestrado, de modo especial á: Andrea, Hellen, Juliane, Pamela e Shirley, que compartilharam comigo todos os sentimentos da pós graduação, espero que posamos continuar caminhando juntas.

É claro que não poderia esquecer de agradecer com bastante carinho as minhas amigas mais íntimas, Camila e Sarah, que compartilharam de todos os meus momentos até aqui desde a escola e tenho certeza que ainda continuaremos a compartilhar por muito mais tempo.

Agradeço à Universidade Nove de Julho pela oportunidade de fazer esse curso, conhecer essas pessoas e ampliar meu conhecimento. Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro, que me possibilitou dedicar exclusivamente à finalização do meu Mestrado em Medicina.

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico caracterizado pela recorrência de crises epilépticas não provocadas, estudos relatam que quase 1% das pessoas experimentam uma convulsão durante suas vidas e afeta em torno de 65 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a doença neurológica mais comum, crônica e perigosa a epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) onde o paciente pode apresentar crises focais simples ou complexa que se originam do lobo temporal, alguns mecanismos que levam a esta desordem incluem o desbalanço dos Canais de íons dependentes de voltagem, a ativação da fosforilação de AKT através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A Epilepsia apresenta grande relevância clínica em razão de alta incidência e gravidade, além de sua razão social que em casos graves chega a impedir o convívio social do paciente. A neuroproteção é um processo desejável em muitos distúrbios neurológicos, mas os mecanismos complexos envolvidos neste campo não são completamente compreendidos. As mitocôndrias são os principais reguladores do metabolismo energético celular (EM), através da produção de Adenosina trifosfato (ATP), as Proteínas Desacopladoras (UCPs) estão presente na membrana interna das mitocôndrias e atuam regulando a cadeia de transporte de elétrons, diminuindo assim o impulso para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aliviando assim o dano celular durante as crises epiléticas. O modelo de epilepsia por pilocarpina se assemelha a ELTM humana sendo caracterizada pela prevalência de *estatus epilepticus* (SE) e incitar o aumento da produção de EROs, além de causar uma potente morte celular por excitotoxicidade induzida por convulsões, em decorrência da produção excessiva de EROs, e o comprometimento de mitocôndrias é notadamente observado neste modelo. O tratamento com Oligonucleótideos anti-sense (ASO) foi empregado nesse trabalho, visando aproveitar sua característica de impedir a produção da proteína do gene que tem como alvo, através do bloqueio da tradução dos mRNA, essa ferramenta foi utilizada nesses animais para impedir a produção de UCP2 com o intuito de esclarecer o papel da UCP2 no distúrbio epilético, descobrindo, assim se a UCP2, atua inibindo mecanismos de fatores apoptóticos e estresse oxidativo, para aumentar a sobrevida dos neurônios após o início da SE. O presente estudo teve como objetivo principal investigar o papel do UCP2, um regulador negativo de EROs, na neuroproteção após

insulto colinérgico, mimetizado pela ação da pilocarpina. Para chegarmos na decisão de em qual momento da epilepsia teria a expressão de UCP2, a fim de bloqueá-la, foi feito um protocolo de observação das fases da doença para determinar em qual delas há expressão de UCP2, seguido de outro grupo experimental, onde avaliamos o curso temporal a fim de esclarecer o momento onde teríamos o pico de sua expressão. Depois desses dois processos finalmente determinamos o melhor momento para a administração de ASO. Nossos dados demonstraram que o aumento da expressão de UCP2 no hipocampo de ratos tem início após 3 dias da indução do status epilepticus (SE), atingindo o pico de expressão em 5 dias após SE, que corresponde a fase latente da epilepsia, após esse período os níveis retornam aos valores basais. Concomitantemente, os níveis de expressão de fosfo-AKT foram maiores no hipocampo durante a fase silenciosa precoce (5 dias após SE). Adicionalmente, demonstrou-se que o bloqueio de UCP2 por oligonucleótidosanti-sentido (ASO) em ratos SE diminuiu com sucesso tanto o conteúdo de mRNA e de proteína de UCP2. O tratamento com ASO nesses animais aumentou os fatores pró-apoptóticos mitocondriais, a atividade da caspase 3, a expressão de citocinas inflamatórias, as atividades das enzimas antioxidantes e a formação de EROs. Em conclusão, os presentes resultados destacam as ações neuroprotetoras da UCP2, atuando via inibição de fatores apoptóticos e estresse oxidativo, para aumentar a sobrevida dos neurônios após o início da SE.

Palavras Chave: Epilepsia - UCP2 - ERO - ASO - Pilocarpina

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic brain disorder characterized by the recurrence of unprovoked epileptic seizures, studies report that nearly 1% of people experience a seizure during their lives and affects around 65 million people worldwide, with the most common neurological disease , chronic and dangerous epilepsy of the Mesial Temporal Lobe (ELTM) where the patient may present simple or complex focal seizures that originate from the temporal lobe, some mechanisms that lead to this disorder include the imbalance of voltage-dependent ion channels, activation of AKT phosphorylation through the production of reactive oxygen species (EROs). Epilepsy has great clinical relevance due to its high incidence and severity, as well as its social reason which, in severe cases, impedes the patient's social interaction. a desirable process in many neurological disorders, but the complex mechanisms involved in this field are not completely understood. Mitochondria are the main regulators of cellular energy metabolism (MS), through the production of Adenosine triphosphate (ATP), the Decoupling Proteins (UCPs) are present in the inner membrane of the mitochondria and act regulating the electron transport chain, stimulus for the production of reactive oxygen species (ROS), thus relieving cellular damage during epileptic seizures. The model of pilocarpine epilepsy resembles human ELTM being characterized by the prevalence of epleticus (SE) status and incite the increase of the ROS production, besides causing a powerful cellular death by excitotoxicity induced by convulsions, due to the excessive production of ROS , and mitochondrial impairment is notably observed in this model. The anti-sense Oligonucleotide (ASO) treatment was used in this work, in order to take advantage of its characteristic of preventing the production of the protein of the gene that targets, through blocking the translation of the mRNA, this tool was used in these animals to prevent the production of UCP2 in order to clarify the role of UCP2 in the epileptic disorder, thus discovering that UCP2 acts to inhibit mechanisms of apoptotic factors and oxidative stress to increase survival of neurons after the onset of ES. The present study had as main objective to investigate the role of UCP2, a negative regulator of EROs, in the neuroprotection after cholinergic insult, mimicked by the action of pilocarpine. In order to arrive at the decision on which time

of epilepsy the expression of UCP2 would have, in order to block it, a protocol of observation of the stages of the disease was made to determine in which one of them there is UCP2 expression, followed by another experimental group, where we evaluated the temporal course in order to clarify the moment in which we would have the peak of its expression. After these two processes we finally determine the best time for ASO administration. Our data demonstrated that increased UCP2 expression in the rat hippocampus begins after 3 days of the induction of the status epilepticus (SE), reaching peak expression at 5 days after SE, which corresponds to the latent phase of epilepsy, after that period levels return to baseline. Concomitantly, phospho-AKT expression levels were higher in the hippocampus during the early silent phase (5 days after SE). In addition, UCP2 blocking by anti-sense oligonucleotides (ASO) in SE mice has been shown to successfully decrease both the mCPNA and protein content of UCP2. The treatment with ASO in these animals increased the pro-apoptotic mitochondrial factors, the activity of caspase 3, the expression of inflammatory cytokines, the activities of the antioxidant enzymes and the formation of ROS. In conclusion, the present results highlight the neuroprotective actions of UCP2, acting through inhibition of apoptotic factors and oxidative stress, to increase survival of neurons after ES onset.

Keywords: Epilepsy - UCP2 – ROS - ASO - Pilocarpine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho do protocolo experimental I ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Figura 2. Desenho do protocolo experimental II ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Figura 3 a. Desenho do protocolo experimental III ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental. Essa primeira parte corresponde ao protocolo do anti-sense.

Figura 3 b. Desenho do protocolo experimental III ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental. Essa segunda parte corresponde aos dias decorridos de todos os animais no protocolo da pilocarpina.

Figura 4. PCR quantitativo em tempo real para o mRNA da UCP2 após SE. Um aumento na expressão gênica de UCP2 foi encontrado na fase silenciosa do modelo de epilepsia por pilocarpina. * p <0,001 de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

Figura 5. Expressão no curso do tempo do mRNA de UCP2 após SE. A expressão de UCP2 aumenta após SE na fase silenciosa precoce da epilepsia induzida por pilocarpina. * p <0,001 vs. Controle, 1h, 5h, 24h, 7d, 45d, 90d; #p <0,05 vs. SE 3d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

Figura 6. Expressão de fosfo-AKT nas regiões do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado de grupos agudos (5 horas após SE, 5H), silenciosos (5 dias após SE, 5D) e crônicos (60 dias após SE, 60D). **A)** Formação de hipocampo de rato com coloração de Nissl destacando as áreas de CA1, CA3 e giro dentado. **B)** Fotomicrografias das regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo de ratos após SE processado para imunohistoquímica fosfo-AKT (p-AKT) e respectivos controles. Animais tratados com pilocarpina no 5º dia após SE (fase silenciosa) apresentaram

maior expressão de p-AKT em comparação a qualquer outro grupo. Aumento de X100 (objetiva de 10x).

Figura 7. Expressão de UCP2 do hipocampo na presença ou ausência de tratamento anti-sense (ASO) em ratos SE. **A)** Tratamento com ASO diminuiu a expressão de mRNA da UCP2 em ratos 5 dias após o início da SE. & p <0,001 vs. SE 5d; * p <0,001 vs. Controle e 5d SE ASO; **B)** A expressão da proteína UCP2 apresentou níveis elevados 5 dias após SE. O tratamento com ASO diminuiu com sucesso a expressão da proteína UCP2 5 dias após SE. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

Figura 8. Modulação da expressão de marcadores pró-inflamatórios no hipocampo com ou sem tratamento com ASO. **A)** o início do SE aumentou a expressão de mRNA dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-6), enquanto o tratamento com ASO resultou em maior expressão de mRNA desses marcadores. **B)** O início da SE e o tratamento com ASO levam ao incremento do conteúdo de proteínas IL-1 β e IL-6. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

Figura 9. Modulação da apoptose na presença ou ausência de tratamento com ASO em ratos SE. **A)** SE diminui a expressão de mRNA de bcl-2, enquanto aumenta a expressão de mRNA de fator pró-apoptótico ruim. O tratamento com ASO aumentou a má expressão em ratos SE, com baixos níveis de expressão do mRNA do fator bcl2 anti-apoptótico. **B)** Bcl2: razão ruim, indicando que o SE seguido de tratamento com ASO estimulou a apoptose. **C)** A atividade da caspase 3 é aumentada 5 dias após SE, enquanto um aumento acentuado da atividade foi observado quando os ratos SE foram submetidos ao tratamento com ASO. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

Figura 10. Estresse oxidativo dentro do hipocampo de ratos SE com e sem tratamento com ASO. (A) Níveis de MDA (B) Atividade da proteína carbonilada (C) SOD, (D) e atividade da catalase. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de sequências de primers pPCR em tempo-real.

Tabela 2. Imunorreatividade para fosfo-AKT no giro CA1, CA3 e dentado no modelo de epilepsia induzido pela administração de pilocarpina. A coloração de fosfo-AKT foi pontuada por dois observadores independentes como se segue: + baixo; ++ moderado; +++ alta intensidade baseada em fotomicrografias apresentadas na Figura 3. Ratos tratados com salina controle; Aguda - 5 horas após o status epilepticus (SE); Silencioso - 5 dias após SE; Crônica - 60 dias após SE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCG: Tonico-cônica generalizada (crises)

UCPs: Proteína desacopladora

UCP1: Proteína desacopladora 1

UCP2: Proteína desacopladora 2

UCP3: Proteína desacopladora 3

UCP4: Proteína desacopladora 4

UCP5: Proteína desacopladora 5

ETC: cadeia de transporte de elétrons

EM: metabolismo energético

ATP: adenosina trifosfato

EROs: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

GFAP: Filamento Intermediário da Glia

SE: Status Epilepticus

ELMT: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

PA: Potencial de Ação

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase

AKT: Quinase B

ATP: Adenosina Trifosfato

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

SNC: sistema nervoso central

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar de Filamento Intermediário da Glia

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

SE: Status Epilepticus

Bcl-2: Linfoma de Células B-2 (Bcl-2),

Bax: isoforma pró-apoptótica da Bcl-2

PDSN: Protodioscina

casp3: Caspase3

NSPC: Células TroncoPprogenitorasNneurais

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-6: Interleucina-6

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

SOD: Superóxido Dismutase

CAT: Catalase

GP: Glutatona peroxidase

GR: Glutatona Redutase

ASO: Oligonucleotídeo Antisence

aCSF: fluido cerebrospinal artificial

PBS: Solução Salina tamponada com Fosfato

ABC: Avidina-Biotina-Peroxidase

DAB: Diaminobenzidina

TR: Transcrição reversa

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

DNP: Hidrazonadinitrofenila estável

E.P.M.: Erro Padrão da Média

LISTA DE SÍMBOLOS

α : Alfa

β : Beta

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius

cm: Centímetro(s)

g: Gramas

mg: Miligrama(s)

mg/g: Miligrama por grama

mL: Mililitro

ml/kg: Mililitro por quilograma

mL/rato: Mililitros por rato

1 Unidade/ μg : 1 unidade por micrograma(s)

μL : Microlitro(s)

ng/dL: Nanograma(s) por decilitro

ng/mL: Nanograma(s) por miligrama

pmol/nL: Picomol por Nanolitro

M: Massa Molar

mM: Mili Molar

Sumário

1. Introdução	19
1.1. Epilepsia	19
1.2. Proteínas desacopladoras (UCPs).....	21
1.3. Epilepsia induzida por pilocarpina	23
1.4. Oligonucleótideos Anti-sense (ASO).....	24
1.5. Apoptose	26
1.6. Inflamação e estresse oxidativo na epilepsia.....	28
2. Justificativa	31
3. Objetivo	32
3.1. Objetivos específicos	32
4. Métodos	33
4.1. Grupos experimentais	33
4.1.1. Protocolo I: Expressão de UCP2	33
4.1.2. Protocolo II: Curso temporal	35
4.1.3. Protocolo III: Silenciamento da UCP 2	36
4.2. Imuno-histoquímica	39
4.3. Expressão quantitativa de mRNA.....	40
4.4. Silenciamento UCP2	41
4.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	42
4.6. Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	42
4.7. Análise estatística	43
5. Resultados	44
6. Discussão	56
7. Conclusão	62
8. Referências bibliográficas	63

1. Introdução

1.1. Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico caracterizado pela recorrência de crises epilépticas não provocadas (BRAGATTI, 2013; ENGEL, 2008, 1-13 p.), através de distúrbio na propagação do sinal elétrico, descarga neuronal ou despolarização, nos neurônios podendo provocar, contrações e espasmos involuntários principalmente nos músculos esqueléticos, acompanhados ou não de perda de consciência.

Estudos relatam que a probabilidade de desenvolver epilepsia ao longo da vida é de 3% e afeta em torno de 65 milhões de pessoas em todo o mundo (0,5%-1,0%), sendo a doença neurológica mais comum, crônica e perigosa. Segundo uma meta-análise de estudos internacionais, a prevalência de epilepsia é de 6,4 casos por 1.000 pessoas e a incidência anual cumulativa é de 67,77 casos por 100.000 pessoas-ano. Sendo que países de baixa e média renda possui uma prevalência ativa maior. (DEVINSKY, 2018; FIEST, 2016, 2017; JETTÉ, 2016; SCORZA, 2019). No Brasil, foi encontrado uma prevalência de 11,9:1.000 na Grande São Paulo e de 16,5:1.000 para epilepsia ativa em Porto Alegre, sendo que as incidências são maiores no primeiro ano de vida e após aos 60 anos de idade. (KWAN, 2004; MARINO, 1986; NUNES, 2011).

O processo patológico da epilepsia pode se dar pela deficiência ou mal funcionamento de canais dependentes de voltagem como os canais de Na^+ , Ca^+ , k^+ e Cl^- . O bom funcionamento desses canais implica na transmissão adequada de impulsos nervosos e transmissão de sinal ao longo da rede neural, e quando essa função se perde ou é prejudicada por algum fator genético ou adquirido, uma das manifestações do problema pode ser o surgimento de convulsões, levando à um estado epilético.

A epilepsia é uma patologia complexa e que pode incluir três períodos: um período agudo com fatores iniciais como, malformações cerebrais congênitas, lesões cerebrais estruturais adquiridas, incluindo status epilepticus, um período latente caracterizado pela ausência de convulsão, mas frequentemente com a ocorrência de um estágio crônico com crises recorrentes espontâneas e picos interictais, que são

surtos periódicos e muito breves de atividade neuronal que são observados no eletroencefalograma de pacientes com epilepsia crônica (PANUCCIO G, 2010).

