
Ciências Biológicas Noturno

Gabriel Elias Figueiredo

**Expressão de genes relacionados a cálcio e
glutamato no hipocampo de pacientes com
epilepsia do lobo temporal**

A large, abstract geometric pattern in the bottom half of the page, consisting of overlapping light blue and white shapes that form a complex, crystalline structure.

Rio Claro
2009

GABRIEL ELIAS FIGUEIREDO

Expressão de genes relacionados a cálcio e
glutamato no hipocampo de pacientes com epilepsia
do lobo temporal

Orientador: LÍLIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI

Supervisor: MÁRIO SÉRGIO PALMA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2009

573.8 Figueiredo, Gabriel Elias
F866e Expressão de genes relacionados a cálcio e glutamato no
hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal /
Gabriel Elias Figueiredo. - Rio Claro : [s.n.], 2009
30 f. : il., gráfs.

Trabalho de conclusão (Licenciatura e Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências

Orientador: Lília Freire Rodrigues de Souza Li

1. Neurobiologia. 2. Receptor sensor de cálcio. 3.
Receptor metabotrópico de glutamato. 4. Clínica médica. 5.
PCR em Tempo Real. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

“Séculos se passaram, e por incrível que pareça ainda continuamos escravos da triste luta entre o Bem e o Mal, pois esquecemo-nos de que o Bem e o Mal são apenas formas de compreender a dicotomia que representa o conhecimento e a ignorância.”

“Nascemos para evoluir, para nos tornarmos melhores a cada nova existência. Que o homem desperte para a sua missão, para o objetivo maior de sua vida. Que ele possa se libertar de seu pequeno mundo de ilusões e enxergar a verdadeira e infinita vida, como um pequeno peixe que é solto de seu aquário nas águas intermináveis do oceano e se surpreende com a ausência de limites em meio ao infinito.”

Livro “Universalismo Crístico”,
de Roger Bottini Paranhos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, uma vez que Ele é a força primordial que move nossos esforços, bem como provê a vida em todas as suas formas de manifestação.

Meus primeiros agradecimentos são destinados a todas as pessoas que cruzaram meu caminho durante esses anos de universidade e que de alguma forma contribuíram para que eu aqui chegasse. Tantas amizades, tantas alegrias e, felizmente, nenhuma inimizade. Aos meus amigos da turma do CBN 2004, um especial agradecimento. Muito obrigado por todos esses anos de amizade verdadeira, a qual foi imprescindível tanto para minha formação acadêmica quanto pessoal. Aos novos companheiros do CBN 2005, muito obrigado por minha “adoção” por parte de vocês nesse ano. Apesar do pouco tempo de convivência, se mostraram grandes amigos, muito solícitos, sempre. Dedico um especial agradecimento a Ângela. Seu apoio irrestrito nas épocas de ocupações intensas foi sem dúvida imprescindível. Muito obrigado pela compreensão de sempre e por ser essa pessoa única, que veio para mim dos céus.

Aos companheiros de república, Gustavo, Miagui, Perdido, Pataca, Daniel, Jacaré, Néia e Xaxim, todos moradores passados ou atuais, um gigante agradecimento. Só tendo convivido todos esses anos sob o mesmo teto pode-se ter ciência do quanto essa convivência foi proveitosa para mim. Tão raro e verdadeiro companheirismo, algo do qual só frente à perspectiva de deixar, sinto o peito apertar e as palavras me faltam.

À Dra. Lília, dedico especial agradecimento. Não só por todo o conhecimento adquirido durante esses anos no laboratório, mas também pelo apoio moral. De inigualável valia foram esses anos de pesquisa sob sua orientação e sem dúvida contribuíram diretamente para a tomada de decisões atuais. A todos os amigos do laboratório também, muito obrigado.

Meus próximos agradecimentos são dedicados a minha família, a qual me forneceu apoio incondicional desde minha decisão de ingressar no curso de biologia, durante toda sua extensão, e, mais importante do que nunca, neste momento especial de tomada de decisões cruciais pelo qual passo nos dias atuais. Após Deus, o apoio familiar representa para mim o mais importante pilar de sustentação de minha perseverança em enfrentar mais esse desafio inusitado. Não tenho dúvidas de que, sem o apoio incondicional ministrado por meus familiares mais próximos, não seria eu nem uma fagulha da pessoa que sou.

De maneira alguma poderia eu deixar de agradecer a meus avôs, Santa, Zezé (que continua no auxílio irrestrito de onde quer que esteja), Ranulfo e Isolina - a qual, por mais longe que esteja, sei que sempre esteve por perto. Não hesito em afirmar que a vigília e

proteção que sempre me dispensaram foram cruciais para me conduzir rumo a tantas conquistas e me levarão a tantas outras. A minha tia Jesuânia, muito obrigado pela dedicação de sempre e, apesar da distância, a proximidade se faz presente pela afinidade. À tia Gisela também, muito obrigado.

A meus irmãos, Leonardo, Cristiano, e primos-irmãos, Guilherme e Henrique, todos igualmente eternos companheiros na caminhada infinita, agradeço especialmente. Ao que o panorama da necessidade de agradecimento se avizinha, faltam-me palavras, e por isso peço desculpas. Qualquer tentativa de colocar em palavras o quão agradecido me sinto por tantos anos de apoio e amizade sincera, sem dúvida seria incompleta. Portanto, deixo aqui um grande abraço mais do que agradecido, certo de que laços de amizade como esses não se corrompem nem sob o jugo do mais oxidante dos agentes (essa, especialmente para o químico da família) nem sob a mais excruciante das dificuldades.

A minha mãe e a meu pai, por fim, gostaria de destinar a maior parte dessa dedicatória; não caberia nesse curto espaço todo meu agradecimento e admiração por contribuírem ativamente na moldagem de meu caráter, tendo habilmente me guiado por esses anos a fio, superando o duro fardo da criação plena do filho. Não fosse o apoio irrestrito dado às minhas decisões atuais, temo que forças me faltariam para perseverar. Felizmente, só o melhor recebo deles. A meus pais, daria o mundo, se possível, entretanto, tendo em vista tal impossibilidade, tudo o que meu limitado escopo permite é um incomensurável voto de agradecimento e compromisso de eterno débito para com eles.

Dezembro de 2009

SUMÁRIO

	Página
1- RESUMO	3
2- INTRODUÇÃO	4
2.1 - Epilepsia e esclerose medial temporal	4
2.2 - Fatores associados à esclerose medial temporal	4
2.3 - Homeostase do cálcio.....	5
2.4 - Papel do cálcio extracelular.....	6
2.5- Receptor sensor de cálcio.....	6
2.6- Receptores metabotrópicos do glutamato	7
2.7- Famílias de proteínas ligantes de cálcio neuronal	8
2.8- Papel do íon cálcio em hipocampo	9
3- OBJETIVO	10
4- MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1- Pacientes	10
4.2- Extração de RNA	10
4.3- RT-PCR	10
4.4- PCR quantitativo em tempo real.....	10
5- FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	11
6- ASPECTOS ÉTICOS.....	11
7- RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	11
8- RESULTADOS.....	11
8.1-Validação.....	11
8.2- Quantificações de expressão gênica.....	13
9 - DISCUSSÃO.....	21
10- CONCLUSÕES.....	25
11- REFERÊNCIAS.....	27

1- RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a principal forma de epilepsia, e a principal lesão desenvolvida por pacientes com ELT é a esclerose mesial temporal (EMT) apresentando perda neuronal, gliose e atrofia da região do hipocampo. Os íons cálcio são fundamentais para o funcionamento de inúmeras vias metabólicas em todos os níveis fisiológicos e desempenham papel fundamental nas respostas de despolarização neuronal. Foi comprovado que a ativação tanto de receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos de glutamato promove o influxo anormal de Ca^{2+} para o meio intracelular, potencializando o efeito de excitação associado à EMT. O cálcio atua tanto como mensageiro celular secundário, quanto primário através da interação com um receptor específico na superfície celular, o Receptor Sensor de Cálcio (CASR). O CASR é expresso em diversas regiões do cérebro, incluindo o hipocampo, no entanto são desconhecidas muitas das possíveis funções desempenhadas por este receptor no cérebro. Ele pertence à família de receptores acoplados a proteína-G, e exibe homologia significativa com os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). Ademais, os mGluRs regulam a expressão da família de proteínas ligantes de cálcio neuronal, da qual faz parte a proteína VILIP-1, associada especificamente com o fenômeno da plasticidade sináptica no cérebro. O objetivo deste projeto foi determinar a expressão das proteínas CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos de hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal comparando com a expressão de tecidos de indivíduos normais. Os três genes encontraram-se subexpressos nos tecidos de pacientes com ELT, sendo que os tecidos dos pacientes, em grau crônico da doença, justificam tais graus de expressão. Sugere-se uma possível interação entre CASR e mGluR1 e inferimos que esses dois receptores podem estar envolvidas na gênese da ELT; Além disso, é altamente provável que ambos os receptores possam também responder ao íon cálcio. Inferimos também ser provável que VILIP-1 e mGluR1 estejam envolvidas no desencadeamento de excitabilidade excessiva neuronal em hipocampo, um dos fatores constatados em pacientes com ELT. O papel do íon cálcio no cérebro é de extrema relevância e concluímos que CASR e mGluR1, por meio de resposta a esse íon, podem estar envolvidos de forma relevante na gênese da epilepsia do lobo temporal.

2- INTRODUÇÃO

2.1 - Epilepsia e esclerose medial temporal

Epilepsia é o termo utilizado para definir um conjunto de condições patológicas geralmente crônicas, abrangendo uma gama de doenças que têm em comum a manifestação de crises epiléticas. Estas, por sua vez, são causadas por descarga anormal excessiva e transitória de células nervosas (GUERREIRO, 1996). Diversos sintomas podem se manifestar em decorrência dessas crises, dependendo da área cerebral afetada. Geralmente, a principal forma de epilepsia manifestada é a epilepsia do lobo temporal (ELT). A lesão mais usualmente encontrada em pacientes com ELT é a esclerose hipocampal. Esta, por sua vez, é também designada esclerose medial temporal (EMT), uma vez que as alterações neuropatológicas não necessariamente se restringem ao hipocampo (GUERREIRO, 1996).

2.2 - Fatores associados à esclerose medial temporal

As lesões epileptogênicas cerebrais (como a atrofia medial) resultam em alterações bioquímicas ou elétricas causadas por uma predisposição genética ou por lesões adquiridas (GUERREIRO, 1996; ANDRADE-VALENÇA et al, 2006). São observadas mais comumente a perda neuronal, gliose e atrofia da região do hipocampo (GUERREIRO, 1996). Em indivíduos suscetíveis geneticamente, lesões precoces podem levar a um aumento na excitabilidade das células granulares, desinibindo certos neurônios e, conseqüentemente, alterando os padrões de descargas elétricas, tornando estes neurônios “epiléticos”. Alguns mecanismos podem potencializar esse efeito de excitação aumentada, como a ativação dos receptores glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), o qual despolariza neurônios e promove influxo anormal de cálcio. A perda neuronal tem como principal base esta ativação anômala de receptores NMDA e o influxo aberrante de cálcio (JACK et al, 1990; MEENCKE & VEITH, 1991). Além dos receptores ionotrópicos, os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) também atuam em diversos processos cerebrais relacionados a respostas excitatórias anormais de neurônios, e podem desempenhar um importante papel na epilepsia, neurotoxicidade e doenças neurodegenerativas (KNÖPLFEL et al, 1995; SACAN & SCHOEPP, 1992; MCDONALD et al, 1993). Foi observada expressão aumentada de mGluR

do tipo 1 em tecidos hipocampais de pacientes com epilepsia do lobo temporal (WERNER et al, 2007; PITSCHE et al, 2007). Além disso, foi demonstrado que através da estimulação de mGluRs do grupo I (mGluRs 1 e 5) por agonistas específicos, obtém-se descargas sincronizadas na região do hipocampo incluindo descargas sincronizadas curtas, de até 1 segundo, seguidas de descargas prolongadas, de mais de 2 segundos (MERLIN & WONG, 1997; CHUANG et al, 2001; SAYIN & RUTECKI, 2003). Estas respostas excitatórias não-comuns assemelham-se muito com o quadro anormal de excitabilidade neuronal observado na epilepsia (SAYIN & RUTECKI, 2003; TAYLOR et al, 1995; WONG et al, 1999).

2.3 - Homeostase do cálcio

O íon cálcio é essencial ao funcionamento de uma ampla gama de processos biológicos dos organismos, que abrange desde os processos de ordem extracelular e os relacionados ao seu trânsito no sangue, quanto intercelular e intracelular (BROWN et al, 1995), sendo um importante mensageiro secundário intracelular participando de inúmeras vias metabólicas, transmitindo informações a partir da superfície da membrana plasmática até alvos citosólicos específicos. Com justiça, esse íon participa de toda a história de vida das células em geral, uma vez que ele é indispensável a processos fundamentais ao longo do desenvolvimento, como por exemplo, em células ovo, nas quais um aumento repentino na concentração citosólica de Ca^{2+} , que segue a fertilização, provoca uma onda de Ca^{2+} responsável pelo início do desenvolvimento embrionário (BERRIDGE et al, 1999). Também nas células musculares o cálcio é de suma importância, dando início à contração muscular. A concentração de Ca^{2+} difere com relação aos meios extra e intracelular, sendo mantida neste em concentrações baixas e sujeitas a amplas variações, enquanto que no meio extracelular os níveis são altos e praticamente constantes. As células devem ser, portanto, sensíveis a pequenas, porém fisiologicamente importantes, mudanças na concentração de cálcio extracelular (BROWN et al, 1995).

Alterações efetivas na concentração citosólica de Ca^{2+} ocorrem através do controle da abertura e fechamento dos canais de cálcio existentes na membrana plasmática, e também através dos canais iônicos de Ca^{2+} na membrana do retículo endoplasmático, um importante reservatório intracelular deste íon, e que, diferentemente do citosol, possui altos níveis de cálcio. O controle destes canais é realizado por meio de rebuscados mecanismos que

envolvem a ação de moléculas mensageiras intracelulares, como o próprio íon cálcio, o inositol 1,4,5-trisfosfato, entre outras.

2.4 - Papel do cálcio extracelular

Em muitas células secretoras o cálcio extracelular atua influenciando a secreção hormonal, como nas células da paratireóide – efeito inibitório –, tireóide e células nervosas – efeito estimulatório (BROWN, 1991). Ademais, está envolvido em processos diversos como proliferação celular, aprendizado e memória (BRAUNEWELL & GUNDELFINGER, 1999). Tem ainda efeito substancial sobre os rins, uma vez que alterações na concentração de Ca^{2+} extracelular afetam a taxa de filtração glomerular e ainda governam a atividade do hormônio antidiurético (GUERREIRO, 1996). O íon cálcio é capaz de desempenhar a função de mensageiro extracelular primário devido à existência de receptor específico para este íon ancorado à membrana plasmática, o Receptor Sensor de Cálcio extracelular (CASR). Estes tipos celulares são capazes de detectar pequenas alterações na concentração de Ca^{2+} extracelular, caracterizando um eficiente sistema homeostático iônico, que por sua vez utiliza a produção hormonal e de outras substâncias para regular a concentração de cálcio extracelular (BROWN et al, 1995).

