

HÁTYLAS FELYPE ZANETI DE AZEVEDO

Alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de epilepsia com insulto precipitante febril

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2016

HÁTYLAS FELYPE ZANETI DE AZEVEDO

Alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de epilepsia com insulto precipitante febril

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Azevedo, Hátylas Felype Zaneti de

Alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de epilepsia com insulto precipitante febril / Hátylas Felype Zaneti de Azevedo. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientador: Carlos Alberto Moreira Filho.

Descritores: 1.Hipocampo 2.Epilepsia 3.Expressão gênica 4.Biologia computacional 5.Redes reguladoras de genes 6.Convulsões febris

USP/FM/DBD-474/16

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Alberto Moreira-Filho por toda orientação e oportunidade de aprendizado que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Paula pela companhia, carinho e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos.

À minha Família por me apoiar em todos os momentos e por serem meus exemplos de vida.

À equipe do Laboratório de Genômica Pediátrica - Silvia Y. Bando, Nathalia Khaled, Fernanda Bernardi Bertonha, Paula Santos, Priscila Iamashita e Leandro Ferreira - pelo aprendizado, ajuda nos experimentos e discussões de trabalho.

Ao Dr. Alexandre Valotta, pela contribuição científica no projeto em relação a critérios de neuroanatomia e alterações histológicas relacionadas à epilepsia.

Aos Drs. André Fujita, Patrícia Palmeira e Débora Romeo Bertola pelas contribuições científicas em minha Qualificação de Doutorado.

Ao Cristiano Guimarães, Carlos Eduardo Vitor, Lisandra Pessa, Alessandra Mascarello, Marcos Ferreira, Carla Santos, Renata Costa, Romulo Reis, Elza Durham, Ediliz Possari, Fernando Gama, Eloisa Ishikawa e Natanael Segretti pela companhia no dia a dia e pelo apoio para a realização do doutorado.

RESUMO

Azevedo HFZ. *Alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de epilepsia com insulto precipitante febril* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Convulsões febris complexas durante a infância representam um fator de risco importante para o desenvolvimento da epilepsia. Porém, pouco se sabe sobre as alterações moleculares induzidas por crises febris que tornam o cérebro susceptível à atividade epiléptica. Nesse contexto, modelos experimentais de convulsões induzidas por hipertermia (CH) permitem a análise temporal das alterações moleculares no cérebro após CH. Neste projeto, foram investigadas alterações temporais em redes de co-expressão gênica hipocampais durante o desenvolvimento de ratos Wistar submetidos a CH. Amostras de RNA foram obtidas da região CA3 ventral do hipocampo em quatro intervalos de tempo após as CH induzidas no décimo primeiro dia pós-natal (P11). Essas amostras foram utilizadas para a análise da expressão gênica global por meio de técnicas de microarranjos de DNA. Os pontos temporais foram selecionados para investigar as fases aguda (P12), latentes (P30 e P60) e crônica (P120) do modelo experimental. Os dados de expressão gênica foram analisados a partir da construção de redes de co-expressão gênica para investigar módulos de genes co-expressos, dado que esses módulos podem conter genes com funções semelhantes. A análise transcriptômica consistiu na construção de redes de co-expressão gênica, identificação de módulos, análises de correlação entre módulos e grupos experimentais, e avaliação de mudanças de conectividade entre módulos dos grupos experimentais e controles. Os módulos relevantes foram enriquecidos funcionalmente para identificar funções biológicas associadas às CH. Os resultados mostraram que as CH induzem alterações em vias de sinalização envolvidas em processos imunológicos e de desenvolvimento, tais como Wnt, Hippo, Notch, JAK-STAT e MAPK. Módulos associados à diferenciação neuronal e transmissão sináptica foram identificados em todos os intervalos temporais analisados. Estes resultados sugerem que alterações transcricionais desencadeadas por CH podem levar à neurogênese hipocampal, ao remodelamento tecidual e à inflamação crônica, tornando o cérebro susceptível à atividade epiléptica crônica.

Descritores: hipocampo; epilepsia; expressão gênica; biologia computacional; redes reguladoras de genes; convulsões febris

ABSTRACT

Azevedo HFZ. *Transcriptome alterations in the hippocampus of rats subjected to experimental febrile seizures* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Complex febrile seizures during infancy constitute an important risk factor for epilepsy development. However, little is known about the alterations induced by febrile seizures that could turn the brain susceptible to epileptic activity. In this context, experimental models of hyperthermic seizures (HS) may allow the temporal analysis of brain molecular changes after HS. Here, we investigated temporal changes in hippocampal gene co-expression networks during the development of rats subjected to HS. Total RNA samples were obtained from the ventral hippocampal CA3 region at four time points after HS at postnatal day 11 (P11) and later used for gene expression profiling. The temporal endpoints were selected to investigate the acute (P12), latent (P30 and P60) and chronic (P120) stages of the HS model. A weighted gene co-expression network analysis was employed to investigate modules of co-expressed genes, as these modules may contain genes with similar biological functions. The transcriptome analysis pipeline consisted in building gene co-expression networks, identifying network modules and hubs, performing gene-trait correlations and examining module connectivity changes. Modules were functionally enriched to identify functions associated to HS. Our data showed that HS induce alterations in developmental and immune pathways, like Wnt, Hippo, Notch, JAK-STAT and MAPK. Interestingly, modules involved in cell adhesion, neuronal differentiation, axonogenesis and synaptic transmission were activated as early as one day after HS. These results suggest that HS trigger transcriptional alterations that may lead to persistent neurogenesis, tissue remodeling and chronic inflammation in the CA3 hippocampus, turning the brain prone to epileptic activity.

Descriptors: hippocampus; epilepsy; gene expression; computational biology; gene regulatory networks; febrile seizures.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epilepsia e Epileptogênese	1
1.1.1 <i>Epilepsia e Crises Epilépticas</i>	1
1.1.2 <i>Mecanismos que regulam a excitabilidade neuronal</i>	2
1.1.3 <i>Epileptogênese</i>	3
1.1.4 <i>Epilepsia do Lobo temporal Mesial e Alterações Estruturais no Hipocampo</i>	4
1.2 Epilepsia desencadeada por insultos febris	7
1.2.1 <i>Convulsões febris em crianças e Epilepsia</i>	7
1.2.2 <i>Fisiopatologia das crises convulsivas induzidas por insulto febril</i>	8
1.3 Modelos experimentais em Epilepsia	10
1.3.1 <i>Modelos experimentais clássicos de epilepsia</i>	10
1.3.2 <i>Modelos Experimentais em Epilepsia de Crises Febris</i>	11
1.4 Epilepsia, Genômica Funcional e Biologia de Sistemas	14
1.4.1 <i>Estudos Genômicos e Epilepsia</i>	14
1.4.2 <i>Genômica funcional e epilepsia febril</i>	15
1.4.3 <i>Biologia de sistemas e Neurociências</i>	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MÉTODOS	21
4.1 Protocolos Experimentais	21
4.1.1 <i>Modelo animal e indução de crises convulsivas por meio de hipertermia</i>	21
4.1.2 <i>Grupos Experimentais e Avaliação das crises convulsivas</i>	23
4.1.3 <i>Microdissecção do hipocampo e das regiões CA3 hipocampais</i>	23
4.2 Experimentos de DNA microarray	24
4.2.1 <i>Extração do RNA total</i>	24
4.2.2 <i>Microarranjos de oligonucleotídeos de DNA</i>	25
4.3 Análises de Bioinformática	27
4.3.1 <i>Processamento e análise estatística dos resultados de microarranjos de DNA</i>	27
4.3.2 <i>Análise das redes de co-expressão gênica e Enriquecimento Funcional</i>	28
4.4 Validação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Observação de crises convulsivas nos animais submetidos à hipertermia	31
5.2 Expressão gênica diferencial e funções hiper-representadas por esses genes	33
5.2.1 <i>Genes diferencialmente expressos em P12</i>	33
5.2.2 <i>Genes diferencialmente expressos em P30</i>	33
5.2.3 <i>Genes diferencialmente expressos em P60</i>	34
5.2.4 <i>Genes diferencialmente expressos em P120</i>	34
5.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas	39
5.3.1 <i>Módulos e genes associados às crises convulsivas em P12</i>	39
5.3.2 <i>Módulos e genes associados às crises convulsivas em P30</i>	39

<i>5.3.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P60</i>	40
<i>5.3.4 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P120</i>	40
5.4 Análise da preservação e alteração de conectividade dos módulos entre as redes dos grupos experimentais	46
<i>5.3.1 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P12</i>	46
<i>5.3.2 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P30</i>	47
<i>5.3.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P60</i>	48
<i>5.3.4 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P120</i>	49
5.5 Módulos e intervalos de tempo envolvidos na susceptibilidade ou resistência a crises convulsivas	56
<i>5.5.1 Módulos e genes associados ao intervalo de P12</i>	56
<i>5.5.2 Módulos e genes associados ao intervalo de P30</i>	59
<i>5.5.3 Módulos e genes associados ao intervalo de P60</i>	59
<i>5.5.3 Módulos e genes associados ao intervalo de P120</i>	59
5.6 Funções biológicas em módulos associados às crises convulsivas nos diferentes pontos experimentais	60
6. DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia e Epileptogênese

1.1.1 *Epilepsia e Crises Epilépticas*

A epilepsia constitui um grupo heterogêneo de doenças neurológicas, caracterizado pela predisposição do cérebro em gerar crises convulsivas epilépticas de forma recorrente (FISCHER et al., 2005). Trata-se de uma doença neurológica frequente, acometendo aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo (MEYER et al., 2010). As formas mais comuns de epilepsia possuem característica multifatorial, sendo causadas pela interação entre fatores ambientais precipitantes e módulos específicos de genes (BANDO et al., 2011; BANDO et al. 2013; MOREIRA-FILHO et al. 2015).

A epilepsia geralmente se inicia na infância, prejudicando as relações sociais e o desenvolvimento do indivíduo. Portanto, o diagnóstico precoce e o manejo adequado dos pacientes são essenciais para a redução da morbidade. Embora novas drogas antiepilépticas estejam em desenvolvimento, cerca de 20 milhões de pessoas são refratárias aos tratamentos disponíveis, apresentando crises recorrentes (GARRIGANUT et al., 2006). O impacto da epilepsia refratária ultrapassa a inconveniência das crises, levando a uma progressiva deficiência intelectual, comorbidades psiquiátricas, danos físicos e baixa qualidade de vida dos pacientes (WIRREL, 2013).

As crises epilépticas são caracterizadas por um período anormal de excitação sincrônica de uma população de neurônios. Elas representam a manifestação clínica da atividade cortical anormal e a expressão fenotípica de cada crise é determinada por seu ponto de origem e grupo neuronal envolvido (STEINLEIN, 2004). Diversos são os mecanismos que podem desencadeá-las, mas um desequilíbrio causado entre inibição e excitação neuronais é o fator desencadeante das crises (SCHARFMAN, 2007).

1.1.2 Mecanismos que regulam a excitabilidade neuronal

O mecanismo básico de excitabilidade neuronal é o potencial de ação. Por sua característica “tudo ou nada”, o potencial de ação apresenta um limiar para disparo que é regulado pelo gradiente eletroquímico do neurônio. Portanto, um estado hiperexcitável é resultante de um desbalanço entre excitação e inibição neuronais. Alguns exemplos são o aumento da neurotransmissão excitatória sináptica, diminuição da neurotransmissão inibitória, alteração de canais iônicos dependentes da voltagem ou alteração da concentração de íons a favor da despolarização da membrana.

O principal neurotransmissor (NT) excitatório é o glutamato. Esse NT atua em receptores glutamatérgicos que são classificados em duas classes principais. A primeira subclasse é a dos receptores ionotrópicos AMPA (α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) cainato e NMDA (N-metil D-Aspartato). Após a ativação desses receptores pelo glutamato, ocorre o influxo de íons catiônicos, contribuindo para a despolarização da membrana. A outra subclasse de receptores glutamatérgicos é a dos receptores metabotrópicos, cuja transdução de sinal utiliza proteínas G. Essa subclasse compreende três tipos de receptores (GluR1, GluR2 e GluR3), diferenciados pela localização pré- *versus* pós-sináptica (BROMFIELD et al., 2006).

O principal NT inibitório é o ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA interage com dois subtipos principais de receptores: GABA_A e GABA_B. Os receptores GABA_A e GABA_B são encontrados na pós e pré-sinapse, respectivamente. Os receptores GABA_A são permeáveis a íons Cl⁻ e quando ativados causam a hiperpolarização da membrana celular, inibindo o potencial de ação. Portanto, agonistas de receptores GABA_A, como benzodiazepínicos, são capazes de suprimir a atividade elétrica cerebral. Os receptores GABA_B, todavia, regulam a atividade da neurotransmissão gabaérgica, devido a sua localização pré-sináptica. Esse receptor está acoplado a segundos mensageiros, os quais ativam canais de K⁺ e, portanto, hiperpolarizam a membrana plasmática, causando uma redução na atividade gabaérgica e consequente hiperexcitabilidade.

Os NTs glutamato e GABA exercem papéis importantes no desequilíbrio da excitabilidade neuronal. Uma das hipóteses para o surgimento das crises é a ativação das vias que utilizam o NT excitatório glutamato e/ou diminuição na via do NT inibitório GABA (MORINOTO et al., 2004). Entretanto, essa relação não é trivial (SCHARFMAN, 2007), pois diversos fatores desencadeiam alterações na atividade elétrica cerebral e, por esse motivo, a doença é considerada como complexa e multifatorial (GITAI, 2008).

1.1.3 Epileptogênese

Os neurônios estão conectados por meio de conexões sinápticas que controlam a excitabilidade cerebral. A ocorrência de lesões no tecido cerebral, de modificações durante o desenvolvimento cerebral ou de outros agentes etiológicos pode levar ao desenvolvimento de crises recorrentes e espontâneas (Silva e Cabral, 2008). Esse processo, denominado epileptogênese, ocorre a partir da reorganização das redes neuronais e de componentes presentes nas sinapses, formando uma rede neuronal hiperexcitável. Após um período de latência, essas alterações seriam responsáveis pela atividade epiléptica espontânea do tecido cerebral (SILVA E CABRAL, 2008).

Mudanças durante este período de latência compreendem, por exemplo, neurogênese, necrose de interneurônios inibitórios e brotamento de axônios, levando à reverberação de circuitos neuronais. Outras mudanças vigentes são a invasão de células inflamatórias periféricas no tecido neuronal, dano vascular e angiogênese, mudança em componentes da matriz extracelular, além de alterações em NTs e canais iônicos (PITKANEN; LUKASIUK, 2009). Essas alterações precedem as crises espontâneas recorrentes e levam ao quadro de epilepsia diagnosticada clinicamente.

1.1.4 Epilepsia do Lobo temporal Mesial e Alterações Estruturais no Hipocampo

Crises epilépticas com origem no lobo temporal e em estruturas límbicas, como a amígdala e o hipocampo, representam um subgrupo distinto de epilepsia denominado Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) (HERNÁNDEZ-RONQUILLO, 2012).

O hipocampo de pacientes com ELTM apresenta um padrão estereotipado de lesão. O hipocampo apresenta sub-regiões interligadas que são denominadas giro denteado e “Corno de Amon” (CA). O CA é ainda subdividido em seções denominadas CA1, CA2 e CA3. Os principais tipos celulares nessas estruturas são as células neuronais granulares do giro denteado e as células piramidais do CA. A Figura 1 ilustra um comparativo entre a anatomia do hipocampo de roedores e humanos. Enquanto o hipocampo de roedores apresenta uma disposição ventrodorsal, o hipocampo de humanos apresenta uma disposição anteroposterior.

A principal aferência para o hipocampo é a via perforante, que se origina no córtex entorrinal e inerva os dendritos das células granulares do giro denteado. Já os axônios das células granulares, conhecidos como fibras musgosas, são projetados para as células piramidais na região CA3. Por fim, a região CA3 emite conexões para a região CA1, coletivamente denominadas via colateral de Schaffer (Figura 2).

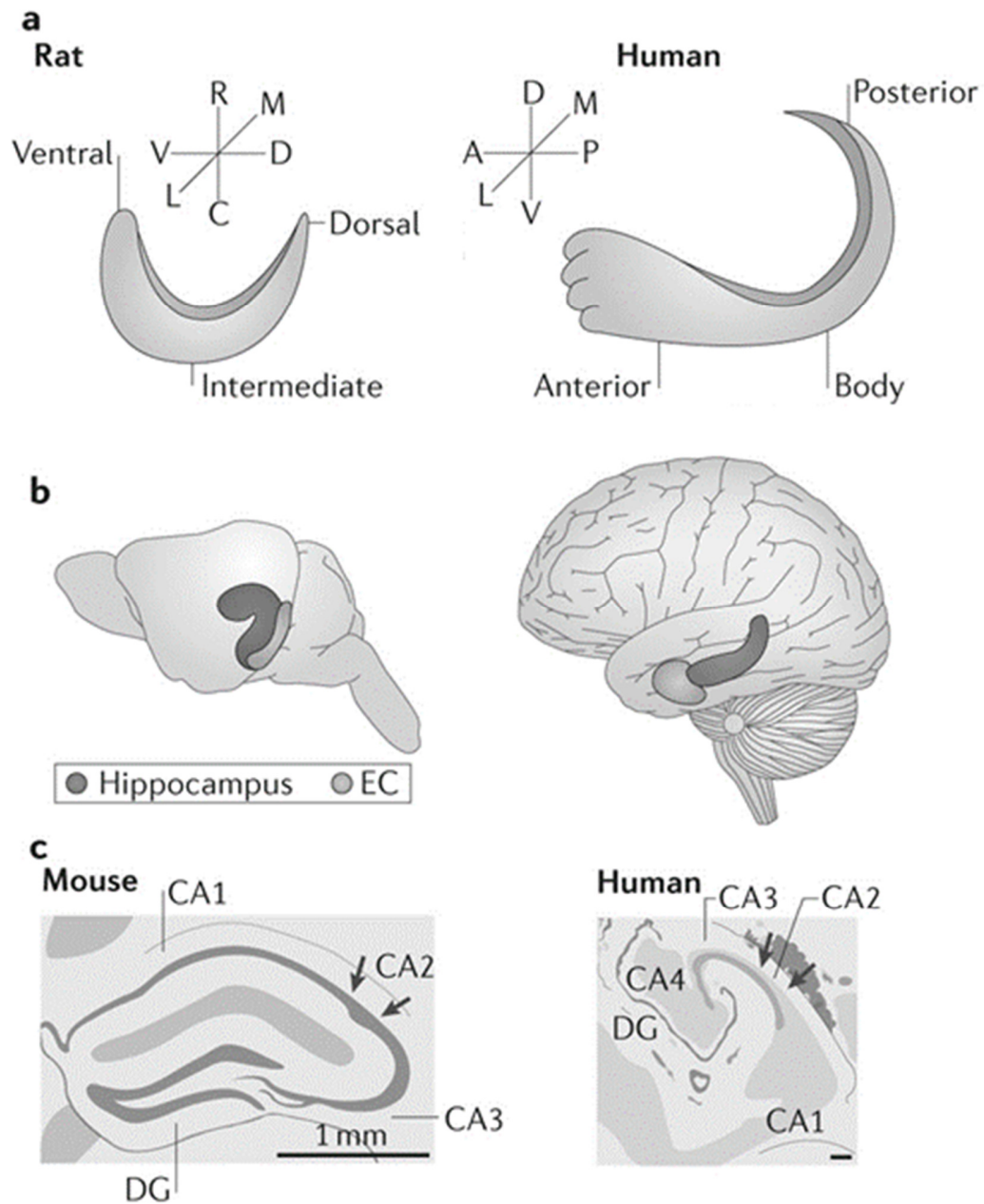


Figura 1. Comparativo entre a anatomia do hipocampo de roedores e humanos. A) O hipocampo apresenta disposição ventrodorsal em roedores e anteroposterior em humanos. B) Disposição do hipocampo e córtex entorrinal (EC) no cérebro de roedores e humanos. C) Desenho de seções transversais de tecido corado pela técnica de Nissl em hipocampos de roedores e humanos. A, anterior; C, caudal; D, dorsal, DG, giro denteado; L, lateral; M, medial; P, posterior. Adaptado de STRANGE et al., 2014.

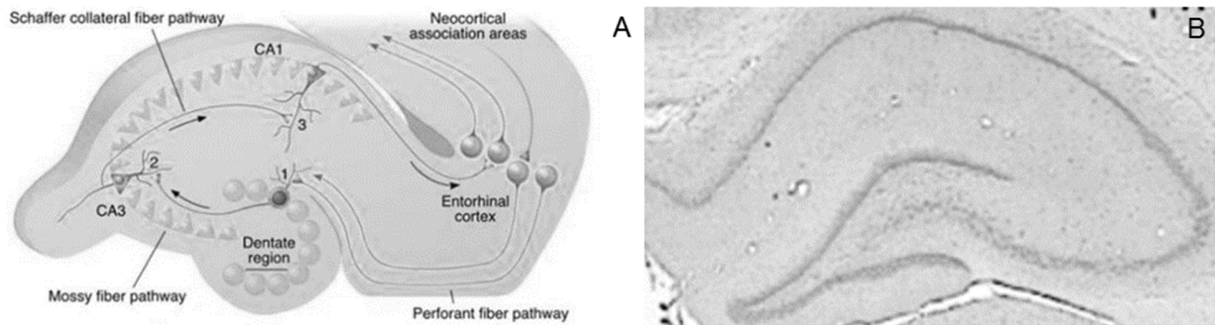


Figura 2. Anatomia do hipocampo de ratos. A) Imagem ilustrando as sub-regiões do hipocampo, como o giro dentado e o Corno de Amon, com as subdivisões CA1 e CA3. Também estão ilustradas a via colateral de Schaffer e a via perfurante. B) Corte coronal de hipocampo de ratos corado pela técnica de Nissl. Adaptado de SCORZA et al., 2005.

A esclerose hipocampal é o achado histopatológico mais comum na ELTM. Ela é caracterizada macroscopicamente pelo endurecimento e redução volumétrica no hipocampo, além da perda neuronal e gliose no Corno de Ammon (CA) e da reorganização axonal do giro dentado (BABB, 1991). Ademais, o hipocampo de pacientes com ELTM apresenta perda neuronal em CA1 e CA3, além de perda e dispersão das células granulares do giro dentado. Um outro achado histológico relevante é o brotamento das fibras musgosas, que é caracterizado pela reorganização dos axônios das células granulares para dentro da camada molecular do giro dentado (SUTULA et al., 1989). Esse brotamento pode ser facilmente visualizado pela técnica de Timm, visto que os terminais sinápticos dessas fibras apresentam elevadas concentrações de zinco (DANSCHER, 1981).

As principais características da ELTM são: (i) foco epiléptico no sistema límbico; (ii) período latente até o desenvolvimento das crises recorrentes; (iii) desenvolvimento de resistência ao tratamento farmacológico e (iv) um insulto precipitante inicial (CURIA et al., 2008). A ocorrência de um insulto precipitante inicial em fases precoces do desenvolvimento cerebral pode acarretar modificações epileptogênicas progressivas, as quais resultam no desenvolvimento da ELTM (MATHERN, 1995). Traumas de crânio, infecções no sistema nervoso central, *status epilepticus* e crises febris prolongadas

constituem os principais eventos precipitantes ligados à ELTM (RANSOM e BLUMENFELD, 2007). Em particular, as epilepsias induzidas por insulto febril correspondem a um grupo clinicamente relevante, dado a ocorrência frequente de insultos febris em crianças.

1.2 Epilepsia desencadeada por insultos febris

1.2.1 Convulsões febris em crianças e Epilepsia

Crises convulsivas representam 1% das emergências pediátricas, e em 80% dos casos um insulto febril é o agente precipitante. Portanto, o histórico desses pacientes deve ser avaliado para identificar a etiologia da crise, pois essa manifestação está associada a diversas doenças (JONES e JACOBSEN, 2007). Após a primeira crise febril (CF), antipiréticos ou anticonvulsivantes não são recomendados, embora benzodiazepínicos possam ser utilizados para reduzir a recorrência de CFs (KNUDSEN, 2000). Em adultos, crises epiléticas associadas ao estado febril são raras. Portanto, a capacidade de gerar convulsões febris é considerada uma característica do cérebro em desenvolvimento, tipicamente em crianças entre 2 meses e 5 anos de idade (DUBE et al., 2007). Pessoas com CFs recorrentes na infância apresentam dez vezes mais chance de desenvolver epilepsia, comparado à população geral (NELIGAN et al., 2012).

O estudo FEBSTAT ("*Consequences of Prolonged Febrile Seizures in Childhood*") tem avaliado de maneira prospectiva as consequências de crises febris prolongadas com o intuito de identificar crianças com maior risco para desenvolvimento da epilepsia após crises febris (HESDORFFER ET AL., 2012). A equipe do Centro Médico de Montefiore (Nova Iorque, EUA) recrutou 199 crianças entre as idades de 1 mês e 5 anos, que apresentaram *status epilepticus* febril para a realização de estudos de neuroimagem e acompanhamento dos casos para identificar a ocorrência de crises convulsivas.

Um dos trabalhos do estudo FEBSTAT mostrou que anormalidades em exames de ressonância magnética, tais como alterações morfológicas no hipocampo, aumentam

em mais de três vezes o risco de apresentar novas convulsões após manifestarem crises febris complexas (HESDORFFER et al., 2016). Esses dados confirmam estudos pioneiros de neuroimagem, os quais mostraram que CFs prolongadas produzem lesões no hipocampo e que estas evoluem para uma atrofia hipocampal (CENDES, 2004).