As epilepsias podem ser divididas em eixos topográficos e etiológicos, sendo no primeiro, subdivididas em generalizadas, que se manifestam por crises epilépticas, cuja origem envolve os dois hemisférios simultaneamente, são acompanhadas de alteração de consciência como: crises de ausência, crises mioclônicas, movimentos involuntários na parte superior do corpo e membros e crises tônico-clônicas generalizadas (TCG), contração súbita dos músculos de forma involuntária em ambos os lados do corpo sendo mais comuns durante o sono. A outra subdivisão da epilepsia em eixo topográfico é a epilepsia focal onde as crises epilépticas iniciam em uma área específica do cérebro e seus sintomas dependem desse local de origem e velocidade de propagação desse impulso elétrico anormal, podendo ser uma crise focal simples, ou seja, sem perda de consciência ou uma crise focal complexa, com comprometimento da consciência durante o episódio. No entanto seja a crise simples ou complexa, quando propagada por todo o córtex cerebral pode levar a uma TCG sendo então denominada crise focal secundariamente generalizada. (BANCAUD, 1981; ELGER, 2008).

No eixo etiológico temos as epilepsias idiopáticas, sem lesão, são geralmente relacionadas à idade, epilepsias sintomáticas, com lesão, ou criptogênicas que são presumivelmente sintomáticas, mas sem uma lesão nos exames de imagem disponíveis no momento. As lesões sintomáticas geralmente relacionadas á essas epilepsias são: esclerose temporal mesial, neoplasias cerebrais primárias, anomalias vasculares e malformações do desenvolvimento corticocerebral. (BETTING, 2008; CASCINO, 2008; FRITZ, 1989).

Ainda nessa subdivisão temos a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) onde o paciente pode apresentar crises focais simples ou complexa que se originam das estruturas mesiais do lobo temporal, esse tipo de epilepsia focal que apresenta grande relevância clínica em razão de alta incidência e gravidade.

Pacientes com ELTM apresentam crises focais simples ou complexas que se originam nas estruturas mesiais do lobo temporal, geralmente precedidas por auras. (FERNANDES, 2013) Auras correspondem a manifestações sensitivo-sensoriais,

vegetativas ou psíquicas puramente subjetivas e que ocorrem em 20% a 90% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal.

A condição de epilepsia tem consequências neurológicas, cognitivas, psicológicas e sociais importantes que impacta diretamente na qualidade de vida dos afetados, se estima que em aproximadamente um terço dos pacientes a medicação antiepileptica não é o suficiente para controlar os episódios convulsivos. (KWAN, 2000; SCORZA, 2019).

1.2. Proteínas desacopladoras (UCPs)

As mitocôndrias são os principais reguladores do metabolismo energético celular (EM), através da produção de Adenosina trifosfato (ATP), os fatores que são reduzidos, como NADH e FADH₂, obtidos pela oxidação de moléculas de carboidratos, proteínas e lipídeos, fornecem os elétrons para a cadeia de transporte de elétrons (ETC) tendo como resultado final a redução do oxigênio em água, a liberação de ATP, NAD e FAD. Essa transferência de elétrons através da ETC controla o influxo de prótons H⁺ no espaço intermembranar, formando assim uma força motora de prótons, cuja energia é usada pela ATP sintase para a fosforilação de ADP.

As proteínas desacopladoras (UCPs) desempenham um papel crucial na ETC atuando agudamente no controle do vazamento de prótons, que ocorre devido ao fato de que parte da energia liberada na oxidação de substratos energéticos é dissipada em forma de calor em vez de ser convertida em ATP, dessa forma as mitocôndrias têm sido descritas como um local potencial para os eventos intrincados que resultam em distúrbios patológicos e morte celular, uma vez que são amplamente envolvidas na manutenção da homeostase celular. (BUCIELLO, 2015; DIVAKARUNI, 2011; KRAUSS, 2006).

As UCPs são proteínas transportadoras de ânions e se encontram na membrana interna da mitocôndria e são responsáveis pela diminuição do gradiente de prótons transmembrana, controle do vazamento de prótons, essa atividade reduz o impulso para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), consequentemente diminuindo a morte celular. (BARNSTABLE, 2016; LAPP DW, 2014).

Até o momento, cinco isoformas da UCP foram descritas com base na homologia da sequência de UCP1, que é predominantemente expressa em tecido adiposo marrom onde está associada a uma função termogênica atuando como o gerador de calor sem tremores para manter a temperatura corporal em recém-nascidos e mamíferos durante a hibernação, através da catálise do vazamento de prótons. A UCP3, por sua vez, é expressa principalmente no músculo esquelético, mas também pode ser encontrada no tecido adiposo marrom e no músculo cardíaco, no entanto seus mecanismos de ativação, bem como seu papel fisiológico ainda não foram esclarecidos. (BOYER BB, 1998; BUCIELLO, 2015; KIM-HAN, 2005).

Em relação as UCP4 e UCP5 como têm baixa homologia com a UCP1, pouco se sabe a respeito de suas funções, embora estudos recentes vem sugerindo que a UCP4 pode se relacionar negativamente com a doença de Alzheimer, porém esse ponto, não está totalmente esclarecido (KRAUSS, 2006; MONTESANTO, 2016).

A UCP2, que é o foco desse estudo, normalmente é expressado em células imunes e neuronais, sendo regulada pela lesão do sistema nervoso central (SNC). A geração de EROs mitocondriais em condições patológicas é dependente do potencial de membrana mitocondrial, e apesar de evidências sugerirem que a super expressão de UCPs pode ser neuroprotetora, se deve lembrar que em algumas situações, a ativação da UCP pode resultar em um equilíbrio entre efeitos benéficos e prejudiciais, podendo ser a expressão da UCP2 pró-apoptótica ou anti-apoptótica, dependendo da regulação transcricional e bioquímica das regiões cerebrais afetadas. A UCP2 causa desacoplamento moderado, reduzindo o vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons e, assim, diminui a geração de superóxido, bem como regulando o potencial de membrana que é um importante fator para a absorção de Ca^{2+} , já que muitas vias dependentes de Ca^{2+} estão envolvidas em morte celular neuronal. (DEJEAN, 2004; KIM- HAN, 2005; MILLS, 2002).

Ainda a respeito da atuação dinâmica da UCP2 no SNC, embora em repouso a UCP2 seja encontrada principalmente em neurônios, dados recentes indicam que os níveis de proteína nos astrócitos aumentam rapidamente em resposta ao estresse celular (HASS, 2016; LAPP DW, 2014). Os astrócitos são o tipo de célula mais abundante no SNC, promovem a sobrevivência neuronal regulando os níveis de neurotransmissor, metabólitos e antioxidantes no ambiente extracelular que durante desordens de no SNC, podem adotar um fenótipo pró-inflamatório reativo, caracterizado pela regulação

positiva da proteína ácida fibrilar de filamento intermediário da glia (GFAP), redução na captação de neurotransmissores, alterações metabólicas e liberação de citocinas pró-inflamatórias (HASS, 2016; SOFRONIEW, 2009). Também é sugerido que a UCP2 está associada ao aumento dos níveis de glutatona nos tecidos, através da cisteína produzida pelos astrócitos e neurônios, que é um poderoso sequestrador de EROs (HASS, 2016; VOZZA, 2014).

Em um estudo demonstrando a atuação da UCP2 em células imunes, conduzido por, Basu-Ball e colaboradores (2011) onde se verificou que durante a uma infecção pelos parasitas da Leishmania, que infecta o macrófago do hospedeiro e diminui a produção de EROs para se estabelecer dentro da célula, a UCP2 sofre uma forte regulação positiva, facilitando a permanecia do parasita. No entanto quando observada a expressão amentada de UCP2 em células neuronais em: Aterosclerose, isquemia cerebral e encefalomielite autoimune experimental, foi verificado que o controle de formação de EROs nesses casos fornece uma neuroproteção. (HAINES, 2012; MOUKDAR, 2009; VOGLER, 2006).

1.3. Epilepsia induzida por pilocarpina

Como apresentado anteriormente, a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é um tipo de epilepsia focal que apresenta grande relevância clínica. Um dos modelos que vem sendo amplamente utilizado para mimetizar a ELTM, é o modelo induzido por pilocarpina. (CAVALHEIRO, 1995).

A pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, quando administrado por via sistêmica em altas doses em roedores (~360 mg/kg), induz um quadro de alterações comportamentais com manifestação de crises motoras límbicas que surgem aos 15-30 minutos após injeção, e podem perdurar por horas, status epilepticus (SE), caracterizando o período agudo do modelo (TURSKI, 1983; Cavalheiro, 1995, 2006). Além do mecanismo das convulsões neurotóxicas induzidas pela pilocarpina está bem estabelecido, é atualmente hipotetizado que a excitotoxicidade infligida pelo status epilepticus (SE) induzida pela pilocarpina resulta em aumentos patológicos nas lesões neuronais em resposta à produção excessiva de EROs (GOUVEIA, 2011; SILVA, 2008).

Como mencionado anteriormente estudos usando altas doses de pilocarpina (acima de 350 mg / kg i.p.) mostraram a existência de dano oxidativo subjacente ao SE e aumentos das atividades das enzimas antioxidantes foram encontradas (FREITAS R.M, 2004; TEJADA S, 2006). O cérebro é mais vulnerável aos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo do que outros tecidos devido a várias razões, uma delas é seu alto consumo de oxigênio, outras razões são o fato de conter grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas que são suscetíveis a sofrer de peroxidação lipídica além dos metais oxidáveis e ter comparativamente menos capacidade antioxidante do que outros tecidos (BELLISSIMO M.I, 2001, FREITAS R.M, 2004; SAH R, 2002)

Nesse modelo de Epilepsia por pilocarpina, também é observado que a neurogênese, formação de novos neurônios para o reparo de lesões cerebrais, essa função é comprometida pelas crises (FERNANDES, 2013).

Outros estudos revelam que momentos após um evento inicial (crises agudas ou status epilepticus) ocorrem aumentos da neurogênese no hipocampo e recrutamento anormal de neurônios recém-gerados. Assim como nos pacientes com ELTM a neurogênese diminui substancialmente na fase crônica da epilepsia, análises sugerem que essa diminuição é devido a ativação da cascata inflamatória decorrente das crises espontâneas frequentes (Fernandes, 2013; PARENT, 2006).

1.4. Oligonucleótideos Anti-sense (ASO)

Nos últimos anos, houve um ressurgimento de oligonucleotídeos antisense (ASOs) como ferramentas valiosas para estudar sobre os mecanismos da doença e como terapêutica poderosa para a intervenção de doenças. Parte deste sucesso recente pode ser atribuído a melhorias feitas na estrutura do ASO e modificações químicas que tornaram os ASOs mais vantajosos e eficientes como estratégias potenciais para o tratamento da doença. A biotecnologia anti-sense envolve o impedimento estérico da progressão do ribossoma e / ou da inibição da transcrição de uma dupla fita alvo de mRNA / ASO, através da divisão do transcrito , ou seja separação da dupla fita do

mRNA alvo, esse processo é mediado pela ativação da RNase H que degrada a cadeia de RNA de um duplex de RNA-DNA (HEGARTY JP, 2017).

O campo da terapêutica anti-sentido começou com a constatação de que um oligodesoxinucleído tridecero complementar a 13 nucleotídeos do RNA do 35S vírus do sarcoma de Rous inibiu a tradução do mRNA viral e a subsequente produto de vírus (ZAMECNIK, 1978).

Os ASOs são tipicamente compostos por 8-50 nucleotídeos de comprimento. Os fosfodiésteres não modificados de ASOs são rapidamente atacados por nucleases celulares. O aumento da afinidade do oligonucleótideo alvo está correlacionado com o aumento da atividade anti-sense celular. Para obter uma aplicação clínica apreciável, uma estrutura química ASO precisa ser otimizada por uma combinação de glicose, estrutura, nucleobase e modificações nos terminais 3 e 5 (KHVOROVA, 2017). Os ASOs podem exercer seus efeitos de direcionamento de genes através de diferentes mecanismos de ação, tornando-os suscetíveis a uma variedade de alvos moleculares e processos de doenças.

As doenças neurodegenerativas, especificamente, estão em necessidade iminente de uma terapia eficaz, e as ASOs oferecem uma estratégia possível. Considerando os notáveis sucessos de ensaios clínicos que, até hoje, foram alcançados em doenças como a atrofia muscular espinhal e a esclerose lateral amiotrófica, pesquisadores e pacientes estão entusiasmados com a aplicação de ASO nas doenças neurodegenerativas. Muitas doenças neurodegenerativas são coletivamente caracterizadas pela disfunção ou acúmulo anormal de proteínas tóxicas, onde oferece um bom campo para os ASOs (SCHOCH KM, 2017).

Entretanto antes que os ASOs possam exercer seus efeitos moduladores de genes, eles devem superar as barreiras de membranas e trafegar para locais subcelulares, tipicamente o núcleo, esses obstáculos podem ser vistos como um limitante da atividade do ASO.

Para que os ASOs sejam eficazes, eles devem se entregues nas regiões ou células afetadas em concentrações apropriadas. Além de, serem estáveis e manter a eficácia ao longo do tempo para o tratamento. Doenças do SNC frequentemente apresentam problemas que limitam a entrega eficiente e eficaz de medicamentos. Mais

notavelmente, a barreira hematoencefálica restringe a entrada de certas moléculas com base no tamanho, carga ou solubilidade (PARDIGGE, 1998).

Os ASOs de fita única se ligam ao RNA alvo por meio do emparelhamento de bases que, dependendo do design do ASO e do alvo, podem acionar mecanismos distintos de ação pelos quais o ASO degrada ou modifica seu alvo.

Um dos mecanismos pelo qual o ASO chega no seu alvo é a degradação mediada pela RNase H por uma clivagem seletiva do pré-mRNA. Uma vez que ASOs têm 2 modificações ('2-5') a RNase H requer um 2'- O livre , nucleotídeos anti-sense gapmers devem ser inseridos, Gapmers consistem de uma região central que suporta a atividade de RNase H com flanqueando extremidades quimicamente modificadas que protegem o ASO de nucleases (EVERS M.M, 2015; JULIANO R.L, 2016).

O outro mecanismo pelo qual o ASO chega em seu alvo é a modulação de processamento do pré-mRNA nuclear. Os ASOs podem ter como alvo regiões específicas como de junção de 5' / 3' ou locais de aprimoramento / silenciador de emenda exônicos / intrônicos (ESEs ou ISEs, ESSs ou ISSs) levando a inclusão de um exon (EVERES M.M, 2015).

A aplicação de ASOs para o tratamento de doenças neurodegenerativas mostrou grande sucesso em modelos de camundongos de doença, permitindo que os ASOs sejam aplicados de forma constante a doenças humanas por meio do desenvolvimento de estudos clínicos. ASOs estão atualmente sendo aplicadas a várias doenças neurodegenerativas, mas têm sido mais importantes no tratamento da atrofia muscular espinhal, completando o status da Fase III e alcançando a aprovação do medicamento pela FDA no ano passado. Além da atrofia muscular o ASO tem sido implicado na esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington, estando em fases iniciais. (SARDONE V; SCHOCH KM, 2017).

1.5. Apoptose

Embora tenha havido progresso no entendimento da ocorrência de epilepsia, os pesquisadores ainda precisam desenvolver biomarcadores confiáveis ou marcadores substitutos para lesões epileptogênicas (SAHOO SS, 2013). Sabe-se que as crises

epiléticas têm um grande potencial de gerar apoptose nas células neuronais, dessa forma se torna importante estudar os mecanismos pelo qual esse processo ocorre.

A apoptose é um processo de morte celular desencadeado por fatores internos e externos, e não é necessário apenas para manter a função fisiológica normal, mas também intimamente associado à ocorrência de certas doenças (KUMAR A, 2015). O mecanismo relacionado à perda de neurônios pode ser através de vários receptores, que quando ativados levam a uma série de mudanças bioquímicas no interior das células causando sua morte.

A protease da caspase é uma via de transdução comum que induz a apoptose na epilepsia (RINWA P, 2013). Em particular, a capacidade de sobrevivência das células é influenciada por Bcl-2/ Bax (linfoma de células B-2 (Bcl-2), Bax, isoforma pró-apoptótica da Bcl-2), através da promoção da morte celular em resposta a numerosos estímulos anti-apoptóticos e apoptóticos, através da indução da liberação do citocromo C após sua incorporação na membrana mitocondrial .

Em um estudo de Mao K. e colaboradores (2016), mostrou que os níveis de apoptose celular aumentaram após a indução de epilepsia por pilocarpina nos ratos. No entanto, a regulação positiva da atividade da caspase-3 e os níveis de expressão de Bax / Bcl-2 (linfoma de células B-2 (Bcl-2), Bax, isoforma pró-apoptótica da Bcl-2), foram suprimidos pelo tratamento com piperina, que é um potente antioxidante presente na pimenta, demonstrando assim que apesar da epilepsia elevar o estímulo apoptótico, esse ainda pode ser mediado por antioxidantes exógenos, abrindo assim uma probabilidade de estudos na área, para encontrar uma terapia que reverter a maior parte dos danos neurais da apoptose.