2.5- Receptor sensor de cálcio

A interação do Ca^{2+} extracelular com o CASR promove a ativação deste receptor, com mudanças conformacionais e desencadeia de uma gama de processos intracelulares com a ativação da proteína G_q , que por sua vez ativa a fosfolipase C (PLC). Esta fosfolipase degrada o inositol 4,5-bisfosfato em inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerol. O IP3 é uma pequena molécula que deixa a membrana celular, difunde-se no citossol e alcança a membrana do retículo endoplasmático, onde se liga aos canais de cálcio dependentes de IP3, abrindo-os. Conseqüentemente, os íons Ca^{2+} presentes no interior do retículo são liberados para o citossol (ALBERTS et al ,2002). O aumento do cálcio intracelular promove abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática por curtos períodos de tempo, o que resulta em pulsos do íon para o citosol (BRAUNEWELL & GUNDELFINGER, 1999). O diacilglicerol, por sua vez, permanece na membrana celular e participa, juntamente com íon cálcio e

fosfatidilserina, da ativação da proteína-quinase C (PKC). Esta proteína, uma vez ativada, fosforila proteínas-alvo que podem variar dependendo do tipo celular (ALBERTS et al, 2002).

O CASR é um membro da família de receptores acoplados a proteína-G (GPCR) (BROWN et al, 1993). Todos os membros desta família compartilham homologia entre uma região específica dessas proteínas: sete domínios transmembrana, que sofrem alterações conformacionais seguidas à ativação da proteína devido à adesão do agonista, modificando a disposição das alças intracelulares, dessa maneira, promovendo a ativação da proteína-G específica (BROWN et al, 1993). O CASR é expresso mais abundantemente na paratireóide e rins de mamíferos, mas também em menores níveis em outros tecidos, como a tireóide, intestino, pulmão, e várias regiões do cérebro, no qual o receptor sensor de cálcio está presente em diversas regiões, incluindo o hipocampo, hipotálamo e cerebelo (BROWN & VASSILEV & HEBERT, 1995).

Sua presença no cérebro pressupõe outra função desse receptor além da homeostase de cálcio envolvida no controle do metabolismo iônico, exercida por outros tecidos. O CASR neuronal reconhece e responde às mudanças locais no Ca^{2+} extracelular, resultantes dos níveis variados de atividade neuronal e sináptica (RUAT et al, 1995).

2.6- Receptores metabotrópicos do glutamato

O CASR exibe homologia significativa com alguns membros da família de receptores acoplados a proteína-G, os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). A homologia do CASR com os mGluRs transparece principalmente em relação aos domínios extracelular e transmembrana, o que reflete na similaridade de ligação dos agonistas aos receptores específicos. Os mGluRs são proteínas residentes principalmente dentro do sistema nervoso central (SNC), e respondem ao glutamato como seu ligante principal (NAKANISHI, 1992). O glutamato é o neurotransmissor da maioria das sinapses excitatórias rápidas no SNC de mamíferos, e desempenha um importante papel numa ampla variedade de funções deste sistema (HOLLMAN & HEINEMANN, 1994; CONN & PIN, 1997). O glutamato se liga ao domínio extracelular dos mGluRs de maneira semelhante à que os íons cálcio o fazem em relação ao receptor sensor de cálcio, o que denota a similaridade topológica entre os dois tipos de receptores (O'HARA et al, 1993; CONKLIN & BOURNE, 1994). Muitas evidências revelam que os mGluRs modulam a transmissão sináptica excitatória por meio de diversas rotas de transmissão neural, como a regulação da liberação de neurotransmissores, influências

na atividade de canais iônicos e modulação da plasticidade sináptica (OKAMOTO et al, 1998). Existem pelo menos oito mGluRs, que são divididos em três grupos de acordo com similaridades na seqüência e sinal de transdução. Por exemplo, o grupo I inclui os mGluRs 1 e 5, que, diferentemente das outras variedades conhecidas desse receptor, acoplam ao metabolismo do fosfolípido de inositol, com a estimulação da fosfolipase C (PLC) e hidrólise do fosfoinositol (IP) (OKAMOTO et al, 1998), o que por sua vez regula os níveis de cálcio intracelular.

2.7- Famílias de proteínas ligantes de cálcio neuronal

Outra família específica de proteínas ligantes de cálcio desempenha importantes papéis no sistema nervoso central: a família de proteínas ligantes de cálcio com motivos “*EF Hand*”, expressas exclusivamente no sistema nervoso (BRAUNEWELL & GUNDELFINGER, 1999; SPILKER et al, 2002; LENZ, 1996), e pertencentes à família de proteínas ligantes de cálcio neuronal. Estas proteínas se ligam ao cálcio e estão associadas à importante função da plasticidade sináptica desempenhada por este íon no cérebro, que se refere aos fenômenos de aprendizado e formação da memória (BRAUNEWELL & GUNDELFINGER, 1999; BURGOYNE & WEISS, 2001). Estudos identificaram que uma dessas proteínas, S100B, quando superexpressa em hipocampo de ratos, está ligada à disfunção dessa região cerebral e conseqüentemente à epilepsia (SCHÄFER & HEIZMANN, 1996). Foi identificado alto padrão de expressão em hipocampo (regiões CA1, CA2, e Giro Dentado) de outra proteína da família de proteínas ligantes de cálcio neuronal, VILIP-1, incluída no grupo das proteínas do tipo visinina (BRAUNEWELL et al., 2003). Foi também demonstrado que a expressão destas proteínas é regulada pela ativação, por ação de agonistas, de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), principalmente o tipo I (mGluR1) (BRAUNEWELL et al, 2003). Especificamente VILIP-1 tem sido evidenciada por ter especial função na Potenciação de Longa Duração (PLD) (BRAUNEWELL et al., 2003; MANAHAN-VAUGHAN & BRAUNEWELL, 1999), um dos fenômenos envolvidos na plasticidade sináptica. A PLD é um processo no qual as sinapses têm sua intensidade aumentada em grande escala, melhorando a transmissão entre os neurônios. Ademais, ainda não foi investigado o papel de VILIP-1 em EMT.

2.8- Papel do íon cálcio em hipocampo

Os íons cálcio são necessários para a ativação das sinapses excitatórias, nas quais são liberados sobre as fendas sinápticas, gradualmente culminando em aumento nos níveis de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, dessa maneira diminuindo a concentração de cálcio extracelular na fenda sináptica. Estas mudanças das concentrações de Ca^{2+} extracelular podem modular a atividade dos receptores de cálcio, alterando a eficácia das sinapses. Esse efeito é análogo ao realizado pelos mGluRs, que, sob a ação moduladora do glutamato, podem inibir a liberação de neurotransmissores (GEREAU & CONN, 1995). Além disso, a presença de receptores sensores de cálcio em várias regiões do cérebro sugere que eles podem ter participação em diversos processos neuronais ainda desconhecidos (BROWN & VASSILEV & HEBERT, 1995) e mesmo em processos já conhecidos, porém não totalmente elucidados. Ademais, foi demonstrado que se obtém diminuição do Ca^{2+} extracelular em neurônios do hipocampo através da ativação de canais receptores de glutamato permeáveis ao cálcio nas regiões sinápticas (STABEL et al., 1990) devido ao influxo de cálcio através desses canais na membrana plasmática dessas células (BROWN & VASSILEV & HEBERT, 1995).

3- OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo determinar os graus de expressão das proteínas VILIP-1, CASR e mGluR1 em tecidos de hipocampo de pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal e em tecidos de indivíduos normais. Por meio da quantificação de expressão destes receptores através de PCR quantitativo em tempo real, compararam-se os graus de expressão entre os tecidos afetados com controles normais.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Pacientes

Foram analisados tecidos de pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal submetidos a tratamento cirúrgico com hipocampectomia, após consentimento do paciente ou responsável. Parte do tecido de hipocampo cerebral retirado durante cirurgia foi congelado em nitrogênio líquido e mantido congelado a -80°C até o seu uso. Para controle, foram utilizadas amostras de hipocampo de autópsias de indivíduos sem história de doença de sistema nervoso central realizadas pelo Instituto Médico Legal (IML) de Campinas. Os tecidos controle foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C . Este projeto foi aprovado pelo CEP da FCM (CEP# 470/2003).

4.2- Extração de RNA

Para extração de RNA, parte do tecido foi macerado em almofariz e misturado com *TriZol* (*Invitrogen*®), seguindo protocolo.

4.3- RT-PCR

Três microgramas de RNA total foram utilizados para reação de transcriptase reversa (RT-PCR) para formação de cDNA utilizando a enzima *Superscript III* (*Invitrogen*®).

4.4- PCR quantitativo em tempo real

Para quantificação de expressão gênica foi utilizado o método de PCR quantitativo em tempo real, usando o sistema Taqman®. Uma sonda fluorogênica foi utilizada; esta se liga especificamente à região compreendida entre os dois primers. Foi utilizado um termociclador

com sistema de monitoramento para emissão de fluorescência, dois primers específicos para cada gene que se desejava amplificar, abrangendo regiões de aproximadamente 70 a 100 pares de bases, um fluoróforo (“*reporter*”), e um inibidor de reação (“*quencher*”), que atua impedindo a emissão do fluoróforo até o estágio de anelamento, no qual este se afasta do inibidor o suficiente para emitir fluorescência. O gene endógeno utilizado para as normalizações dos primers (validações) foi GAPDH, o qual, por ser expresso constitutivamente em praticamente todas as células humanas, é um gene indicado para a padronização dos ensaios de quantificação relativa de expressão gênica.

5- FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para efeito de análise dos resultados, foram comparados os graus de expressão dos genes de CASR, mGluR1 e VILIP-1 entre tecidos normais e tecidos do hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal. Cada amostra foi amplificada em triplicatas e o grau de expressão foi avaliado de acordo com o método especificado.

6- ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa sob o parecer do CEP n.º 470/2003, e não envolve aspectos de biossegurança.

7- RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Tendo em vista a homologia existente entre o CASR e o mGluR1, a presença de ambos na região hipocampal de mamíferos, e a comprovada ação do mGluR1 em síndromes associadas a mudanças na excitabilidade de neurônios, visamos identificar o grau de expressão do receptor sensor de cálcio na síndrome da esclerose medial temporal e inferir possíveis interações entre CASR e mGluR1, bem como deste com o receptor VILIP-1.

8 - RESULTADOS

8.1 – Validação

Os primeiro ensaios de PCR em tempo real foram destinados à validação dos primers dos genes de interesse. A validação de CASR foi feita separadamente dos outros dois genes. GAPDH é utilizado como controle endógeno para padronização. A Figura 1 mostra o ensaio em que foi validado esse primer.

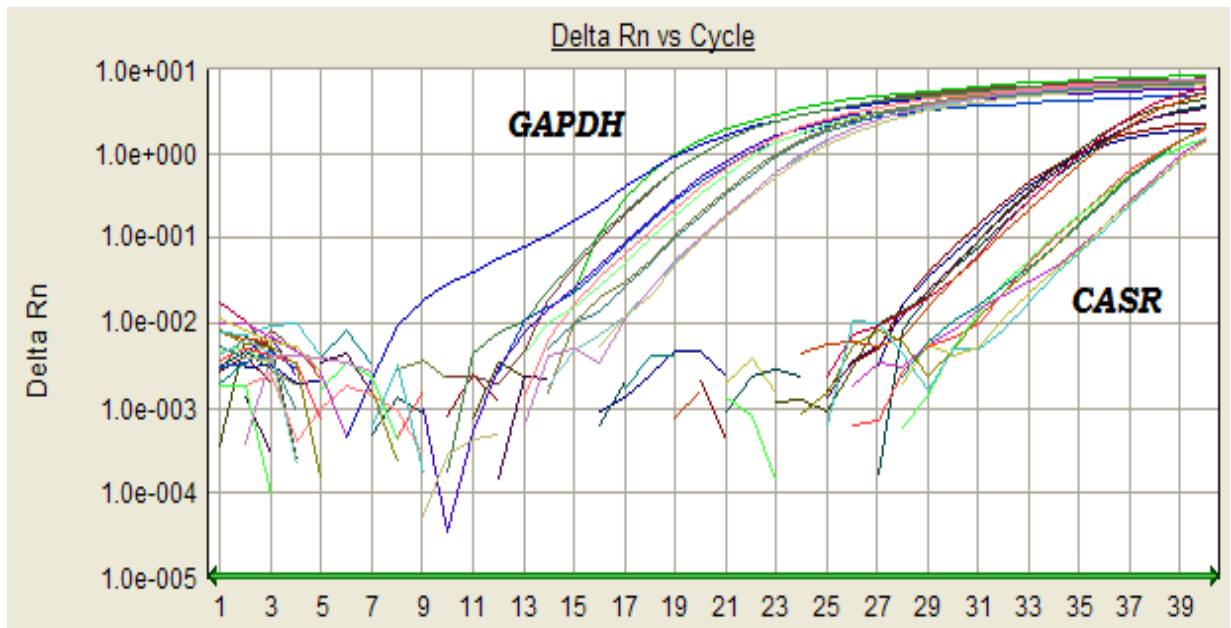


Figura 1: Validação de CASR com GAPDH. Eixo X: ciclos de amplificação. Eixo Y: valores de expressão gênica.

A curva padrão (Fig.2) pode então ser determinada a partir dos dados da validação.

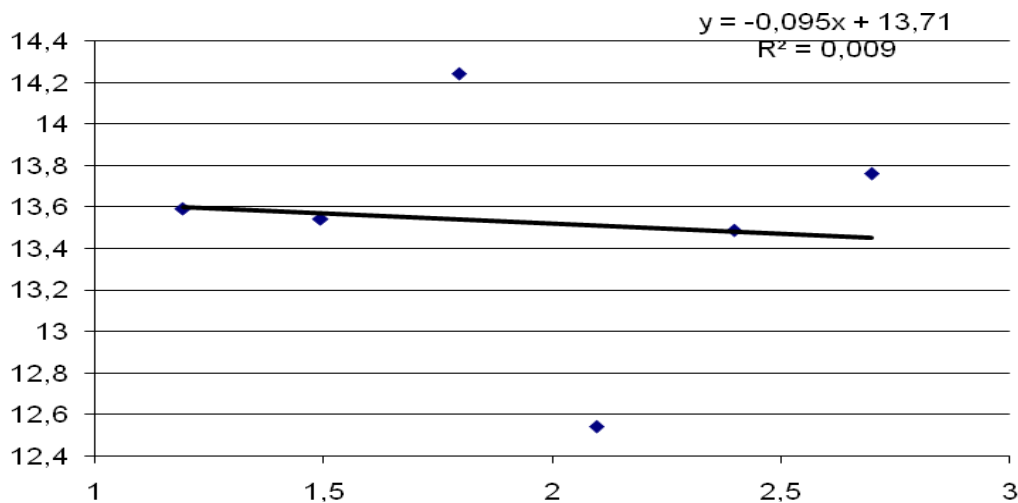


Figura 2: Curva padrão do CASR O eixo X representa a média de Ct de CASR menos a média de Ct de GAPDH. O eixo Y representa o log das concentrações utilizadas de cDNA, que variaram de 500ng/uL a 7,81ng/uL.