As características acima mencionadas da ELTM com histórico de crises febris (ELTM-FS) tem motivado grupos de pesquisa a classificar a ELTM-FS como um subgrupo específico da ELTM. De fato, a esclerose hipocampal é observada de maneira mais frequente nesse grupo de pacientes (HEUSER et al., 2011). Além disso, a análise da textura de imagens de ressonância revelou um padrão específico de esclerose do giro denteado em pacientes com ELTM-FS (ALEGRO et al., 2012).

1.2.2 Fisiopatologia das crises convulsivas induzidas por insulto febril

As CFs podem estar associadas às epilepsias monogênicas ou ainda àquelas consideradas complexas, sugerindo que fatores genéticos e ambientais estão associados a propensão a desenvolver convulsões após um período febril (BERG et al., 1999). Essas ocorrem em um intervalo de idade específico, indicando que fatores específicos relacionados ao desenvolvimento cerebral estão envolvidos nessas crises (VAN et al., 2006). O aumento da temperatura cerebral pode alterar as funções neuronais, incluindo canais iônicos sensíveis a alterações de temperatura. Por exemplo, os receptores de potencial transiente vaniloide, como o TRPV4, apresentam expressão constitutiva no hipocampo e maior ativação decorrente do aumento da temperatura corporal (SHIBASAKI et al., 2007). Essas alterações influenciam o disparo de potenciais de ação e aumentam a probabilidade de geração de atividade neuronal sincronizada, ou seja, crises epiléticas (MOSER et al., 1993). Notavelmente, a hipertermia induzida por medicação ou banho quente pode desencadear crises em crianças (FUKUDA et al., 1997), revelando que o aumento da temperatura cerebral gera crises epiléticas.

Evidências experimentais indicam que componentes da resposta imune desempenham papel importante na patogênese das CFs (HEIDA et al., 2009). Em particular, foi

descrita a participação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nesse processo, sendo que níveis plasmáticos aumentados de IL-1 β e IL-6 estão presentes em pacientes com CFs (VIRTA et al., 2002). Ademais, polimorfismos no promotor do gene IL-1 β foram associados ao aumento da produção desta interleucina em pacientes com ELTM e em crianças com crises febris. De fato, camundongos transgênicos com hiperexpressão de IL-1RA (inibidor de IL-1 β) apresentam menor susceptibilidade às crises (VEZZANI et al., 2004). Esse conjunto de evidências indica que a IL-1 β pode representar um novo alvo para controlar as crises febris.

Mutações em canais de sódio (SCN1A e B) também foram relacionadas a maior sensibilidade a crises febris (CATTERALL et al., 2010). Pacientes com mutações nesses receptores apresentam epilepsia generalizada com crises febris *plus* (GEFS+) (ESCAYG et al., 2001). Essa síndrome é caracterizada por crises febris em pacientes acima de seis anos, indicando uma hipersensibilidade dos pacientes a convulsões induzidas por febre. Além disso, mutações de perda total de função do canal NaV1.1, codificado pelo gene SCN1A, causam a epilepsia mioclônica grave da infância (Síndrome de Dravet). Essa síndrome é intratável e apresenta comorbidades como ataxia e declínio cognitivo (LOSSIN et al., 2003). Recentemente, foi descrita a associação entre variantes genéticas de SCN1A e ELTM em pacientes com histórico de CFs na infância (KASPERAVICIUTE et al., 2013). Além disso, o estudo das epilepsias de caráter multifatorial permite identificar novas variantes em genes previamente associados a epilepsias genéticas e sua associação com o desenvolvimento da epilepsia mediante determinados insultos (MOREIRA-FILHO et al., 2015).

Outras alterações moleculares foram descritas no contexto de CFs em modelos experimentais. Essas alterações participam da hiperexcitabilidade hipocampal evocada no momento das crises epiléticas recorrentes. CHEN et al. (2003), por exemplo, demonstraram que a inibição retrógrada da liberação de GABA está relacionada ao aumento de canabinoides endógenos, promovendo hiperexcitabilidade no hipocampo de ratos. BREWSTER et al. (2002), por outro lado, demonstraram que CFs aumentam a expressão de canais controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por

hiperpolarização (HCN1 e HCN2). Esses canais controlam correntes catiônicas que contribuem para a manutenção do potencial de repouso da membrana neuronal. O aumento da expressão de HCN1 ocorre no hipocampo de pacientes com ELTM, indicando sua relevância no contexto clínico (BENDER et al., 2003).

1.3 Modelos experimentais em Epilepsia

Modelos experimentais constituem uma ferramenta importante para a análise de alguns aspectos da sintomatologia e etiologia dos transtornos. São também fundamentais na seleção de novos compostos com potencial terapêutico durante a fase de investigação pré-clínica (STEPHENS E ANDREWS, 1991). A utilização de modelos animais é responsável por grande parte do conhecimento obtido até o momento em epilepsia. Esses modelos podem ser enquadrados em duas categorias: os que mimetizam crises convulsivas e aqueles que mimetizam a epilepsia crônica. A epilepsia humana é caracterizada pela presença de crises múltiplas, recorrentes e espontâneas. Dessa forma, modelos que envolvam a indução de uma crise convulsiva única sem convulsões subsequentes no período crônico somente mimetizam uma crise convulsiva, e não o quadro complexo de alterações biológicas que gera as crises recorrentes.

1.3.1 Modelos experimentais clássicos de epilepsia

Existem diversos modelos experimentais na literatura para mimetizar crises epiléticas. Esses modelos podem ser genéticos ou induzidos por meio de estímulos elétricos ou químicos. Os modelos experimentais clássicos são os modelos da pilocarpina, do cainato, de sensibilização (utilizando pentilenotetrazol ou outros indutores), de estimulação elétrica ou modelos de hipertermia (O'DELL et al., 2012).

Os modelos da pilocarpina e do cainato induzem um estado epilético que gera crises epiléticas recorrentes após um período latente. O modelo da pilocarpina foi extensamente utilizado para mimetizar a ELTM de humanos. Essa substância é originada de um alcaloide extraído da planta jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e possui

atividade colinérgica que induz o estado epiléptico por meio de lesões cerebrais decorrentes da excitotoxicidade neuronal. A descrição das características comportamentais, histológicas e eletroencefalográficas do modelo permitiu seu uso de maneira corrente na literatura. Nesse modelo, foram descritas alterações como apoptose na região CA3 hipocampal (TURSKI et al., 1983), brotamento das fibras musgosas (MELLO et al., 1993), inflamação, neurogênese e liberação de fatores neurotróficos (SCORZA et al., 2009). Já o modelo de epilepsia induzida pelo cainato, um análogo glutamatérgico excitotóxico, gera crises epileptiformes na região CA3 hipocampal. Nesse modelo, neurônios piramidais da região CA3 são sensíveis à neurodegeneração induzida pelo cainato, colocando essa região no centro das alterações morfológicas subjacentes ao modelo (BEN-ARI e COSSART, 2000). Outra região hipocampal, a CA1, apresenta depressão da inibição gabaérgica causada pela administração de cainato, indicando que a rede de interações neuronais que comunica essas regiões participa ativamente do desencadeamento das crises epiléticas.

Os modelos de sensibilização (ou *kindling*) são relevantes na avaliação de alterações epileptogênicas progressivas no cérebro dos animais. O pentilenotetrazol (PTZ), por exemplo, um antagonista gabaérgico, é administrado em doses subconvulsivas, e os animais durante o tratamento desenvolvem crises cujo grau de intensidade pode ser avaliado por meio de escores comportamentais (DHIR, 2012). Foi demonstrado que o PTZ aumenta a expressão de receptores NMDA no hipocampo e córtex de animais submetidos a esse modelo de *kindling*, sendo que essa alteração pode desencadear a hiperexcitabilidade, detectada por estudos eletrofisiológicos nas regiões CA3 e giro denteado (EKONOMOU e ANGELATOU, 1999).

1.3.2 Modelos Experimentais em Epilepsia de Crises Febris

Modelos utilizando insultos precipitantes no cérebro em desenvolvimento são importantes para explorar os mecanismos de epileptogênese no início da vida. Ademais, a partir desses modelos, pode-se inferir o potencial terapêutico de moléculas genuinamente anti-epileptogênicas, visando evitar a reconfiguração neuronal que

desencadeia o circuito neuronal hiperexcitável (AUVIN et al., 2012). Considerando a relevância dos insultos precipitantes febris para o desencadeamento da epilepsia, diversos modelos experimentais utilizando protocolos de indução febril foram elaborados para o estabelecimento da relação entre as crises febris prolongadas e a ELTM (BARAM et al., 1997). Alguns desses modelos mostraram, por exemplo, que convulsões febris podem causar danos neuronais e aumento da citogênese no giro denteado do hipocampo por pelo menos duas semanas (NAZEM et al., 2012). Além disso, crises febris experimentais aumentam a complexidade dendrítica em células granulares do giro denteado (RAIJMAKERS et al., 2016). Alguns estudos também identificaram um biomarcador de neuroimagem (redução do tempo de relaxamento T2 na amígdala) que possui valor preditivo para o desenvolvimento de epilepsia após crises induzidas por hipertermia em roedores (CHOY et al., 2014). Esses animais apresentaram um aumento da expressão de marcadores inflamatórios na amígdala (PATTERSON et al., 2015), demonstrando que insultos febris podem desencadear alterações duradouras no sistema nervoso.

Dado a relevância de citocinas pró-inflamatórias para o desenvolvimento das crises febris, foi estabelecido um modelo utilizando lipopolissacarídeos (LPS) para a indução de resposta inflamatória seguido de dose subconvulsivante de ácido caínico (HEIDA et al., 2009). Outro estudo demonstrou que crises induzidas por hipertermia podem ser utilizadas como modelo para convulsões febris em crianças (HOLTZMAN et al., 1981). Interessantemente, animais nocaute para o receptor de IL-1 β são resistentes à crise febril induzida por hipertermia em sua fase neonatal (DUBÉ et al., 2005a). Esses modelos corroboram a hipótese de que componentes do sistema imune, tais como a citocina pró-inflamatória IL-1 β , estão relacionados à gênese das crises febris. No modelo experimental de crises febris prolongadas, utilizado por Dubé et al. em 2005, ratos com idade de 10-11 dias (fase importante do desenvolvimento do hipocampo e córtex cerebral) foram submetidos a temperaturas superiores a 39,5°C em uma câmara de hipertermia por 30 a 45 minutos. Os animais desenvolveram crises epiléticas severas durante a fase de indução do modelo e, após alguns meses (período latente assintomático), desenvolveram crises espontâneas e recorrentes (DUBÉ et al., 2000;

DUBÉ et al., 2002). Um estudo descreveu características eletroencefalográficas, marcadores inflamatórios (IL-1 β) e alterações de neuroimagem (sinal T2 de ressonância magnética) em animais submetidos a esse modelo experimental (DUBÉ et al., 2010). Notavelmente, o aumento de pH no cérebro induzido por hipertermia aumenta sua hiperexcitabilidade, sendo que esse efeito pode ser mimetizado pela administração intraperitoneal de bicarbonato. A supressão da alcalose nesse caso, utilizando 5% de CO₂ ambiental, foi capaz de inibir as crises, impedir o aumento das correntes de hiperpolarização I_H e inibir a expressão de receptores CB1 no hipocampo (SCHUCHMANN et al., 2006). Foi também demonstrado que o anticonvulsivante topiramato apresenta efeito neuroprotetor em neurônios piramidais presentes nas regiões CA1 e CA3 nos cérebros de animais submetidos ao modelo de CFs (SOBANIEC-LOTOWSKA; LOTOWSKA, 2011). Por fim, foi descrito que a liberação do neuropeptídeo Y (NPY) no giro denteado e região CA3 hipocampal é capaz de prevenir a recorrência de CFs nesse modelo por meio do aumento do limiar para a crise (DUBÉ et al., 2005b). Isso sugere que a sinalização desencadeada pelo NPY e sua ação moduladora da neurotransmissão gabaérgica apresentam efeito neuroprotetor.

Devido à elevada frequência de malformações corticais que geram crises recorrentes após insultos febris em crianças, modelos mimetizando ambas as condições foram desenvolvidas. Nesses modelos, a primeira manipulação desenvolve uma lesão cortical que acarretará em maior sensibilidade à indução de crises febris. De fato, em um modelo de lesão congelante em P1 seguido de crises febris induzidas em P10, foi observado que a temperatura necessária para induzir convulsão generalizada durante a hipertermia foi diminuída em ratos com lesão cortical e a latência para alcançar essa convulsão também foi menor (SCANTLEBURY et al., 2004). Outros modelos utilizaram o período intrauterino para a indução de displasias corticais. LIN et al. (2006) utilizaram a radiação intrauterina em E17 como ferramenta para formação de displasias corticais do tipo difusa. PARK et al. (2010), por sua vez, utilizaram a exposição ao agente alquilante metilazoximetanol para a indução de displasia cortical no período intrauterino. Posteriormente, os filhotes foram submetidos a CFs para a avaliação de alterações morfológicas no hipocampo desses animais. Alterações como redução da densidade

neuronal em CA1, gliose e reorganização sináptica foram observadas nesses animais, indicando que displasias corticais no cérebro imaturo aumentam os efeitos pró-epileptogênicos das crises febris.

1.4 Epilepsia, Genômica Funcional e Biologia de Sistemas

1.4.1 Estudos Genômicos e Epilepsia

Mutações em genes que acarretam casos de epilepsia familiar auxiliam na identificação dos caminhos funcionais que levam à epileptogênese. Noebels (2003), por exemplo, ressalta a relevância das mutações de 70 genes que codificam canais iônicos, proteínas responsáveis pelo tráfico de vesículas contendo neurotransmissores e proteínas envolvidas na proliferação, migração e desenvolvimento neuronal. Isso indica que os processos biológicos envolvidos na epileptogênese estão associados ao aumento da susceptibilidade a insultos precipitantes, resposta inflamatória exacerbada pós-insulto, remodelamento da circuitaria neuronal e alterações de canais iônicos que reduzem o limiar para disparo das crises epilépticas frequentes.

SHARMA em 2012 realizou uma revisão extensa de 39 estudos avaliando o transcriptoma associado à epilepsia em humanos e em modelos experimentais. Nela, as sinalizações desencadeadas pelos receptores do tipo Toll-like e pelas quimiocinas foram identificadas como fatores convergentes para a epileptogênese. Além disso, diversas outras funções foram hiper-representadas pelos genes diferencialmente expressos obtidos nesses estudos, tais como diferenciação celular, axogênese, adesão celular, proliferação celular, regulação de íons cálcio, proteínas estruturais, inflamação, função glial, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, metabolismo celular, canais iônicos, sinalização neuronal, função sináptica e regulação da transcrição. Outro estudo revisou as principais alterações transcriptômicas que ocorrem durante a epileptogênese em modelos animais de ELTM. As principais funções hiper-representadas nesse estudo foram proliferação glial, resposta imune, estresse, inflamação, transmissão sináptica, transporte iônico e plasticidade sináptica (ARONICA;

GORTER, 2007). Esses resultados demonstram a diversidade de fenômenos que ocorrem como causa ou consequência das crises epiléticas.

Estudos de expressão gênica visando avaliar as alterações decorrentes da ELTM utilizam normalmente tecido cerebral oriundo de cirurgias em pacientes ou modelos experimentais de ELTM. A região cerebral mais utilizada é o hipocampo, devido a sua função primordial no remodelamento do circuito neuronal presente nos casos de ELTM. O hipocampo é dividido em duas regiões: o giro denteado (GD), formado primariamente de células granulares, e o corno de Ammon, composto por neurônios piramidais excitatórios que podem ser divididos nas sub-regiões CA1, CA2 e CA3. As populações neuronais de cada uma dessas regiões podem ser diferenciadas em relação a sua morfologia, conectividade, propriedades eletrofisiológicas e susceptibilidade a insultos. Além disso, foi demonstrado que padrões de expressão gênica estão restritos ou enriquecidos em regiões específicas do hipocampo, tais como genes associados à transdução de sinal, fatores de transcrição, proteínas de ligação ao cálcio e enzimas modificadoras de carboidratos (LEIN et al., 2004; ZHAO et al., 2001). Essa observação corrobora a relevância do estudo específico de subregiões hipocâmpais para se revelar os mecanismos moleculares subjacentes aos fenômenos ocorrendo nessas regiões.

1.4.2 Genômica funcional e epilepsia febril

Uma característica da epilepsia induzida por insulto febril é a persistência por meses de alterações na expressão gênica desencadeadas pela crise. Isso foi evidenciado em alguns trabalhos que demonstraram a correlação entre alterações persistentes em canais iônicos do tipo HCN e de glutamato e aumento na susceptibilidade a crises (BREWSTER et al., 2002; ZHANG et al., 2004). Portanto, o aumento da plasticidade dos programas de expressão gênica em fases iniciais da vida pode permitir que insultos febris alterem a expressão de genes de maneira persistente, convertendo um circuito neuronal normal para um alterado e epilético (BENDER e BARAM, 2007). Portanto, a análise das alterações de expressão gênica pode revelar o padrão de modificações subjacentes à circuitaria neuronal envolvida no disparo das crises epiléticas.

Bando et al. (2011) demonstraram que em pacientes com ELTM o padrão transcriptômico observado na região CA3 hipocampal está relacionado ao insulto precipitante inicial. Ademais, foi demonstrado que os genes com maior centralidade nas redes de co-expressão gênica diferem entre pacientes cujo insulto precipitante foi febril (IPF) em relação ao grupo não febril (IPNF). Enquanto nos pacientes com IPF esses genes estavam relacionados à sinalização glutamatérgica, nos pacientes com IPNF os genes estavam relacionados à sinalização gabaérgica e à modulação de NTs. O exame histológico também demonstrou que a perda de células granulares foi maior no hipocampo dos pacientes cujo insulto inicial foi febril. Esses achados sugerem potenciais diferenças morfológicas e moleculares no hipocampo de pacientes com IPF em relação ao grupo com IPNF. A evolução dessas análises de bioinformática revelou que nós com alta centralidade nas redes associadas ao transcriptoma em CA3 participam de mecanismos compensatórios e patogênicos da ELTM (BANDO et al., 2013). Por fim, a análise de comunidades nas redes de co-expressão gênica no hipocampo de pacientes epiléticos com IPF demonstrou módulos funcionais envolvidos em efeitos pró-epileptogênicos, pró-convulsivantes e de resposta ao estresse celular, revelando um padrão hierárquico na resposta transcricional após a injúria no cérebro em desenvolvimento (MOREIRA-FILHO et al., 2015).

JUNG et al. (2011) revelaram os perfis de expressão gênica diferencial durante o período latente após crises febris induzidas por hipertermia em modelo animal. Esses genes foram categorizados de acordo com o seu padrão de alteração em genes continuamente altos (CA), continuamente baixos (CB), padrão oscilatório (PO) e aumento progressivo (AP). Os genes da categoria CA estavam relacionados com ciclo celular e adesão, enquanto os genes do tipo CB estavam associados com metabolismo energético. Já os genes com PO estavam relacionados com inflamação, apoptose e sinalização gabaérgica. Por fim, os genes com AP estavam envolvidos com transporte iônico e sinaptogênese. Uma importante limitação desse estudo é a utilização de material de cérebro total para a realização dos estudos de expressão gênica diferencial. Dessa forma, o estudo de regiões específicas cerebrais pode revelar novos mecanismos biológicos associados à epileptogênese em modelos animais de ELTM.

Dessa maneira, se faz necessária a futura avaliação das alterações de expressão gênica em regiões particularmente envolvidas na circuitaria neuronal epiléptica, tais como as regiões hipocampais CA3 e giro denteado. Novas abordagens visando a integração sistemática da avaliação dessas alterações são também relevantes para se identificar o panorama molecular envolvido na epileptogênese induzida por insulto febril.

1.4.3 *Biologia de sistemas e Neurociências*

A biologia de sistemas é a área da biologia que avalia de maneira sistêmica fenômenos biológicos. A partir de abordagens do tipo “*top-down*”, como as ciências ômicas, são obtidas informações massivas sobre um determinado fenômeno, tais como o perfil de expressão gênica, o proteoma de uma célula, o padrão de fosforilação dessas proteínas e o conjunto de metabólitos oriundos de reações enzimáticas. Esses dados são utilizados para reconstruir o fenômeno estudado, com o intuito de identificar mecanismos moleculares subjacentes a esse fenômeno. O desafio de se analisar uma quantidade expressiva de dados, bem como de integrar diferentes tipos de informações aproximou essa área das ciências da computação. Ainda, métodos computacionais podem ser utilizados para a modelagem de sistemas biológicos, permitindo a geração de *insights* que direcionem a experimentação subsequente.

Dados transcriptômicos podem ser organizados em redes baseadas em valores de co-expressão ou interações físicas. Essa constatação permitiu a aplicação da teoria dos grafos para o desenvolvimento de redes de interação molecular (GESCHWIND e KONOPKA, 2009). As redes são representadas na teoria dos grafos por meio de nós conectados a arestas. Em análises de redes, os nós representam genes diferencialmente expressos entre duas ou mais condições experimentais e as arestas representam as conexões entre esses genes, obtidas a partir de dados de co-expressão ou da interação física entre as proteínas codificadas por esses genes.

A configuração das conexões entre os nós ilustra de maneira gráfica a complexidade molecular associada a um determinado fenômeno biológico. Além disso, algumas propriedades das redes são de particular interesse para a biologia e informações sobre

a topologia dessas redes podem revelar genes de maior relevância de acordo com medidas de centralidade estabelecidas. A organização das redes de maneira livre de escala, por exemplo, indica que essas redes não são organizadas de maneira aleatória e, conseqüentemente, genes com maior centralidade, denominados “*hubs*”, possuem potencialmente maior relevância na regulação da rede associada a esses genes (GRANT, 2003). Essa centralidade é calculada de diversas maneiras, por exemplo, utilizando o número total de conexões de um nó (grau ou “*node degree*”), o número de caminhos mínimos que passam pelo nó (“*node betweenness*”), a fração de trios de nós que são efetivamente interconectados entre si (coeficiente de clusterização), entre outros (BARABASI e OLTAVAI, 2004).

As análises das redes de interações transcricionais utilizando conceitos da teoria dos grafos já foram utilizadas no estudo da neurociência. Por exemplo, *hubs* contidos em redes transcricionais são capazes de prever a função de classes distintas de interneurônios (WINDEN et al., 2009). Esses resultados demonstram como a diversidade fenotípica observada nos neurônios pode ser vislumbrada no nível transcricional. Outro estudo realizou análises de microarranjos de DNA para investigar as alterações de expressão gênica no hipocampo de animais submetidos ao modelo de ELTM induzida por cainato (WINDEN et al., 2011). Nele, foram identificados nas redes de interação gênica módulos de co-expressão e genes centrais associados à epileptogênese. Esses genes estavam envolvidos principalmente com a proteção contra o estresse oxidativo em células gliais, indicando que o desbalanço entre espécies reativas de oxigênio possa induzir genes protetores durante a epileptogênese. Tomados em conjunto, os resultados desses dois estudos indicam a relevância das ferramentas de biologia de sistemas para a análise da complexidade das interações entre neurotransmissores, proteínas cinases, fatores de transcrição, genes e proteínas no sistema nervoso central, durante o estado fisiológico ou patológico.

2. JUSTIFICATIVA

Os insultos febris são potenciais indutores da epileptogênese, tornando o cérebro hiperexcitável e susceptível a crises epiléticas recorrentes. Muitos genes distintos foram implicados na susceptibilidade a crises febris, incluindo canais de sódio, receptores GABA_A e interleucinas. Isso indica que a interação entre esse conjunto de genes e outros ainda não descritos pode contribuir para a ocorrência das crises de uma maneira complexa e organizada. Além disso, os eventos epileptogênicos induzidos por esses gatilhos moleculares são desconhecidos. Deste modo, o estudo sistemático dos genes regulados pelas crises febris pode revelar o espectro total de alterações moleculares induzidos nesse processo. Para atingir esse objetivo, estudos utilizando tecidos humanos são limitados, pois somente estão disponíveis em pacientes adultos no estágio avançado e farmacoresistente da doença. Portanto, o uso de modelos animais é fundamental para essa linha de investigação.

Dessa forma, o presente trabalho buscou identificar as alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de crises convulsivas induzidas por hipertermia. Esses animais foram avaliados temporalmente para revelar as alterações moleculares que ocorrem de forma aguda e crônica no modelo experimental. Os resultados obtidos permitiram a identificação de mecanismos biológicos que participam na reorganização da circuitaria neuronal em regiões críticas para o desenvolvimento da epilepsia. A análise topológica das redes de co-expressão geradas a partir dos dados transcriptômicos revelou o padrão de regulação dessas redes e dos genes com maior relevância para o desencadeamento dos eventos epileptogênicos induzidos pelos insultos febris. Esses genes poderão ser investigados em futuros estudos visando confirmar seu papel no contexto da epileptogênese e seu potencial como alvo terapêutico para medicamentos anti-epileptogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo identificar temporalmente as alterações transcriptômicas no hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de crises convulsivas induzidas por hipertermia, a partir da análise do perfil de expressão gênica diferencial e de suas redes de co-expressão gênica.