Já no estudo de Song S e colaboradores (2018), na qual os animais que receberam a pilocarpina também foram tratados com protodioscina (PDSN), um anticonvulsivante, os resultados mostraram um declínio na expressão de Bcl-2 no grupo submetido a pilocarpina com um aumento simultâneo nos níveis de Bax e caspase-3, enquanto o grupo tratado com (PDSN) mostrou modulação significativa destas proteínas apoptóticas: Bax e caspase-3 foram inibidos e a expressão de Bcl-2 aumentada no hipocampo.

Outros estudos mostram que uma população restrita de neurônios nascidos após SE, determinada entre outros fatores pela intensidade inicial do SE e consequente

ativação das vias mitocondriais mediadas por caspase3 (casp3), se sobreviver ao SE pode contribuir para reorganização da rede e reconfiguração dos circuitos hipocampos associados à epileptogênese (EKDAHL CT, 2003; JESSBERGER S, 2007). Além disso, ainda sugerem que as caspases desempenham um papel mais amplo relacionado as células tronco/progenitoras neurais (NSPC), do que o inicialmente previsto, as caspases ativas, particularmente casp3, são expressas em diferentes células apoptóticas e não apoptóticas do prosencéfalo (vesículas anterior cerebrais, primitivas do embrião) e podem desempenhar papéis adicionais além da morte celular programada (YAN XX, 2001), contribuindo para a diferenciação de NSPC (FERNANDO P, 2005), dessa forma também é importante ressaltar que o destino do NSPC parece ser influenciado por um balanço entre as proteínas mitocondriais anti e pró-apoptóticas da Bcl-2 cujos níveis de expressão são ditados por vários mecanismos reguladores (SOLA S, 2013; SCHOUTEN M, 2015). A ocorrência e o desenvolvimento da epilepsia estão intimamente associados à regulação imunológica e à inflamação.

1.6. Inflamação e estresse oxidativo na epilepsia

A ocorrência e o desenvolvimento da epilepsia estão intimamente associados à regulação imunológica e à inflamação. A Interleucina-1 β (IL-1 β) é um importante mediador inflamatório em reações agudas ao estresse e danos, e o aumento dos níveis de IL-1 β no cérebro pode aumentar a inflamação do tecido cerebral, causando convulsões (DUNDAR NO, 2013). Foi provado que a inflamação é um fator fundamental no início e manutenção de convulsões. A IL-1 β também é capaz de ativar células endoteliais e neutrófilos, aumentar a expressão de moléculas de adesão, promover a liberação de outras citocinas, como Interleucina-6 (IL-6), e fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos, e causar várias respostas inflamatórias em conjunto com o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), essas citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β TNF- α , demonstram aumentar a excitabilidade e sincronização neuronal, assim induzindo ou agravando convulsões epilépticas (ASHHAB UM, 2013; GUPTA RA, 2015).

Evidências acumuladas destacam o papel da resposta inflamatória na ELTM e sugerem que uma regulação positiva persistente de fatores inflamatórios pode contribuir para a etiopatogênese da ELTM. Acredita-se que a citocina pró-inflamatória IL-1 β esteja envolvida no desenvolvimento e manutenção de convulsões, ao mesmo tempo em que convulsões epilépticas induzem a geração de IL-1 β . Muitos estudos também evidenciam que a IL-1 β pode ativar a PI3K / Akt após a ligação com seus receptores. (RAO RS, 2008; SAYYAH M, 2003; VEZZANI A, 2007).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que raramente é expressa no tecido cerebral normal. Os níveis de TNF- α aumentam rapidamente em vários distúrbios do sistema nervoso central, como isquemia cerebral e epilepsia (TIWARI, 2013). O TNF- α regula a transmissão sináptica, especificamente o TNF- α libertado pelas células da glia. A transmissão sináptica pode ser acelerada através dos receptores AMPA nos neurônios. Através da sua ligação a diferentes receptores e do ajuste da interação com o sistema do ácido glutâmico, a excitabilidade nervosa pode ser afetada, afetando a sensibilidade da ocorrência da epilepsia (KUMAR S, 2007).

Quanto ao estresse oxidativo ele é causado pela liberação excessiva de radicais livres que apesar de participam da patogênese de inúmeras doenças neurodegenerativas (WALDBAUM S, 2010), em situações fisiológicas normais, são importantes para o sistema imune auxiliando na eliminação de infecções.

Recentemente a associação entre estresse oxidativo e epilepsia foi reconhecida, EROs como (O₂⁻, H₂O₂, HO₂) são um resultado obrigatório da fosforilação oxidativa mitocondrial e são normalmente desintoxicados por um elaborado sistema de defesa antioxidante endógenos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GP), glutationa redutase (GR) e numerosos antioxidantes não enzimáticos, quando os níveis de EROs excedem o “tampão” de proteção dessas defesas antioxidantes, as células se tornam oxidativamente estressadas, condição que quando persistente pode causar disfunção celular e eventualmente morte.

Demonstrou-se que as EROs induzem dano em todas as macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (DAL-PIZZOL F, 2000; SAH R, 2002). Os sistemas antioxidantes celulares demonstraram uma grande adaptação ao estresse oxidativo, a fim de evitar o dano oxidativo causado pela superprodução de EROs. Enzimas

antioxidantes são reguladas por EROs e citocinas, juntamente com outros fatores (SHULL S, 1991; WHITE C.W, 1989).

Evidências acumuladas sugerem que o estresse oxidativo não é apenas uma consequência do início da epilepsia, mas também pode estar envolvido na ocorrência de epilepsia. Portanto, os antioxidantes que reduzem o estresse oxidativo recentemente atraíram a atenção no tratamento da epilepsia (KHAJURIA A, 1998). No entanto, foi demonstrado que o dano por estresse oxidativo ocorre em todos os modelos de crises epilépticas (LUNA B, 2014).

2. Justificativa

A epilepsia atinge até 1% da população mundial, sendo 67,3 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo um problema de saúde pública de extrema importância e gravidade, uma vez que aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a medicação mesmo ela sendo adequada. Um paciente epilético pode, dependendo da gravidade, chegar em média a ter até 40 crises epiléticas em um dia, isso torna praticamente impossível o indivíduo manter uma vida normal, impactando diretamente e drasticamente em sua qualidade de vida e convívio social, mas para se buscar alternativas novas e viáveis de tratamento é importante esclarecer a epileptogênese, além dos possíveis mecanismos já descritos na literatura, dessa desordem, por isso a importância de se tentar elucidar o papel da ativação da UCP2, uma vez que a cada dia temos mais trabalhos associando essa proteína mitocondrial a doenças neurais. Uma das formas de descobrir como a UCP2 está envolvida na fisiopatologia da epilepsia é administrar em animais um oligonucleotídeo antisense (ASO), que irá impedir a expressão da proteína UCP2, em um modelo experimental de pilocarpina, que mimetiza a ELTM humana, possibilitando a descoberta de algum possível mecanismo fisiopatológico envolvido na epilepsia associado as funções da UCP2.

3. Objetivo

O objetivo principal desse trabalho foi testamos a hipótese de que a UCP2 pode atuar como um fator de proteção endógeno contra o dano induzido pela epilepsia, usando a administração de oligonucleotídeos antisense (ASO), em modelo experimental de pilocarpina.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Observar as convulsões dos animais.
- ✓ Pontuar usando a escala de Racine por 4 horas, após esse tempo.
- ✓ Avaliar: Expressão quantitativa de mRNA;
- ✓ Analisar as concentrações de UCP2, caspase 3 ativa, bcl-2, bad, TNF α , IL-1 β e IL-6 através de teste ELISA;
- ✓ Analisar o estresse oxidativo através da quantificação da lipoperoxidação (MDA), proteínas carboniladas, catalase e superóxido dismutase.

4. Métodos

4.1. Grupos experimentais

Para a realização completa desse trabalho foram utilizados 79 ratos Wistar machos (200-250 g) que foram divididos em três protocolos experimentais diferentes e os animais foram randomizados de forma aleatória. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho (0034/2012). Toda a cirurgia foi realizada sob anestesia com pentobarbital sódico, e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento.

Todas as investigações seguiram as diretrizes da Universidade para o uso de animais em estudos experimentais e conformaram-se ao Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (publicação NIH nº 85-23, revisada em 1996). Os animais foram mantidos em luz artificial 12:12 h: ciclo escuro com ração para roedores e água a vontade.

Como dito antes foram realizados três protocolos em momentos diferentes conforme descrito a seguir:

4.1.1. Protocolo I: Expressão de UCP2

No primeiro experimento o objetivo foi verificar em que fase da epilepsia (aguda, latente e crônica) ocorre a expressão de UCP2, para isso foram utilizados 30 animais divididos em 6 grupos com um nº de 5 animais por grupo.

Grupo C5h (n = 5): Controle 5 horas, representa o período agudo da epilepsia.

Grupo C5d (n = 5): Controle de 5 dias após a indução da convulsão pela ação da pilocarpina, representa o controle do período latente da epilepsia.

Grupo C60d (n = 5): Controle 60 dias após a indução da convulsão pela ação da pilocarpina, representa o controle do período crônico da epilepsia.

Grupo SE5h (n = 5): Grupo epilético 5 horas após a indução da convulsão pela ação da pilocarpina (indução do SE), representa o período agudo da epilepsia.

Grupo SE5d (n = 5): Grupo epilético de 5 dias após a indução da convulsão pela ação da pilocarpina (indução do SE), representa o período latente, ou silencioso, da epilepsia.

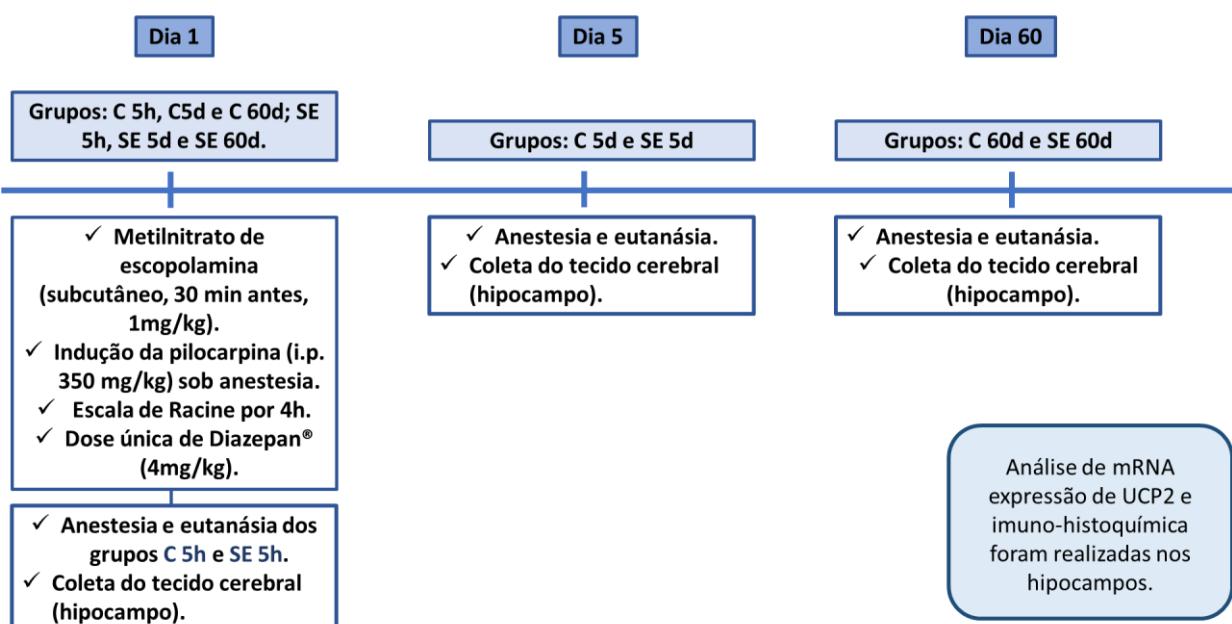
Grupo SE60d (n = 5): Grupo epilético de 60 dias após a indução da convulsão pela ação da pilocarpina (indução do SE), representa o período crônico da epilepsia.

Para o processo de indução do SE os ratos dos grupos SE5h, SE5d e SE60d, foram previamente preparados com uma dose de 1mg/kg de metil nitrito de escopolamina, por via subcutânea 30 minutos antes da intenção da epilepsia, para prevenir efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Após os 30 minutos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico e receberam uma dose única de pilocarpina (350mg/kg, i.p.). E os grupos controles foram preparados da mesma forma que os grupos submetidos a pilocarpina, ou seja, também receberam a dose de metil nitrito de escopolamina, e no lugar da pilocarpina receberam uma injeção de solução salina (i.p.). As convulsões foram observadas e pontuadas usando a escala de Racine (RACINE, 1972) por 4 horas e, em seguida, os ratos que foram submetidos a indução da epilepsia, receberam uma dose de 4 mg/kg de Diazepam para finalizar SE.

Na sequência os animais foram anestesiados e eutanasiados no tempo de seus respetivos grupos e o cérebro foi coletado para as análises da expressão da proteína UCP2 e mRNA e imuno-histoquímica, que foram realizadas na porção correspondente ao hipocampo.

Figura 1. Desenho do protocolo experimental I ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Protocolo I: Expressão de UCP2



4.1.2. Protocolo II: Curso temporal

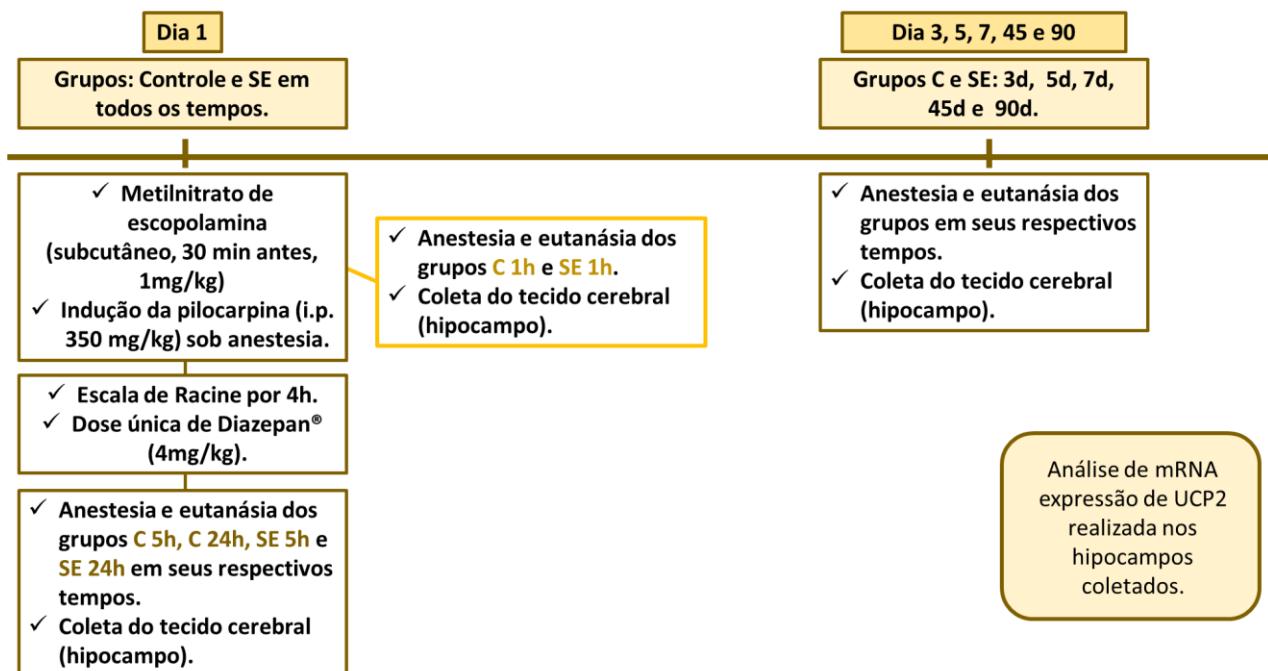
No segundo experimento o objetivo foi verificar a expressão de UCP2 em um curso temporal nas 3 fases do modelo de pilocarpina, para isso foram utilizados 25 animais divididos em um total de 16 grupos:

- | | |
|--|--|
| SE 1 hora: Grupo SE agudo (n= 2) | C 1 hora: Grupo controle, salina (n= 1) |
| SE 5 horas: Grupo SE agudo (n= 2) | C 5 horas: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 24 horas: Grupo SE agudo (n =2) | C 24 horas: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 3 dias: Grupo SE Silencioso (n= 2) | C 3 dias: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 5 dias: Grupo SE Silencioso (n=2) | C 5 dias: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 7 dias: Grupo SE Silencioso (n= 2) | C 7 dias: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 45 dias: Grupo SE Crônico (n=2) | C 45 dias: Grupo Controle, salina (n= 1) |
| SE 90 dias: Grupo SE Crônico (n= 2) | C 90 dias: Grupo Controle, salina (n= 1) |

Quanto ao n de 1 animal faltando, o rato morreu durante o procedimento, que foi realizado da mesma forma que no protocolo I, apenas como o diferencial que os animais eutanasiados no tempo de 1 hora após a indução do SE, não receberam a dose de diazepam, como os demais animais além de não ter sido separada amostra para a imuno-histoquímica, porém as análises de expressão de UCP2 tanto proteica, quanto o mRNA, foram realizadas no hipocampo desses animais.