Os primers para genes do receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) e VILIP-1 foram validados utilizando-se tecidos de córtex cerebral. As figuras 3 a 5 mostram as validações, nas quais foram aplicadas concentrações de cDNA que variaram de 250ng/uL a 0.00025ng/uL. O ensaio foi realizado simultaneamente para os genes em estudo; entretanto, as figuras foram separadas para melhor visualização, por questões de sobreposição de curvas. GAPDH é utilizado como controle endógeno para padronização.

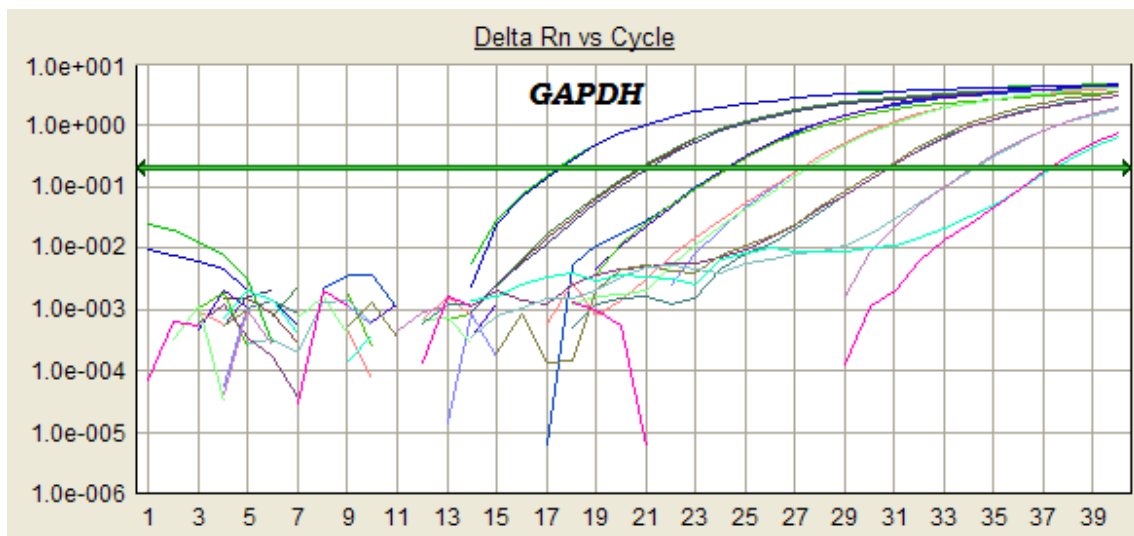


Figura 3: Expressão de GAPDH no ensaio de validação em córtex humano. Eixo X: ciclos de amplificação. Eixo Y: valores de expressão gênica.

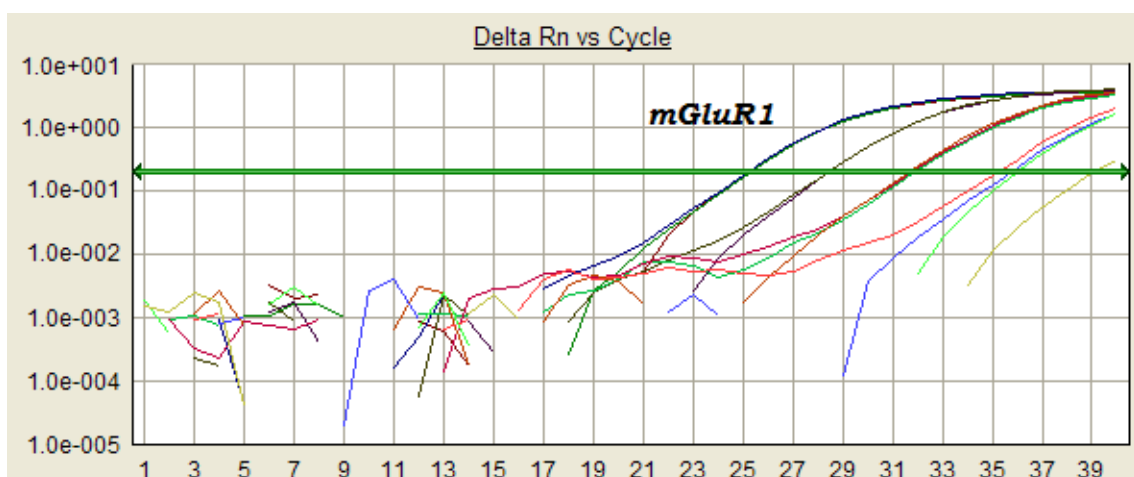


Figura 4: Validação de mGluR1 em córtex humano. Eixo X: ciclos de amplificação. Eixo Y: valores de expressão gênica.

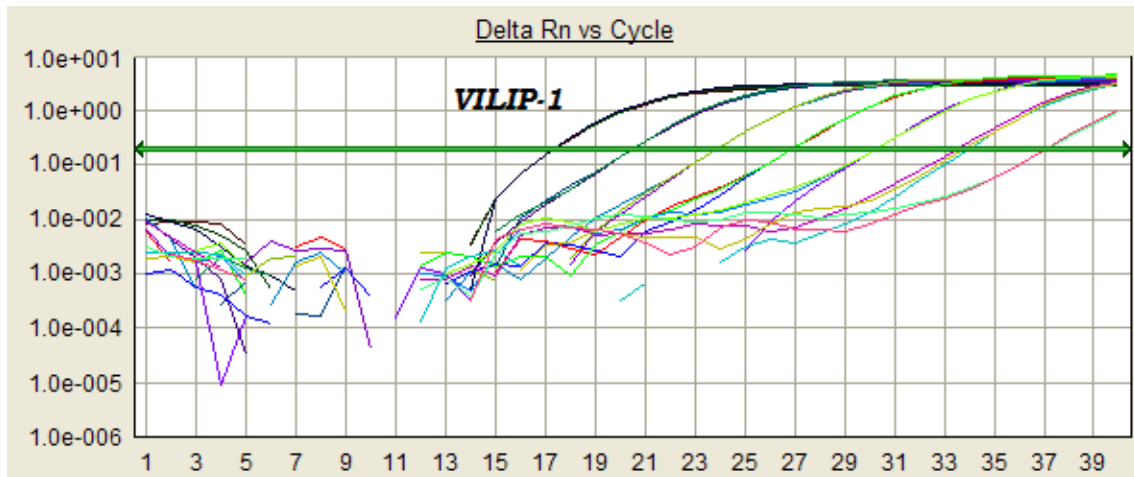


Figura 5: Validação de VILIP-1 em córtex humano. Eixo X: ciclos de amplificação. Eixo Y: valores de expressão gênica.

8.2 - Quantificações de expressão gênica

Após a validação dos primers passou-se para os ensaios efetivos de quantificação de expressão gênica dos genes de interesse, através da PCR em tempo real.