3.2 Objetivos específicos

- a) identificar perfis diferenciais de expressão gênica após indução de crise convulsiva em um modelo experimental de insulto febril induzido por hipertermia;
- b) identificar funções biológicas hiper-representadas por esses perfis transcricionais;
- c) identificar padrões de co-expressão entre os genes diferencialmente expressos para construção de redes de interação gênica;
- d) analisar a topologia das redes para identificação de módulos e genes com maior centralidade (*hubs*);
- e) verificar a expressão de alguns genes diferencialmente expressos por PCR em tempo real (qPCR), para confirmação dos resultados de microarranjos de DNA.

4 MÉTODOS

4.1 Protocolos Experimentais

Os protocolos utilizados foram desenvolvidos de acordo com os preceitos éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, em 18/11/2013, sob o nº 460/13.

4.1.1 Modelo animal e indução de crises convulsivas por meio de hipertermia

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas e machos, provenientes do Biotério da FMUSP. Os animais foram acasalados, com programa de iluminação artificial com ciclo de luz claro/escuro de 12h e temperatura controlada em 23°C. A idade dos animais foi determinada a partir do dia do nascimento (dia pós-natal P0) e os ratos foram selecionados aleatoriamente para os diferentes grupos experimentais. A sexagem dos filhotes foi realizada em P1.

No décimo primeiro dia de vida pós-natal (P11), os animais foram submetidos a um modelo de crises febris prolongadas adaptado de Baram et al. (1997) e Dubé et al. (2000, 2006). Aos pares, os animais foram expostos ao calor seco em um recipiente retangular de vidro com temperatura ambiente média de 39,5 – 42,3 °C, até atingirem a temperatura corpórea de 39,5 – 41 °C (Dubé et al., 2010) pelo período de 45 minutos.

A temperatura corpórea dos animais foi medida por via oral, com termômetro específico. Os registros de temperatura foram realizados durante o experimento para o acompanhamento do estado febril dos animais. Os animais que chegaram aos 45 minutos de hipertermia acima de 40 °C foram retirados da câmara de indução e ficaram em temperatura ambiente pelo período de 2 minutos. Os animais foram então pesados, hidratados e monitorados pelo período de 1 hora (período pós-indução). O período de pós-indução foi gravado para posterior análise das imagens, qualificando assim as

alterações comportamentais dos animais. O grupo controle foi formado por animais que foram colocados na caixa utilizada para hipertermia, porém não foram expostos ao calor. O método utilizado para sacrifício dos animais foi a decapitação.

Os modelos de crises induzidas por hipertermia descritos na literatura utilizam como abordagem para aumento da temperatura corporal dos animais: i) um fluxo de ar quente a partir de secadores de cabelo (BARAM et al., 1997), ii) sistemas com água quente para indução de hipertermia (YAGOUBI et al., 2015) ou iii) câmaras utilizadas para o procedimento hipertérmico (SCHUCHMANN et al., 2006). Porém, as duas primeiras abordagens apresentam complexidade maior em sua realização, além da dificuldade em controlar a temperatura do ambiente nessas condições. Portanto, adotamos a terceira abordagem e desenvolvemos um aparato que fornecesse condições ideais para o aumento rápido da temperatura corporal dos animais e o controle do ambiente. Esse aparato (Figura 3) consiste de uma caixa de vidro com as dimensões (30, 19,5, 14 cm) que possui lâmpadas incandescentes de 40 W e 220 volts. A temperatura da caixa foi medida constantemente durante a realização do protocolo por termômetro digital. A primeira medida foi realizada antes da hipertermia, e no transcorrer do experimento o registro foi feito a cada 10 minutos.

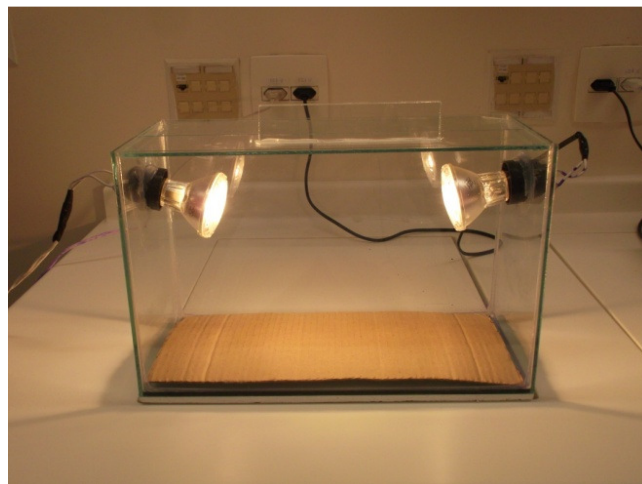


Figura 3. Aparato para geração de insulto hipertérmico.

4.1.2 Grupos Experimentais e Avaliação das crises convulsivas

As análises de expressão gênica das regiões CA3 hipocampal foram realizadas nos dias 1º (P12), 19º (P30), 49º (P60) e 109º (P120) após o protocolo de indução hipertérmica, considerando o período latente entre a indução da crise febril e o período de crises recorrentes após 90-120 dias nesse modelo. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle, animais submetidos à hipertermia com crises convulsivas, e animais submetidos à hipertermia sem crises. As crises convulsivas foram avaliadas de acordo com a escala de Racine (MORIMOTO et al., 2004). Essa escala estabelece comportamentos associados às crises convulsivas, de acordo com uma classificação de 5 estágios. O estágio 1 está associado a movimentos oromastigatórios, o estágio 2 a movimentos horizontais de cabeça, o estágio 3 à clonia dos membros anteriores, o estágio 4 à extensão dorsal e por fim o estágio 5 está envolvido com a perda de balanço e queda.

4.1.3 Microdissecção do hipocampo e das regiões CA3 hipocampais

A região ventral do hipocampo de ratos foi selecionada para a análise da expressão gênica global, visto que a hiperexcitabilidade hipocampal ocorre preferencialmente na região CA3 do hipocampo (WU et al., 2005). Além disso, a porção ventral do hipocampo de ratos é homóloga ao hipocampo anterior em humanos, a qual representa a região relacionada a mudanças histológicas em pacientes com ELTM (TOYODA et al., 2013).

A microdissecção foi realizada como descrito em Gorter et al. (2006). Após decapitação, o hipocampo dos animais foi acessado a partir de incisão na parte ventrocaudal abaixo da fissura rinal. Ambos os hipocampos foram cortados em partes menores (200-300 µm) e a região CA3 foi selecionada e removida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 4 °C sob um microscópio de dissecção. O material obtido da região CA3 foi acondicionado em tubos tipo *ependorf* contendo RNA later™ (Qiagen) para posterior extração do RNA total. Foram realizados procedimentos de dissecção para obter amostras das regiões CA3 ventral e CA3 dorsal, conforme a Figura 4. No

hemisfério direito, um corte coronal foi realizado e a porção mais interna do hipocampo foi removida (CA3 dorsal). Já no hemisfério esquerdo foi realizado uma secção horizontal para obtenção das amostras de CA3 ventral.

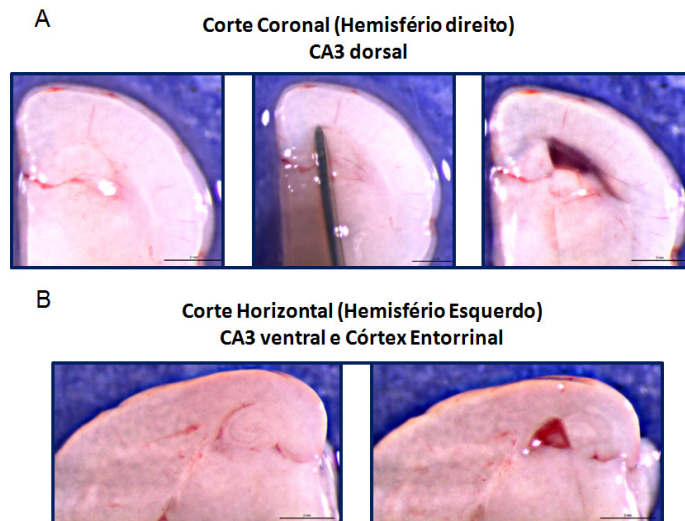


Figura 4. Dissecção dos hemisférios direito e esquerdo cerebrais para obtenção de amostras de CA3 dorsal e CA3 ventral, respectivamente.

4.2 Experimentos de DNA *microarray*

4.2.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy® Mini (Qiagen, Germantown, USA) e armazenado a -80 °C até a utilização nos experimentos subsequentes. Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram analisadas com o auxílio do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). A análise realizada pelo Bioanalyzer informa de forma automatizada parâmetros de integridade do RNA por meio da variável RIN (*RNA Integrity Number*). O RIN varia de zero a dez, indicando respectivamente de zero a cem por cento de integridade do RNA (SCHROEDER et al., 2006). Foram utilizadas somente amostras com RIN ≥ 7 .

4.2.2 Microarranjos de oligonucleotídeos de DNA

Os experimentos para análise de expressão gênica foram realizados na plataforma da Agilent Technologies, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante. Foram utilizadas lâminas de DNA *microarrays* com oligonucleotídeos de 60 bases, individualmente pré-validados, contendo 44 mil transcritos do genoma de rato (*Agilent whole rat genome 4X44K v3 oligonucleotide microarrays*, G2519F-028282).

Kits *Low Input Quick Amp Labeling* foram utilizados na geração do cRNA (RNA complementar) para a etapa de hibridização. O protocolo consiste da transcrição reversa de uma alíquota de 200 ng de RNA total em cDNA. Depois, o cDNA sintetizado foi transcrito *in vitro* em cRNA e marcado com o corante fluorescente cianina Cy3. O cRNA marcado foi então purificado utilizando colunas RNeasy Mini (Qiagen). Por fim, a qualidade de cada amostra de cRN foi confirmada por meio do rendimento total obtido e da atividade específica da Cy3, calculados com base em medidas espectrofotométricas obtidas no Nanovue (GE Healthcare, WI, USA). Foram consideradas qualificadas as amostras que apresentaram rendimento superior a 1,65 µg e atividade específica maior que 6 pmol de Cy3 por µg de RNA. Após obtenção dos cRNAs incorporados com Cy3, as amostras foram hibridizadas em lâminas de microarranjos de DNA contendo oligonucleotídeos complementares a 44.000 transcritos da espécie *Rattus norvegicus*.

As lâminas foram incubadas a 65 °C por 17 horas em uma câmara de hibridização de acordo com o protocolo da Agilent (Versão 5.7, março de 2008). Após hibridização, as imagens foram capturadas pelo leitor Agilent Bundle (Agilent Technologies G2505B) e extraídas pelo *software* Feature Extraction versão 9.5.3 (Agilent Technologies). A qualidade das lâminas foi analisada pelo relatório de controle de qualidade gerado pelo *software*. Esse relatório apresenta parâmetros como reprodutibilidade, distribuição gaussiana dos sinais de fluorescência encontrados, comportamento similar do sinal processado e do *background* nas diferentes linhas e colunas do *microarray*, distribuição uniforme do *background* e obtenção de uma curva de comportamento linear utilizando como pontos os sinais de fluorescência obtidos de diferentes RNAs *spike-in*.

A qualidade das hibridizações foi avaliada por meio da *i)* inspeção visual da distribuição homogênea da fluorescência nas lâminas (Figura 5A) e também da *ii)* análise de parâmetros contidos nos relatórios de qualidade gerados para cada lâmina escaneada, como a distribuição de *outliers* na lâmina (Figura 5B), a reprodutibilidade dos sinais obtidos para as sondas em replicata na lâmina (Figura 5C), a distribuição gaussiana dos valores de fluorescência obtidos (Figura 5D), além da distribuição dos valores de sinal de fluorescência processado e de *background* ao longo das colunas e linhas contidas no *microarray* (Figura 5E).

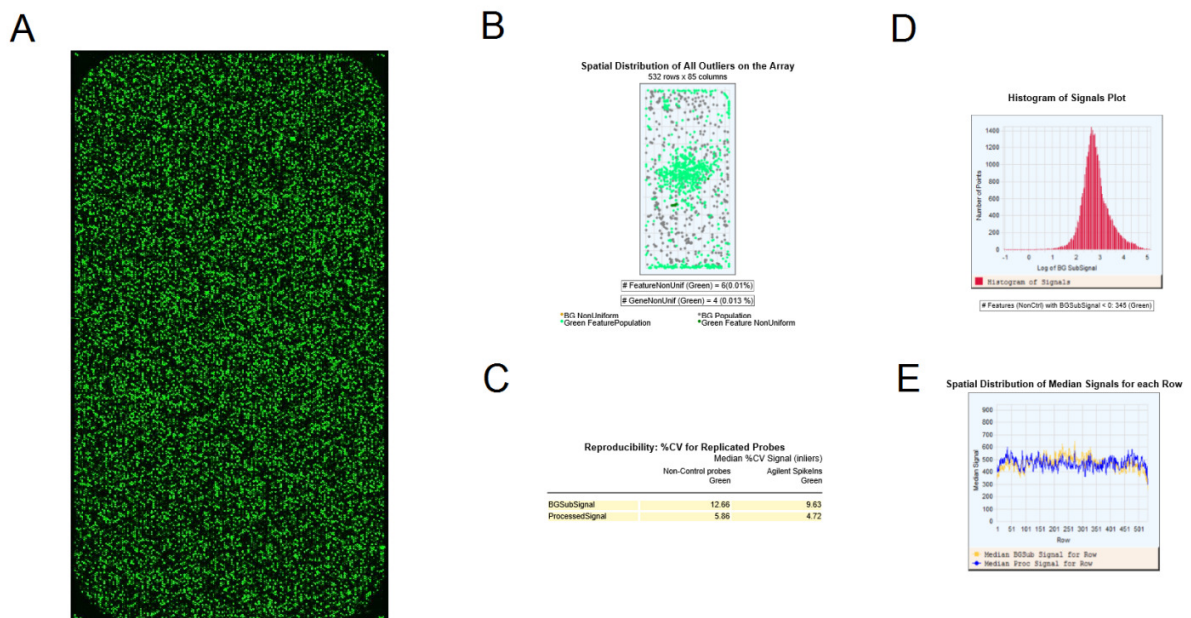


Figura 5. Análise da qualidade da hibridização nas amostras utilizadas. A) Inspeção visual da distribuição homogênea dos sinais de fluorescência. B) Avaliação da distribuição e porcentagem de *outliers* observados na lâmina. C) Reprodutibilidade dos valores de fluorescência obtidos para as sondas em replicata na lâmina. D) Distribuição gaussiana dos sinais de fluorescência obtidos. E) Distribuição dos valores de sinal de fluorescência processado e de *background* ao longo das linhas do microarranjo.

4.3 Análises de Bioinformática

A análise dos dados de expressão gênica seguiu o algoritmo estabelecido no esquema da Figura 6. Esse algoritmo foi utilizado com o objetivo de identificar a expressão gênica diferencial entre os grupos experimentais e controle em cada intervalo de tempo, além da construção de redes de co-expressão gênica que foram utilizadas para análise à jusante (*downstream*) dos dados, com o objetivo de: identificar *hubs* intramodulares, correlacionar módulos e genes com grupos experimentais, avaliar alterações de conectividade de genes em módulos específicos, analisar a preservação de conectividade dos módulos entre os grupos experimentais e controles, e por fim realizar o enriquecimento funcional de módulos relevantes para identificar funções biológicas hiper-representadas pelos genes pertencentes a esses módulos.

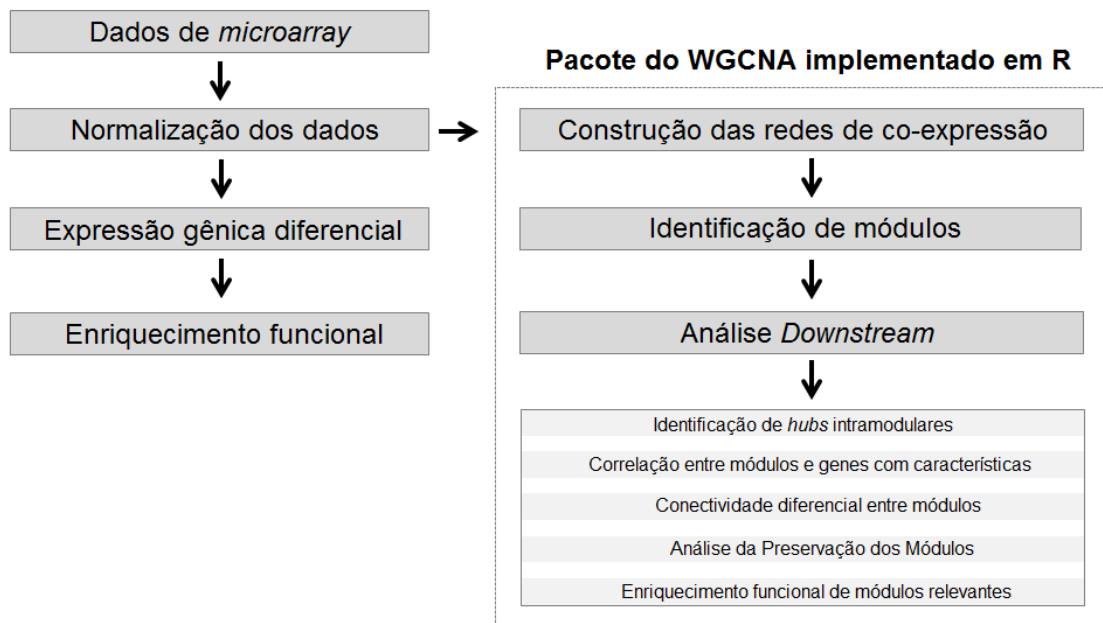


Figura 6. Algoritmo utilizado para análise dos dados de expressão gênica.

4.3.1 Processamento e análise estatística dos resultados de microarranjos de DNA

O ambiente estatístico R Studio (<http://www.r-project.org>) foi usado para analisar os dados. O parâmetro considerado nas análises de bioinformática foi o sinal processado

(*gProcessedSignal*) gerado pelo software *Feature Expression* (v9.5.3). As médias das intensidades das sondas de cada gene foram obtidas e em seguida, foi calculado o logaritmo na base 2 (\log_2) dos valores encontrados. Os perfis de expressão gênica diferencial foram obtidos utilizando o pacote *limma* (*Linear Models for Microarray Data*), fornecido pelo *Bioconductor*. Os dados foram processados e normalizados por quantis (*quantile normalization*). A técnica utilizada para controlar os falsos positivos durante a análise de *microarray* foi a de BENJAMINI & HOCHBERG (1995).

4.3.2 Análise das redes de co-expressão gênica e Enriquecimento Funcional

As redes de co-expressão gênica foram construídas com base em medidas de correlação entre a expressão dos genes para identificar módulos de co-expressão. A medida de similaridade utilizada foi a correlação ponderada (*Biweight midcorrelation*). Essa medida de similaridade é baseada na mediana ao invés da média de expressão dos genes e dessa maneira é menos sensível a *outliers* (ZHENG et al., 2014). Somente os 5000 genes mais variáveis em cada intervalo de tempo foram utilizados nas análises e o tamanho mínimo de cada módulo foi determinado em 50 genes. *Hubs* intramodulares foram identificados como os 10 genes com maior conectividade em cada módulo. Os genes foram classificados de acordo com sua conectividade intramodular e mudanças nas posições (*ranking*) desses genes entre as redes foram determinadas para identificação de nós e módulos associados com ganho ou perda de conectividade.

A construção e análise das redes de co-expressão gênica foi realizada utilizando o pacote WGCNA (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*), implementado em R (LANGFELDER e HORVATH, 2008). Esse algoritmo permite a construção das redes de co-expressão, identificação de módulos de genes co-expressos, além da correlação de módulos e genes com características das amostras, como por exemplo se as amostras pertencem aos grupos controles e experimentais. Após a construção dos módulos, estes são nomeados automaticamente por cores específicas. Genes que não foram classificados em nenhum dos módulos são distribuídos coletivamente no módulo “grey”.

Já o módulo “gold” consiste de 1000 genes randomicamente selecionados para a análise de preservação de módulos.

A análise de preservação de módulos foi também implementada utilizando o WGCNA para verificar se parâmetros de densidade e conectividade dos módulos são mantidos entre as redes (LANGFELDER et al., 2011). O parâmetro estatístico $Z_{summary}$, gerado pelo *software* WGCNA, foi utilizado para a avaliação da preservação dos módulos nas redes. O valor de $Z_{summary} < 2$ indica pouca preservação de um módulo entre as redes, enquanto $2 < Z_{summary} < 10$ indica evidência moderada de preservação, e por fim $Z_{summary} > 10$ sugere elevada preservação de um determinado módulo.

Por fim, o *software* calcula medidas de centralidade dos nós, tais como o parâmetro K_{within} (grau intramodular), o qual identifica genes com maior número de conexões em cada módulo. Gráficos de dispersão foram também construídos no programa GraphPad Prism 5, utilizando os parâmetros K_{within} e *gene significance*, este último representando a correlação de um determinado gene com o grupo experimental. A correlação de um determinado módulo com um grupo experimental específico foi calculada utilizando a significância do vetor característico de cada módulo (“eigengene vector”) e o valor de p correspondente para cada módulo. Genes com um valor de p menor que 0,05 e módulos com um valor de p menor que 0,1 foram considerados significativamente correlacionados a um grupo específico.

Para procurar funções biológicas hiper-representadas no conjunto de genes diferencialmente expressos, ou em módulos relevantes nas redes de co-expressão gênica, listas de genes foram inseridas nos programas EnrichR (CHEN et al., 2013) e PANTHER (MI et al., 2016). Somente funções estatisticamente significativas foram incluídas na análise, com $p < 0,05$ calculado pelo teste de Fisher.

4.4 Validação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os dados obtidos por DNA *microarray* foram validados utilizando a técnica de qPCR. A qPCR foi realizada utilizando os kits SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies, EUA) e QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). As amostras foram incubadas à 95 °C por 5 minutos, e submetidas a 40 ciclos de 95 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. Os primers foram desenhados no *software* Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os controles de especificidade das reações foram a presença de apenas um pico de fluorescência na curva de dissociação e a ausência de amplificação nas reações em que o cDNA estava ausente. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio de quantificação relativa utilizando curva padrão. Os dados foram normalizados pela expressão do gene *housekeeping* GAPDH. A significância estatística foi determinada por teste t de *Student*, com $p < 0,05$. As sequências dos *primers* utilizados estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências dos *primers* utilizados para os ensaios de qPCR.

Gene	Primer	Sequência (5' to 3')
PTGIR	PTGIR FW	TGGGACGATGCTGTGTGA
	PTGIR RV	GAAAGCGTAGATGGAAGGCAA
SOX9	SOX9 FW	AGGAAGCTGGCAGACCAGTA
	SOX9 RV	ACGAAGGGTCTCTTCTCGCT
TRIP12	TRIP12 FW	CCAACCCAGAAATCAACCAGTC
	TRIP12 RV	GATTTCCAACATGGCCCGGGAG
RHOX8	RHOX8 FW	TGCCTGGACCCCTACTATTG
	RHOX8 RV	CTGGCTGGCACATAGTCCTG
GAPDH	GAPDH FW	GACATGCCGCCTGGAGAAAC
	GAPDH RV	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

5. RESULTADOS

5.1 Observação de crises convulsivas nos animais submetidos à hipertermia

Foram utilizados 116 animais (machos e fêmeas em mesma quantidade para cada grupo e intervalo de tempo), sendo que 35 animais foram designados ao grupo controle e os demais 81 animais foram submetidos ao protocolo experimental de crise convulsiva induzida por hipertermia. 49 animais submetidos ao protocolo tiveram crises convulsivas, sendo que os outros 32 animais não apresentaram crise durante a primeira hora avaliada após o período de hipertermia (Figura 7).

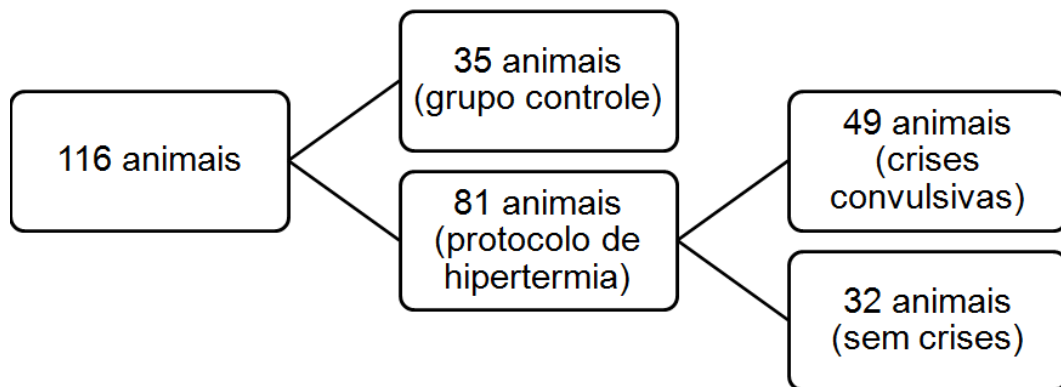


Figura 7. Número de animais utilizados de acordo com o grupo experimental e a observação de crises convulsivas após protocolo de hipertermia.

O número de animais e a classificação da escala de Racine nos respectivos pontos experimentais pode ser visualizada na Tabela 1. A maior parte dos animais com crise tiveram movimentos horizontais de cabeça (estágio 2 da escala de Racine), perda de balanço e queda (estágio 5). A observação dos comportamentos associados aos estágios 1 (movimentos oromastigatórios), 3 (clonia dos membros anteriores) e 4 (extensão dorsal) foi menos frequente.