Figura 2. Desenho do protocolo experimental II ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Protocolo II: Curso temporal



4.1.3. Protocolo III: Silenciamento da UCP 2

No terceiro experimento o objetivo foi verificar qual era o efeito da UCP2 na epilepsia, em que sua presença poderia influenciar na epileptogênese, através oligonucleóideos anti-sense (ASO) foi feito o silenciamento gênico da UCP2, assim impedindo a expressão da proteína. Foram utilizados 24 animais divididos em 3 grupos:

C5d: Grupo controle de 5 dias ($n= 7$) esses animais não foram submetidos a nenhum experimento, apenas anestesiados e eutaniados ao final do protocolo. Imitando o indivíduo saldável.

SE5d: Grupo submetido ao SE ($n= 7$), esses animais foram submetidos ao mesmo protocolo de epilepsia realizado anteriormente e para que ambos grupos sofressem o mesmo estresse cirúrgico esses animais também receberam injeções de solução PBS em vez do anti-sense. Imitando o indivíduo epilético “normal”.

SE ASO5d: Grupo submetido ao SE e ao silenciamento gênico (N= 10), protocolo de epilepsia foi realizado do mesmo modo que nos experimentos anteriores e grupo SE5d, sendo que além da pilocarpina esses animais foram submetidos ao silenciamento gênico. Imitando o indivíduo epilético com ausência da proteína UCP2.

Para que fosse possível a administração do oligonucleótideos anti-sense (ASO) com maior eficiência foi realizado, no grupo SE ASO5d, uma craniotomia para a implantação da uma cânula (calibre 23), para isso os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina (35 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente), via i.p., depois tiveram a cabeça raspada no lugar da implantação da cânula e colocadas em uma estrutura estereotáxica e seus olhos foram protegidos e hidratados com Ocry-gel. Foi feita uma incisão no couro cabeludo da linha média e o crânio foi exposto e limpo de sangue e periósteo. Posteriormente, uma cânula foi implantada unilateralmente no hipocampo de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (AP: 3,5 mm atrás do Bregma, lateral: 3,1 mm e vertical: 4,5 mm do córtex cerebral (PAXINOS, 1985). Dois parafusos foram colocados no crânio, e cada cânula foi ancorada no lugar com o cimento dentário colocado ao redor da cânula externa e parafusos. Uma barra de aço inoxidável que se estende um pouco além da ponta da cânula foi inserida e deixada no local até a injeção. Todos os ratos receberam ~ 5ml de solução salina, 0,9 % via injeção i.p. para reidratar e ajudar na recuperação da cirurgia. Os animais ficaram em recuperação pós-cirúrgica por 7 dias antes de quaisquer outros procedimentos experimentais. A administração de pilocarpina foi realizada como descrito anteriormente nos grupos SE 5d e SE ASO 5d.

O grupo SE ASO5d recebeu uma micro injeção de 500 pmol/100 nL, através da cânula previamente implantada de ASO que foi dissolvido em fluido cerebrospinal artificial (aCSF), imediatamente antes da administração, que foi aplicado diretamente no subcampo do hipocampo CA3 esse procedimento foi realizado diariamente a partir do dia antes da administração de pilocarpina até 5 dias após SE para que obtivéssemos o efeito do bloqueio da expressão genética da UCP2. Os animais do grupo SE 5d serviram como controle do veículo, portanto receberam a mesma quantidade de aCSF da mesma forma que o grupo alvo.

Figura 3 a. Desenho do protocolo experimental III ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Protocolo III: Silenciamento da UCP2 pt. 1

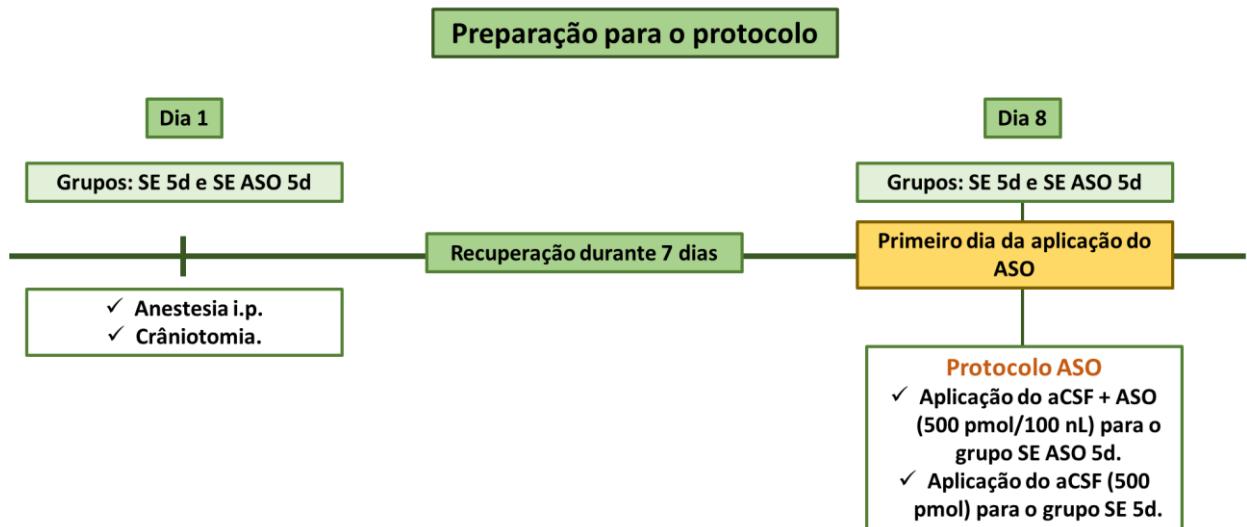
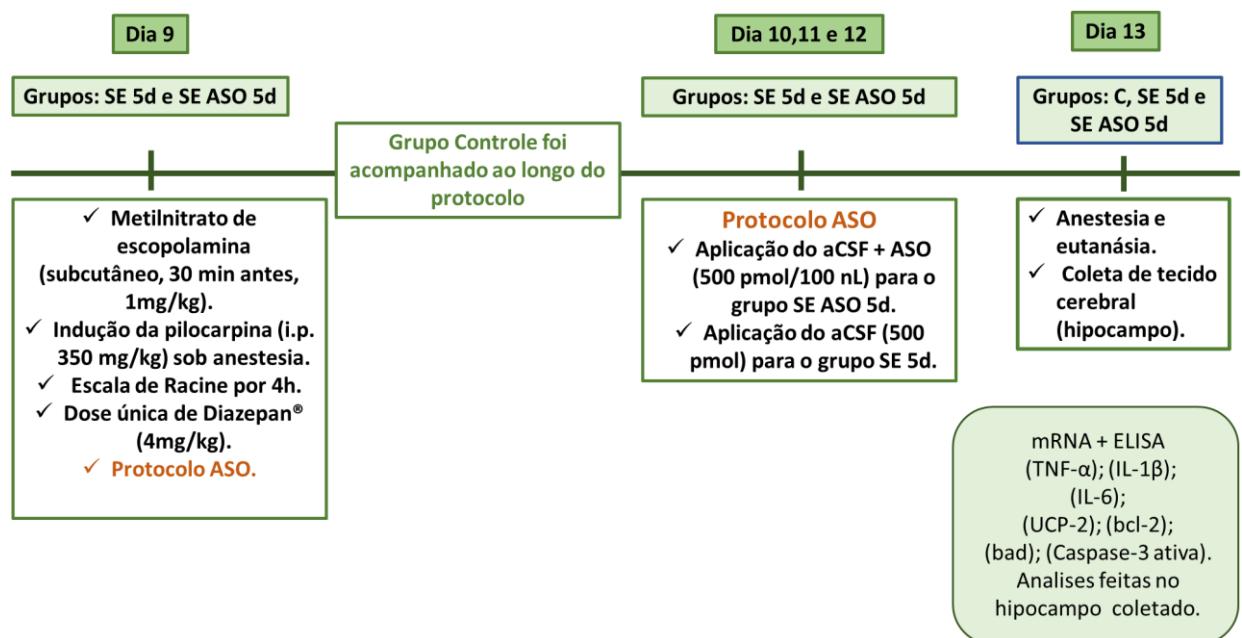


Figura 3 b. Desenho do protocolo experimental III ao longo do tempo decorrido durante essa fase experimental.

Protocolo III: Silenciamento da UCP2 pt. 2



4.2. Imuno-histoquímica

Os animais do protocolo I foram anestesiados com uma dose letal de pentobarbital sódico e submetidos a perfusão transcardíaca com solução de paraformaldeído a 1% (pH 7,4, 15 mL/rato, velocidade de infusão de 15 mL/minuto) seguido por uma solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4, 150 mL/rato, taxa de infusão 15 mL/minuto). Após a perfusão, o cérebro foi cuidadosamente descolado do crânio, fixado em paraformaldeído a 4% por 48 horas e imerso em solução de sacarose a 30% por crioproteção por 48 horas.

Foram realizados cortes coronais de quarenta micrómetros de espessura que foram obtidos utilizando um criostato (HM 505E Micromeria, Zeiss) e armazenados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As fatias foram coletadas ao longo do hipocampo e armazenadas em tampão fosfato 0,1M. A seguir as fatias foram montadas em lâminas revestidas com gelatina para imuno-histoquímica com anticorpo p-AKT (Santa Cruz, 1:200).

As fatias de flutuação livre foram tratadas com peróxido de hidrogénio a 1% durante 10 minutos, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7.4), e depois tratadas com Triton X-100 a 0,4% durante 30 minutos. As fatias foram lavadas com PBS, pré-incubadas com albumina a 10% durante 2 horas e incubadas com anticorpo primário durante a noite a 4 °C. As fatias foram lavadas e depois incubadas à temperatura ambiente com anticorpos secundários apropriados (1:200, imunoglobulina G biotinilada, Calbiochem) durante 2 horas. As secções foram lavadas e incubadas em complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Kit, Vector, VECTASTAIN®) durante 90 minutos, depois lavadas com Tris-HCl (pH 7.6) e finalmente desenvolvidas com diaminobenzidina (DAB) (1 comprimido/15mL de Tris-HCl). Em seguida, as fatias foram lavadas em PBS e montadas em lâminas histológicas. A análise e documentação dos resultados foram realizadas usando um microscópio Leica FW 4500 B (Wetzlar, Alemanha). O grau de coloração foi provisoriamente classificado pelos seguintes critérios: 1+, baixa coloração; 2+, coloração moderada; e 3+, coloração intensa detectada por microscopia de luz × 100 aumento (10x objetivo).

4.3. Expressão quantitativa de mRNA

Os hipocampos descongelados foram homogeneizados em 1 ml de reagente Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) e o RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e para a análise de expressão gênica em PCR em tempo real. Inicialmente, o DNA contaminante foi removido usando DNase I (Invitrogen) em uma concentração de 1 unidade / µg de RNA na presença de 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, contendo 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, depois foi feita a incubação em 95 °C durante 5 min para a descontaminação do DNA. Transcrição reversa (TR) foi realizada em uma reação de 20 µL na presença de 50mM Tris-HCl, pH8,3, 3mM MgCl₂, 10mM ditiotreitol, 0,5mM dNTPs, e 50 ng de primers aleatórios com 200 unidades de enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (Invitrogen). Esta reação foi realizada como se segue:

- ✓ 20 °C durante 10 min, 42 °C durante 45 min e 95 °C durante 5 min.

O cDNA foi nesse ponto amplificado por PCR em tempo real no Sistema de Detecção de Sequências 7500 (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o kit de reação central SYBR Green (Applied Biosystems). A enzima polimerase foi ativada pelo calor durante 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C amplificou o transcrito e os dados foram recolhidos em cada ciclo.

Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada ponto de dados. A expressão do mRNA do gene alvo foi quantificada como um valor relativo comparado com uma referência interna, GAPDH, cuja expressão foi acreditada para não mudar entre as condições experimentais variáveis. Um segundo par de um gene de limpeza (18S rRNA, número de acesso do GenBank Rn18s) foi usado para validar os resultados. Os primers de rato utilizados para a quantificação de mRNA estão na tabela 1.

Tabela 1. Tabela de sequências de primers pPCR em tempo-real.

Gene Alvo (mRNA)	Nº GenBank	Frente (5'-3')	Verso (3'-5')
UCP2	NM_019354.2	5'-CCACAGCCACCGTGAAGTT-3'	5'-CGGA CTTGGCGGTGCTA-3'
bad	NM_017059.2	5' - ACTCCCCCGAGAGGTCTT-3'	5'-AGTTGAAGTTGCCATCAGCAAA-3'
Bcl-2	NM_016993.1	5'-GCTACG AGTGGGATACTGG 3 '	5'-GTGTGCAGATG CCGGTTCA-3'
TNF- α	X66539	5'-AAATGGGCTCCCTATCAGTTC-3'	5'-TCTGCTTGGTGGTTGCTACGAC-3'
IL-1 β	M98820	5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3'	5'-GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC-3'
IL-6	E02522	5'-TCCT ACCCAA CCTCCAATGCTC-3	5'-TTGGAT GGTCTTGGTCCTAGCC-3'
GAPDH	NM_017008	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GCCAACGGCCATCA-3'
18S rRNA	Rn18s	-	-
UCP2 ASO	NM 011671	5 '- TGC ATT GCA GAT CTC A-3'	5 '-TGA GAT CTG CAA TGC A-3'

Um microlitro de reação de TR foi usado para PCR em tempo real. Valores quantitativos para gene alvo e A transcrição do mRNA de GAPDH foi obtida a partir do número do ciclo inicial, em que a intensificação no sinal associado a um crescimento exponencial de produtos de PCR começa a ser detectado. Curvas de fusão foram geradas no final de cada corrida para confirmar a uniformidade do produto. O nível de expressão do gene alvo relativo foi normalizado com base na expressão de GAPDH como um controle de RNA endógeno.

Os valores da expressão das amostras foram determinados subtraindo o valor médio de Ct do gene mRNA alvo do valor médio de Ct do controle interno (GAPDH). O parâmetro $2 - \Delta\Delta Ct$ foi usado para expressar a relação dados de expressão.

4.4. Silenciamento UCP2

A determinação do oligonucleótideos anti-sense (ASO Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi de acordo com a eficácia destes oligonucleótideos na inibição da expressão de UCP2 foi previamente demonstrada em outros trabalhos (SOUZA GR, 2008; DE SOUZA CT, 2007). Os oligonucleótideos anti-sense foram dissolvidos em fluido cerebrospinal artificial (aCSF) imediatamente antes da administração, como dito anteriormente e aplicado no hipocampo sequência de UCP2 depositada no NIH-NCBI (tabela 1).

4.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As concentrações de UCP2, caspase 3 ativa, IL-1 β e IL-6 no Hipocampo dos animais controle, SE e SE-ASO foram quantificadas por ELISA. Os tecidos foram coletados e imediatamente congelados a -80 °C e armazenados até o uso. Para extração de proteína, os tecidos foram homogeneizados no gelo com reagente de extração de tecido (Invitrogen) contendo coquetel de inibidor de protease (Roche, Indianapolis, IN). Após centrifugação a 12.000 rpm a 4 °C por 20 min, o sobrenadante foi analisado quanto à proteína UCP2 por Kit de ELISA específico para roedores, Cusabio® (Wuhan, China), além da atividade da caspase-3 (Caspase-3 / CPP32 kit de ensaio colorimétrico, Biovision, Milpitas, CA), IL-1 β e IL-6 (IL-1 β de rato ou Quantikine de IL-6 de rato; R & D Systems, Abingdon, Reino Unido).

4.6. Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados nos homogenatos de hipocampo de ratos controle, SE e SE-ASO. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida usando um kit comercial colorimétrico (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA) no qual os radicais superóxido foram gerados pela xantina oxidase e hipoxantina e detectados a 450 nm usando um sal de tetrazólio. A atividade da catalase (CAT) foi medida utilizando um kit comercial espectrofotométrico (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA). Este método de ensaio baseia-se na medição do substrato de peróxido de hidrogênio que permanece após a ação da catalase. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados utilizando um kit comercial (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA) baseado na reação de malondialdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA), que produz um produto colorimétrico, cuja quantidade é proporcional à quantidade de MDA presente. O dano proteico oxidativo foi determinado utilizando um kit comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) baseado na derivatização de grupos proteína carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), o que leva à formação de hidazonadinitrofenila estável (DNP).