Os primeiros experimentos evidenciaram que os tecidos controle apresentaram em geral um grau mais elevado de expressão para todos os genes considerados (figura 7).

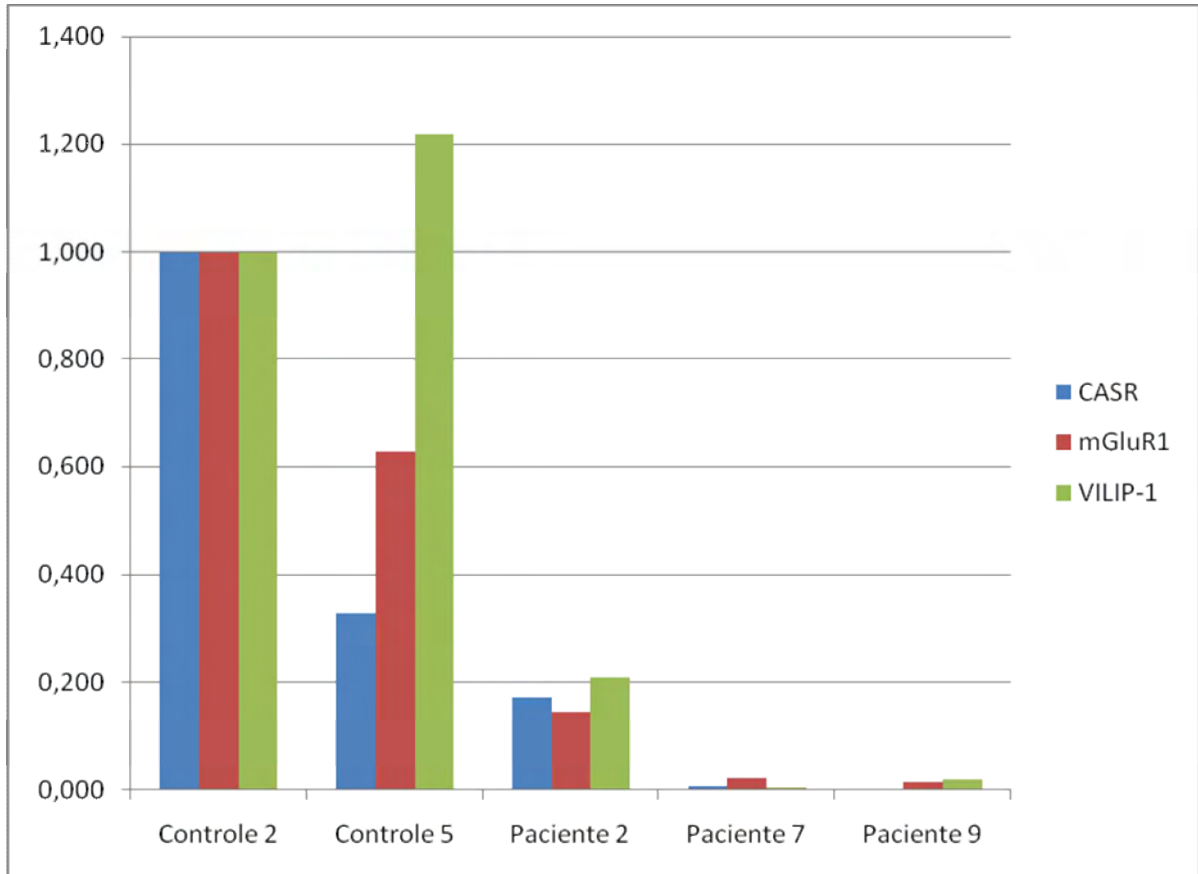


Figura 7: Gráfico da expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 2 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores de RQ são 1,00. Foram realizadas triplicatas para cada uma das amostras e para os três genes, sendo que os resultados aqui apresentados já correspondem às médias dos valores obtidos para cada amostra analisada.

Os próximos ensaios realizados evidenciaram resultados que, apesar de diferirem ligeiramente do padrão observado nos resultados acima, ainda assim demonstraram que, exceto para o paciente 7, os graus de expressão gênica dos três genes de interesse nos tecidos controle foram superiores à expressão dos tecidos de pacientes (Fig. 8).

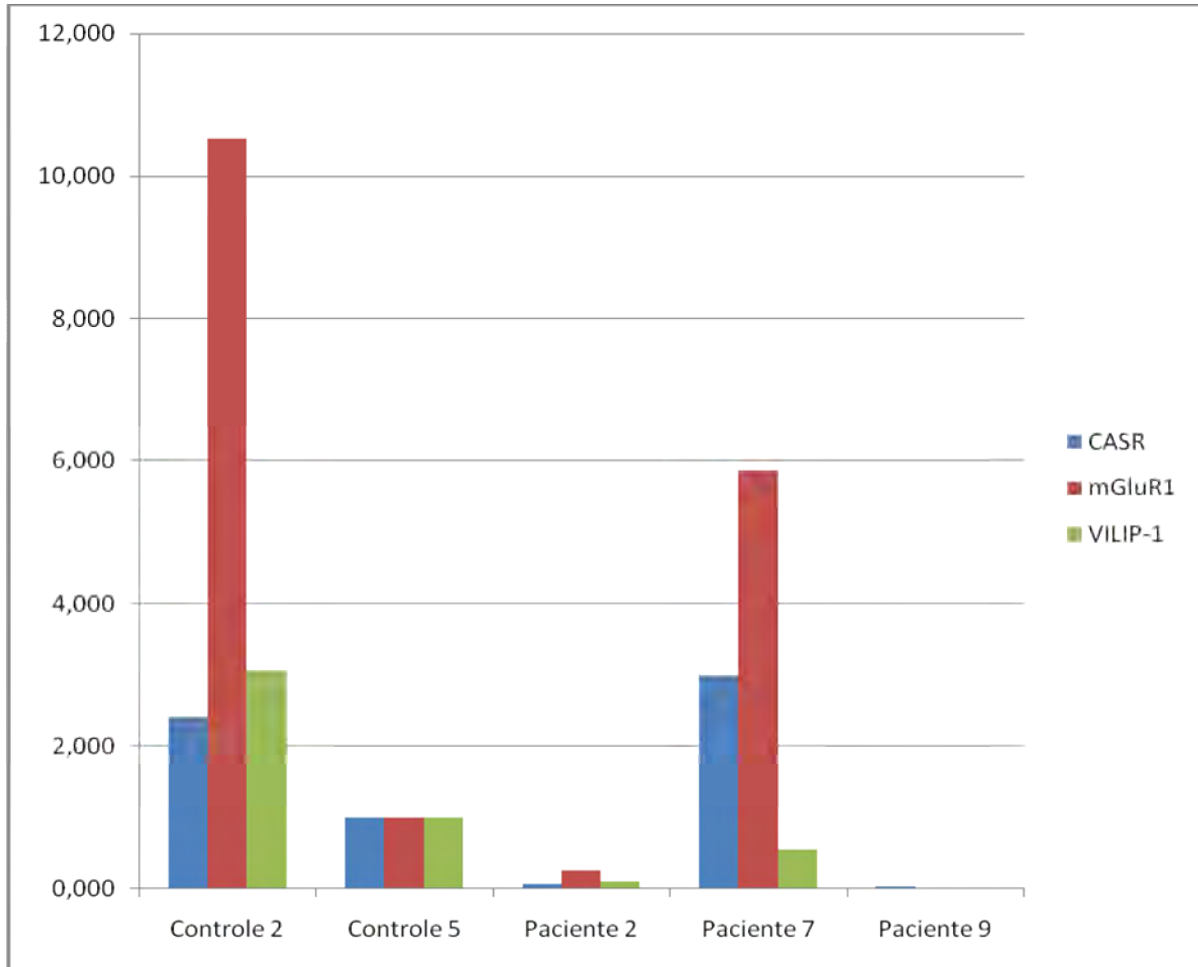


Figura 8: Gráfico da expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 5 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores são 1,00. Foram realizadas triplicatas para cada uma das amostras e para os três genes, sendo que os resultados aqui apresentados já correspondem às médias dos valores obtidos para cada amostra analisada.