Tabela 1. Número de animais designados para cada grupo e ponto experimental, além da distribuição do número de animais de acordo com a escala de Racine.

Ponto experimental	Controle	Hipertermia sem Crise	Hipertermia com Crise			
			Escala de Racine			
			2	3	4	5
P12	8	11	4	2	6	2
P30	11	8	4	0	1	4
P60	6	4	8	0	0	4
P120	8	4	6	3	1	4
Total	35	32	22	5	8	14
			49			

As 74 amostras de RNA obtidas da região CA3 ventral que tiveram RIN > 7 foram submetidas ao protocolo de microarranjos de DNA para determinar o perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos experimentais em cada intervalo de tempo estudado. A concentração média de RNA obtida foi de 100,3 ng/μL e o escore RIN médio foi de 7,9 (Figura 8).

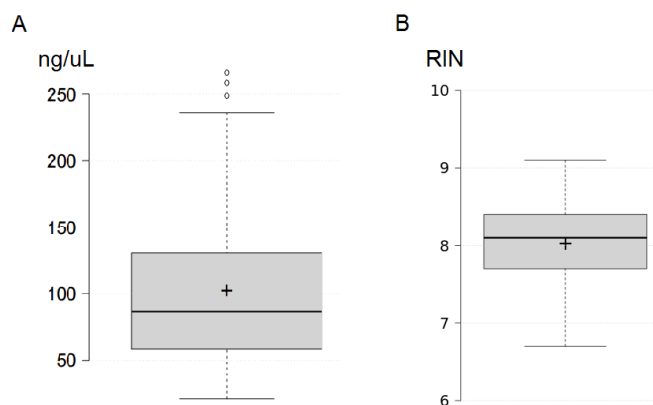


Figura 8. Boxplots contendo os valores de quantificação (A) e integridade do RNA (B) para as 77 amostras de RNA obtidas da região CA3 ventral de ratos Wistar. A concentração média de RNA obtida foi de 100,3 ng/μL e o escore médio de RIN foi 7,9.

5.2 Expressão gênica diferencial e funções hiper-representadas por esses genes

Genes diferencialmente expressos (DE) foram determinados entre o grupo com crises convulsivas (CONV) após hipertermia e o grupo controle (CTRL) nos quatro períodos de tempo avaliados. Os principais genes diferencialmente expressos identificados, bem como a razão de expressão (*fold change*) entre esses grupos, estão ilustrados no Quadro 2. As funções hiper-representadas pelos genes diferencialmente expressos em cada intervalo de tempo estão demonstradas nos Quadros 3 e 4, em conjunto com as bases de dados que foram utilizadas no Enrichr (KEGG, WikiPathways, Reactome e Biocarta), e os valores de p identificados. Alguns genes diferencialmente expressos foram selecionados para validação dos dados de microarranjos de DNA pela técnica de PCR em tempo real, conforme ilustrado na Figura 9.

5.2.1 Genes diferencialmente expressos em P12

89 genes DE (80 hiper e 9 hipo-regulados) foram observados entre os grupos experimental e controle um dia após as crises convulsivas induzidas por hipertermia (P12). Esses genes foram associados às funções de via de sinalização de RAS, metabolismo de aminoácidos, apoptose e transporte iônico. Dentre esses genes, o gene hipo-regulado *Hes6* participa da diferenciação neuronal (BAE et al., 2000), enquanto o gene hiper-regulado *Nlk* codifica uma cinase que contribui para a proliferação e diferenciação neuronal (ISHITANI e ISHITANI, 2013).

5.2.2 Genes diferencialmente expressos em P30

83 genes DE (56 hiper e 27 hipo-regulados) foram observados entre os grupos experimental e controle em P30. Esses genes estão relacionados ao transporte de ânions, morfogênese tecidual e regulação da atividade de cinases. Dentre esses genes, a proteína codificada pelo gene hipo-regulado *Gfra2* influencia a severidade das crises induzidas por sensibilização (*kindling*) em camundongos (NANOBASHVILI et al., 2013).

5.2.3 Genes diferencialmente expressos em P60

263 genes DE (162 hiper e 101 hipo-regulados) foram observados entre os grupos experimental e controle em P60. Esses genes estão relacionados às vias de sinalização de Wnt, Rap1, Notch, HIF e interferon. Além disso, também estão relacionados à ativação plaquetária, adesão focal, processamento de mRNAs, organização da cromatina, regulação da migração celular e diferenciação celular. Dentre esses genes, os genes hiper-regulados *Sox9* (GUO et al., 2012) e *Tpt1* (JOHANSSON e SIMONSSON, 2010) participam da auto-renovação de células-tronco.

5.2.4 Genes diferencialmente expressos em P120

341 genes DE hipo-regulados foram observados em P120. Esses genes estão associados às vias de MAPK, JAK-STAT e Wnt, transporte de íons e aminoácidos, morfogênese celular e transporte de neurotransmissores. Em particular, os genes *Rhox8* (ARTEGIANI et al., 2015) e *Mta2* (MUHCHYI et al., 2013) estão envolvidos na neurogênese.

Quadro 2. Principais genes diferencialmente expressos e razão da expressão (*fold change*: FC) desses genes entre os grupos experimental e controle, em cada intervalo de tempo.

P12		P30		P60		P120			
Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC
March9	0,48	Olr791	0,49	Cpne4	0,62	Trip12	0,41	Mcpt114	0,58
Cartpt	0,55	Tmem255b	0,53	RT1-M1-2	0,65	Zfp280b	0,49	Prl7b1	0,58
Hes6	0,58	Gfra2	0,53	Adcy3	0,67	Pkib	0,51	Actc1	0,57
Srsf7	0,67	Ctrb1	0,55	Lonp2	0,67	Trpv5	0,50	Slc6a18	0,58
H2afv	0,72	Tomm20l	0,55	Cabp7	0,67	Adgrg7	0,49	Tesb	0,58
Ccdc85a	0,75	Tmprss6	0,57	Abca3	0,68	Bcl2l1	0,51	Hcn4	0,60
Galr2	0,77	Rhox2	0,58	Inpp5j	0,67	Ppp1r3a	0,50	Adgrg1	0,58
Ppp1r1a	0,77	Trim26	0,58	Ttc4	0,68	Ovol2	0,52	Fabp12	0,59
Psm7	0,78	Ston1	0,60	Cep19	0,69	Krt14	0,52	Dlx3	0,60
Dnajb6	1,52	Ptgir	0,62	Chmp1a	0,69	Bpifa1	0,55	Il20	0,61
Usp46	1,53	Uqcrc1	1,39	Habp4	0,70	Ece1	0,56	Tmc1	0,60
Nlk	1,53	Rasip1	1,43	Syt12	0,70	Mta2	0,54		
Smpd3	1,56	Zkscan5	1,41	Pax5	1,58	Igf2bp2	0,51		
Brap	1,66	Katnb1	1,40	Hes7	1,61	Cyp4a1	0,55		
Ric8a	1,63	Cpt1c	1,43	Rpl23a	1,59	Kirrel	0,59		
Polr2m	1,62	Fhl2	1,45	Tpt1	1,70	Rhox8	0,56		
Cyb5r1	1,65	Atp9b	1,47	Ghdc	1,62	Gabrq	0,58		
Pax3	1,81	Inpp5d	1,49	Dcun1d1	1,66	Otor	0,57		
		Ier5	1,53	Hif1a	1,67				
		Wfs1	2,05	Sox9	1,67				
				Olr143	1,67				
				Trim42	1,89				

Quadro 3. Funções enriquecidas pelos genes diferencialmente expressos identificados em P12 e P30.

	FUNÇÕES	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	BANCO DE DADOS	P-VALUE
P12	Via de sinalização de Ras	Brp, Angpt2, Pld1, Bcl2l1	KEGG	0,031
	Metabolismo de aminoácidos	Psat1, Ndufab1, Rpl13, Dlat, Prodh, Psma7	REACTOME	0,010
	Apoptose	Vav3, Hint1, Arhgef3, Trib3, Prodh, Bcl2l1	Gene Ontology	0,005
	Transporte de compostos nitrogenados	Smpd3, Slc43a1, Slc1a1, Cartpt, Slc25a5, Slc28a1	Gene Ontology	0,007
	Transporte iônico	Knh6, Galr2, Kcna2, Scn4a, Clcn1	Gene Ontology	0,019
P30	Metabolismo de vitaminas	Sdc3, Ctrb1, Slc19a1	REACTOME	0,031
	Transporte de ânions	Slc35b4, Slc6a12, Nfkbie, Atp9b, Slc19a1	Gene Ontology	0,009
	Direcionamento de proteínas	Sun1, Nfbie, Pkd1, Dbn1, Pex14	Gene Ontology	0,001
	Morfogênese tecidual	Ahi1, Luzp1, Pkd1, Rasip1	Gene Ontology	0,050
	Regulação positiva de cinases	Wfs1, Lmna, Adcy4, Mapk8ip3, Pkd1	Gene Ontology	0,038

Quadro 4. Funções enriquecidas pelos genes diferencialmente expressos identificados em P60 e P120.

	FUNÇÕES	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	BANCO DE DADOS	P-VALUE
P60	Ativação plaquetária	Col1a1, Mapk11, Adcy3, Arhgef1, Myl12a, Mapk13, Pik3r5	KEGG	0,003
	Via de sinalização de Rap1	Pdgfrb, Mapk11, Csf1, Hgf, Flt4, Ctnnd1, Adcy3, Mapk13, Pik3r5	KEGG	0,005
	Via de sinalização de HIF-1	Egln2, Slc2a1, Hmox1, Hif1a, Pik3r5	KEGG	0,020
	Adesão focal	Col1a1, Pdgfrb, Hgf, Flt4, Zyx, Myl12a, Pik3r5	KEGG	0,033
	Processamento de mRNA	Srp19, Ddx6, Sf3a1, Rnasel, Myef2, Rbm4b, Ybx1, Rpl9, Hnrnpab, Uhmk1, Snrpd2, Auh, Pcbp2	WikiPathways	0,014
	Organização da cromatina	Hist2h2aa3, Kat2a, Dot1l, H2afx, Elp6, Padi1, Smarca4, Hcfc1	Reactome	0,004
	Ativação de Hox	Hist2h2aa3, Cnot6, H2afx, Rqcd1, Rarb	Reactome	0,007
	Via de sinalização de Tcf/Wnt	Hist2h2aa3, Tnks2, Ppp2r1a, H2afx, Sox9, Psmb8, Smarca4	Reactome	0,018
	Via de sinalização do IFN	Nup205, Rnasel, Irf7, Psmb8, Kpnb1, Ip6k2	Reactome	0,049
	Via de sinalização de Wnt	Sdhaf2, Tnks2, Ppp2r1a, Ppap2b, Sfrp5, Ctnnd1, Sox9, Zbed3h	Gene Ontology	0,003
	Migração celular	Col1a1, Pdgfrb, Ccl24, Tgfb2, Csf1, Hgf, Flt4, Sox9, Hif1a, Elp6	Gene Ontology	0,006
	Via de sinalização de Notch	Hes7, Notch3, Ncstn, Mdk, Wdr12, Hif1a, Kat2a	Gene Ontology	0,010
Diferenciação de células tronco	Col1a1, Tgfb2, Sdhaf2, Cnot3, Sox9	Gene Ontology	0,009	
P120	Via de sinalização de MAPK	Ppp5c, Hspa1l, Flnc, Mapk14, Fgf1, Ngf, Tp53	KEGG	0,039
	Via de sinalização de JAK-STAT	Ctnfr, Il20, Stat6, Il2rg, Bcl2l1	KEGG	0,047
	Transporte iônico e de aminoácidos	Slc12a3, Slc12a5, Slc6a18, Slc43a2, Slc1a3, Slc6a20	Reactome	0,003
	Via de sinalização de Tcf/Wnt	Amer1, Ctbp1, Ppp2r5e, Sox13, Psm1, Smarca4, Lrp6	Reactome	0,024
	Morfogênese celular	Sema4a, Dst, Slc1a3, Mapk14, Ngf, Rtn4, Gje1, Smarca4, Lrp6, Pax8, Peak1, Numb, Pacsin2, Vhl, Bcl2l1, Shank1	Gene Ontology	0,001
	Transporte de ânions	Clcn7, Gabrq, Slc12a3, Slc12a5, Slc6a18, Slc43a2, Slc25a42, Slc6a20	Gene Ontology	0,001
	Transporte de neurotransmissores	Gabrq, Slc6a18, Snph, Nrxn3, Slc1a3, Slc6a20, Slc6a2	Gene Ontology	0,001

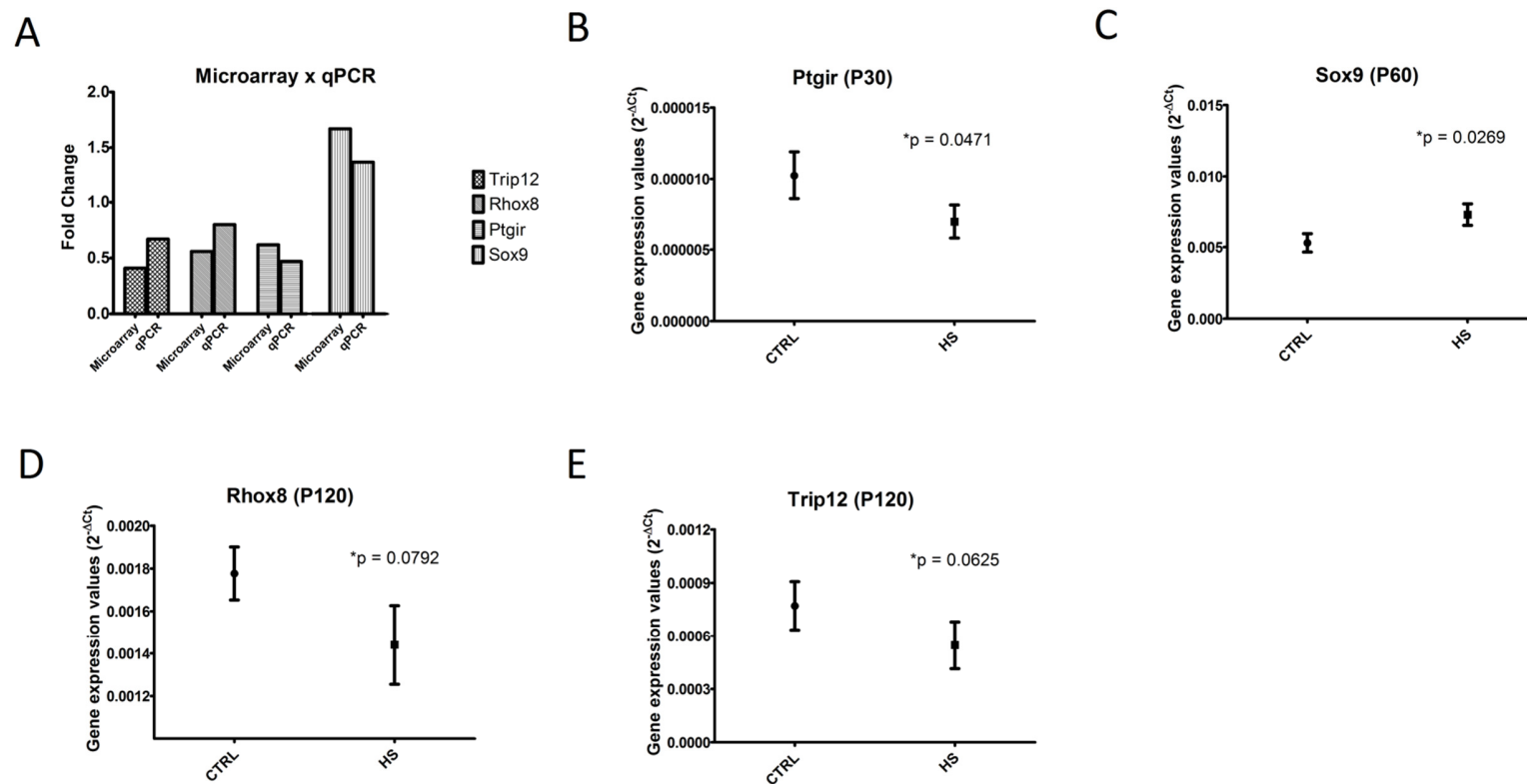


Figura 9. Comparação dos resultados de microarranjo (*microarray*) de DNA e PCR em tempo real (qPCR). Os genes *Trip12*, *Rhox8*, *Ptgir* e *Sox9* foram selecionados para verificação da expressão gênica diferencial e confirmação dos dados de microarranjos de DNA pela técnica de qPCR.

5.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas

A construção de uma única rede de co-expressão foi realizada inicialmente para cada intervalo de tempo, utilizando coletivamente as amostras pertencentes aos grupos CONV e CTRL. A análise dessas redes permitiu a identificação de módulos de co-expressão associados às crises convulsivas em cada intervalo de tempo. Módulos positivamente correlacionados às crises convulsivas estão representados na cor vermelha, enquanto módulos negativamente correlacionados às crises convulsivas estão representados na cor verde. Nessa análise, a correlação positiva de um módulo significa que os genes desse módulo possuem em média maiores níveis de expressão gênica no grupo CONV. Além disso, *hubs* correlacionados significativamente com os grupos CONV foram identificados por meio da correlação de sua expressão gênica com os grupos experimentais. Os *hubs* e as funções enriquecidas pelos módulos associados às crises convulsivas estão ilustrados nos Quadros 5 a 8.

5.3.1 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P12

Na análise em P12 (Figura 10A), os módulos “*midnightblue*”, “*magenta*” e “*grey60*” tiveram correlações positivas com as crises convulsivas, enquanto os módulos “*turquoise*” e “*purple*” tiveram correlações negativas. O módulo “*midnightblue*” está relacionado à via de sinalização de Wnt, diferenciação neuronal e axonogênese. O *hub* *Hrh4*, que codifica o receptor de histamina 4, está associado com imunomodulação. O módulo “*purple*” está relacionado com a migração transendotelial de leucócitos, via de sinalização do VEGF, via de sinalização de Wnt e ciclo celular. O *hub* *Smarb1* nesse módulo participa do desenvolvimento de neurônios do cerebelo (MORENO et al., 2014).

5.3.2 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P30

Na análise em P30 (Figura 10B), os módulos “*green*” e “*blue*” exibiram correlações positivas com as crises convulsivas, enquanto os módulos “*cyan*” e “*magenta*” apresentaram correlações negativas. O módulo “*blue*” está associado à transmissão

sináptica, orientação axonal e junções ocludentes. O *hub Itga2b* nesse módulo codifica proteína de adesão celular, enquanto *Clstn3* está envolvido no desenvolvimento de sinapses excitatórias e inibitórias (PETTEM et al., 2013). O módulo “magenta”, por sua vez, está envolvido na resposta imune, transporte de membranas e desenvolvimento neuronal. O *hub Lhx8* nesse módulo induz a diferenciação de células progenitoras neuronais do hipocampo em neurônios colinérgicos (SHI et al., 2012).

5.3.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P60

Na análise em P60 (Figura 10C), os módulos “black” e “tan” exibiram correlações positivas com o grupo CONV, enquanto os módulos “turquoise”, “lightcyan”, “grey60” e “lightgreen” mostrou correlações negativas com as crises convulsivas. Os genes do módulo “black” estão relacionados ao sistema imune, organização da cromatina e desenvolvimento sináptico. O *hub Pax5*, por exemplo, regula a diferenciação de neurônios dopaminérgicos a partir de células tronco (PERRIER et al., 2004). Já o módulo “lightgreen” está associado a fatores de crescimento neuronal, via de Wnt, adesão focal e regulação da projeção neuronal. O *hub Chmp1a* por exemplo regula a proliferação de células progenitoras neuronais (MOCHIDA et al., 2012).

5.3.4 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P120

Na análise em P120 (Figura 10D), os módulos “cyan”, “blue”, “salmon”, “green” e “grey60” foram negativamente correlacionados ao grupo CONV. Os genes do módulo “blue” estão relacionados a funções antioxidantes, sistema imune e vias de sinalização associados ao Desenvolvimento tais como Hippo, complexo repressor Polycomb 2 e Wnt. O *hub Pou6f2* nesse módulo é um membro da família de fatores de transcrição POU que controlam a diferenciação celular. Além disso, o módulo “grey60” contém genes envolvidos com a sinalização de interferon e com o processo metabólico de glicerolipídios. O *hub Irf8* por exemplo é crucial para a transformação da micróglia em um fenótipo reativo que leva à inflamação cerebral (MASUDA et al., 2012).

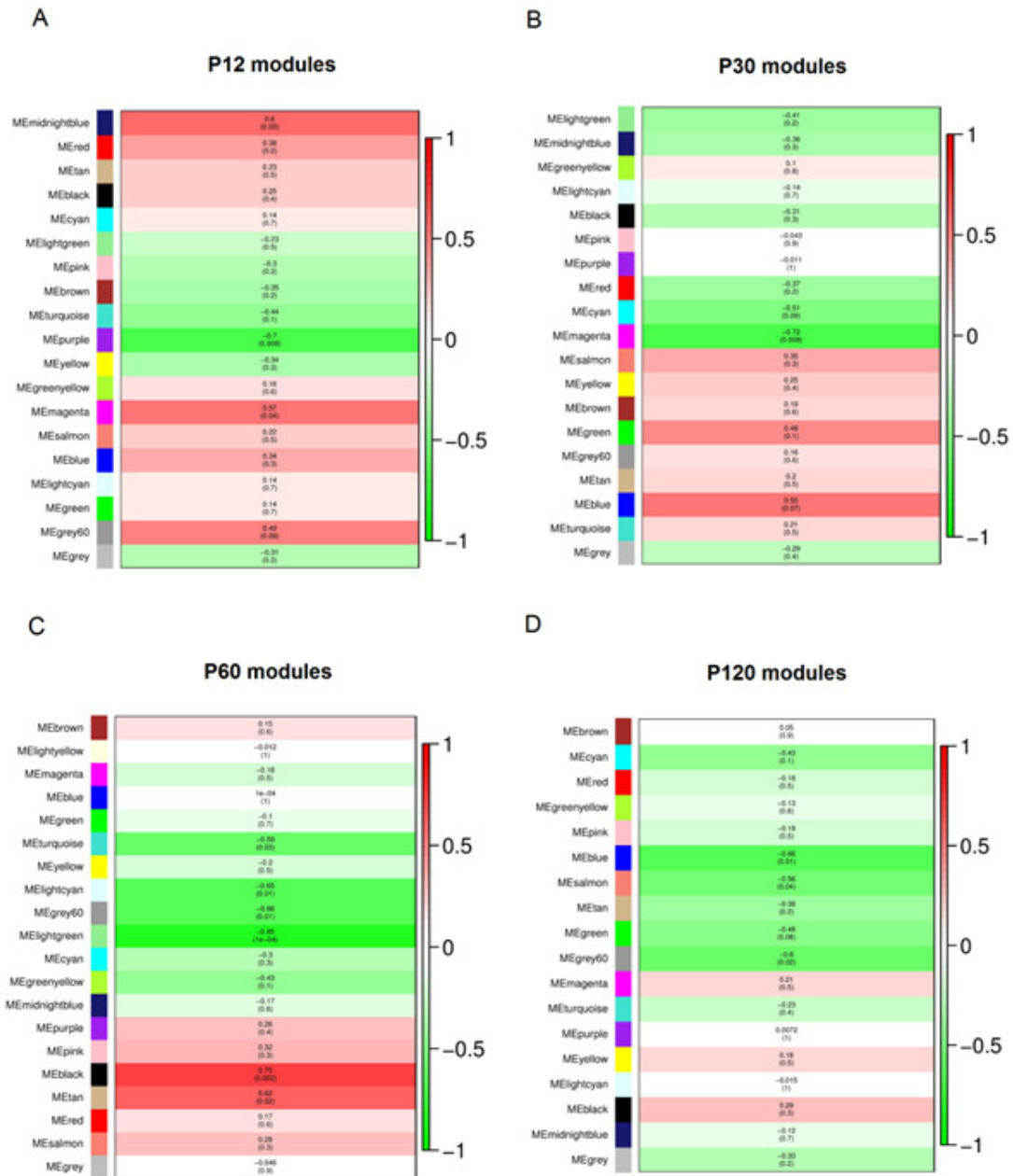


Figura 10. Correlação entre módulos e crises convulsivas na análise em que as redes foram construídas utilizando conjuntamente as amostras dos grupos CONV e CTRL em cada intervalo de tempo. Os nomes dos módulos estão à esquerda de cada gráfico e os coeficientes de correlação estão dispostos no topo de cada linha. Os valores de p para cada módulo estão exibidos entre parênteses na parte inferior de cada linha. As linhas estão coloridas de acordo com o valor da medida de correlação: vermelho para correlações positivas e verde para correlações negativas.

Quadro 5. Hubs e funções em módulos correlacionados ao grupo com crises convulsivas na análise em P12.