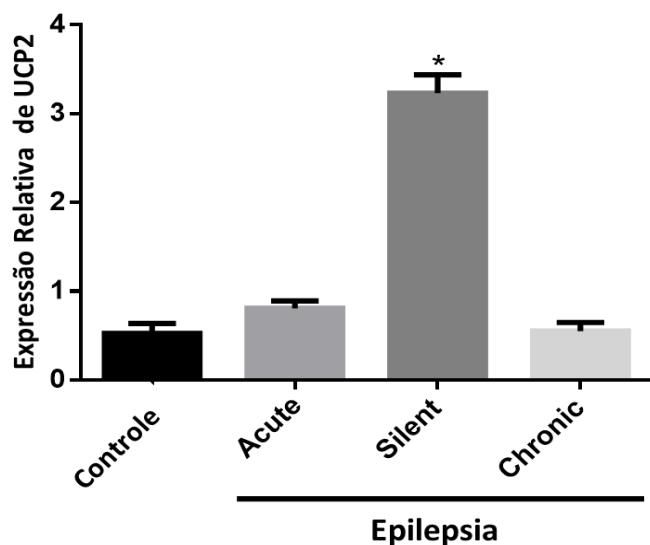
4.7. Análise estatística

Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, EUA). Os testes de Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para verificar as variações de normalidade e erro, respectivamente. A análise de variância bidirecional (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey foi usada para detectar diferenças entre três grupos em amostras com distribuição normal. A menos que indicado de outro modo, as experiências bioquímicas e de biologia molecular foram realizadas em triplicado. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

5. Resultados

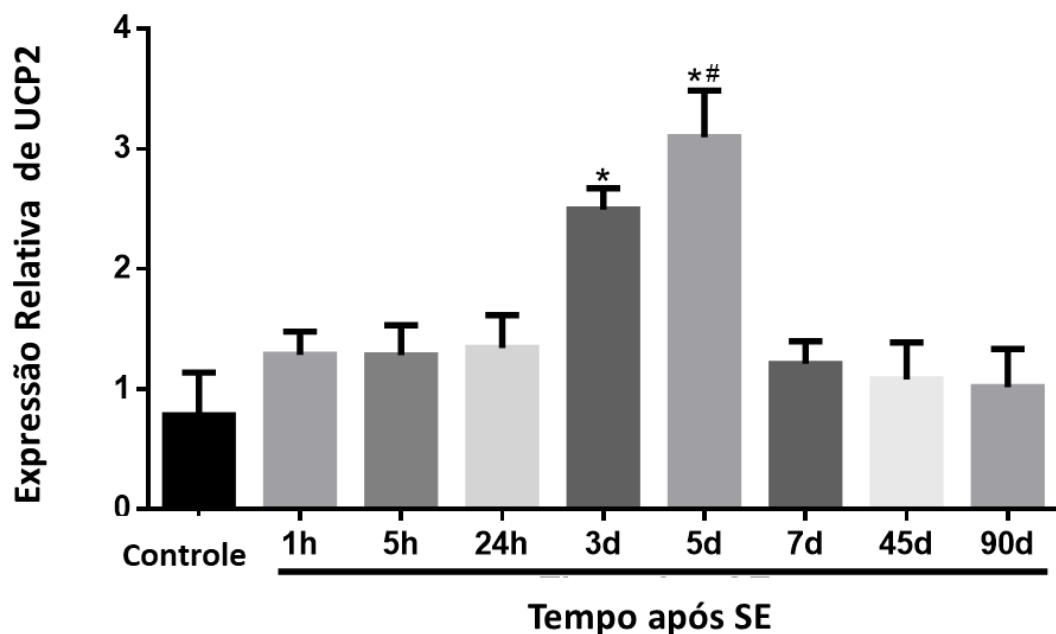
Nós hipotetizamos que a UCP2 pode agir como um neuroprotetor na epilepsia, assim como age em outras doenças que atinge os neurônios, contrabalanceando o dano neuronal provocado pelo SE induzido pela pilocarpina no modelo experimental. Analisando o hipocampo de ratos SE, notamos expressão inalterada de mRNA de UCP2 na fase aguda ($0,80 \pm 0,22$) em relação aos controles tratados com veículo ($0,52 \pm 0,19$). No entanto, a expressão de mRNA da UCP2 observada na fase silenciosa foi cerca de 3 vezes maior do que a observada na fase aguda ($3,26 \pm 0,28$). O conteúdo de mRNA da UCP2 na fase crônica ($0,53 \pm 0,11$, Figura 1) retornou aos níveis basais e foi similar ao grupo controle.

Figura 4. PCR quantitativo em tempo real para o mRNA da UCP2 após SE. Um aumento na expressão gênica de UCP2 foi encontrado na fase silenciosa do modelo de epilepsia por pilocarpina. * $p < 0,001$ de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias \pm E.P.M.



Portanto, analisamos a expressão temporal do mRNA da UCP2 durante todas as fases deste modelo experimental de epilepsia. Observamos que, três dias após a injeção de pilocarpina, houve uma expressão significativa da expressão de UCP2 ($1,47 \pm 0,14$, Figura 2) quando comparada ao controle. A expressão aumentada de mRNA da UCP2 atingiu um pico 5 dias após o início da SE ($3,10 \pm 0,31$), para diminuir ainda mais os níveis basais após esse período.

Figura 5. Expressão no curso do tempo do mRNA de UCP2 após SE. A expressão de UCP2 aumenta após SE na fase silenciosa precoce da epilepsia induzida por pilocarpina. * $p < 0,001$ vs. Controle, 1h, 5h, 24h, 7d, 45d, 90d; # $p < 0,05$ vs. SE 3d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias \pm E.P.M.



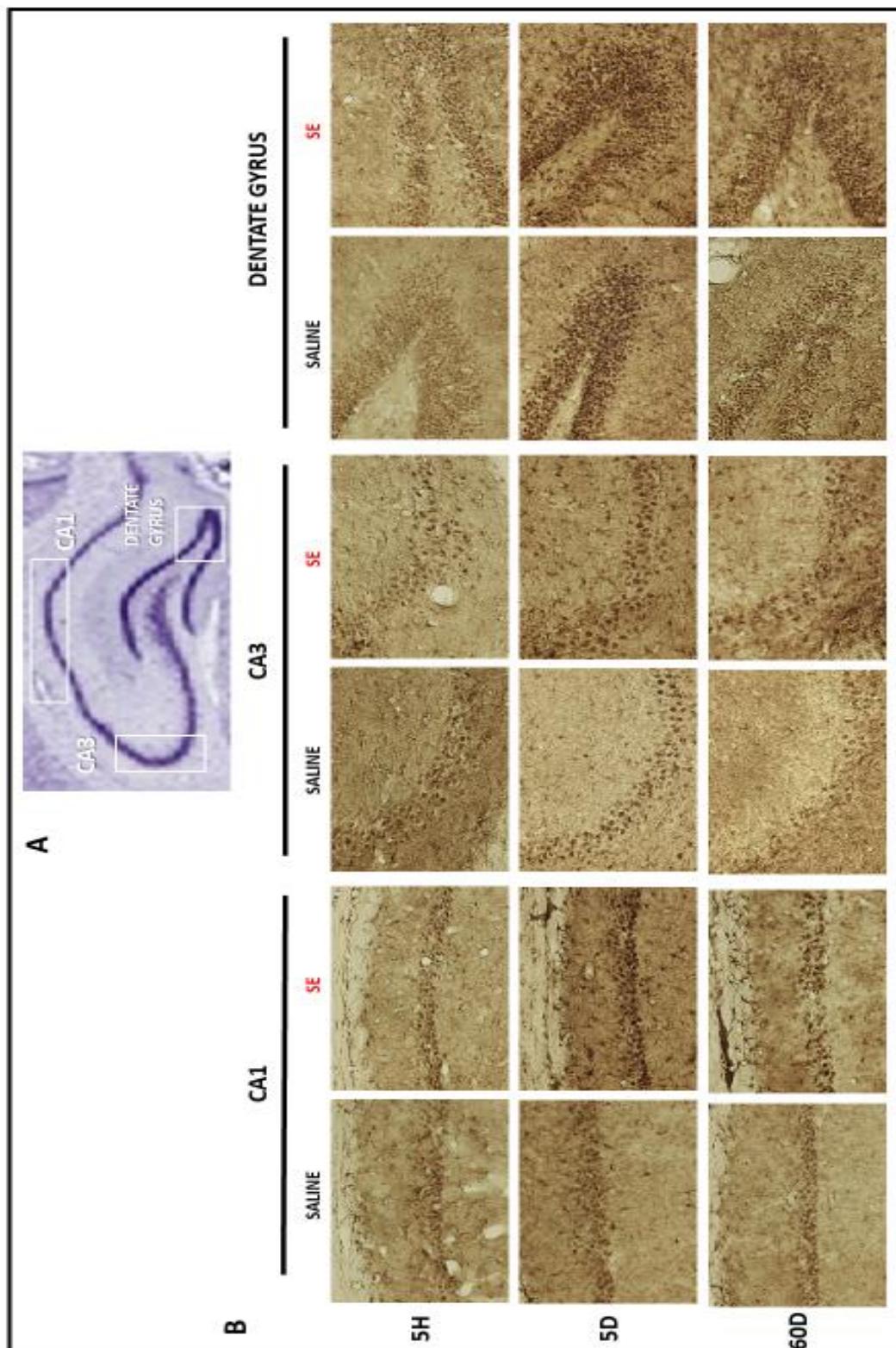
Concomitantemente, detectamos por imuno-histoquímica expressão robusta de AKT fosforilada, um marcador de células de sobrevivência, na fase silenciosa (5 dias após a administração de pilocarpina) quando comparado ao controle e qualquer outro grupo experimental (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 2. Imunorreatividade para fosfo-AKT no giro CA1, CA3 e dentado no modelo de epilepsia induzido pela administração de pilocarpina.

Setor hipocampal	Controle (salina)	Agudo (5H)	Silencioso (5D)	Crônico (60D)
CA1	+	+	+++	++
CA3	++	+	+++	+
Giro denteado	+	+	+++	++

A coloração de fosfo-AKT foi pontuada por dois observadores independentes como se segue: + baixo; ++ moderado; +++ alta intensidade baseada em fotomicrografias apresentadas na Figura 3. Ratos tratados com salina controle; Aguda - 5 horas após o status epilepticus (SE); Silencioso - 5 dias após SE; Crônica - 60 dias após SE.

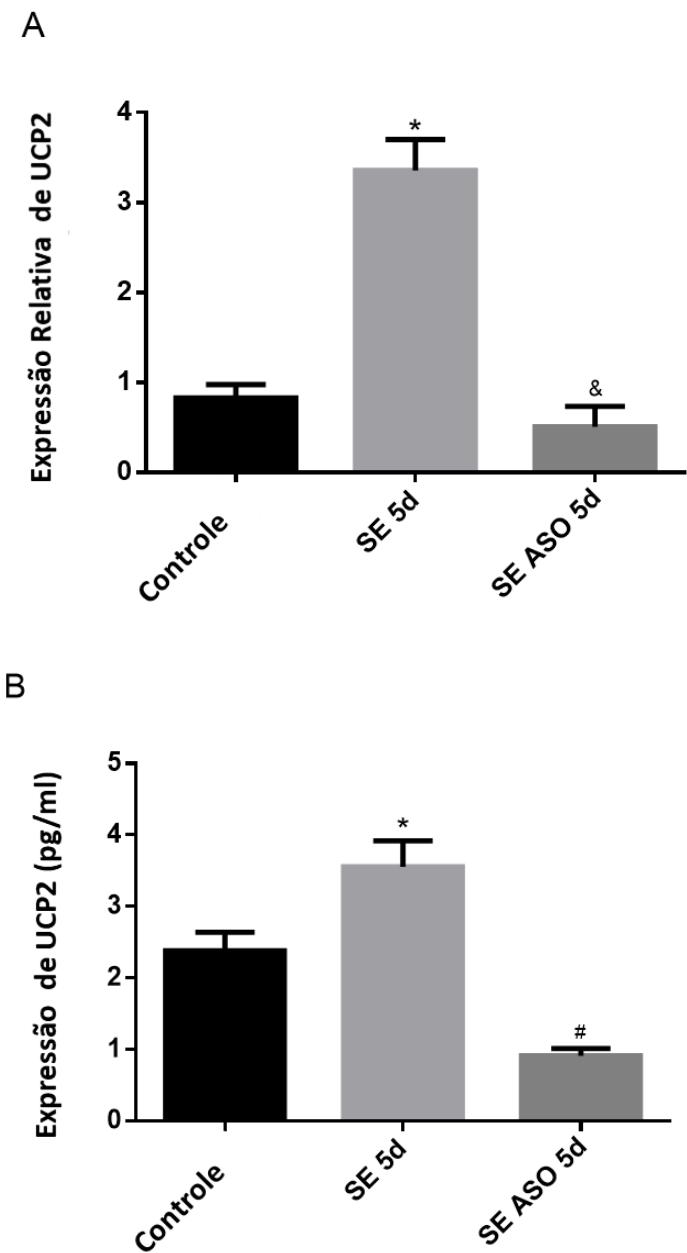
Figura 6. Expressão de fosfo-AKT nas regiões do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado de grupos agudos (5 horas após SE, 5H), silenciosos (5 dias após SE, 5D) e crônicos (60 dias após SE, 60D). A) Formação de hipocampo de rato com coloração de Nissl destacando as áreas de CA1, CA3 e giro dentado. B) Fotomicrografias das regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo de ratos após SE processado para imunohistoquímica fosfo-AKT (p-AKT) e respectivos controles. Animais tratados com pilocarpina no 5º dia após SE (fase silenciosa) apresentaram maior expressão de p-AKT em comparação a qualquer outro grupo. Aumento de X100 (objetiva de 10x).



Usamos os mesmos oligonucleótideos para analisar o início da epileptogênese com a subtração da UCP2. De fato, o silenciamento de UCP2 foi um sucesso e houve a diminuição da expressão de mRNA de UCP2, como era esperado, no grupo SE ASO 5d ($0,51 \pm 0,21$, Figura 4A) em comparação com os grupos de controle e SE 5d ($0,83 \pm 0,16$ e $3,36 \pm 0,32$, respectivamente). O tratamento com ASO foi bem tolerado e nenhuma mortalidade foi observada no grupo experimental.

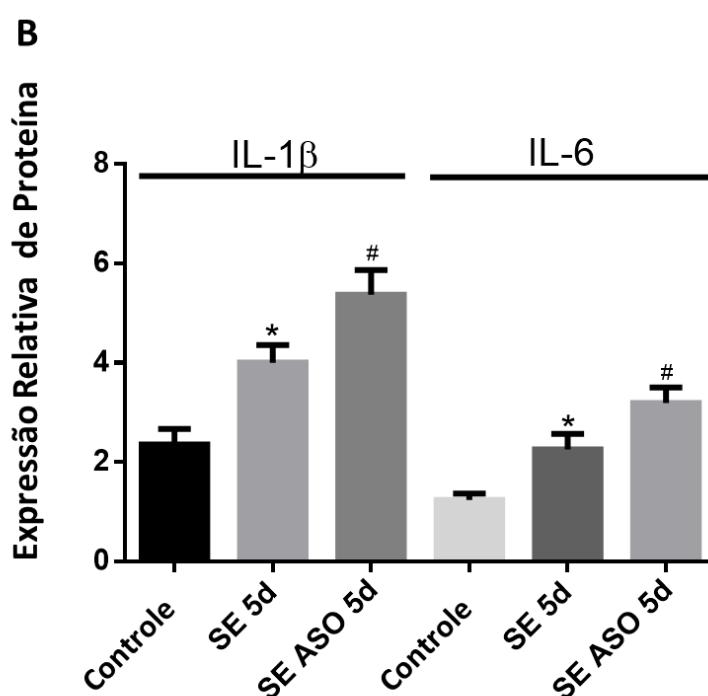
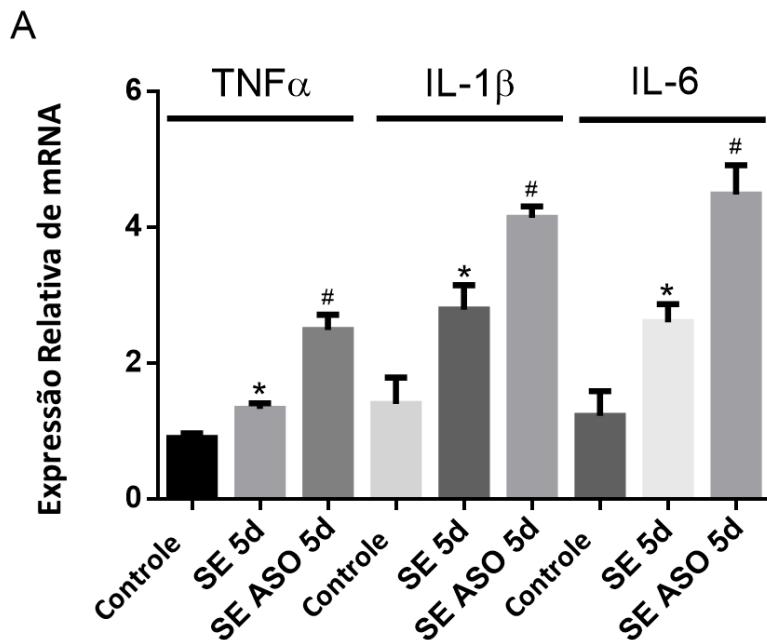
Os ratos que receberam a administração de ASO para UCP2 apresentaram 100% de SE (todos os animais tratados com ASO seguido de administração de pilocarpina revelaram estado epilético, em contraste, com os animais que receberam apenas pilocarpina foram menos propensos a entrar no status epilepticus (7 de 12 ratos). A quantificação da proteína UCP2 apresentou valor diminuído após a pilocarpina, o grupo SE ASO 5d ($0,91 \pm 0,21$) em relação aos grupos SE 5d ($3,55 \pm 0,21$) e controle ($2,38 \pm 0,21$, Figura 4B).