Desta vez o tecido controle 5 foi tomado como base para comparação, e portanto seus valores de quantificação relativa são 1,00.

Considerando-se o paciente 7 nota-se que a expressão do CASR esteve ligeiramente superior ao controle 2, e bem acima da expressão desse mesmo gene no controle 5. Já considerando o mGluR1, sua expressão esteve notadamente superior à do controle 5, no entanto bem abaixo da expressão do controle 2, que superou o valor de 10,00 em quantificação relativa.

Quanto aos outros tecidos de pacientes, todos apresentaram dados de expressão gênica menores do que os correspondentes nos tecidos controle, para os três genes de interesse. O paciente 9 apresentou dados de expressão bastante baixos, atingindo os valores de

quantificação relativa de 0,034; 0,025 e 0,002 para CASR, mGluR1 e VILIP, respectivamente, e por isso não pode ser visualizado na Fig.8.

Nos próximos experimentos foi tomado como base de comparação outro tecido controle, o Controle 1. Os resultados mostraram os mesmos padrões de expressão, com exceção do paciente 2, o qual apresentou expressão mais de duas vezes e meia maior para VILIP, e o controle 2, que apresentou expressão maior para mGluR1 e VILIP (Figura 9).

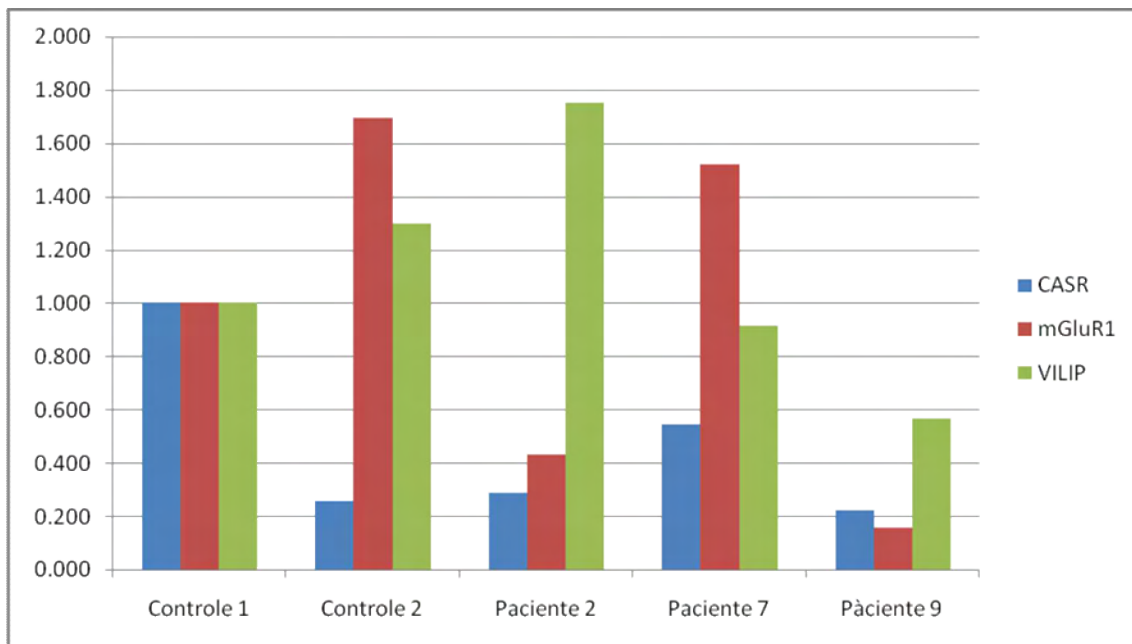


Figura 9: Gráfico da expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 1 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores são 1,00. Foram realizadas triplicatas para cada uma das amostras e para os três genes, sendo que os resultados aqui apresentados já correspondem às médias dos valores obtidos para cada amostra analisada.

Nos ensaios seguintes foram utilizados mais um tecido controle (4) e mais um de paciente (13). Os resultados foram ao encontro do padrão anterior de expressão para os três genes, e, além disso, os pacientes 9 e 13 apresentaram graus de expressão muito baixos para os três genes (Figura 10).

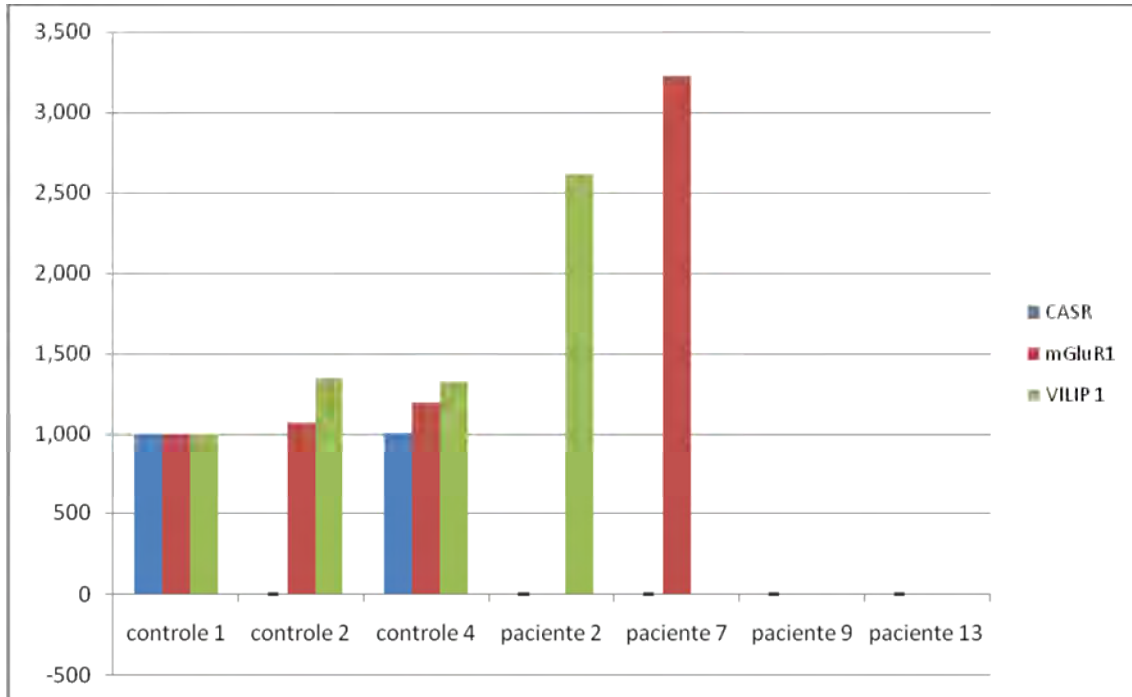


Figura 10: Gráfico da expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 1 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores são 1,00. Foram realizadas triplicatas para cada uma das amostras e para os três genes, sendo que os resultados aqui apresentados já correspondem às médias dos valores obtidos para cada amostra analisada.