MÓDULO (GENES)	CORRELAÇÃO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
<i>Midnightblue</i> (103)	Positiva	Alpk3, Hrh4, Iba57, Vom1r78, Spag7, Slc12a8, Tiam1, Suv420h2, Dzank1, Prodh2	Direcionamento axonal, degradação de beta-catenina, regulação da diferenciação neuronal, atividade da Rho GTPase
<i>Magenta</i> (166)	Positiva	Rapgef6, Igtp, Cpg1, Cox7c, Sdpr, Rpsa, Dnah10, Krcc1, Pigr, Rpl13-ps1	Fosforilação oxidativa, doenças neurodegenerativas, sinapse glutamatérgica, endocitose, canais de potássio, resposta celular ao estresse, ativação da via das MAP cinases
<i>Grey60</i> (65)	Positiva	Ywhae, Acsi5, Heatr5b, Dohh, Uhrf1bp1l, Zc3h10, Npw, Tmem128, Clcn4, Gas1	Proteólise mediada por ubiquitinas, apoptose, regulação do citoesqueleto de actina, checkpoints do ciclo celular, sinalização de VEGF, sinalização de IGF1R, imunidade inata, regulação positiva da neurogênese
<i>Purple</i> (162)	Negativa	Smarcb1, Tbl3, Psmb3, Capn15, Edf1, Med29, Mrpl23, Pafah1b3, Uqc22, March9	Migração transendotelial de leucócitos, degradação proteossomal, apresentação de antígenos mediada por MHC de classe I, sinalização de VEGF, sinalização de Wnt, ciclo celular, sinalização de proteínas Ras
<i>Turquoise</i> (1308)	Negativa	Unc45a, Bop1, Slc7a4, Slc3a2, Abhd17a, Nkiras2, Asphd2, Dapk3, Rabac1, Apbb1	Glicólise, ativação plaquetária, proteólise medida por ubiquitina, via de AMPK, sinapse gabaérgica, vias metabólicas, via de IL-1, via de BDNF, via de Notch, via de TGF- β , neurotransmissão glutamatérgica, sinalização por NGF

Quadro 6. *Hubs* e funções em módulos correlacionados ao grupo com crises convulsivas na análise em P30.

MÓDULO (GENES)	CORRELAÇÃO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
<i>Green</i> (319)	Positiva	Lztr1, Clcn7, Ciz1, Pepd, Cops4, Trmt1, Mum1, Cc2d1a, Hps4, Dos	Via de Notch, via de AMPK, Autofagia, processamento de mRNA, sinalização de HGFR, sistema neuronal, transmissão sináptica, apoptose
<i>Blue</i> (673)	Positiva	Itga2b, Prkar1b, Pcyox1, Clstn3, Pomgnt2, Cck, Atg7, St6galnac5, Got2, Herc2	Transmissão sináptica, reabsorção de bicarbonato, sinapse glutamatérgica, junções oclusivas, endocitose, glicólise e gluconeogênese, via de Delta-Notch, direcionamento axonal, apresentação de antígenos por MHC classe II, ativação plaquetária, sinalização por EGFR
<i>Cyan</i> (117)	Negativa	Smek1, Zfp68, Vps13d, Dlg2, Camk2n1, Styx, Rims2, Zfp157, Pcbp3, Ctnnd1	Via de neurotrofinas, via de Wnt, via das MAP cinases, via de Hippo, via de Delta-Notch, regulação do metabolismo de mRNAs, transmissão sináptica, sinalização glutamatérgica
<i>Magenta</i> (213)	Negativa	Pde10a, Sh3rf2, Lhx8, Sstr3, Grn, Stx1a, Tbc1d8, Neurod2, Cct3, Atp6ap1l	Vesícula sináptica, interação receptor-matrix extracelular, adesão focal, transportadores de aminoácidos e receptores SLC, migração leucocitária, regulação da atividade de Rho GTPase, proliferação de células tronco

Quadro 7. Hubs e funções em módulos correlacionados ao grupo com crises convulsivas na análise em P60.

MÓDULO (GENES)	CORRELAÇÃO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
<i>Black</i> (239)	Positiva	Ghdc, Cyp21a1, Cox6b2, Ube3d, Pax5, Zfyve1, Mapk13, Plg, Tex19, Spata31d3	Sinalização de neurotrofinas, via de sinalização de TNF, vesícula sináptica, via de sinalização de ErbB, receptores de quimiocinas, enzimas modificadoras de cromatinas, sinalização de Wnt, ativação leucocitária
<i>Tan</i> (156)	Positiva	Pfkl, Capn15, Mrpl38, Slc13a2, Pde4a, Tnip2, Cep250, Spsb4, Ubl5, Hes7	Regulação da inflamação por canais TRP, via de HIF-1, via de AMPK, autofagia, via de PI3K-Akt-mTOR, adesão focal, via de TGFβ, via de IL-1, regulação transcricional por p53, regulação da plasticidade sináptica neuronal
<i>Turquoise</i> (881)	Negativa	Gtf3c1, Elac2, Mgrn1, Sult4a1, Rai1, Ap1b1, Ubr4, Gnpat, Ccdc112, Thoc5	Lisossomos, via de Rap1, via de neurotrofinas, via de HIF-1, via da fosfolipase D, adesão focal, via de ErbB, via de mTOR pathway, via de Ras, spliceossomo, via de BDNF, via de EGFR, sinalização por IL-1, IL-4, IL-11 e IL-17, adesão celular, via de MAPK, regulação positiva da diferenciação neuronal
<i>Lightcyan</i> (117)	Negativa	Ap1ar, Stambpl1, Megf9, Cep152, Fam19a1, Syt4, Dync1i1, Arpc5, Tsc22d2, Tppp	Via de MAPK, sinalização glutamatérgica, regulação do citoesqueleto de actina, direcionamento axonal, diferenciação celular, plasticidade sináptica, diferenciação de células-tronco
<i>Grey60</i> (76)	Negativa	Marcks11, Msra, Mvd, Nprl2, Lzts2, Abca2, Ankrd34a, Nudt15, Il34, Ppfia4	Via de Rap1, via de Ras, pluripotência de células tronco, regulação do citoesqueleto de actina, adesão focal, via de PI3K-Akt-mTOR-pathway, sistema neuronal
<i>Lightgreen</i> (68)	Negativa	Chmp1a, Keap1, Fads1, Vps41, Stard7, Dcaf5, Pdgrfb, Nadk, Slc40a1, Top3b	Via da fosfolipase D, adesão focal, sinalização por NGF, sinalização por FGFR, homeostase celular de cations, via de Ras, regulação negativa da projeção neuronal, via de Wnt

Quadro 8. Hubs e funções em módulos correlacionados ao grupo com crises convulsivas na análise em P120.

MÓDULOS (GENES)	CORRELAÇÃO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
Cyan (87)	Negativa	Skap2, Ccrn4l, Kpna2, Rbp1, Popdc3, Lyplal1, Cnr1, Prss22, Dlx5, Usp46	Endocitose, via de mTOR, via de EGFR, via de sinalização de Notch, via de sinalização de TGF-beta, via de sinalização de EPH-Ephrin, direcionamento axonal, migração neuronal
Blue (890)	Negativa	Pou6f2, Bpifa1, Naaladl1, Rhox8, Ino80d, Il20, Hsd17b2, Kdm5c, Ccr1l1, Gja10	Metabolismo de glutationas, doenças auto-imunes, via de Hippo, via de JAK-STAT, via de Nrf2, complex repressor Polycomb 2, via de Wnt, pluripotência de células tronco, via de sinalização de p53, canais de potássio, transporte de íons e aminoácidos, regulação positiva da produção da IL-6
Salmon (103)	Negativa	Rgcc, Vps26b, Gtpbp6, Ndufs7, Txndc17, Chgb, Ube2v1, Ebi3, Sdhc, Rab36	Fosforilação oxidativa, doenças neurodegenerativas, endocitose, desenvolvimento de projeções neuronais
Green (253)	Negativa	Mras, Zc3h13, Rabl6, Ptpre, Gria1, Pnmal2, Pnmal1, Rmrp, Taok3, Gskip	Potenciação de longo-prazo, via de Hippo, via de MAPK, via de TGF-beta, pluripotência de células tronco, via da fosfolipase D, sistema neuronal, via de VEGF, morfogênese de projeções neuronais, axonogênese
Grey60 (74)	Negativa	Irf8, Spink13, Brd3, Camk1g, Cmtm3, Ece1, Gpc6, Zbtb26, Barhl1, Zdhhc19	Sinalização de interferonas, processo metabólico de glicerolípídeos

5.4 Análise da preservação e alteração de conectividade dos módulos entre as redes dos grupos experimentais

Redes de co-expressão gênica foram também construídas utilizando as amostras dos grupos CONV e CTRL em separado, para cada intervalo de tempo analisado. Essa análise teve o objetivo de identificar nós pertencentes aos mesmos módulos nas redes relacionadas às amostras dos grupos CONV e CTRL que apresentam elevadas diferenças de conectividade entre os grupos.

Os nós foram classificados de acordo com sua conectividade e comparados entre as redes relacionadas aos grupos CONV e CTRL. Essa análise permitiu a análise da identificação de módulos e genes com ganho de conectividade no grupo CONV (Figura 10). A hipótese nesse caso é que módulos e nós com ganho de conectividade estão relacionados ao fenótipo de crises convulsivas. Os *hubs* e funções principais dos genes pertencentes a esses módulos estão apresentados nos Quadros 9 a 12.

A análise da preservação dos módulos também foi realizada para identificar a similaridade de densidade e conectividade de um determinado módulo entre as redes dos grupos CONV e CTRL. O parâmetro estatístico Z_{summary} , gerado pelo *software* WGCNA, foi utilizado para a avaliação da preservação dos módulos nas redes. O valor de $Z_{\text{summary}} < 2$ indica pouca preservação de um módulo entre as redes, enquanto $2 < Z_{\text{summary}} < 10$ indica evidência moderada de preservação, e por fim $Z_{\text{summary}} > 10$ sugere elevada preservação de um determinado módulo.

5.3.1 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P12

Os módulos que apresentaram maior ganho de conectividade em P12 foram os módulos “*blue*”, “*green*”, “*magenta*” e “*salmon*” (Figura 11A). Os módulos menos preservados entre as redes CONV e CTRL em P12 foram os módulos “*darkred*”, “*royalblue*”, “*grey60*” e “*darkgreen*”. Dentre esses módulos, o módulo “*blue*” apresentou o maior número de genes com ganho de conectividade na rede do grupo CONV. Esse

módulo possui genes relacionados às funções de apoptose, regulação da adesão e migração celular, resposta celular ao estresse e axonogênese. O *hubBcar1* nesse módulo codifica uma proteína adaptadora relevante para a migração celular e formação de axônios (HUANG et al., 2006), enquanto o *hub Entp2* corresponde a um gene cuja proteína está envolvida no controle da proliferação de células progenitoras em nichos neurogênicos do cérebro (GAMPE et al., 2015).

O módulo “*turquoise*” também incluiu muitos genes com ganho de conectividade no grupo CONV. Os genes desse módulo estão associados à apoptose, junções oclusivas, transmissão sináptica, diferenciação neuronal, vias de sinalização do Sistema imune, além das vias de sinalização Hippo e Wnt. Os *hubs Rtn2* e *Rtn3* nesse módulo são parte da família de proteínas *reticulon*, que possuem papel fundamental no brotamento neural. De fato, camundongos que super-expressam *Rtn3* desenvolvem anormalidades nos neuritos neuronais (HU et al., 2007).

O módulo “*darkred*” foi o módulo menos preservado na análise em P12. Esse módulo possui genes relacionados a vias de sinalização de neurotrofinas, FGFR, HIF-1 e Wnt, além de participar da apoptose, ativação de receptores NMDA, diferenciação celular e axonogênese. O *hub Nefl* nesse módulo é um marcador de neurônios diferenciados, enquanto o *hub Ssbp3* codifica uma proteína que induz a diferenciação de células tronco embrionárias em células similares às células trofoblásticas (LIU et al., 2016).

5.3.2 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P30

Os módulos que apresentaram maior ganho de conectividade na rede do grupo CONV em P30 foram os módulos “*brown*”, “*green*”, “*lightcyan*”, “*magenta*” e “*red*” (Figura 11B). Os módulos menos preservados entre as redes relacionadas aos grupos CONV e CTRL foram os módulos “*darkred*”, “*turquoise*”, “*pink*”, “*darkturquoise*” e “*green*”.

O módulo “*brown*” apresentou o maior número de genes com ganho de conectividade na rede associada ao grupo CONV. Esse módulo possui genes relacionados a funções

de metabolismo celular, diferenciação celular, apoptose e transmissão sináptica. O *hub Osm* nesse módulo codifica a proteína oncostatina M, a qual inibe a proliferação de células precursoras neurais (BEATUS et al., 2011).

O módulo “magenta” também apresentou muitos genes com ganho de conectividade. Esses genes estão associados à via da fosfolipase D, organização do citoesqueleto de actina, regulação da quimiotaxia e da adesão celular, regulação positiva da neurogênese e regulação da manutenção e proliferação de células tronco. Por exemplo, o *hub RaiA (Ras-like small GTPase)* está envolvido na polarização celular durante o desenvolvimento neuronal (DAS et al., 2014).

O módulo “darkgreen” foi o módulo menos preservado na análise em P30. Esse módulo possui genes relacionados às funções de orientação axonal, potenciação de longo prazo, apoptose, via de BDNF, via de IL-1, adesão celular, via de sinalização das Efrinas, vias de sinalização envolvidas na resposta imune inata e efetores de Rho GTPases. Os *hubs Pif1, Chac1 e Noxa1* nesse módulo estão associados à viabilidade celular e ao estresse oxidativo, enquanto o *hub EphA10* participa da via de sinalização das Efrinas, envolvida na orientação axonal. Além disso, esse gene é ativado no hipocampo de camundongos tratados com pilocarpina (XIA et al., 2013).

5.3.3 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P60

Os módulos que apresentaram maior ganho de conectividade em P60 foram os módulos “brown”, “midnightblue”, “pink”, “red”, “salmon”, “turquoise” e “yellow” (Figura 11C). Os módulos menos preservados entre as redes relacionadas aos grupos CONV e CTRL foram “grey60”, “skyblue”, “greenyellow”, “orange” e “brown”.

Os módulos “brown” e “turquoise” exibiram o maior número de genes com ganho de conectividade na rede associada ao grupo CONV. Além disso, o módulo “brown” foi o módulo menos preservado na análise em P60. Genes nesse módulo estão relacionados à adesão focal, pluripotência de células tronco, proliferação de linfócitos, migração

celular e desenvolvimento de projeções neuronais. Dentre os *hubs* nesse módulo, *Actn1*, *Fkbp8* e *Acap3* estão envolvidos na extensão de neuritos. Em particular, neurônios hipocampais apresentam uma redução pronunciada na neuritogênese após a redução da expressão do gene *Acap3* (MIURA et al., 2016). Outros *hubs* observados nesse módulo foram *Cacnb3*, um canal de cálcio ativado por voltagem, e genes relacionados ao sistema imune, tais como *Cnrip* e *Il16*.

As principais funções hiper-representadas por genes no módulo “*turquoise*” foram: transporte de íons cálcio e potássio, migração neuronal e crescimento axonal, vias associadas ao desenvolvimento como Wnt e Robo, transmissão sináptica e regulação da inflamação por canais TRP. Dentre os *hubs* nesse módulo, o gene *Scx* (*scleraxis*) codifica um fator de transcrição importante para a diferenciação de células-tronco. Já o hub *Mx1* codifica uma proteína com expressão em oligodendrócitos e o hub *Ednra* representa um receptor endotelial que atua como um agente quimiotático para o crescimento axonal de neurônios simpáticos (MAKITA et al., 2008).

O módulo “*greenyellow*” foi também pouco preservado na análise em P60. Os genes desse módulo estão relacionados às vias de p53 e Wnt, crescimento axonal, morfogênese de neurônios, ubiquitinação de proteínas e transmissão sináptica. Dentre os *hubs* nesse módulo, o gene *Ptprt* codifica uma tirosina cinase que regula a formação de sinapses (LEE et al., 2015). Outros *hubs* relevantes nesse módulo são *Pomgnt1*, que codifica uma enzima que realiza a glicosilação de proteínas durante o desenvolvimento cerebral (DWYER et al., 2015) e *Taok2*, que codifica uma cinase essencial para a morfogênese dos dendritos (DE ANDA et al., 2012).

5.3.4 Módulos e genes associados às crises convulsivas em P120

Os módulos que apresentaram maior ganho de conectividade em P120 foram os módulos “*blue*”, “*brown*”, “*grey60*”, “*pink*”, “*purple*”, “*royalblue*” e “*tan*” (Figura 11D). Os módulos menos preservados entre as redes relacionadas aos grupos CONV e CTRL foram os módulos “*green*”, “*grey60*”, “*lightgreen*”, “*orange*” e “*skyblue*”.

Genes no módulo “*blue*” foram associados à via das MAP cinases, organização da matriz extracelular, transmissão sináptica, apoptose, diferenciação celular, regulação da neurogênese, desenvolvimento de projeções neuronais e resposta ao estresse oxidativo. Dentre os *hubs* nesse módulo, os genes *Ndufb3* e *Ndufs5* participam do processo de fosforilação oxidativa, enquanto o gene *Npdc1* é um regulador da proliferação e diferenciação neuronal e o gene *Shank3* modula os níveis do receptor NMDA em terminais de axônios (HALBEDL et al., 2016).

O módulo “*brown*”, por sua vez, apresenta genes associados à transmissão sináptica, adesão focal, regulação do citosqueleto de actina, crescimento axonal, diferenciação neuronal e sinalização mediada pelas vias de Wnt e Robo. Dentre os *hubs* nesse módulo, o gene *Gria1* codifica um receptor glutamatérgico ionotrópico AMPA e o gene *Robo2* é parte da via de Robo que regula a orientação axonal.

Os módulos “*grey60*” e “*skyblue*” foram os módulos menos preservados na análise em P120. O módulo “*grey60*” está associado a funções do sistema imune, tais como fagocitose, ativação de linfócitos, via de NF- κ B, além de possuir genes envolvidos na organização de projeções celulares e morfogênese celular. Dentre os *hubs* nesse módulo, o gene *Gatad2* é parte do complexo de remodelamento da cromatina NuRD, o qual regula a formação de dendritos e a conectividade neuronal (YAMADA et al., 2014). Em paralelo, o módulo “*skyblue*” está associado à via de TNF α -NF κ B, metabolismo do ácido hialurônico, via de sinalização de Wnt, diferenciação neuronal e migração celular. O *hub* *Ska3* nesse módulo codifica uma proteína que promove a neuritogênese (TONG et al., 2013). Além disso, os *hubs* *Hyal2* e *Hmmr* participam do metabolismo do ácido hialurônico, função relevante para a motilidade celular.

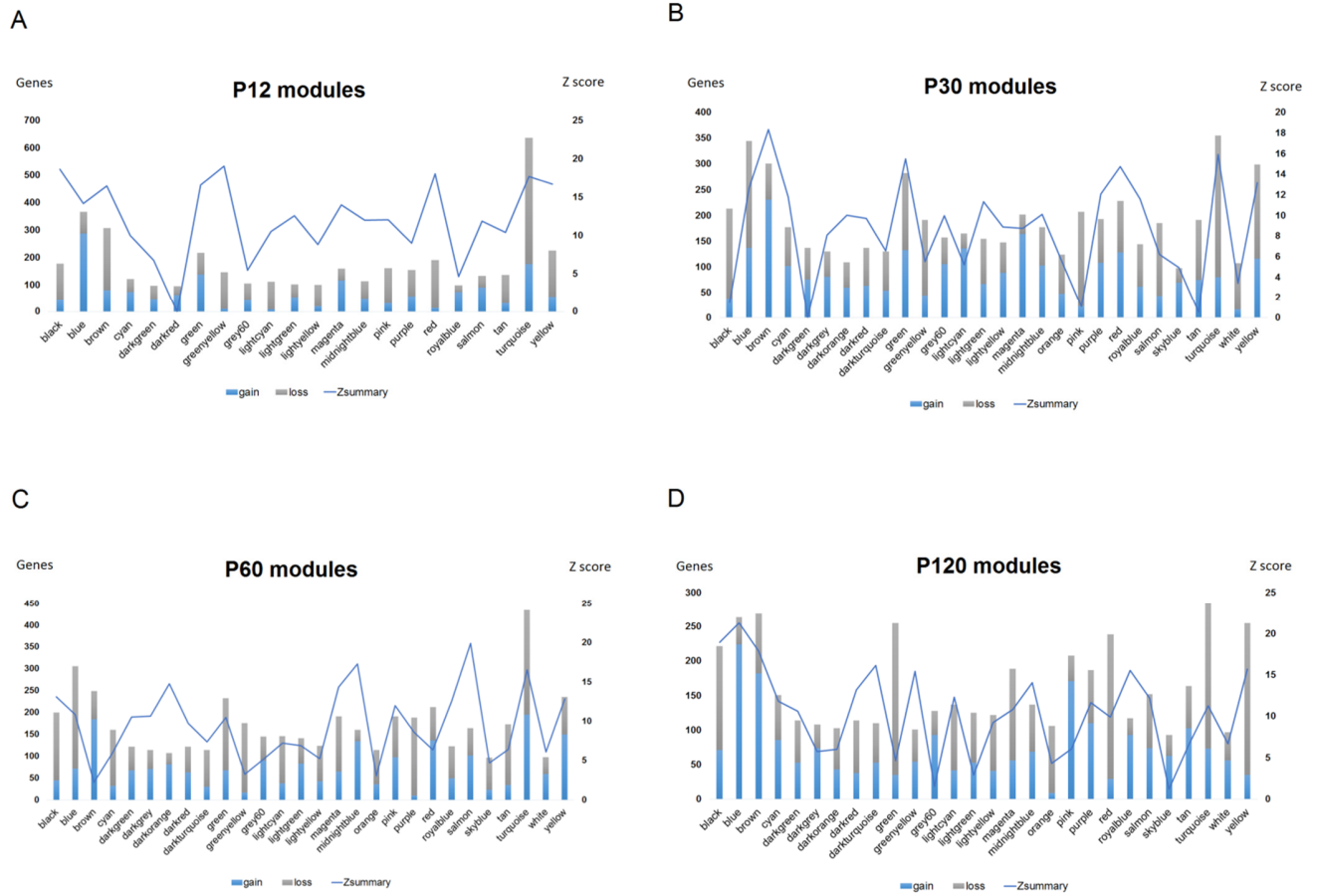


Figura 11. Análise da preservação e das alterações de conectividade dos módulos entre as redes associadas aos grupos CONV e CTRL. Os genes em cada módulo foram classificados de acordo com sua conectividade intramodular e mudanças nas posições (*ranking*) desses genes entre as redes foram avaliadas para identificação de genes com ganho ou perda de conectividade nas redes. O parâmetro estatístico $Z_{summary}$ foi utilizado para a avaliação da preservação dos módulos nas redes, i.e., da densidade e conectividade dos módulos entre as redes dos grupos CONV e CTRL. O valor de $Z_{summary} < 2$ indica pouca preservação de um módulo entre as redes, enquanto $2 < Z_{summary} < 10$ indica evidência moderada de preservação, e por fim $Z_{summary} > 10$ sugere elevada preservação de um determinado módulo entre as redes.

Quadro 9. Funções em módulos com ganho de conectividade ou baixa preservação no grupo CONV em P12.

MÓDULO (GENES)	TIPO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
Blue (367)	Ganho de conectividade	Bcar1, Slc25a5, Entpd2, Zfp148, Gimap9, Srp72, Rarres1, Hspa9, Rassf2, Romo1	Ciclo celular, endocitose, adesão focal, regulação do citoesqueleto de actina, via de EGFR, apoptose, resposta celular ao estresse, autofagia, replicação de DNA, axonogênese, adesão celular em neurônios
Green (215)	Ganho de conectividade	Abcb6, Exosc5, Rbm7, C1ql1, Uri1, Pycr2, Mpdz, Hdgfrp3, Cstf2, Nudt16l1	Sinalização de endocanabinóides, via de PI3K-Akt, sinapse gabaérgica, adesão focal, via de EPH-ephrin, fosforilação oxidativa, organização de projeções celulares, regulação positiva da diferenciação neuronal
Magenta (160)	Ganho de conectividade	Slc4a2, Zfp407, Nes, Etv3, Cd6, Glrx2, Phb, Clrn2, Ccnf, Kcnk2	Via de FoxO, via de MAPK, organização da cromatina, regulação da Gastrin-CREB via PKC e MAPK, regulação da transmissão sináptica, regulação do potencial de membrana
Salmon (132)	Ganho de conectividade	Cct5, Col1a2, Mien1, Mettl2b, Mxi1, Foxe1, Cfl1, Rreb1, Hyal3, Cdhr1	Fosforilação oxidativa, via de TGF- β , ciclo celular, ativação de NF- κ B, transporte de canais iônicos, resposta a IL-1L-1, via de Wnt, apoptose, organização do citoesqueleto de actina, manutenção de células tronco
Darkred (97)	Baixa preservação	Nefl, Ssbp3, Epm2aip1, Sat1, Psmg4, Cmas, Srgap3, Zc3h18, Ctss, Scml4	Via de p53, via de HIF-1, via de neurotrofinas, via de Wnt, apoptose, ativação do receptor NMDA, diferenciação celular, axonogênese
Royalblue (98)	Baixa preservação	Tmem212, Tbkbp1, Nxph1, Adcyap1, Fcgr1a, Tspyl4, Eif4ebp1, Aars, Mal2, Apex1	Sinalização de PI3K-Akt-mTOR, via de EPH-Ephrin, direcionamento axonal, transporte transmembrana mediado por receptores SLC, sinalização por VEGF, regulação negativa da morte neuronal, regulação negativa de projeções neuronais, neurogênese
Grey60 (106)	Baixa preservação	Ddx39b, Ap2s1, Ddx24, Atg16l1, Commd4, Acin1, Bloc1s2, Eif3e, Tpm3, Chmp4b	Regulação de cálcio, Adesão celular mediada por integrinas, adesão focal, via de PI3K-Akt-mTOR, resposta celular ao estresse
Darkgreen (97)	Baixa preservação	Prpf40a, Sort1, Cd33, Uqcrc1, Smarca4, Ubc, Rnf187, Gdi1, Cript, Otx1	Sinapse colinérgica, canais de potássio, via de Wnt, ciclo celular, ativação diferenciação neuronal

Quadro 10. Funções em módulos com ganho de conectividade ou baixa preservação no grupo CONV em P30.