Figura 7. Expressão de UCP2 do hipocampo na presença ou ausência de tratamento anti-sense (ASO) em ratos SE. **A)** Tratamento com ASO diminuiu a expressão de mRNA da UCP2 em ratos 5 dias após o início da SE. & p <0,001 vs. SE 5d; * p <0,001 vs. Controle e 5d SE ASO; **B)** A expressão da proteína UCP2 apresentou níveis elevados 5 dias após SE. O tratamento com ASO diminuiu com sucesso a expressão da proteína UCP2 5 dias após SE. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.



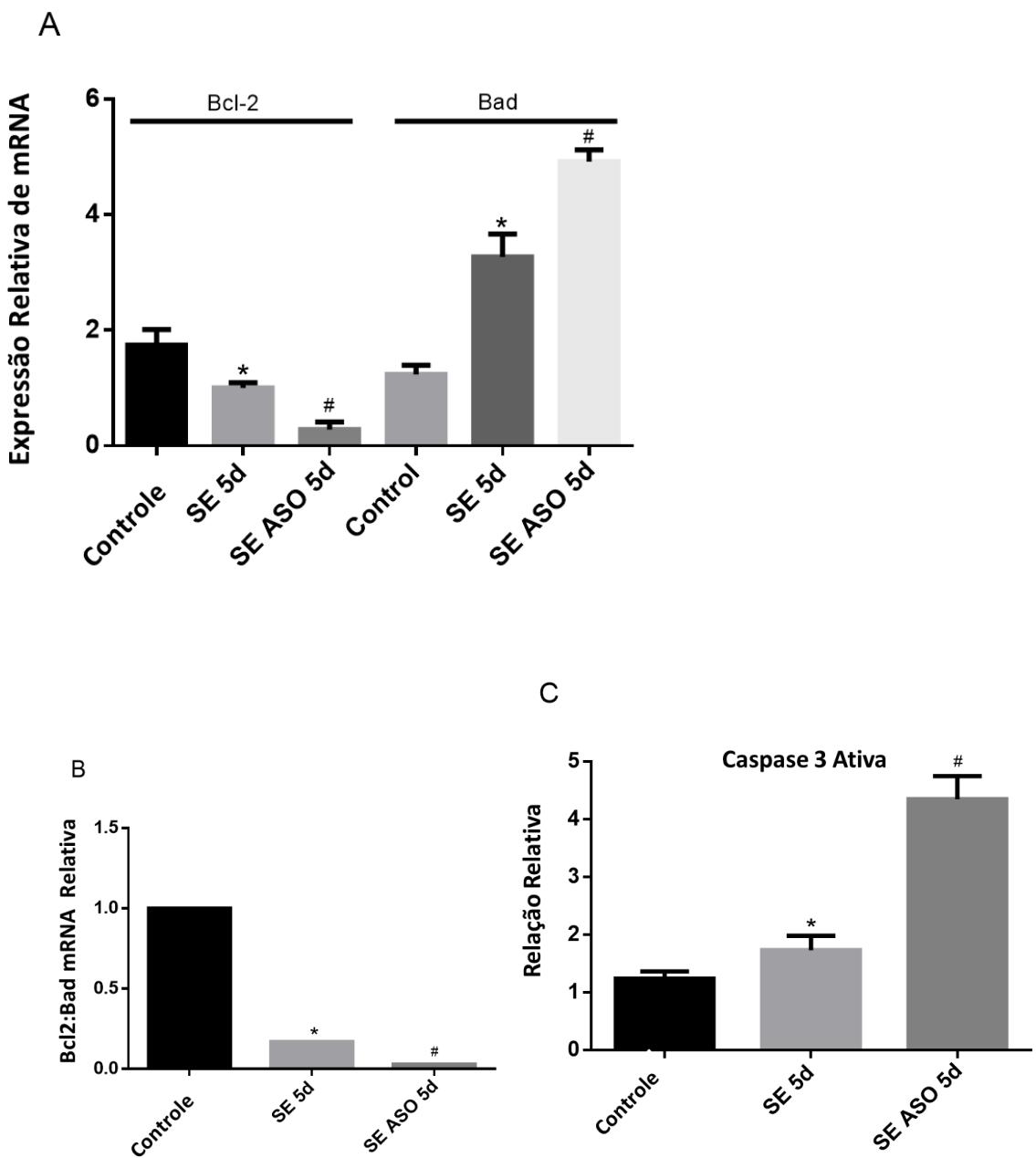
Em seguida, analisamos a expressão de mediadores inflamatórios nas amostras de hipocampo de ratos controle, SE 5d e SE ASO 5d. Observamos um aumento de TNF- α ($1,33 \pm 0,05$), IL-1 β ($2,89 \pm 0,41$) e mRNA de IL-6 ($2,48 \pm 0,29$) 5 dias após o início do SE quando comparado ao controle ($0,90 \pm 0,03$, $1,40 \pm 0,47$ e $1,22 \pm 0,39$, respectivamente; (Figura 5A). No entanto, após o tratamento com ASO, os hipocampos de ratos SE ASO 5d apresentaram uma expressão quase 2 vezes maior desses mediadores pró-inflamatórios ($2,49 \pm 0,21$, $4,13 \pm 0,12$ e $4,48 \pm 0,47$, respectivamente) em comparação com os ratos SE 5d. O aumento de IL-1 β e IL-6 detectados na quantificação de mRNA foi corroborado usando o método de detecção de ELISA para determinar a expressão proteica. Além da expressão aumentada de IL-1 β e IL-6 em ratos SE ($4,01 \pm 0,19$ e $2,26 \pm 0,19$, respectivamente), o grupo SE ASO apresentou expressão significativa e forte desses marcadores pró-inflamatórios ($5,37 \pm 0,29$ e $3,19 \pm 0,19$) em comparação com qualquer outro grupo experimental (controle IL-1 β : $2,35 \pm 0,13$ e IL-6: $1,23 \pm 0,05$).

Figura 8. Modulação da expressão de marcadores pró-inflamatórios no hipocampo com ou sem tratamento com ASO. A) o início do SE aumentou a expressão de mRNA dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-6), enquanto o tratamento com ASO resultou em maior expressão de mRNA desses marcadores. B) O início da SE e o tratamento com ASO levam ao incremento do conteúdo de proteínas IL-1 β e IL-6. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.



Em seguida, analisamos a expressão de mRNA de fatores apoptóticos na presença ou ausência de tratamento com ASO em hipocampos de ratos SE na fase silenciosa. O início da SE induziu não apenas uma redução na expressão de mRNA anti-apoptótico bcl2 ($0,72 \pm 0,21$), mas também uma expressão robusta de mRNA do promotor de morte associado a bcl2 (bad, $3,58 \pm 0,44$), sugerindo uma ativação da apoptose quando comparado ao controle ($1,95 \pm 0,26$ e $1,69 \pm 0,32$, respectivamente). Então, observamos uma forte diminuição na expressão do mRNA de bcl2 após 5 dias do início do SE e tratamento com ASO ($0,26 \pm 0,05$) em comparação ao grupo SE. A expressão do mRNA da bad aumentou com o tratamento SE-ASO ($6,75 \pm 0,53$) em comparação com qualquer outro grupo (Figura 6A). Essa maior diminuição na relação bcl2: mRNA ruim sugere uma morte celular apoptótica mais pronunciada relacionada ao silenciamento da UCP2 na fase silenciosa do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina (Figura 6B). Para investigar que o tratamento ASO alterou a sobrevida aumentando a apoptose, analisamos o hipocampo para o nível de caspase-3 ativa. Como mostrado na Figura 6C, a atividade da caspase-3 no dia 5 foi significativamente maior no hipocampo do grupo SE ASO ($4,35 \pm 0,36$) em comparação ao grupo controle ($1,23 \pm 0,18$) e SE ($1,73 \pm 0,21$), indicando aumento da apoptose após Administração ASO.

Figura 9. Modulação da apoptose na presença ou ausência de tratamento com ASO em ratos SE. A) SE diminui a expressão de mRNA de bcl-2, enquanto aumenta a expressão de mRNA de fator pró-apoptótico ruim. O tratamento com ASO aumentou a má expressão em ratos SE, com baixos níveis de expressão do mRNA do fator bcl2 anti-apoptótico. B) Bcl2: razão ruim, indicando que o SE seguido de tratamento com ASO estimulou a apoptose. C) A atividade da caspase 3 é aumentada 5 dias após SE, enquanto um aumento acentuado da atividade foi observado quando os ratos SE foram submetidos ao tratamento com ASO. * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.

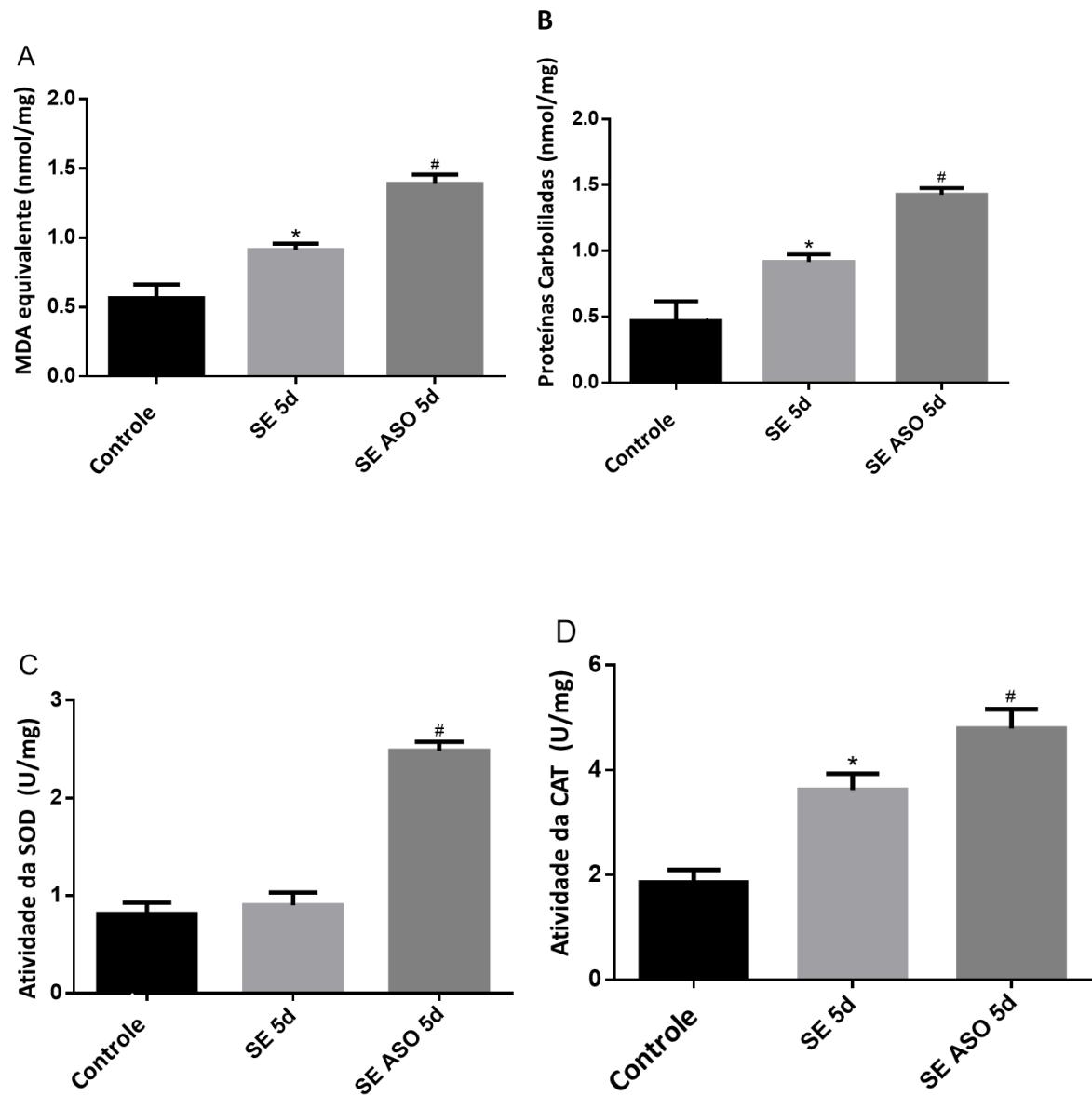


A peroxidação lipídica foi quantificada pela medida da produção de MDA. Verificou-se que os níveis de MDA aumentaram no hipocampo de ratos que foram submetidos à administração de pilocarpina (grupo SE, $0,91 \pm 0,07$) em comparação

com o controlo ($0,56 \pm 0,15$). O tratamento com ASO aumentou significativamente os níveis de MDA no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina ($1,39 \pm 0,11$, Figura 7A). Em ratos SE, os níveis de proteína carbonilada foram elevados dentro do hipocampo ($0,92 \pm 0,11$) em comparação com o controle ($0,47 \pm 0,23$). O tratamento com ASO aumentou os níveis de proteína carbonilada no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina. ($1,42 \pm 0,09$, Figura 7B).

Para avaliar a eficácia do tratamento com ASO no sistema antioxidante intracelular, medimos as atividades das enzimas relacionadas às EROs. A atividade da enzima SOD estava inalterada no hipocampo do grupo SE 5d ($0,90 \pm 0,17$) em relação ao controle ($0,81 \pm 0,11$). No entanto, o tratamento com ASO aumentou significativamente a atividade da SOD de ratos SE ($2,48 \pm 0,34$; Figura 7C). Demonstramos que houve um aumento nos níveis de atividade da catalase ($3,62 \pm 0,16$) no hipocampo após SE comparado ao controle ($1,82 \pm 0,11$). Deve-se notar que o tratamento com ASO resultou em aumento da atividade da CAT no hipocampo ($4,79 \pm 0,23$, Figura 7D).

Figura 10. Estresse oxidativo dentro do hipocampo de ratos SE com e sem tratamento com ASO.
(A) Níveis de MDA **(B)** Atividade da proteína carbonilada **(C)** SOD, **(D)** e atividade da catalase.
 * p <0,001 vs. Controle; #p <0,001 vs. Controle e SE 5d de acordo com ANOVA two-way seguido por testes post hoc de Tukey. Valores são médias ± E.P.M.



6. Discussão

No presente estudo, demonstramos que ratos submetidos a epilepsia induzido por pilocarpina, apresentaram expressão aumentada de UCP2 no hipocampo durante a fase silenciosa precoce (entre 3-5 dias após SE). O tratamento com ASO diminui com sucesso o mRNA da UCP2 e as expressões proteicas neste período após SE. Além disso, os cérebros de ratos SE injetados com ASO mostraram um aumento no estresse oxidativo, marcado por danos causados pela peroxidação lipídica, maiores níveis de proteína carbonila, e aumento nos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, SOD e catalase. Além disso, quando os ratos SE receberam ASO, observamos aumento da expressão dos marcadores pró-inflamatórios e aumento da apoptose.

A expressão do gene UCP2 durante a fase silenciosa sugere que essa molécula possa ser necessária durante a epileptogênese aumentando a sobrevivência de células neuronais no hipocampo, diminuindo a produção de EROs de forma direta, agindo na regulação do gradiente de prótons, ou indiretamente favorecendo a liberação de cisteína pelos astrócitos para a produção de glutatona um importante antioxidante endógeno, assim atribuindo também a UCP2 a preservação de outros sistemas antioxidantes (VOZZA, 2014). O estudo de DIANO et al, (2003) também sugere a ideia de que a UCP 2 promove uma proliferação mitocondrial a partir da diminuição do gradiente de prótons, pela ativação da UCP2, que ao “comprometer” a eficiência na produção de ATP, ativa a cascata de sinalização para a necessidade de mais fontes de ATP, ou seja mais mitocôndrias. Essas mitocôndrias parcialmente desacopladas e mais numerosas podem produzir as mesmas ou maiores quantidades de ATP do que o número normal de mitocôndrias, sem um aumento correspondente na produção de radicais livres, essa hipótese é sustentada pelos dados de DIANO onde a peroxidação lipídica suprimida nos cérebros de animais transgênicos com maior número mitocondrial e níveis de ATP, provavelmente são consequência da diminuição dos níveis de EROs, porque a UCP2 usa essas espécies reativas de oxigênio para aumentar sua condução de prótons, processo que também elimina esses radicais livres, além de que no hipocampo epiléptico dos seres humanos, o

número de mitocôndrias nos neurônios sobreviventes é elevado (BLUMCKE, 1999; DIANO, 2003).

Nosso grupo relatou a participação de várias moléculas com efeitos no processo inflamatório que gradualmente estão assumindo um papel importante na epilepsia e seu potencial tratamento (ARGAÑARAZ GA, 2004,2008). A fim de estabelecer mecanismos de epileptogênese, observamos inúmeras alterações celulares e moleculares que, com o tempo e aumentando a compreensão, ampliam a lista de novas moléculas que podem contribuir para o estado patológico da doença. Embora a neuroproteção baseada na UCP2 tenha sido amplamente relatada em muitas espécies (ANDREWS ZB, 2006; CLAVEL S, 2003; CHEN S, 2006; DEIERBORG T, 2008; HAINES BA, 2010, 2012; ISLAM R; 2005; NAKASE T, 2007; RICHARD D, 2001; SIMON-ARECES J, 2012.), sua participação na epilepsia do hipocampo necessita de mais investigação. Para este fim, observamos aumento da expressão de UCP2 após a administração de pilocarpina na fase silenciosa, atingindo um pico no quinto dia após o início do status epilepticus. Isso é corroborado por grupos que analisaram a epilepsia induzida por ácido caínico em roedores (CLAVEL S, 2003; LABEDEV DS, 2010; SIMEONE KA, 2014).

A fase silenciosa do modelo induzido por pilocarpina é caracterizada por nenhum fenótipo diferenciado, mas muitas alterações metabólicas. Observamos um aumento na p-AKT no mesmo período em que a expressão da UCP2 é incrementada. A quinase AKT, como dito anteriormente, é uma proteína quinase específica de serina / treonina que desempenha um papel central nas vias de sinalização que regulam o metabolismo e a transformação celular. A AKT pode regular positivamente o crescimento celular e a apoptose ativando uma série de diferentes moléculas de sinalização, entre elas a AKT pode ativar diretamente o linfoma de células B (Bcl-2) e inibir a caspase, inibindo assim a apoptose (KING CG, 2006; SONG G, 2005; XIN M, 2005; ZHANG Y, 2013). Além de sua atuação na apoptose a Akt também controla o estresse oxidativo mitocondrial via regulação de mTOR, e a ativação de Akt pode assim efetivamente reduzir os níveis de EROs mitocondriais (DEMIDENKO ZM, 2009; KOROTCHKINA LG, 2010).

Uma possível hipótese do que ocorre durante a epilepsia sugere o envolvimento do trem2 (receptor desencadeante expresso em células mieloides-2) é um receptor imune e funciona como um fator desencadeante da fagocitose e um modulador da resposta inflamatória na microglia (JIN SC, 2014), inibe a progressão da epilepsia através da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) / Akt, no modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina a regulação negativa do Trem2 teve um efeito inibitório na ativação da via PI3K / Akt o que resultou em uma diminuição de Bcl-2 e aumento de Bax e caspase3, eventualmente contribuindo para a apoptose e lesão neuronal e ao contrário, também ocorre quando temos a regulação positiva de Trem2 os níveis de fosforilação de PI3K e Akt aumentam, resultando em maior nível de Bcl-2 enquanto os níveis de Bax e caspase3 diminuem, consequentemente a apoptose e lesão neuronal induzida por epilepsia é inibida. (Liu AH, 2019).

Na epilepsia, a fosforilação da AKT é muito bem-vinda porque influencia positivamente a sobrevivência neuronal, reduzindo o dano celular observado após o insulto. Embora não tenha atividade quinase, a UCP2 tem uma interação próxima com fatores de sobrevivência celular com base em relatórios recentes (HAINES B, 2012). Derdák et al. (2006), usando um modelo de camundongo knockout da UCP2, forneceram a primeira evidência in vivo para uma ligação entre a UCP2 e o câncer, quando camundongos transgênicos mostraram um desequilíbrio entre a proliferação de células epiteliais e a apoptose.

O silenciamento da expressão gênica da UCP2 é um protocolo molecular direcionado ao mRNA dessa molécula, limitando sua disponibilidade por meio do emparelhamento entre sequências de nucleotídeos complementares. Este modelo foi usado anteriormente com resultados interessantes. Por exemplo, De Souza et al. (2007) demonstraram que o silenciamento da UCP2 melhora a síndrome hiperglicêmica em dois modelos animais distintos de obesidade e diabetes. Em 2008, Degasperi et al. relataram que a inibição da expressão de UCP2 aumenta a expressão dos marcadores de TNF- α , apoptose e EROs. Ainda foi relatado um efeito antagonista entre o TNF- α e a UCP2, em células vasculares, onde uma diminuição nos níveis de TNF- α aumenta a expressão de UCP2 promovendo redução aos danos vasculares, e o contrário também foi observado, onde um aumento de TNF- α seguido da diminuição de UCP2 aumenta os danos vasculares (GÓMEZ-HERNÁNDEZ, 2014). Também foi relatado que a UCP2 atua na resposta glial neuroprotetora revertendo a produção de

fatores inflamatórios e aumentando ou preservando o suprimento de antioxidantes endógenos (HU L, 2019). Os autores postularam que a indução da expressão da UCP2 no hipotálamo de ratos poderia ser considerada um mecanismo protetor endógeno que poderia minimizar os efeitos prejudiciais de estímulos inflamatórios potentes. Nossa observação de que ratos que foram submetidos ao tratamento anti-sense da UCP2 foram mais suscetíveis ao status epilepticus pode ser uma evidência de neuroproteção provocada pela UCP2.

SE induzida por pilocarpina pode promover estresse oxidativo e pode ser refletida na ativação direta de enzimas antioxidantes. Em condições saudáveis, é encontrado um equilíbrio entre a produção de EROs e sua destruição por sistemas antioxidantes. No entanto, esse equilíbrio pode ser alterado pelo aumento da produção de EROs ou pela diminuição dos sistemas antioxidantes celulares.

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na epileptogênese, após a primeira crise ocorre alterações neurobiológicas progressivas, logo a primeira convulsão torna-se mais tarde uma causa de convulsões recorrentes na ELTM. O estresse oxidativo tem como alvo o DNA mitocondrial e a peroxidação lipídica que afetam a depleção de ATP e contribuem ainda mais para a produção excessiva de EROs. A neurodegeneração, que é mediada pela gliose reativa induzida por convulsões, essas mudanças metabólicas anulam mecanismos de proteção antioxidante endógenos (PUTTACHARY S, 2011). Em um estudo utilizando um antioxidante catalítico em um modelo experimental de pilocarpina, foi visto que a remoção de EROs melhorou a memória de reconhecimento a curto e longo prazo além da memória espacial em ratos epiléticos, mesmo após descontinuação do medicamento, mostrando que a remoção farmacológica de EROs seguida da inibição do estresse oxidativo é suficiente para atenuar a disfunção mitocondrial e a perda neuronal do hipocampo, fornecendo um mecanismo potencial para o comprometimento cognitivo associado à epilepsia (MC ELROY PB, 2017).

As convulsões induzidas por pilocarpina produzem várias alterações nas variáveis relacionadas à geração e eliminação de radicais livres de oxigênio em ratos adultos (PAZDERNIK TL, 2001). A reação da enzima SOD resulta em H₂O₂ e água de dismutação do radical superóxido (O₂⁻) e a catalase converte H₂O₂ em oxigênio e água (DRINGEN R, 2005). Tejada et al. (2007) relataram que um aumento na atividade enzimática antioxidante foi observado após SE, indicando que os neurônios

tentam neutralizar as EROs induzidas por SE excessiva. No entanto, observamos uma atividade SOD inalterada após o início do SE. A atividade da SOD está relacionada a mecanismos envolvidos na iniciação e / ou propagação de convulsões induzidas pela pilocarpina. Estes dados são corroborados por outro estudo mostrando a atividade da SOD inalterada 24 h após o tratamento com pilocarpina, sugerindo que a atividade da SOD somente muda durante o início das convulsões (HUSSAIN S, 1995).

Cao et al. (2013) relataram que esplenócitos de camundongos nocautes para UCP2 eram mais suscetíveis à apoptose induzida pela ativação de patógenos, e que o alto nível de EROs em camundongos UCP2-KO poderia ser a causa da suscetibilidade apoptótica. Em nosso estudo, quando a UCP2 foi inibida, as atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD aumentaram significativamente. Estes resultados estão de acordo com (DEGASPERI GR, 2008; YIRAN Z 2013) que sugeriram que o efeito prejudicial da redução da expressão de UCP2 estava ligado à formação aumentada de EROs. Além disso, mostramos que o tratamento com ASO resultou em MDA e aumento de proteína carbonilada em ratos SE. O estresse oxidativo induz a apoptose celular quando os fatores antioxidantes endógenos foram diminuídos(DEGASPERI GR, 2008; YIRAN Z 2013). Nossos resultados sugerem que o início da SE induz a apoptose no hipocampo de ratos, diminuindo as atividades das enzimas antioxidantes. O aumento desses sistemas antioxidantes endógenos após o tratamento com ASO pode proteger o hipocampo contra o estresse oxidativo induzido pela pilocarpina.

Bengzon et al. (2002) relataram que mudanças na expressão e atividade de proteínas reguladoras de morte celular, tais como membros das famílias Bcl2 e caspases, ocorrem em regiões vulneráveis à degeneração celular. Isso sugere um envolvimento desses fatores na apoptose após convulsões. Chen et al. (CHEN N, 2014) observaram que a administração de ácido caínico levou a acentuada apoptose neuronal no hipocampo, acompanhada de níveis aumentados de Bax, caspase-3 ativada e níveis reduzidos de Bcl2. Em nosso estudo, o mRNA de bcl2 diminuiu em relação à má expressão após a epilepsia induzida pela pilocarpina. A redução da expressão da UCP2 resulta em uma modulação ainda maior de ambos os fatores, indicando uma ativação mais pronunciada da morte celular por apoptose quando a ASO é administrada, dados que são corroborados por Degasperi et al. (2008) Enquanto o aumento da atividade da caspase 3 foi observado após o início da SE, um

aumento maior foi observado após o tratamento com SE e ASO. Podemos então inferir que as células neuronais provavelmente apresentavam maior suscetibilidade à morte celular após a SE. No entanto, após a ASO, esta suscetibilidade aumentou. Esses dados, juntamente com a relação bcl2: ruim após o tratamento antissenso, destacam o papel neuroprotetor da UCP2. Juntas, essas evidências demonstram um mecanismo para defesa de uma célula protetora contra o insulto, de acordo com vários outros estudos (KIM-HAN JS, 2005; NIQUET J, 2004; RICHARD D, 2001).

Embora o papel neuroprotetor da UCP2 possa ser dependente da ativação de várias outras moléculas, sua inibição mostrou uma diminuição na forma ativada da AKT, que por sua vez impediu a AKT de exercer sua atividade catalítica e subsequentemente ativar outras moléculas relacionadas à sobrevivência celular (MORTE MI, 2013; ZHAO H 2006). A UCP2 é um fator neuroprotetor tanto por seus efeitos diretos na diminuição das ERO mitocondriais, como pela mudança no espectro de citocinas secretadas em direção a um espectro mais anti-inflamatório (HASS DT, 2016). De fato, quando reduzimos a expressão de UCP2, as expressões dos marcadores pró-inflamatórios foram aumentadas. Nossos dados corroboram um estudo usando camundongos deficientes em UCP2 tratados com neurotoxina MPTP e também mostraram uma expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α e interleucina 1 β (LU M 2014).

7. Conclusão

Nossos dados comprovam que a expressão de UCP2 ocorre na fase silenciosa da epilepsia, sendo quase 3 vezes maior que o controle, evidenciando assim sua presença no metabolismo energético nesse período, além disso também ficou claro através do curso temporal, que a UCP2 é expressa apenas na fase silenciosas da doença retornando aos valores basais após 7 dias de SE, sendo assim ainda ficamos com a dúvida de porque ela para de ser expressa quando a epilepsia chega na fase crônica e ainda, se a UCP2 é responsável de alguma forma pela ausência de crises epilética nesse período, visto que quando chaga na fase crônica da epilepsia ocorre convulsões espontâneas.

Quando estudamos o efeito da UCP2 na fase silenciosa, pela ausência de UCP2, através da administração de ASO, vimos que sua expressão pode modular respostas apoptóticas e inflamatórias, através do controle da cadeia respiratória e redução de estresse oxidativo, reduzindo assim o dano celular no hipocampo nesse período, prolongando a sobrevida das células da glia e neurônios após estagio agudo da crise epilética, provocada pela pilocarpina.

Apesar de nossas importantes descobertas, que certamente auxiliam no entendimento da fisiopatologia da epilepsia, ainda restaram muitas duvidas quanto ao mecanismo pelo qual a UCP2 atua e porque ela deixa de ser expressa quando chega na fase crônica. Essas são apenas algumas das duvidas que permanecem até que novos estudos nesse tema sejam conduzidos a fim de continuar esclarecendo o papel da UCP 2 na atividade do eixo de sobrevivência à apoptose na epilepsia.

8. Referências bibliográficas

1. Argañaraz G. A., Perosa S. R., Lencioni E. C. et al., "Role of kinin B1 and B2 receptors in the development of pilocarpine model of epilepsy," *Brain Research*, vol. 1013, no. 1, pp. 30–39, 2004.
2. Argañaraz G. A., Konno A. C., Perosa S. R. et al., "The reninangiotensin system is upregulated in the cortex and hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy related to mesial temporal sclerosis," *Epilepsia*, vol. 49, no. 8, pp. 1348–1357, 2008.
3. Andrews Z. B., Rivera A., Elsworth J. D. et al., "Uncoupling protein-2 promotes nigrostriatal dopamine neuronal function," *The European Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 1, pp. 32–36, 2006.
4. Ashhab MU, Omran A, Kong H, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and MicroRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 51:950–958, 2013.
5. Bengzon J., Mohapel P., Ekdahl C. T., and Lindvall O., "Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures," *Progress in Brain Research*, vol. 135, pp. 111–119, 2002.
6. Busiello, R. A., Savarese, S., & Lombardi, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology*, 6, 36. doi:10.3389/fphys.2015.00036, 2015.
7. Barnstable CJ, Reddy R, Li H, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) regulates retinal ganglion cell number and survival. *J Mol Neurosci*. 58:461–469, 2016.
8. Boyer BB, Barnes BM, Lowell BB, and Grujic D. Differential regulation of uncoupling protein gene homologues in multiple tissues of hibernating ground squirrels. *Am J. Physiol* 275: R1232–R1238, 1998.
9. Basu-Ball W, Kar S, Mukherjee M, Chande AG, Mukhopadhyaya R et al. Uncoupling protein 2 negatively regulates mitochondrial reactive oxygen species generation and induces phosphatase-mediated anti-inflammatory response in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 187: 1322-1332, 2011.

10. Bellissimo M.I., Amado D., Abdalla D.S., Ferreira E.C., Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M.G., Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats, *Epilepsy Res.* 46,121–128, 2001.
11. Blümcke, I. , Zuschratter, W. , Schewe, J. , Suter, B. , Lie, A. A., Riederer, B. M., Meyer, B. , Schramm, J. , Elger, C. E. and Wiestler, O. D. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J. Comp. Neurol.*, 414: 437-453, 1999.
12. Cavalheiro EA, The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995.
13. Cavalheiro EA, Mello ML, Leite JP. The pilocarpine model of seizures. In: Models of Seizures and Epilepsy. (Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, eds.) Burlington, MA: Elsevier, 433–448, 2006.
14. Clavel S., Paradis E., Ricquier D., and Richard D., “Kainic acid upregulates uncoupling protein-2 mRNA expression in the mouse brain,” *Neuroreport*, vol. 14, no. 16, pp. 2015–2017, 2003.
15. Chen S.-D., Wu H.-Y., Yang D.-I. et al., “Effects of rosiglitazone on global ischemia-induced hippocampal injury and expression of mitochondrial uncoupling protein 2,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 351, no. 1, pp. 198–203, 2006.
16. Chen N., Gao Y., Yan N. et al., “High-frequency stimulation of the hippocampus protects against seizure activity and hippocampal neuronal apoptosis induced by kainic acid administration in macaques,” *Neuroscience*, vol. 256, pp. 370–378, 2014.
17. Cao T., Dong Y., Tang R., Chen J., Zhang C. Y., and Zen K., “Mitochondrial uncoupling protein 2 protects splenocytes from oxidative stress-induced apoptosis during pathogen activation,” *Cellular Immunology*, vol. 286, no. 1-2, pp. 39–44, 2013.
18. Cascino GD. Neuroimaging in epilepsy: diagnostic strategies in partial epilepsy. *Semin Neurol.* 28(4):523-32, 2008.

19. Dringen R., "Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 7, no. 9-10, pp. 1223–1233, 2005.
20. Degasperi G. R., Romanatto T., Denis R. G. P. et al., "UCP2 protects hypothalamic cells from TNF- α -induced damage," *FEBS Letters*, vol. 582, no. 20, pp. 3103–3110, 2008.
21. De Souza C. T., Araújo E. P., Stoppiglia L. F. et al., "Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 4, pp. 1153–1163, 2007.
22. Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. *Epilepsy. Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18024, 2018.
23. Derdak B, Li PA. Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits inflammatory cytokines and activates cell survival factors after cerebral ischemia. *PLoS One* 7: e31739, 2012.
24. Dejean L, Camara Y, Sibille B, Solanes G, and Villarroya F. Uncoupling protein-3 sensitizes cells to mitochondrial-dependent stimulus of apoptosis. *J Cell Physiol* 201: 294– 304, 2004.
25. Dundar NO, Aktekin B, Ekinci NC, Sahinturk D, Yavuzer U, Yegin O, Haspolat S. Secreção de interleucina-1beta em pacientes com esclerose hipocampal com epilepsia do lobo temporal mesial. *Neurol Int.* ; 5 : e17, 2013.
26. Dal-Pizzol F., Klamt F., Vianna M.M., Schroder N., Quevedo J., Benfato M.S., Moreira J.C., Walz R., Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats, *Neurosci. Lett.* 291 179–182, 2000.
27. Diano, S., Matthews, R. T., Patrylo, P., Yang, L., Beal, M. F., Barnstable, C. J., & Horvath, T. L. Uncoupling Protein 2 Prevents Neuronal Death Including that Occurring during Seizures: A Mechanism for Preconditioning. *Endocrinology*, 144(11), 5014–5021, 2003.
28. Demidenko ZN, Shtutman M, Blagosklonny MV. Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. *Cell Cycle* 8:1896–1900, 2009.