MÓDULO (GENES)	TIPO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
Blue (345)	Ganho de conectividade	Slc30a5, Hypk, Ankrd33b, Axin1, Arv1, Inip, Dscr3, Ptp4a3, Zfyve1, Acy3	Processamento de proteínas pelo retículo endoplasmático, via de Hippo, via de Wnt, apoptose, organização do citoesqueleto de actina
Brown (301)	Ganho de conectividade	Osm, B2m, Wbp4, Spata18, Retsat, Pomt1, Olr546, Stra6, Pcdhga7, Usp5	Doença de Parkinson, sinapses colinérgica e dopaminérgica, potenciação de longo prazo, metabolismo celular, proteassomo, autofagia, apoptose, desenvolvimento do sistema nervoso, regulação da diferenciação celular
Green (282)	Ganho de conectividade	Chac2, Tmed7, Ivd, Tmx3, Smarcb1, Gmpr, Sav1, Ndufb2, Cpt1a, Sqstm1	Sinapse glutamatérgica, sinapse gabaérgica, proteólise mediada por ubiquitinas, vias metabólicas, via da oncostatina M, resposta ao dano do DNA, junções celulares, desenvolvimento de projeções neuronais e transmissão sináptica
Lightcyan (165)	Ganho de conectividade	Tmem171, R3hdml, Chd5, Pth2, Eif1, Foxp3, Gja8, Rap2a, Polr1b, Pik3r5	Cadeia de transporte de elétrons, reparo de DNA, regulação da diferenciação neuronal, neurogênese, homeostase de íons cálcio
Magenta (202)	Ganho de conectividade	Sapcd1, RalA, Olr567, Gpr137, Lace1, Creb3, Rabgga, Mum1, Med25	Via de fosfolipase D, organização do citoesqueleto de actina, regulação positiva da adesão celular e quimiotaxia, manutenção de células tronco, regulação positiva da neurogênese, diferenciação de células tronco
Red (228)	Ganho de conectividade	Tmem246, Sult4a1, Vps11, Psm8, Armc9, Dopey2, Prkar1b, Dctn2, Ankrd46, Pcyox1	Migração transendotelial de leucócitos, sinapse glutamatérgica, regulação do citoesqueleto de actina, Sistema neuronal, sinalização por VEGF, transmissão sináptica, desenvolvimento de projeções neuronais, apoptose neuronal, diferenciação neuronal
Darkgreen (137)	Baixa preservação	Chac1, Pif1, Hpcal4, Noxa1, Defb24, EphA10, Atp6ap11, Zfp516, Htr5b, Ncf1	Direcionamento axonal, via de Ras, potenciação de longo prazo, apoptose, via de sinalização de BDNF, via de IL-1, adesão celular, sinalização de EPH-Ephrin, imunidade inata, efetores de Rho GTPase
Pink (207)	Baixa preservação	Sectm1b, Ube3d, Fam134b, Idh3g, Anapc13, S100b, Cpne8, Pgam1, Dpysl2, Itgb3bp	Transmissão sináptica, glicólise, fosforilação oxidativa, metabolismo de aminoácidos, sistema immune, migração neuronal, transporte de ânions
Tan (191)	Baixa preservação	Wfdc10, Gpd1l, Sfrp5, Baiap2, Myo5b, Tmem229b, Bsd1, Nup62, Thop1, Cacna1e	Via de Wnt, via de MAPK, sinalização de cálcio, direcionamento axonal, transmissão sináptica, organização do citoesqueleto de actina, diferenciação neuronal, regulação do transporte de íons

Quadro 11. Funções em módulos com ganho de conectividade ou baixa preservação no grupo CONV em P60.

MÓDULO (GENES)	TIPO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
<i>Brown</i> (249)	Ganho de conectividade e Baixa Preservação	Rmnd5b, Bop1, Actn1, Sec14l5, Tmem25, Fkbp8, Acap3, Cacnb3, Cnrip1, Il16	Adesão focal, pluripotência de células tronco, metabolism de lipídeos, regulação positiva da proliferação de linfócitos, regulação negativa da migração celular, desenvolvimento de projeções neuronais
<i>Midnightblue</i> (160)	Ganho de conectividade	Anxa7, Snd1, Klhdc3, C5ar1, Gosr2, Bpifb6, Or10ad1, Rpp30, Rps19, Atp6v0a1	Sinapse glutamatérgica, sinalização de BDNF, processamento de antígenos, degradação proteossomal, transporte iônico, transmissão sináptica, plasticidade neuronal
<i>Red</i> (212)	Ganho de conectividade	Dctn1, Dapk3, Dgat1, Mus81, Unc45a, Rnft2, Dcaf15, Pomgnt2, Abcb8, Ogdh	Via de Hippo, sinalização por interleucinas, diferenciação neuronal, organização da matriz extracelular, desenvolvimento do hipocampo, resposta imune inata
<i>Turquoise</i> (438)	Ganho de conectividade	Tpd52l1, Scx, Mx1, Ednra, Ano3, Dleu7, Slc7a3, Nr2f2, Epha5, Gpr155	Transporte de cálcio, sinapse colinérgica, direcionamento axonal, via de Wnt, sinalização de Robo, canais de potássio, migração neuronal, transmissão sináptica
<i>Yellow</i> (235)	Ganho de conectividade	Bckdk, Rmdn1, Ninj1, Robo1, Tst, Dchs1, Galt, Lsm3, Olr733, Gja10	Vias metabólicas, sinapse gabaérgica, organização da matriz extracelular, desenvolvimento de projeções neuronais, transmissão sináptica, diferenciação neuronal, neurogênese
<i>Greenyellow</i> (176)	Baixa preservação	Ptprt, Armcx1, Tpcn1, Ube2m, Acbd5, Mta2, Celf4, Taok2, Pomgnt1, Slc16a13	Via de Wnt, via de p53, direcionamento axonal, splicing de RNAs, morfogênese neuronal, ubiquitinação de proteínas, transmissão sináptica
<i>Orange</i> (114)	Baixa preservação	Olr1516, March9, Ache, Abcc6, Dusp9, Dynlt1, Sin3b, Sept2, Rnf182, Gltp	Potenciação de longo prazo, sinapse colinérgica, direcionamento axonal, sinalização de EGF, diferenciação celular, regulação positiva da migração celular
<i>Skyblue</i> (97)	Baixa preservação	Calr, Sobp, Acin1, Rabgap1, Nrgn, Epn1, Sstr4, Ring1, Scaf1, Snbc	Endocitose, via de Notch, metabolism de esfingolipídeos, sinalização de ErbB, desenvolvimento do sistema nervoso

Quadro 12. Funções em módulos com ganho de conectividade ou baixa preservação no grupo CONV em P120.

MÓDULO (GENES)	TIPO	HUBS	FUNÇÕES ENRIQUECIDAS
Brown (249)	Ganho de conectividade	Dgkz, Armt1, Acp2, Robo2, Gria1, Ppp2r5c, Pard6a, Mast3, Scd2, Pdk1	Transmissão sináptica, potenciação de longo prazo, migração transendotelial de leucócitos, adesão focal, regulação de citoesqueleto de actina, via de Rap1, direcionamento axonal, via de wnt, sinalização de Robo, diferenciação neuronal, desenvolvimento de projeções neuronais
Blue (264)	Ganho de conectividade	Pdap1, Pcbd2, Eif3f, Npdc1, Rnf34, Ndufb3, Shank3, Ndufs5, Bmpr1b, Map3k7	Via de MAPK, organização da matriz extracelular, transmissão sináptica, apoptose, diferenciação celular, regulação negativa da neurogênese, axonogênese, resposta ao estresse oxidativo
Pink (208)	Ganho de conectividade	Cerk, Prpf8, Ipo13, Ncaph2, Sptan1, Apc2, Exosc7, Arhgdia, Exoc6b, Kdm3a	Doença de Alzheimer, casacata da coagulação, sinalização de FoxO, via da fosfolipase D, via de receptores do tipo Toll-like, regulação do citoesqueleto de actina, via de Wnt
Grey60 (128)	Baixa preservação	Ciz1, Vps4b, Cryga, Gatad2a, Tnrc6a, Cybrd1, Med1, Casp7, Abcd4, Sbno2	Fagocitose, proliferação de linfócitos, regulação da ativação de linfócitos, regulação da sinalização de NF-kappaB, organização de projeções celulares
Skyblue (93)	Baixa preservação	Polr1c, Ska3, Hyal2, Hmnr, Ttc21b, Avl9, Hacd2, Mecr, Vom1r81, Prrc1	Via de TNF α /NF-kB, via de Wnt, regulação negativa da diferenciação neuronal, organização de filamentos de actina, regulação negativa da migração celular, via de MAPK
Lightgreen (125)	Baixa preservação	Tbx3, Ciapin1, Adprm, Scly, Atf4, Commd8, Sf3b3, Bpgm, Ccdc50, Stat1	Organização da matriz extracelular, regulação de transporte de ânions, desenvolvimento de projeções neuronais

5.5 Módulos e intervalos de tempo envolvidos na susceptibilidade ou resistência a crises convulsivas

Uma única rede de co-expressão foi também construída utilizando todas as amostras utilizadas para a geração de dados de expressão gênica global. Os módulos identificados nessa rede foram correlacionados a intervalos de tempo associados a resistência (P12 e P30) ou susceptibilidade a crises convulsivas (P60 e P120). Por exemplo, o módulo “*blue*” foi correlacionado positivamente ao intervalo de tempo P12, enquanto os módulos “*magenta*” e “*purple*” foram correlacionados a P30. Os módulos “*pink*”, “*greenyellow*” e “*turquoise*” foram associados a P60 e o módulo “*green*” foi positivamente correlacionado a P120. Por fim, os módulos “*brown*” e “*red*” foram correlacionados aos períodos de P60 e P120 (Figura 12).

Embora nenhum dos módulos tenha apresentado correlação significativa com o grupo CONV nessa análise, genes específicos nesses módulos apresentaram associação significativa com o grupo CONV (Figura 13). Os módulos “*brown*” e “*green*” apresentaram o maior número de genes significativamente correlacionados ao grupo CONV (Figura 13A). Após filtrarmos os genes com valor de p menor que 0,1 (Figura 13A), gráficos de dispersão foram construídos para cada módulo utilizando os parâmetros K_{within} (conectividade intramodular) no eixo x e *gene significance* (GS, valor de correlação do gene com o grupo CONV) no eixo y (Figuras 13B a 13L). Esses gráficos permitiram a seleção de genes específicos para descrição detalhada de sua relevância em processos epileptogênicos.

5.5.1 Módulos e genes associados ao intervalo de P12

No módulo “*blue*”, os genes *Ptprz1*, *Lypla1*, *Mum1l1*, *Grm7*, *Atf6* e *Il1rap1* apresentaram valores relativamente altos de K_{within} e GS. O gene *Lypla1* foi o mais conectado nesse módulo. Esse gene codifica uma tioesterase que regula a palmitoilação de proteínas durante a morfogênese de espinhas dendríticas (SIEGEL et al., 2009). Além disso, os *hubs* *Grm7* (*glutamate receptor metabotropic 7*) e *Il1rap1*

(*Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1*), estão associados à regulação da sinalização glutamatérgica em P12, sendo que *Il1rap1* participa da formação das sinapses glutamatérgicas (HAYASHI et al., 2013).

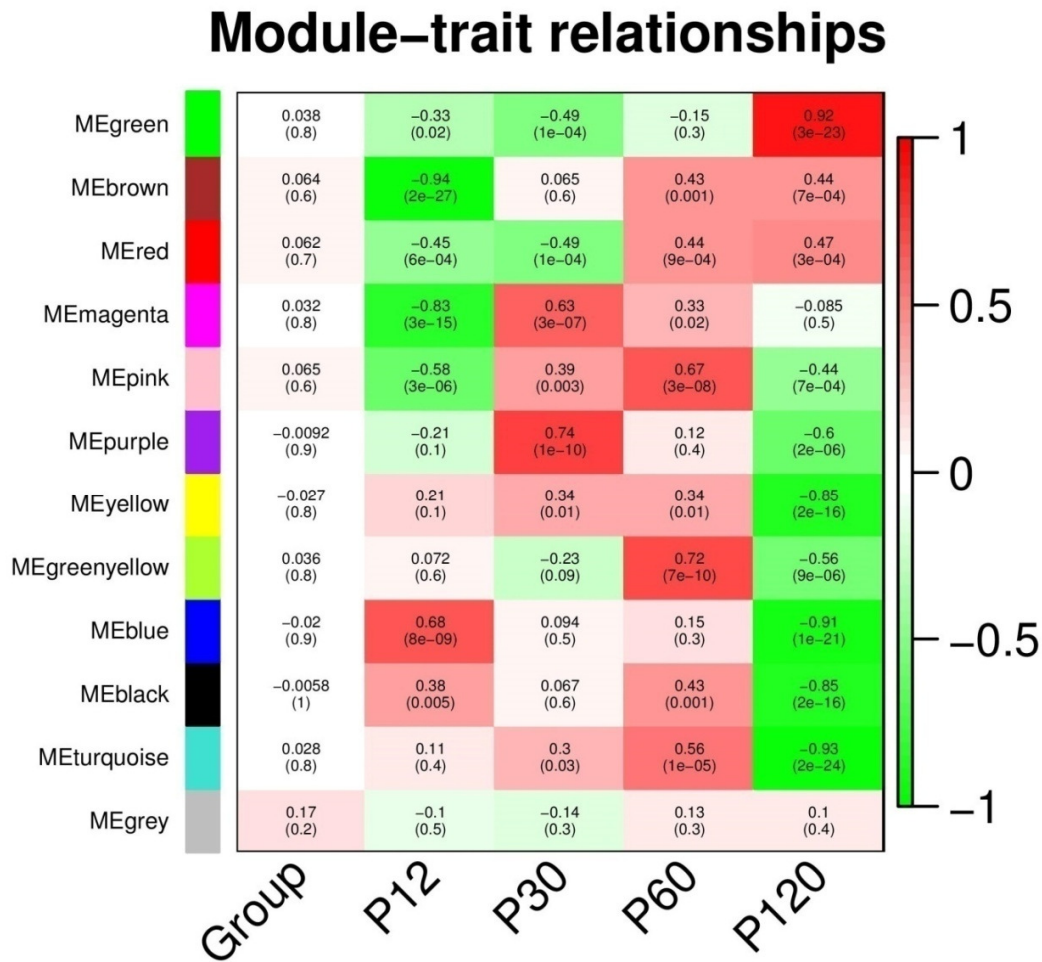


Figura 12. Relações entre módulos, grupos experimentais e intervalos de tempo na análise que utilizou todas as amostras para construção de uma única rede de co-expressão gênica. O nome dos módulos está exibido à esquerda do gráfico, enquanto os coeficientes de correlação dos módulos com os intervalos de tempo podem ser visualizados no campo superior de cada célula. Os valores de p para cada módulo podem ser encontrados no campo inferior de cada célula, entre parênteses. As células estão coloridas de acordo com a correlação do módulo aos intervalos de tempo: vermelho para correlação positiva e verde para correlação negativa.

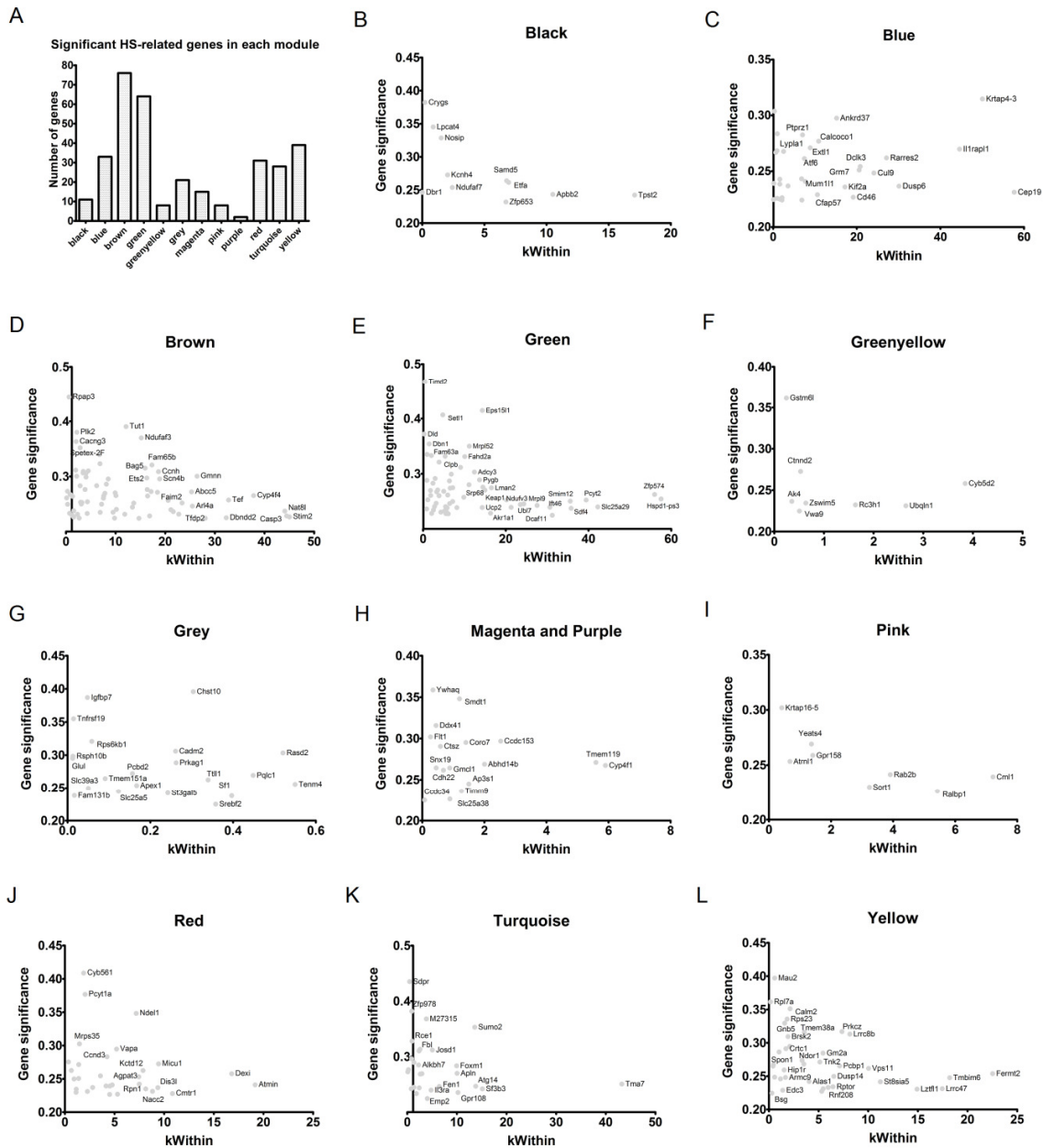


Figura 13. Genes correlacionados às crises convulsivas em cada módulo, baseado na análise exibida na Figura 12. A Figura 13A mostra o número de genes em cada módulo com um valor de $p < 0,1$. As Figuras 13B a 13L exibem os gráficos de dispersão construídos com os parâmetros K_{within} (conectividade intramodular) no eixo x e *gene significance* (valor de correlação do gene com o grupo CONV) no eixo y.

5.5.2 Módulos e genes associados ao intervalo de P30

Para os módulos associados à P30, os genes *Smdt1*, *Ccdc153*, *Cyp4f1*, *Tmem119* (módulo “magenta”), e *Gmcl1e Ddx41* (módulo “purple”) foram os genes que apresentaram valores relativamente altos de *Kwithin* e *GS*. *Tmem119* codifica um marcador de micróglia residentes no cérebro humano (SATOHI et al., 2016), enquanto a expressão de *Cyp4f1* encontra-se aumentada em astrócitos hipocámpais em ratos submetidos a um modelo de injúria cerebral (WANG et al., 2008).

5.5.3 Módulos e genes associados ao intervalo de P60

Os módulos “pink”, “greenyellow” e “turquoise” foram relacionados ao grupo P60. Os principais *hubs* associados ao grupo CONV foram *Cyb5d2*, *Ubqln1*, *Rc3h1* (“greenyellow”), *Cml1*, *Ralbp1eRab2b* (“pink”), além de *Tma7*, *Sumo2*, *AplneFoxm1* (“turquoise”). Dentre esses genes, *Ubqln1* (ZHANG et al., 2015) e *Ralbp1* (BAE et al., 2013) regulam o limiar para crises convulsivas via sinalização GABAérgica. Em paralelo, *Rab2b* (AYALA et al., 1990) e *Foxm1* (UENO et al., 2008) participam do processo de diferenciação neuronal. Por fim, os genes *Cyb5d2*, *Sumo2* (DATWYLER et al., 2011) e *Apln* (ZHANG et al., 2011) apresentam papel relevante em mecanismos de proteção à injúrias teciduais.

5.5.3 Módulos e genes associados ao intervalo de P120

Os módulos “brown” e “red” foram correlacionados aos estágios mais crônicos do modelo experimental (P60 e P120). Muitos dos genes com valores altos de *GS* no módulo “brown” estão intimamente associados à epilepsia. O gene *Stim2* codifica uma proteína sensora de cálcio que modula a atividade neuronal em um modelo de epilepsia crônica (STEINBECK et al., 2011). O gene *Plk2* por sua vez codifica uma proteína necessária para a plasticidade dos neurônios do hipocampo durante a atividade epileptiforme (SEEBURG & SHENG., 2008), enquanto *Cacng3* codifica um canal de cálcio associado à epilepsia infantil e com crises de ausência (EVERETT et al., 2007).

Para o módulo “*red*”, alguns dos genes com valores relativamente altos de K_{within} e GS foram *Atmin*, um gene protetor contra o estresse oxidativo no cérebro em envelhecimento (KANU et al., 2010) e *Ndel1*, cuja proteína respectiva regula a migração neuronal (SASAKI et al., 2005). Por fim, o módulo “*green*” foi associado ao intervalo de P120 e exibiu muitos genes correlacionados ao grupo CONV. Dentre os *hubs* nesse módulo, os genes *Slc25a9*, *Ucp2*, *Ndufv3*, *Mrpl9* e *Hspd1* são todos expressos na mitocôndria.

5.6 Funções biológicas em módulos associados às crises convulsivas nos diferentes pontos experimentais

Gráficos de setores foram construídos com o objetivo de visualizar as funções mais frequentemente associadas às crises convulsivas em cada ponto experimental. Essa análise foi realizada a partir das funções biológicas hiper-representadas por genes em módulos correlacionados ao grupo CONV, de acordo com as funções biológicas identificadas no programa PANTHER. Na Figura 14, pode-se visualizar as funções biológicas hiper-representadas por genes pertencentes aos principais módulos relacionados ao grupo CONV, na análise que as redes foram construídas utilizando *coletivamente* as amostras dos grupos controle e experimental em cada intervalo de tempo (análise descrita na seção 5.3). Já a Figura 15 apresenta a análise realizada quando as amostras dos grupos CTRL e CONV foram *separadas* para a construção das redes de co-expressão gênica (análise descrita na seção 5.4). Esses gráficos permitiram a identificação das principais funções biológicas associadas às crises convulsivas induzidas por hipertermia, envolvidas em processos de desenvolvimento, sistema imune e adesão celular. Além disso, algumas vias de sinalização foram observadas de maneira mais frequente, tais como a via de Wnt, vias dos receptores de EGF e PDGF, via das integrinas, via do receptor de colecistoquinina (CCKR) e via do receptor do hormônio liberador de gonadotrofina.

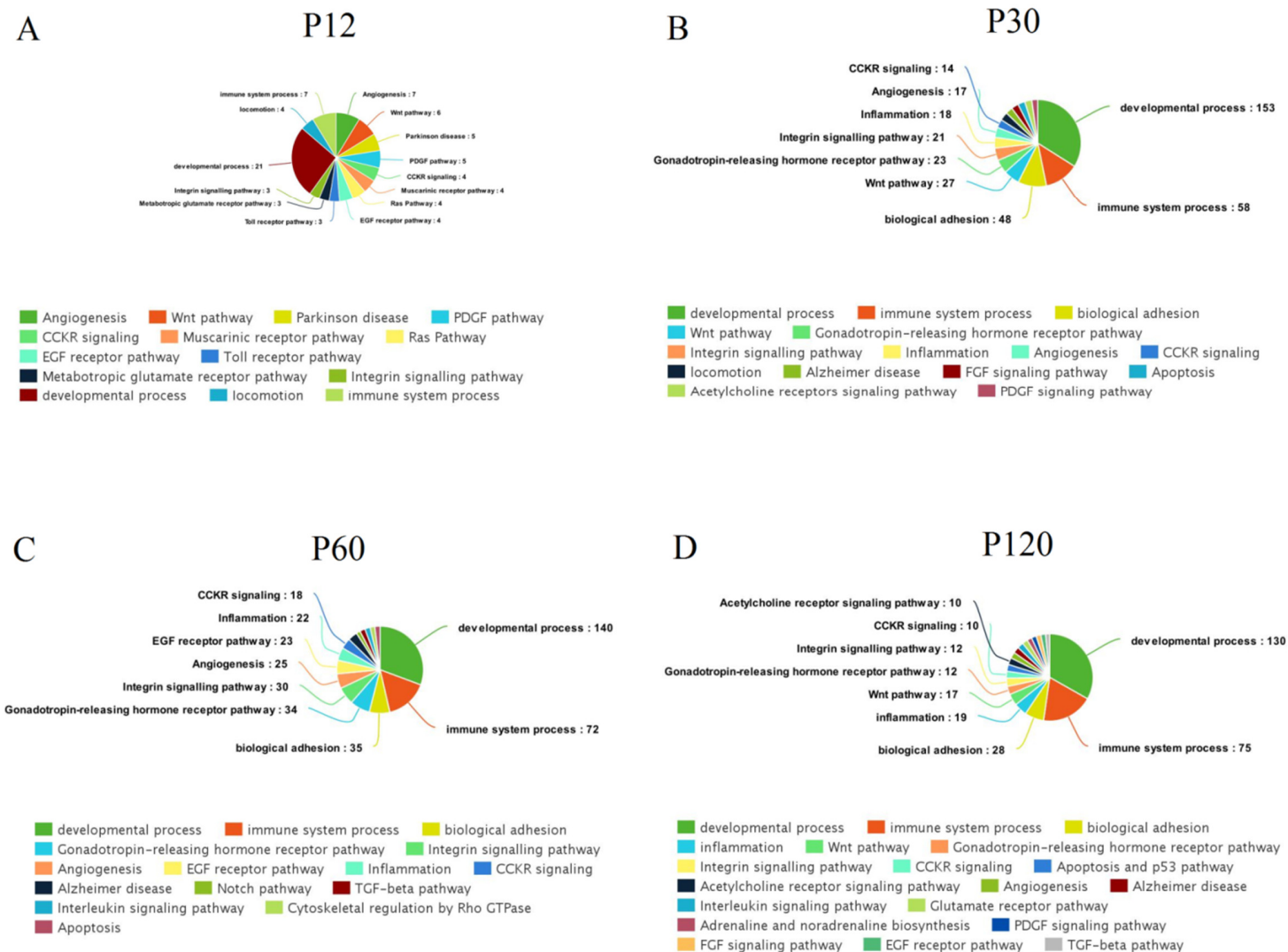


Figura 14. Número de genes em funções biológicas hiper-representadas por módulos associados às crises convulsivas nos diferentes pontos experimentais. As Figuras 14A a 14D representam as funções identificadas nos módulos associados ao grupo CONV em P12, P30, P60 e P120, respectivamente. As redes de co-expressão foram construídas utilizando coletivamente as amostras dos grupos CTRL e CONV em cada período de tempo.

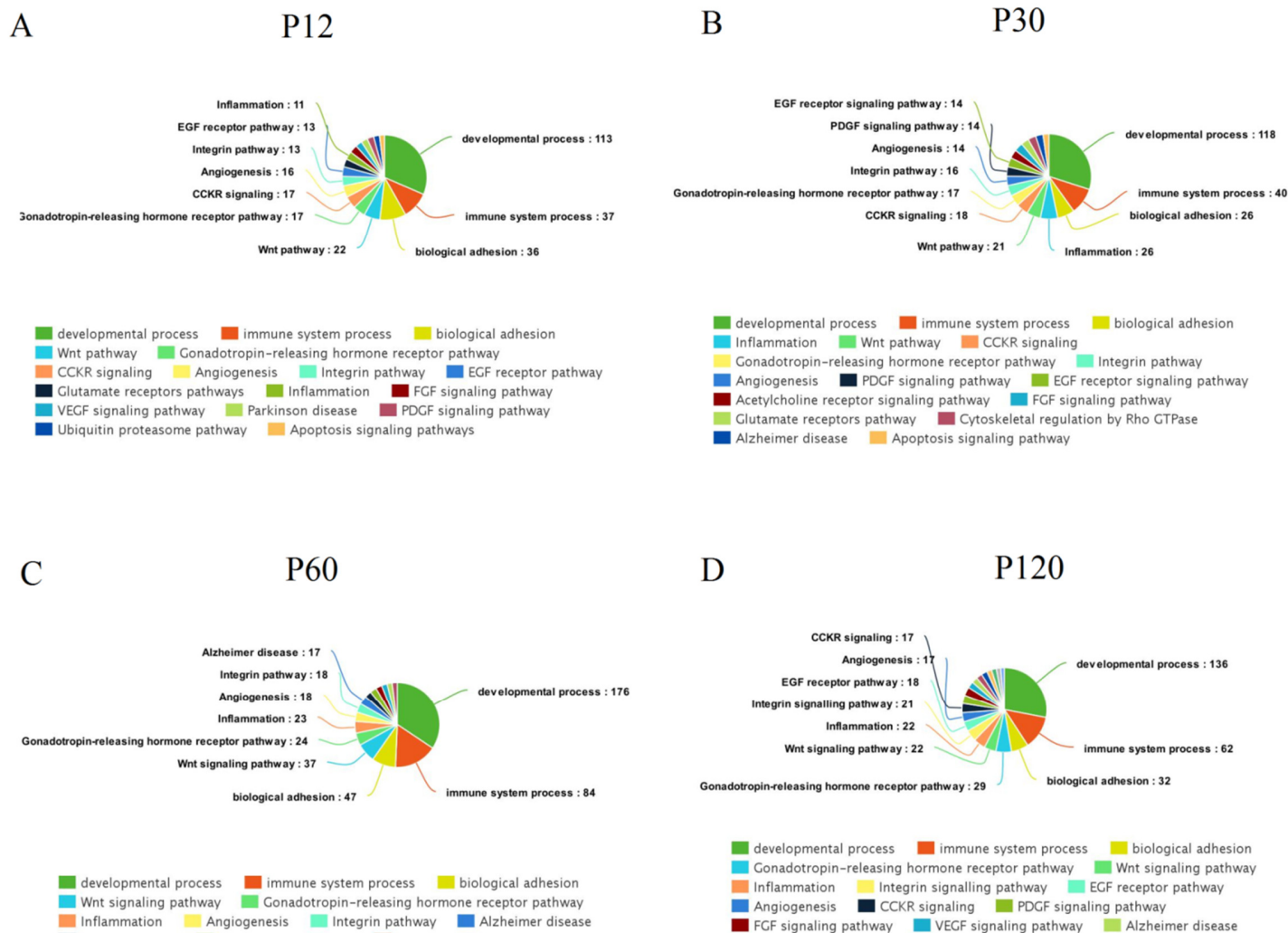


Figura 15. Número de genes em funções biológicas hiper-representadas por módulos associados às crises convulsivas nos diferentes pontos experimentais. As Figuras 15A a 15D representam as funções identificadas nos módulos associados ao grupo CONV em P12, P30, P60 e P120, respectivamente. As redes de co-expressão foram construídas utilizando separadamente as amostras dos grupos CTRL e CONV em cada período de tempo.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizou-se um modelo animal de crises convulsivas induzidas por hipertermia com o objetivo de investigar funções biológicas relevantes para o desenvolvimento da ELTM após crises febris durante a infância. Esse modelo originalmente proposto por BHARAM et al. (1997) foi reproduzido com sucesso em nosso laboratório. Parte significativa dos animais submetidos às condições experimentais apresentou comportamentos associados às crises convulsivas, tais como movimentos estereotipados, perda de balanço e queda. O perfil de expressão gênica global na região CA3 ventral do hipocampo desses animais foi analisado com o intuito de comparar os perfis de expressão gênica global entre os grupos experimentais.

A análise temporal das redes de co-expressão gênica hipocampais permitiu a identificação de módulos de co-expressão e *hubs* relevantes associados às crises convulsivas nas fases aguda, latente e crônica do modelo animal. De maneira geral, módulos e genes associados ao grupo CONV foram associados a funções relevantes para a resposta imune, adesão celular e neurogênese.

Funções relevantes para o sistema imune foram observadas em todas as fases do modelo, incluindo nos estágios mais avançados, sugerindo que um estado de inflamação crônica pode estar presente nesse modelo experimental. De fato, estudos prévios demonstraram que mecanismos inflamatórios podem mediar a epileptogênese, levando ao desenvolvimento da ELTM após crises febris complexas (CHOY et al., 2014). Ademais, marcadores inflamatórios apresentam expressão aumentada no hipocampo e correlacionam com o desenvolvimento da epilepsia em um modelo experimental de CFs (PATTERSON et al., 2015).

Funções associadas à adesão celular foram também observadas em módulos associados às crises convulsivas. Moléculas de adesão participam de funções biológicas relevantes para o desenvolvimento da epilepsia, tais como processos inflamatórios, plasticidade sináptica, transdução de sinal, diferenciação neuronal e migração celular (ENGEL et al., 2008). Concordantemente, crises convulsivas induzidas por hipertermia desencadeiam uma resposta transcricional que leva ao remodelamento tecidual do hipocampo durante as fases aguda e latente do módulo de crises induzidas por hipertermia realizado em camundongos (JONGBLOETS et al., 2015).

Genes associados à neurogênese foram observados em todos os intervalos de tempo avaliados. A neurogênese na região CA3 hipocampal em roedores é pouco conhecida. Nessa região específica, a neurogênese foi observada após a administração de cainato em ratos neonatos de 7 dias de vida (P7). Nesses animais, o número de neurônios que expressam bromodeoxiuridina (BrdU), um marcador de células proliferativas, aumenta em CA3 em P40 e P60, sugerindo uma estimulação tardia da neurogênese pelo cainato em ratos neonatos (DONG et al., 2003). De fato, células progenitoras neurais da região CA3 são capazes de se diferenciar *in vitro* em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, a idade pós-natal para influenciar o fenótipo de diferenciação dessas células na região CA3: a diferenciação neuronal diminui e a diferenciação de oligodendrócitos aumenta com o envelhecimento dos animais (SHETTY & HATTIANGADY, 2013).

Por outro lado, a neurogênese no giro denteado é um fenômeno bem conhecido em humanos e em roedores e já foi caracterizada após crises febris neonatais. Essas células são geradas na zona subgranular e migram para a camada granular do giro denteado. Os neurônios granulares ectópicos por sua vez enviam os axônios e formam conexões excitatórias com a região CA3, levando ao aumento da excitabilidade hipocampal após crises convulsivas induzidas por hipertermia (SCOTT 2012).

Funções biológicas hiper-representadas por módulos em P12 revelaram a resposta ao dano cerebral causado pelas crises convulsivas. Alguns exemplos de funções relevantes observadas em P12 foram o metabolismo de aminoácidos, apoptose, resposta imune, resposta ao estresse celular e transporte iônico. Interessantemente, muitas funções relacionadas a diferenciação neuronal e migração celular foram identificadas já em um dia após as crises convulsivas serem induzidas por hipertermia. De fato, evidências recentes sugerem que a neurogênese é induzida por crises convulsivas agudas ou insultos precipitantes, embora a capacidade de recrutamento e proliferação neuronal reduza substancialmente nas fases mais crônicas da epilepsia (HUANG et al., 2015).

A regulação de muitos genes envolvidos nas vias de Wnt e Hippo já em P12 sugere que o dano induzido por crises convulsivas recapitula vias de sinalização associadas ao desenvolvimento e homeostase no cérebro. Essas duas vias de sinalização estão interconectadas e são inter-reguladas para a promoção de uma resposta tecidual apropriada (KONSAVAGE & YOCHUM, 2013). Além disso, a via de Wnt modula interações entre os sistemas nervoso e o imune, tornando-a um intersector molecular entre a inflamação e a neurogênese (MARCHETTI & PLUCHINO, 2013).

Módulos envolvidos na glicólise e na gliconeogênese foram relacionados às crises convulsivas em P30, um intervalo de tempo relacionado ao fenótipo de resistência a crises induzidas por pentilenotetrazol. Estudos anteriores demonstraram que a glicólise aumenta durante as crises convulsivas, gerando ácido láctico e fornecendo energia na forma de ATP. Entretanto, o ácido láctico reduz o pH tecidual e gera uma acidose metabólica no tecido, que por sua vez inibe a progressão das crises (YANG et al., 2013). Portanto, um dos mecanismos associados à tolerância às crises em P30 pode estar associado à acidose metabólica no cérebro.

Módulos associados às crises convulsivas em P30 apresentaram genes envolvidos em funções importantes para a neurogênese, tais como a diferenciação celular, o crescimento axonal e a regulação da adesão celular. De fato, genes cujas proteínas participam das vias da fosfolipase D e da via das efrinas foram associados a um ganho de conectividade em P30. A fosfolipase D promove a liberação do ativador de plasminogênio tecidual, iniciando uma cascata proteolítica de componentes da matriz extracelular que facilita a neuritogênese (ZHANG et al., 2005). Em paralelo, a via das efrinas está ativada no hipocampo de animais epiléticos, resultando em um aumento do crescimento axonal e da epileptogênese (XU et al., 2003). A via de Delta-Notch foi também identificada por genes de módulos relevantes em P30. Essa via induz a proliferação celular durante a neurogênese e também promove o aumento da excitação neuronal durante crises convulsivas (SHA et al., 2014).

Módulos associados a vias de sinalização da imunidade inata foram também observados em P30, assim como *hubs* relacionados a marcadores de micróglia e astrócitos. Por exemplo, a presença de vias de sinalização relacionadas à IL-1, receptores do tipo Toll-like, adipocitocinas e MAPK indica a ativação da resposta imune durante esse intervalo de tempo, a qual está diretamente relacionada à hiperexcitabilidade neuronal e epileptogênese (MATIN et al., 2015). Dessa forma, pode-se concluir que eventos pró-convulsivantes podem ativar a micróglia e os astrócitos e liberar mediadores inflamatórios, iniciando uma cascata que contribui para o aumento da excitabilidade neuronal.

Módulos correlacionados às crises convulsivas em P60 foram envolvidos em funções relacionadas ao sistema imune, organização da cromatina, desenvolvimento sináptico, migração celular, via de Wnt, adesão focal, transporte de potássio e migração neuronal. Em P60, é descrito que animais que tiveram crises convulsivas induzidas por hipertermia em P11 são mais susceptíveis a crises induzidas por doses

subconvulsivantes de cainato (DUBÉ et al., 2000). Dessa maneira, funções hiper-representadas em P60 estão relacionadas a um fenótipo de sensibilidade a crises convulsivas. Esse intervalo pode ser particularmente importante para a epileptogênese, pois funções relacionadas a mecanismos epigenéticos foram observadas em P60. Essas alterações podem ser responsáveis pela assinatura molecular de longo prazo induzida por crises febris. Ademais, a identificação de genes associados a adesão focal em P60 sugere que a interação entre a matriz extracelular e células do sistema nervoso é importante para o processo epileptogênico. De fato, a via de sinalização envolvida na adesão focal possui papel no brotamento de fibras musgosas no hipocampo durante o modelo de *kindling* induzido por pentilenotetrazol (SONG et al., 2015).

A regulação da expressão gênica de canais de potássio pode estar relacionada a susceptibilidade a uma dose subconvulsivante de cainato observada nesse intervalo de tempo. Além disso, a expressão diferencial de transportadores de bicarbonato pode estar diretamente associada à sensibilidade dos animais em P60 para crises convulsivas. De fato, SCHUCHMANN et al. (2006) demonstraram que a indução de crises convulsivas por hipertermia em animais está associada a um quadro de alcalose respiratória, o qual é mimetizado pela administração intraperitoneal de bicarbonato. Essa alcalose também foi observada em crianças, nas quais estados de alcalose respiratória foram associados à susceptibilidade para crises convulsivas (SCHUCHMANN et al., 2011).

Módulos correlacionados às crises convulsivas em P120 foram envolvidos em funções como o estresse oxidativo, apoptose, diferenciação neuronal, vias do sistema imune, alterações em transportadores de soluto, junções oclusivas e vias de sinalização do desenvolvimento como Hippo, complex repressor *polycomb 2* (PRC2), Robo e Wnt.

A redução da expressão de proteínas associadas a junções oclusivas (*tight junctions*) tem sido implicada na patogênese da epilepsia, pois essas alterações promovem a consequente infiltração de células inflamatórias e edema no cérebro (MICHALAK et al, 2012). De fato, a administração de topiramato em animais com crises induzidas por hipertermia reduz a atividade convulsiva no cérebro por meio da manutenção correta da expressão de proteínas envolvidas nas junções oclusivas (GURSES et al., 2013).

Módulos associados ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial foram observados em P120, indicando que deficiências na respiração mitocondrial e o estresse oxidativo resultante são importantes para a epilepsia em estágio crônico (ROWLEY & PATEL, 2013). Já a regulação transcricional de genes relacionados ao PRC2 indica que um silenciamento de genes envolvidos na pluripotência e diferenciação neuronal pode ser regulado por esse complexo em P120. Interessantemente, foi recentemente demonstrado que o complexo PRC2 silencia genes responsáveis pela neurodegeneração em neurônios do corpo estriado de camundongos (VON SCHIMMELMANN et al., 2016).

Outras funções hiper-representadas por genes associados às crises convulsivas em P30, P60 e P120 foram a via do receptor de colecistocinina (CCKR) e a via do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). A via de CCKR está inversamente associada ao fenótipo de farmacoresistência na epilepsia, pois controla a atividade de interneurônios inibitórios (MIRZA et al., 2011). Já a via de GnRH possui genes associados com a epileptogênese, em uma análise de enriquecimento funcional realizada em dados de expressão gênica global (SUBRAMANIAN et al., 2005).

Embora estudos anteriores tenham revelado alterações histológicas, comportamentais e eletrofisiológicas associadas ao modelo de convulsões induzidas por hipertermia, este estudo é pioneiro na avaliação sequencial de alterações moleculares ocasionadas por

crises febris. A análise delhada das redes de co-expressão gênica na região CA3 hipocampal ventral permitiu a identificação de módulos transcricionais relacionados ao processo epileptogênico induzido por crises convulsivas febris. Esses dados contribuíram para a identificação de novos alvos para o tratamento da ELTM induzida por um insulto precipitante febril. Além disso, o conjunto desses dados permitiu a identificação de alterações moleculares associadas a fenótipos de resistência e sensibilidade a crises convulsivas. Os resultados sugerem que fármacos atuando em vias de sinalização associadas a processos imunológicos e de desenvolvimento, tais como Wnt, Hippo, Notch, JAK-STAT e MAP cinases, poderiam interferir com o desenvolvimento ou progressão da ELTM.

REFERÊNCIAS

- ALEGRO MC, SILVA AV, BANDO SY, LOPES RD, CASTRO LH, HUNGTSU W, et al. Texture analysis of high resolution MRI allows discrimination between febrile and afebrile initial precipitating injury in mesial temporal sclerosis. *Magn Reson Med*. 2012; 68: 1647–1653.
- ARMARIO A, GAVALDA A, MARTI O. Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol* 1988; 158:207-212.
- ARONICA E, GORTER JA. Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *Neuroscientist* 2007; 13:100-108.
- ARTEGIANI B, DE JESUS DOMINGUES, AM, BRAGADO AS, BRANDL E, MASSALINI S, DAHL A, CALEGARI F. Tox: a multifunctional transcription factor and novel regulator of mammalian corticogenesis. *EMBO J*. 2015; 34, 896–910.
- AUVIN S, PINEDA E, SHIN D, GRESSENS P, MAZARATI A. Novel animal models of pediatric epilepsy. *Neurotherapeutics* 2012; 9:245-261.
- AYALA J, TOUCHOT N, ZAHRAOUI A, TAVITIAN A, PROCHIANTZ A. The product of rab2, a small GTP binding protein, increases neuronal adhesion, and neurite growth in vitro. *Neuron*. 1990; 4:797-805.
- BABB TL. Research on the anatomy and pathology of epileptic tissue. In Luders H (ed) *Epilepsy surgery*, 1991. Raven Press, New York, p. 719-727.
- BAE S, BESSHO Y, HOJO M, KAGEYAMA R. The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development*. 2000; 127, 2933–2943.
- BAE YS, CHUNG W, HAN K, PARK KY, KIM H, KIM E, KIM MH. Down-regulation of RalBP1 expression reduces seizure threshold and synaptic inhibition in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 433:175-80.
- BANDO SY, ALEGRO MC, AMARO E JR, SILVA AV, CASTRO LH, et al. Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesialtemporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2011; 6: e26268.
- BANDO SY, SILVA FN, COSTA LDA F, SILVA AV, PIMENTEL-SILVA LR, et al. Complex network analysis of CA3 transcriptome reveals pathogenic and compensatory pathways in refractory temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2013; 8: e79913.
- BARABÁSI AL, OLTVAI ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*. 2004; 5:101-113.
- BARAM TZ, GERTH A, SCHULTZ L Febrile seizures: an age appropriate model. *Brain Res Dev*. 1997; 246:134 –143.
- BEATUS P, JHAVERI DJ, WALKER TL, COOPER HM, MORIKAWA Y, BARTLETT PF. Oncostatin M regulates neural precursor activity in the adult brain. *Dev. Neurobiol*. 2011; 71, 619–633.
- BEN-ARI Y, COSSART R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*. 2000; 23:580-587.
- BENDER RA, SOLEYMANI SV, BREWSTER AL, NGUYEN ST, et al. Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) insurving dentate gyrus

- granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 2003; 23:6826-6836.
- BENDER RA, BARAM TZ. Epileptogenesis in the developing brain: what can we learn from animal models? *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:2-6.
- BENJAMINI Y, HOCHBERG Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995; 57: 289-300.
- BERG AT, SHINNAR S, LEVY SR, TESTA FM. Childhood-onset epilepsy with and without preceding febrile seizures. *Neurology*. 1999; 53:1742–1748.
- BREWSTER A, BENDER RA, CHEN Y, DUBE C, EGHBAL-AHMADI M, et al. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in a isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci*. 2002; 22:4591-4599.
- BROMFIELD EB, CAVAZOS JE, SIRVEN JI. *An Introduction to Epilepsy*. West Hartford (CT): American Epilepsy Society; 2006. Chapter 1, Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy.
- CATTERALL WA, OAKLEY JC. NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol*. 2010; 588:1849-1859.
- CENDES, F. Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Curr. Opin. Neurol*. 2004. 17, 161–164.
- CHEN K, RATZLIFF A, HILGENBERG L, GULYÁS A, FREUND TF, et al. Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures. *Neuron*. 2003; 39:599-611.
- CHEN EY, TAN CM, KOU Y, DUAN Q, WANG Z, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013; 128:14.
- CHOI, HD, KIM; YI, SONG; HK, KIM; KIM, DS; KANG, TC. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on GABAergic inhibition in the hippocampus of normal and pilocarpine induced epileptic rats. In: Willner, P. (ed) *Behavioural Models in Psychopharmacology*, Cambridge. 2010, 131-141.
- CHOY M, DUBÉ CM, EHRENGRUBER M, BARAM T. Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis. *Epilepsy Curr*. 2014; 14:15-22.
- CONSONI FT, VITAL MA, ANDREATINI R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006, 16:451-458.
- CURIA G, LONGO D, BIAGINI G, JONES RS, AVOLI M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008; 172:143-57.
- DANSCHER G. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry*. 1981; 71: 1–16.
- DAS A, GAJENDRA S, FALENTA K, WU B, DOHERTY P, GUO W, LALLI G. RalA promotes a direct exocyst-Par6 interaction to regulate polarity in neuronal development. *J. Cell Sci*. 2014; 127, 686–99.
- DATWYLER AL, LÄTTIG-TÜNNEMANN G, YANG W, PASCHEN W, LEE SL, DIRNAGL U, ENDRES M, HARMS C. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31:2152-9.
- DE ANDA FC, ROSARIO AL, DURAK O, TRAN T, GRÄFF J, MELETIS K, REI D, SODA T, MADABHUSHI R, GINTY DD, KOLODKIN AL, TSAI LH. Autism spectrum disorder susceptibility gene TAOK2 affects basal dendrite formation in the neocortex. *Nat Neurosci*. 2012; 15:1022-31.
- DONG H, CSERNANSKY CA, GOICO B, CSERNANSKY JG. Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci*. 2003; 23:1742-9.