29. Deierborg T, Wieloch T, Diano S, Warden CH, Horvath TL, Mattiasson G. Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse [published correction appears in J Cereb Blood Flow Metab. 2008 Jun;28(6):1273. Deierborg Olsson, Tomas [corrected to Deierborg, Tomas]]. J Cereb Blood Flow Metab. 28(6):1186–1195, 2008.
30. Engel J Jr PT. Epilepsy: a comprehensive textbook. 1-13 p, 2008.
31. Elger CE, Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. Epilepsy Behav. 12(4):501-39, 2008.
32. Ekdahl CT et al. Mecanismos de morte em neurônios gerados por status epilepticus e efeitos de ataques adicionais em sua sobrevivência . Neurobiol Dis 14, 513-523, 2003.
33. Evers M.M., Toonen L.J., van Roon-Mom W.M. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. Adv. Drug Deliv. Rev. 87:90–103, 2015.
34. Fritz E. Dreifuss et al. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia. 30(4):389-99. 11, 1989.
35. Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C.-S., Dykeman, J., ... Jetté, N, Prevalence and incidence of epilepsy. Neurology, 88(3), 296–303, 2016.
36. Fiest, Kirsten M et al. “Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies” Neurology vol. 88,3: 296-303, 2017.
37. Fernando P., Brunette S. & Megeney LA A diferenciação de células-tronco neurais depende da atividade endógena da caspase 3 . FASEB J 19 , 1671-1673, 2005.
38. Freitas R.M., Nascimento V.S., Vasconcelos S.M., Sousa F.C., Viana G.S., Fonteles M.M., Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats, Neurosci. Lett. 365, 102–105, 2004.
39. Gupta RA, Motiwala MN, Dumore NG, Danao KR, Ganjare AB. Efeito da piperina na inibição da inflamação mediada por TLR4 induzida por FFA e melhoria da

- colite ulcerativa induzida por ácido acético em murganhos. *J Ethnopharmacol.* 164 : 239-246, 2015.
40. Gouveia TL, Scorza FA, Silva MJ, Bandeira T de A, Perosa SR et al. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators in the hippocampus and blocks the hyperthermia of rats submitted to long-lasting status epilepticus. *Epilepsy Behav* 20: 1-5, 2011.
 41. Gómez-Hernández A, Perdomo L, de las Heras N, et al. Antagonistic effect of TNF-alpha and insulin on uncoupling protein 2 (UCP-2) expression and vascular damage. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:108., Published Jul 31. 2014.
 42. Haines and P. A. Li, "Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits inflammatory cytokines and activates cell survival factors after cerebral ischemia," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, article e31739, 2012.
 43. Haines B. A., Mehta S. L., Pratt S. M, Warden C. H., and Li P. A., "Deletion of mitochondrial uncoupling protein-2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 30, no. 11, pp. 1825–1833, 2010.
 44. Hussain S., Slikker Jr W., and Ali S. F., "Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 13, no. 8, pp. 811–817, 1995.
 45. Hass D. T. and Barnstable C. J., "Uncoupling protein 2 in the glial response to stress: implications for neuroprotection," *Neural Regeneration Research*, vol. 11, no. 8, pp. 1197–1200, 2016.
 46. Hass DT, Barnstable CJ. Uncoupling protein 2 in the glial response to stress: implications for neuroprotection. *Neural Regen Res*; 11:1197-200, 2016.
 47. Hegarty JP, Stewart DB. Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102(3):1055-1065, 2017.
 48. Hu L, Zhang S, Wen H, Liu T, J Cai, Du D, et al. A melatonina diminui a polarização M1 através da atenuação do dano oxidativo mitocondrial,

- dependendo da via da UCP2 na microglia tratada com pro-renina. PLoS ONE 14 (2): e0212138, 2019.
49. Islam R., Yang L., Sah M. et al., "A neuroprotective role of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) in a Drosophila Parkinson's disease model," *Neurobiology of Disease*, vol. 46, no. 1, pp. 137–146, 2012.
 50. José Augusto Bragatti, et. Al, *Protocolo Clínico e Diretrizes terapêuticas*, 2013.
 51. Jean Bancaud, et. Al, Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*.;22(4):489-501, 1981.
 52. Jetté, N., Sander, J. W., & Keezer, M. R.), Surgical treatment for epilepsy: the potential gap between evidence and practice. *The Lancet Neurology*, 15(9), 982–994, 2016.
 53. Jessberger S. et al. Neurogênese aberrante associada a convulsões em ratos adultos caracterizada por marcação celular mediada por retrovírus . *J Neurosci* 27 , 9400-9407, 2007.
 54. Juliano R.L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*.44:6518–6548,2016.
 55. Jin SC, Benitez BA, Karch CM, Cooper B, Skorupa T, Carrell D, et al. Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 23: 5838–5846, 2014.
 56. Kwan P, Sander JW. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(10):1376-81, 2004.
 57. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*, 342(5):314-9, 2000.
 58. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB., The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:248–261, 2006.
 59. Kim-Han JS, Dugan LL. Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 7: 1173-1181, 2005.

60. Kumar A, Sasmal D, Sharma N. O papel imunomodulador da piperina na deltametrina induziu a apoptose do timo e alterou as funções imunológicas. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39 : 504-514, 2015.
61. Kumar S, Singhal V, R Roshan, Sharma A, Rembhokar GW, Ghosh B. A piperina inibe a adesão induzida por TNF-alfa de neutrófilos à monocamada endotelial através da supressão da ativação de NF-kappaB e IkappaB quinase. *Eur J Pharmacol.* 575 : 177-186, 2007.
62. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U e Bedi KL. Modulação da piperina do estresse oxidativo induzido por carcinógeno na mucosa intestinal. *Mol Cell Biochem.* 189: 113–118, 1998.
63. King CG, Kobayashi T, Cejas PJ, Kim T, Yoon K et al. TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nat Med* 12:1088-1092, 2006.
64. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53- induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)* 2:344–352, 2010.
65. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol.* 35(3):238–248, 2017.
66. Lebedev D. S. and Arkhipov V. I., “Expression of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in the brain of rats after hippocampal injury inflicted by kainic acid,” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 150, no. 2, pp. 185–187, 2010.
67. Luiz Eduardo Betting, Carlos A. M. Guerreiro, Tratamento das Epilepsias Generalizadas Idiopáticas. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 14(Suppl 2):20-24, 2008.
68. Lapp DW, Zhang SS, Barnstable CJ. Stat3 mediates LIF-induced protection of astrocytes against toxic ROS by upregulating the UPC2 mRNA pool. *Glia* 62:159–170, 2014.

69. Lapp DW, Zhang SS, Barnstable CJ. Stat3 mediates LIF-induced protection of astrocytes against toxic ROS by upregulating the UPC2 mRNA pool. *Glia* 62:159-170, 2014.
70. Luna B, Bhatia S, Yoo C, Felty Q, Sandberg DI, Duchowny M., Khatib Z, Miller I, Ragheb J., Prasanna J, Roy D. Bayesian rede e modelagem de estrutura hierárquica mecanicista de maior probabilidade de desenvolver epilepsia intratável da infância a partir do efeito combinado de variantes de mtDNA, dano oxidativo e número de cópias. *J Mol Neurosci.* 54: 752-766, 2014.
71. Liu, A.-H., Chu, M., & Wang, Y.-P. Up-Regulation of Trem2 Inhibits Hippocampal Neuronal Apoptosis and Alleviates Oxidative Stress in Epilepsy via the PI3K/Akt Pathway in Mice. *Neuroscience Bulletin*, 2019.
72. Marino Jr., R., Cukiert, A., & Pinho, E, Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo da prevalência. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 44(3), 243–254, 1986.
73. Morte M. I., Carreira B. P., Falcão M. J. et al., “Evaluation of neurotoxic and neuroprotective pathways affected by antiepileptic drugs in cultured hippocampal neurons,” *Toxicology In Vitro*, vol. 27, no. 8, pp. 2193–2202, 2013.
74. Montesanto, A., Crocco, P., Anfossi, M., Smirne, N., Puccio, G., Colao, R., ... Rose, G. The Genetic Variability of UCP4 Affects the Individual Susceptibility to Late-Onset Alzheimer’s Disease and Modifies the Disease’s Risk in APOE-ε4 Carriers. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 51(4), 1265–1274., 2016.
75. Moukdar F, Robidoux J, Lyght O, Pi J, Daniel KW et al. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *J Lipid Res* 50: 59-70, 2009.
76. Maria José da Silva Fernandes. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *estudos avançados* 27 (77), 2013.
77. Mao K, Lei D, Zhang H, You C. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. *Exp Ther Med.* 13(2):695-700, 2016.

78. McElroy PB, Liang LP, Dia BJ, Patel M. A espécie reativa de oxigênio inibe a neuroinflamação induzida por status epilepticus. *Exp Neurol*; 298 (Pt A): 13-22, 2017.
79. Nakase T., Yoshida Y., and Nagata K., "Amplified expression of uncoupling proteins in human brain ischemic lesions," *Neuropathology*, vol. 27, no. 5, pp. 442–447, 2007.
80. Niquet J. and Wasterlain C. G., "Bim, Bad, and Bax: a deadly combination in epileptic seizures," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 7, pp. 960–962, 2004.
81. Nunes ML, Geib LT; Grupo Apego. Incidence of epilepsy and seizure disorders in childhood and association with social determinants: a birth cohort study. *J Pediatr (Rio J)*. 87(1):50-56, 2011.
82. Paxinos G., Watson., C., Pennisi M., and Topple A., "Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 13, no. 2, pp. 139–143, 1985.
83. Pazdernik T. L., Emerson M. R., Cross R., Nelson S. R., and Samson F. E., "Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 21, Supplement 1, pp. S87–S94, 2001.
84. Panuccio G., D'Antuono M., de Guzman P., De Lannoy L., Biagini G., Avoli M. In vitro ictogenesis and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 39:372–380. 2010.
85. Parent, J. M. et al. Aberrant Seizure-Induced Neurogenesis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Ann Neurol*, v.59, p.81-91, 2006.
86. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int*. 2015; 745613, 2011.
87. Pardridge W. M., Sakane D. Wu, T., Combined use of carboxyl-directed protein pegylation and vector-mediated blood-brain barrier drug delivery system optimizes brain uptake of brain-derived neurotrophic factor following intravenous administration. *Pharm Res*. Apr; 15(4): 576–582, 1998.

88. Richard D., Clavel S., Huang Q., Sanchis D., and Ricquier D., "Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function," *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, no. 6, pp. 812–817, 2001.
89. Rinwa P, Kumar A, Garg S. Supressão da cascata de sinalização neuroinflamatória e apoptótica pela curcumina sozinha e em combinação com piperina em modelo de rato de depressão induzida por bulbectomia olfatória. *PLoS One*. 8 : e61052, 2013.
90. Rao RS, Medhi B, Saikia UN, et al. Experimentally induced various inflammatory models and seizure: understanding the role of cytokine in rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 18:760–767, 2008.
91. Racine RJ; Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 32(3):281-94, 1972.
92. Sardone V, Zhou H, Muntoni F, Ferlini A, Falzarano MS. Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Molecules*.22(4):563, 2017.
93. Simon-Areces J., Dietrich M. O., Hermes G., Garcia- Segura L. M., Arevalo M. A., and Horvath T. L., "UCP2 induced by natural birth regulates neuronal differentiation of the hippocampus and related adult behavior," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, article e42911, 2012.
94. Simeone K. A., Matthews S. A., Samson K. K., and Simeone T. A., "Targeting deficiencies in mitochondrial respiratory complex I and functional uncoupling exerts anti-seizure effects in a genetic model of temporal lobe epilepsy and in a model of acute temporal lobe seizures," *Experimental Neurology*, vol. 251, pp. 84–90, 2014.
95. Scorza, F. A., Olszewer, E., Fiorini, A. C., Scorza, C. A., & Finsterer, J, Sudden unexpected death in epilepsy: Rethinking the unthinkable. *Epilepsy & Behavior*, 2019.
96. Sofroniew MV, Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647, 2009.

97. Sola S., Morgado AL e Rodrigues CMP Biochimica e Biophysica Acta . BBA - Assuntos Gerais 1830 , 2160–2166, 2013.
98. Schouten M, Fratantoni SA, Hubens CJ, et al. MicroRNA-124 and -137 cooperativity controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells. *Sci Rep.* 2015;5:12448. Published , 24 Jul 2015.
99. Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience.* 122:1073–1080, 2003.
100. Sah R., Galeffi F., Ahrens R., Jordan G., Schwartz-Bloom R.D., Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species, *J. Neurochem.* 80, 383–391, 2002.
101. Shull S., Heintz N.H., PeriasamM. Y, Manohar M., Janssen Y.M., Marsh J.P., Mossman B.T., Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants, *J. Biol. Chem.* 266, 24398–24403, 1991.
102. Silva JA Jr, Goto EM, Perosa SR, Argañaraz GA, Cavalheiro EA et al. Kinin B1 receptors facilitate the development of temporal lobe epilepsy in mice. *Int Immunopharmacol* 8: 197-199, 2008.
103. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59–71, 2005.
104. Song, Shiwei et al. Anticonvulsive effects of protodioscin against pilocarpine-induced epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, *European Journal of Pharmacology* 833 237–246; Elsevier, 15 ago. 2018.
105. Song, Shiwei et al. Anticonvulsive effects of protodioscin against pilocarpine-induced epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, *European Journal of Pharmacology* 833 237–246; Elsevier, 15 ago. 2018.
106. Schoch KM, Miller TM. Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron.* 94(6):1056–1070, 2017.

107. Sahoo SS, Jayapandian C, Garg G, et al. Heart beats in the cloud: distributed analysis of electrophysiological 'Big Data' using cloud computing for epilepsy clinical research. *J Am Med Inform Assoc.* 21(2):263–27, 2013.
108. Tejada S., Roca C., Sureda A., Rial R.V., Gamundí A., Esteban S., Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments, *Brain Res. Bull.* 69, 587–659, 2006.
109. Tejada S., Sureda A., Roca C., Gamundi A., and Esteban S., "Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine," *Brain Research Bulletin*, vol. 71, no. 4, pp. 372–375, 2007.
110. Turski, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.*, v.9, n.3, p.315-35, 1983.
111. Tiwari P, Dwivedi R, N Mansoori, Alam R, Chauhan Reino Unido, Tripathi M, Mukhopadhyay AK. O polimorfismo genético em IL-1beta, TNF-alfa e IL-6 influencia a resposta terapêutica em pacientes com epilepsia refratária a drogas? *Epilepsia Res.* 101 : 261-267, 2012.
112. Vogler S, Pahnke J, Rousset S, Ricquier D, Moch H et al. Uncoupling Protein 2 Has Protective Function during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol* 168: 1570–1575, 2006.
113. Vozza A, Parisi G, De Leonardi F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, Marmo R, Calcagnile VM, Palmieri L, Ricquier D, Paradies E, Scarcia P, Palmieri F, Bouillaud F, Fiermonte G, UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:960-965, 2014.
114. Vezzani A, Baram TZ. New roles for interleukin-1 beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr*, 7:45–50, 2007.
115. Xin M, Deng X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem* 280:10781–10789, 2005.
116. Waldbaum S, Patel M. Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo: um link que contribui para a epilepsia adquirida? *Bioenerg Biomembr.* 42: 449-455, 2010.

117. White C.W., Ghezzi P., McMahon S., Dinarello C.A., Repine J.E., Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia, *J. Appl. Physiol.* 66, 1003–1007, 1989.
118. Yiran Z., Chenyang J., Jiajing W. et al., “Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase pathways involved in cadmium-induced BRL 3A cell apoptosis,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 516051, 12 pages, 2013.
119. Yan XX et al. Expressão da caspase-3 ativa em células mitóticas e pós-mitóticas do prosencéfalo de ratos . *J Comp Neurol* 433, 4-22, 2001.
120. Zhao H., Sapolsky R. M., and Steinberg G. K., “Phosphoinositide- 3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke,” *Molecular Neurobiology*, vol. 34, no. 3, pp. 249–270, 2006.
121. Zhang Y., Wang X., Yang H. et al., “Kinase AKT controls innate immune cell development and function,” *Immunology*, vol. 140, no. 2, pp. 143–152, 2013.
122. Zamecnik, P C, and M L Stephenson. “Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 75,1; 280-4, 1978.