- DUBÉ C, CHEN K, EGHBAL-AHMADI, et al. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol.* 2000; 47:336–344.
- DUBÉ C, VEZZANI A, BEHRENS M, BARTFAI T, BARAM TZ. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol.* 2005; 57:152-155.
- DUBÉ C, BRUNSON KL, EGHBAL-AHMADI M, GONZALEZ-VEGA R, BARAM TZ. Endogenous neuropeptide Y prevents recurrence of experimental febrile seizures by increasing seizure threshold. *J Mol Neurosci.* 2005; 25:275-284.
- DUBÉ C, RICHICHI C, BENDER RA, CHUNG G, LITT B, BARAM TZ. Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. *Brain.* 2006; 129:911–922.
- DUBÉ CM, BREWSTER AL, RICHICHI C, ZHA Q, BARAM TZ. Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci.* 2007, 30:490–496.
- DUBÉ CM, BREWSTER AL, BARAM TZ. Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. *Brain Dev.* 2009; 31:366-371.
- DUBÉ CM, RAVIZZA T, HAMAMURA M, ZHA Q, KEEBAUGH A, FOK K, ANDRES AL, NALCIOGLU O, OBENAU A, VEZZANI A, BARAM TZ. Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *J Neurosci.* 2010; 30:7484–7494.
- DHIR A. Pentylenetetrazol kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci.* 2012; Chapter 9: Unit 9.37.
- DWYER CA, KATOH T, TIEMEYER M, MATTHEWS RT. Neurons and glia modify receptor protein-tyrosine phosphatase ζ (RPTP ζ)/phosphacan with cell-specific O-mannosyl glycans in the developing brain. *J Biol Chem.* 2015; 290:10256-73.
- EKONOMOU A, ANGELATOU F. Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazol-induced "kindling" model of epilepsy. *Neurochem Res.* 1999; 24:1515-1522.
- ENGEL J, PEDLEY TA, AICARDI J. 2008. *Epilepsy: a comprehensive textbook.*
- ESCAYG A, HEILS A, MAC DONALD BT, HAUG K, SANDER T, MEISLER MH, et al. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy seizure plus and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001; 68:866-873.
- EVERETT KV, CHIOZA B, AICARDI J, ASCHAUER H, BROUWER O, CALLENBACH P, COVANIS A, DULAC O, EEG-OLOFSSON O, FEUCHT M, FRIIS M, GOUTIERES F, MAKOFF A, NABBOUT R, OLSSON I, MCKEIGUE P, ROBINSON R, TASKE N, REES M, GARDINER M. Linkage and association analysis of CACNG3 in childhood absence epilepsy. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:463-72.
- FISCHER RS, BOAS WE, BLUME W, ELGER C, GENTON P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470–472.
- FUKUDA M, MORIMOTO T, NAGAO H, KIDA K. Clinical study of epilepsy with severe febrile seizures and seizures induced by hot water bath. *Brain Dev.* 1997; 19:212–216.
- GAMPE K, STEFANI J, HAMMER K, BRENDEL P, POTZSCH A, ENIKOLOPOV G, ENJOJI K, ACKER-PALMER A, ROBSON SC, ZIMMERMANN H. NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain. *Stem Cells.* 2015; 33, 253–264.
- GARRIGA-CANUT M, SCHOENIKE B, QAZI R, BERGENDAHL K, DALEY TJ, et al. 2-Deoxy-d-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nature Neuroscience* 2006; 9:1382-1387.

- GESCHWIND DH, KONOPKA G. Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology. *Nature*. 2009; 461:908-915.
- GITAIDLG, ROMCY-PEREIRA RN, LIVIA LGG, LEITE JP, GARCIA-CAIRASCO N, et al. Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2008; 54: 272-278.
- GORTER, J.A., VAN VLIET, E.A., ARONICA, E., BREIT, T., RAUWERDA, H., et al. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2006; 26:11083-11110.
- GRANT SG. Systems biology in neuroscience: bridging genes to cognition. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13: 577-582.
- GULYAS AI, ACSADY L, FREUND TF. Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus. *Neurochem* 1999; 34, 359–337.
- GUO W, KECKESOVA Z, DONAHER JL, SHIBUE T, TISCHLER V, REINHARDT F, ITZKOVITZ S, NOSKE A., ZURRER-HARDI U, BELL G, MANI SA, VAN OUDENAARDEN A., WEINBERG, RA. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*. 2012; 148, 1015–1028.
- GÜRSSES C, ORHAN N, AHISHALI B, YILMAZ CU, KEMIKLER G, et al. Topiramate reduces blood-brain barrier disruption and inhibits seizure activity in hyperthermia-induced seizures in rats with cortical dysplasia. *Brain Res*. 2013; 1494:91-100.
- HALBEDL S, SCHOEN M, FEILER MS, BOECKERS TM, SCHMEISSER MJ. Shank3 is localized in axons and presynaptic specializations of developing hippocampal neurons and involved in the modulation of NMDA receptor levels at axon terminals. *J Neurochem*. 2016; 137:26-32.
- HAYASHI T, YOSHIDA T, RA M, TAGUCHI R, MISHINA M. IL1RAPL1 Associated with Mental Retardation and Autism Regulates the Formation and Stabilization of Glutamatergic Synapses of Cortical Neurons through RhoA Signaling Pathway. *PLoS ONE*. 2013; 8: e66254.
- HEIDA JG, MOSHÉ SL, PITTMAN QJ. The role of interleukin-1beta in febrile seizures. *Brain Dev*. 2009; 31:388-393.
- HESDORFFER DC, SHINNAR S, LEWIS DV, MOSHÉ SL, NORDLI DR JR, PELLOCK JM, MACFALL J, SHINNAR RC, MASUR D, FRANK LM, EPSTEIN LG, LITHERLAND C, SEINFELD S, BELLO JA, CHAN S, BAGIELLA E, SUN S; FEBSTAT STUDY team. Design and phenomenology of the FEBSTAT study. *Epilepsia*. 2012; 53:1471-80.
- HESDORFFER DC, SHINNAR S, LAX DN, PELLOCK JM, NORDLI DR JR, SEINFELD S, GALLENTINE W, FRANK LM, LEWIS DV, SHINNAR RC, BELLO JA, CHAN S, EPSTEIN LG, MOSHÉ SL, LIU B, SUN S; FEBSTAT STUDY TEAM. Risk factors for subsequent febrile seizures in the FEBSTAT study. *Epilepsia*. 2016; 57:1042-7.
- HEUSER K, CVANCAROVA M, GJERSTAD L, TAUBOLL E. Is Temporal Lobe Epilepsy with childhood febrile seizures a distinctive entity? A comparative study. *Seizure*. 2011; 20:163-6.
- HOLTZMAN D, OBANA K, OLSON J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science* 1981; 213:1034-1036.
- HUX, SHI Q, ZHOU X, HE W, YI H, YIN X, GEARING M, LEVEY A, YAN R. Transgenic mice overexpressing reticulon 3 develop neuritic abnormalities. *EMBO J*. 2007; 26, 2755–67.
- HUANG J, SAKAI R, FURUICHI T. The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons. *Mol. Biol. Cell*. 2006; 17, 3187–96.
- HUANG C, FU XH, ZHOU D, LI JM. The Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Disrupted

- Hippocampal Neurogenesis of Temporal Lobe Epilepsy: A Potential Therapeutic Target? *Neurochem Res.* 2015; 40:1319-32.
- ISHITANI T, ISHITANI S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. *Cell. Signal.* 2013; 25:190-7.
- JOHANSSON H, SIMONSSON S. Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin to control embryonic stem cell fate determination. *Aging.* 2010; 2, 815–822.
- JONES T, JACOBSEN SJ. Childhood febrile seizures: overview and implications. *Int J Med Sci.* 2007; 4:110-114.
- JONGBLOETS BC, VAN GASSEN KL, KAN AA, OLDE ENGBERINK AH, DE WIT M, WOLTERINK-DONSELAAR IG, GROOT KOERKAMP MJ, VAN NIEUWENHUIZEN O, HOLSTEGE FC, DE GRAAN PN. Expression Profiling after Prolonged Experimental Febrile Seizures in Mice Suggests Structural Remodeling in the Hippocampus. *PLoS One.* 2015;10: e0145247.
- JUNG KH, CHU K, KIM JH, et al. Molecular alterations underlying epileptogenesis after prolonged febrile seizure and modulation by erythropoietin. *Epilepsia* 2011; 52:541-550.
- KANU N, PENICUD K, HRISTOVA M, WONG B, IRVINE E, PLATTNER F, RAIVICH G, BEHRENS A. The ATM cofactor ATMIN protects against oxidative stress and accumulation of DNA damage in the aging brain. *J Biol Chem.* 2010; 285:38534-42.
- KASPERAVICIUTE D, CATARINO CB, MATARIN M, LEU C, NOVY J, et al. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain* 2013; 136: 3140–3150.
- KONSAVAGE WM JR, YOCHUM GS. Intersection of Hippo/YAP and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013; 45:71-9.
- KNUDSEN FU. Febrile seizures: treatment and prognosis. *Epilepsia.* 2000; 41:2–9.
- LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:559.
- LANGFELDER P, LUO R, OLDHAM MC, HORVATH S. Is my network module preserved and reproducible? *PloS Comp Biol.* 2011; 7: e1001057.
- LEE JR. Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. *BMB reports.* 2015; 48:249–55.
- LEIN ES, ZHAO X, GAGE FH. Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *J Neurosci.* 2004; 24:3879-3889.
- LIN DD, ROPER SN. In utero irradiation as a model of cortical dysplasia. In: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshé S, editors. *Models of Seizure and Epilepsy.* San Diego, Calif, USA: Elsevier Academic Press; 2006. pp. 271–290.
- LIU J, LUO X, XU Y, JIN Y, LI H. Single-stranded DNA binding protein Ssbp3 induces differentiation of mouse embryonic stem cells into trophoblast-like cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2016; 7, 79.
- LOSSIN C, RHODES TH, DESAI RR, VANOYE CG, WANG D, et al. Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J Neurosci.* 2003; 23:11289-11295.

- LUTTGEN, M., OGREN, S.O., MEISTER, B. 5-HT1A receptor mRNA and immunoreactivity in the rat medial septum/diagonal band of Broca-relationships to GABAergic and cholinergic neurons. *J. Chem. Neuroanat.* 2005; 29:93–111.
- MAKITA T, SUCOV HM, GARIEPY CE, YANAGISAWA M, GINTY DD. Endothelins are vascular-derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons. *Nature.* 2008; 452:759-63.
- MARCHETTI B, PLUCHINO S. Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt! *Trends Mol Med.* 2013; 19:144-56.
- MASUDA T, TSUDA M, YOSHINAGA R, OZATO K, TAMURA T, INOUE K. IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype. *Cell Rep.* 2012; 1, 334–340.
- MATHERN GW, BABB TL, PRETORIUS J K et al. The pathophysiological relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporallobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1995; 21:133-147.
- MATIN N, TABATABAIE O, FALSAPERLA R, LUBRANO R, PAVONE P, et al. Epilepsy and innate immune system: A possible immunogenic predisposition and related therapeutic implications. *Hum Vaccin Immunother.* 2015; 11:2021-2029.
- MELLO LE, CAVALHEIRO EA, TAN AM, KUPFER WR, PRETORIUS JK, et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 1993; 34:985-995.
- MENDES-DA-SILVA C, SOUZA SL, BARRETO-MEDEIROS JM, FREITAS-SILVA SR, ANTUNES DE, CUNHA AD, et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002; 60:928-931.
- MEYER AC, DUA T, MA J, SAXENA S, BIRBECK G. Global disparities in theepilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2010; 88: 260–266.
- MI H, POUDEL S, MURUGANUJAN A, CASAGRANDE JT, THOMAS PD. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:336-42.
- MICHALAK Z, SANO T, ENGEL T, MILLER-DELANEY SF, LERNER-NATOLI M, et al. Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res.* 2013; 103:167-79.
- MIRZA N, VASIEVA O, MARSON AG, PIRMOHAMED M. Exploring the genomic basis of pharmacoresistance in epilepsy: an integrative analysis of large-scale gene expression profiling studies on brain tissue from epilepsy surgery. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:4381-94.
- MIURA Y, HONGU T, YAMAUCHI Y, FUNAKOSHI Y, KATAGIRI N, OHBAYASHI N, KANAHO Y. ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons. *Biochem J.* 2016; 473:2591-602.
- MOCHIDA GH, GANESH VS, DE MICHELENA MI, DIAS H, ATABAY KD, KATHREIN KL, HUANG HT, HILL RS, FELIE JM, RAKIEC D, GLEASON D, HILL AD, MALIK AN, BARRY BJ, PARTLOW JN, TAN WH, GLADER LJ, BARKOVICH AJ, DOBYNS WB, ZON LI, WALSH C. CHMP1A encodes an essential regulator of BMI1-INK4A in cerebellar development. *Nat. Genet.* 2012; 44, 1260–4.
- MOREIRA-FILHO CA, BANDO SY, BERTONHA FB, IAMASHITA P, SILVA FN, et al. Community structure analysis of transcriptional networks reveals distinct molecular pathways for early- and late-onset temporal lobe epilepsy with childhood febrile seizures. *PLoS One.* 2015; 10: e0128174.

- MORENO N, SCHMIDT C, AHLFELD J, POSCHL J, DITTMAR S, PFISTER SM, KOOL M, KERL K, SCHULLER U. Loss of Smar proteins impairs cerebellar development. *J Neurosci.* 2014; 34, 13486–13491.
- MORIMOTO K, FAHNESTOCK M, RACINE RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *J Progress in Neurobiology* 2004; Vol 73.
- MOSER E, MATHIESEN I, ANDERSEN P. Association between brain temperature and dentate field potentials in exploring and swimming rats. *Science.* 1993; 259:1324-1326.
- MUHCHYI C, JULIANDI B, MATSUDA T, NAKASHIMA K. Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013; 31, 424–433.
- NANOBASHVILI A, KOKAIA Z, LINDVALL O. Generalization of rapidly recurring seizures is suppressed in mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Neuroscience.* 2003; 118, 845–852.
- NAZEM A, JAFARIAN AH, SADRAIE SH, GORJI A, KHERADMAND H, et al. Neuronal injury and cytotogenesis after simple febrile seizures in the hippocampal dentate gyrus of juvenile rat. *ChildsNerv Syst.* 2012; 28:1931-1936.
- NELIGAN A, BELL GS, GIAVASI C, GOODRIDGE DM, et al. Long-term risk of developing epilepsy after febrile seizures: a prospective cohort study. *Neurology.* 2012; 78: 1166-1170.
- NOEBELS JL. The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci.*2003;26:599-625.
- O'DELL CM, DAS A, WALLACE G 4TH, RAY SK, BANIK NL. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. *J Neurosci Res.* 2012; 90:913-924.
- OLIVEIRA BLMB, PARREIRAS MS, DORETTO MC. Epilepsia e depressão: falta diálogo entre a neurologia e a psiquiatria. *J. Epilepsy Cln Neurophysiol.* 2007; 13:109-113.
- PARK KI, CHU K, JUNG KH, KIM JH, KANG KM, et al. Role of cortical dysplasia in epileptogenesis following prolonged febrile seizure. *Epilepsia.* 2010; 51:1809-1819.
- PATTERSON KP, BRENNAN GP, CURRAN M, KINNEY-LANG E, DUBÉ C, RASHID F, LY C, OBENAU A, BARAM TZ. Rapid, Coordinate Inflammatory Responses after Experimental Febrile Status Epilepticus: Implications for Epileptogenesis. *eNeuro.* 2015;2(5).
- PERRIER AL, TABAR V, BARBERI T, RUBIO ME, BRUSES J, HARRISON NL, STUDER L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *PNAS.* 2004; 101, 12543–12548.
- PETTEM K, YOKOMAKU D, LUO L, LINHOFF M, SIDDIQUI T, KAWABE H, CHEN F, ZHANG L, RUDENKO G, WANG Y, BROSE N, CRAIG A. The Specific Neurexin Interactor Calsyntenin-3 Promotes Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Neuron.* 2013; 80, 113–128.
- PITKÄNEN A, LUKASIUK K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009; 14: 16–25.
- PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266:730-732.
- RAIJMAKERS M, CLYNEN E, SMISDOM N, NELISSEN S, BRÔNE B, RIGO JM, HOOGLAND G, SWIJSEN A. Experimental febrile seizures increase dendritic complexity of newborn dentate granule cells. *Epilepsia.* 2016; 57: 717-26.

- RANSOM CB, BLUMENFELD H. Acquired Epilepsy: Cellular and Molecular Mechanisms. In: Waxman. *Molecular Neurology*. London: Elsevier; 2007.p.360-370.
- ROWLEY S, PATEL M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62:121-31.
- SAEED AI, SHAROV V, WHITE J, LI J, LIANG W, BHAGABATI N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374-378.
- SASAKI S, MORI D, TOYO-OKA K, CHEN A, GARRETT-BEAL L, MURAMATSU M, MIYAGAWA S, HIRAIWA N, YOSHIKI A, WYNshaw-BORIS A, HIROTSUNE S. Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:7812-27.
- SATOH J, KINO Y, ASAHINA N, TAKITANI M, MIYOSHI J, ISHIDA T, SAITO Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology*. 2016; 36:39-49.
- SCANTLEBURY MH, OUELLET PL, PSARROPOULOU C, CARMANT L, et al. Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. *Epilepsia* 2004; 45:592-600.
- SCHARFMAN HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurosci Rep*. 2007; 7:348-354.
- SHA L, WU X, YAO Y, WEN B, FENG J, SHA Z, WANG X, XING X, DOU W, JIN L, LI W, WANG N, SHEN Y, WANG J, WU L, XU Q. Notch signaling activation promotes seizure activity in temporal lobe epilepsy. *Mol Neurobiol*. 2014; 49:633-44.
- SHETTY AK, HATTIANGADY B. Postnatal age governs the extent of differentiation of hippocampal CA1 and CA3 subfield neural stem/progenitor cells into neurons and oligodendrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31:646-56.
- SCHROEDER A, MUELLER O, STOCKER S, SALOWSKY R, LEIBER M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 2006; 7:3.
- SCHUCHMANN S, SCHMITZ D, RIVERA C, SALMEN B, et al. Experimental febrile seizures are precipitated by a hyperthermia-induced respiratory alkalosis. *Nat Med*. 2006; 12:817-823.
- SCHUCHMANN S, HAUCK S, HENNING S, GRÜTERS-KIESLICH A, VANHATALO S, et al. Respiratory alkalosis in children with febrile seizures. *Epilepsia*. 2011; 52:1949-55.
- SCORZA FA, ARIDA RM, CYSNEIROS RM, SCORZA CA, DE ALBUQUERQUE M, CAVALHEIRO EA. Estudo qualitativo da formação hipocámpal de animais hipertensos com epilepsia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005; 63:283-288
- SCORZA FA, ARIDA RM, NAFFAH-MAZZACORATTI MDAG, SCERNI DA, CALDERAZZO L, et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*. 2009; 81:345-365.
- SCOTT RC, HOLMES GL. Febrile seizures and the wandering granule cell. *Nat Med*. 2012; 18:1180-2.
- SEEBURG DP, SHENG M. Activity-induced Polo-like kinase 2 is required for homeostatic plasticity of hippocampal neurons during epileptiform activity. *J Neurosci*. 2008; 28:6583-91.
- SHARMA A. Genome-wide expression analysis in epilepsy: a synthetic review. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12:1008-1032.
- SHI J, LI H, JIN G, ZHU P, TIAN M, QIN J, TAN X, ZHAO S, WANG F, HUA Y, XIAO Y. Lhx8 promote differentiation of hippocampal neural stem/progenitor cells into cholinergic neurons in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol*. 2012; 48, 603–609.

- SHIBASAKI K, SUZUKI M, MIZUNO A, TOMINAGA M. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci.* 2007; 27:1566–1575.
- SILVA AV, CABRAL FR. Ictogênese, Epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* 2008, vol.14, suppl.2.
- SOBANIEC-LOTOWSKA ME, LOTOWSKA JM. The neuroprotective effect of topiramate on the ultrastructure of pyramidal neurons of the hippocampal CA1 and CA3 sectors in an experimental model of febrile seizures in rats. *Folia Neuropathol.* 2011; 49:230-236.
- SONG MY, TIAN FF, WANG YZ, HUANG X, GUO JL, DING DX. Potential roles of the RGMa-FAK-Ras pathway in hippocampal mossy fiber sprouting in the pentylenetetrazole kindling model. *Mol Med Rep.* 2015; 11:1738-44.
- STEINBECK JA, HENKE N, OPATZ J, GRUSZCZYNSKA-BIEGALA J, SCHNEIDER L, THEISS S, HAMACHER N, STEINFARZ B, GOLZ S, KUZNICKI J, METHNER A. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp Neurol.* 2011; 232:185-94.
- STEINLEIN OK. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5:400-408.
- STEPHENS DN, ANDREWS JS. Screening for anxiolytic drugs. In: Willner, P. (ed) *Behavioural Models in Psychopharmacology*, CUP, Cambridge, 1991, 50-75.
- STRANGE BA, WITTER MP, LEIN ES, MOSER EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci.* 2014; 15:655-69.
- SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA VK, GILLETTE MA, PAULOVIKH A, POMEROY SL, GOLUB TR, LANDER ES, MESIROV JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:15545-50.
- SUTULA T, CASCINO G, CAVAZOS J, PARADA I, RAMIREZ L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol.* 1989; 26:321–330.
- TONG CW, WANG JL, CHANG WT, HUANG AM. Novel genes that mediate nuclear respiratory factor 1-regulated neurite outgrowth in neuroblastoma IMR-32 cells. *Gene.* 2013; 515:62-70.
- TOYODA, I., BOWER, M.R., LEYVA, F., BUCKMASTER, P.S. Early activation of ventral hippocampus and subiculum during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2013; 33: 11100–15.
- TURSKI WA, CAVALHEIRO EA, SCHWARZ M, CZUCZWAR SJ, KLEINROK Z, et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 1983; 9:315-335.
- UENO H, NAKAJO N, WATANABE M, ISODA M, SAGATA N. FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early *Xenopus* embryos. *Development.* 2008; 135:2023-30.
- VAN QUYEN M, KHALILOV I, BEN-ARI Y. The dark side of high-frequency oscillations in the developing brain. *Trends Neurosci.* 2006; 29:419–427.
- VEZZANI A, MONETA D, RICHICHI C, PEREGO C, DE SIMONI MG. Functional role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in seizures. *Adv Exp Med Biol.* 2004; 548:123-133.
- VIRTA M, HURME M, HELMINEN M. Increased plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. *Epilepsia* 2002; 43:920-923.
- VON SCHIMMELMANN M, FEINBERG PA, KU SM, BADIMON A, DUFF MK, WANG Z, LACHMANN A,

- DEWELL S, MA'AYAN A, TARAKHOVSKY A, SCHAEFER A. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) silences genes responsible for neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2016; 19:1321-30.
- WANG Y, ZHAO J, KALSOTRA A, TURMAN CM, GRILL RJ, DASH PK, STROBEL HW. CYP4Fs expression in rat brain correlates with changes in LTB4 levels after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2008; 25:1187-94.
- WINDEN KD, OLDHAM MC, MIRNICS K, EBERT PJ, SWAN CH, et al. The organization of the transcriptional network in specific neuronal classes. *Mol Syst Biol.* 2009; 5:291.
- WINDEN KD, KARSTEN SL, BRAGIN A, KUDO LC, GEHMAN L, et al. A systems level, functional genomics analysis of chronic epilepsy. *PLoS One* 2011; 6: e20763.
- WIRRELL EC. Predicting pharmacoresistance in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 2:19-22.
- WU, C.P., CHEUNG, G., RAKHSHANI, N., PARVARDEH, S., ASL, M.N., HUANG, H.L., ZHANG, L. Ca3 neuronal activities of dorsal and ventral hippocampus are differentially altered in rats after prolonged post-ischemic survival. *Neuroscience.* 2005; 130: 527–39.
- XIA Y, LUO C, DAI S, YAO D. Increased EphA/ephrinA expression in hippocampus of pilocarpine treated mouse. *Epilepsy Res.* 2013; 105, 20–29.
- XU B, LI S, BROWN A, GERLAI R, FAHNESTOCK M, RACINE RJ. EphA/ephrin-A interactions regulate epileptogenesis and activity-dependent axonal sprouting in adult rats. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24:984-99.
- YAGOUBI N, JOMNI Y, SAKLY M. Hyperthermia-Induced Febrile Seizures Have Moderate and Transient Effects on Spatial Learning in Immature Rats. *Behav Neurol.* 2015; 5:924303.
- YAMADA T, YANG Y, HEMBERG M, YOSHIDA T, CHO HY, MURPHY JP, FIORAVANTE D, REGEHR WG, GYGI SP, GEORGOPOULOS K, BONNI A. Promoter decommissioning by the NuRD chromatin remodeling complex triggers synaptic connectivity in the mammalian brain. *Neuron.* 2014; 83:122-34.
- YANG H, WU J, GUO R, PENG Y, ZHENG W, LIU D, SONG Z. Glycolysis in energy metabolism during seizures. *Neural Regen Res.* 2013; 8:1316-26.
- ZHANG G, RAOL YS, HSU FC, BROOKS-KAYAL AR. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizuresusceptibility. *J Neurochem.*2004; 88:91-101.
- ZHANG Y, KANAHO Y, FROHMAN MA, TSIRKA SE. Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2005; 25:1797-805.
- ZHANG X, PENG X, FANG M, ZHOU C, ZHAO F, ZHANG Y, XU Y, ZHU Q, LUO J, CHEN G, WANG X. Up-regulation of apelin in brain tissue of patients with epilepsy and an epileptic rat model. *Peptides.* 2011; 32:1793-9.
- ZHANG Y, LI Z, GU J, ZHANG Y, WANG W, SHEN H, CHEN G, WANG X. Plic-1, a new target in repressing epileptic seizure by regulation of GABAAR function in patients and a rat model of epilepsy. *Clin Sci (Lond).* 2015; 129:1207-23.
- ZHENG CH, YUAN L, SHA W, SUN ZL. Gene differential coexpression analysis based on biweight correlation and maximum clique. *BMC Bioinformatics.* 2014;15 Suppl 15: S3.
- ZHAO X, LEIN ES, HE A, SMITH SC, ASTON C, GAGE FH. Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J Comp Neurol.* 2001; 441:187-196.