Os próximos dados de expressão incluíram mais pacientes (1, 6, 16 e 17). Os obtidos evidenciaram basicamente os mesmos padrões anteriores: os tecidos de pacientes apresentaram graus de expressão menores do que os dos controles para os três genes - com exceção do paciente 2, para VILIP, e paciente 7, para mGluR1 (Figura 11).

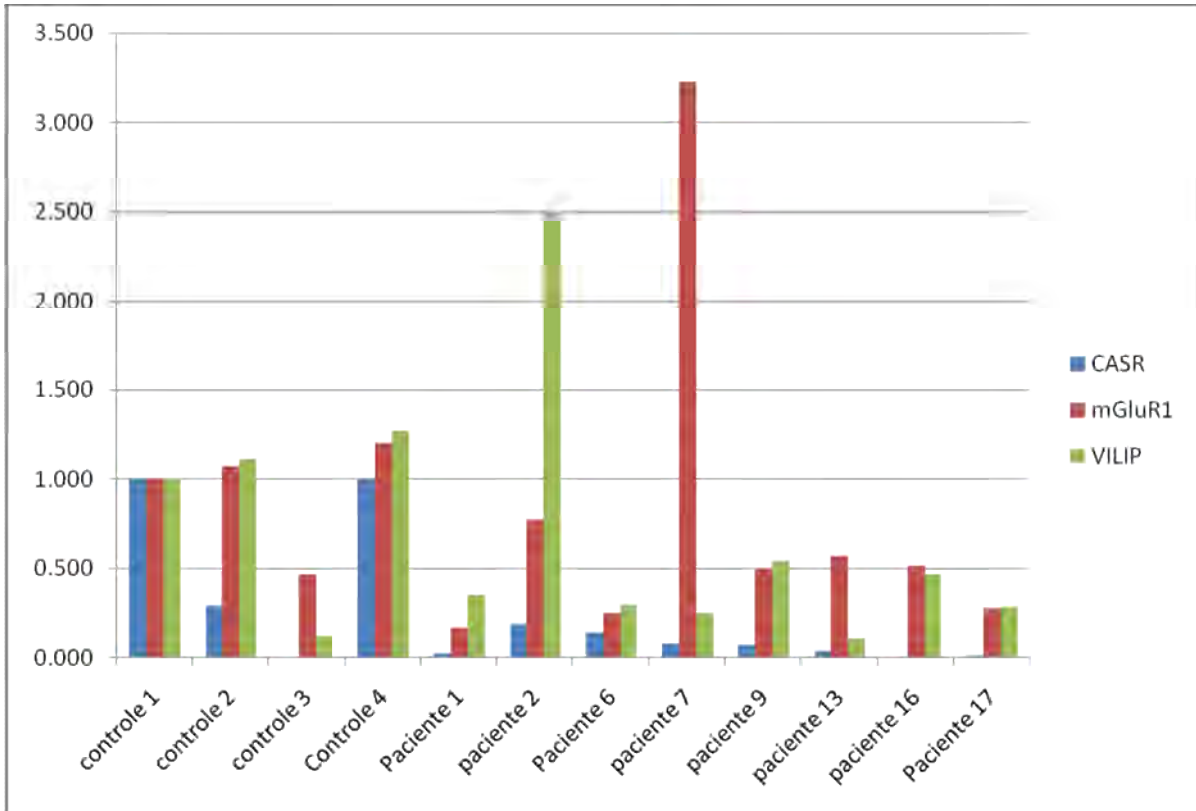


Figura 11: Gráfico da expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 1 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores são 1,00. Foram realizadas triplicatas para cada uma das amostras e para os três genes, sendo que os resultados aqui apresentados já correspondem às médias dos valores obtidos para cada amostra analisada.

Ademais, apresenta-se abaixo o gráfico contendo a média do conjunto de dados obtidos durante toda a realização do presente estudo (Figura 12).

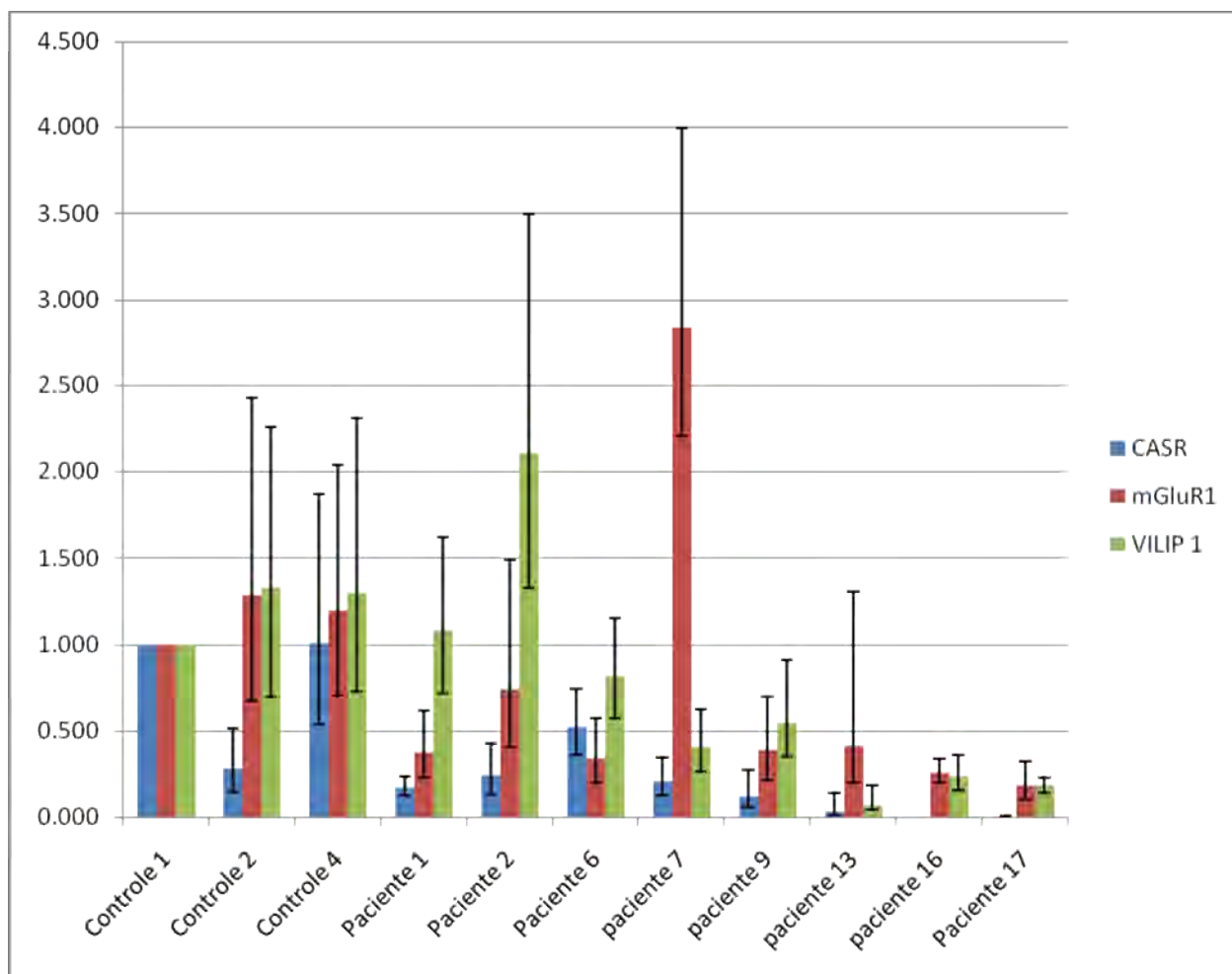


Figura 12: Gráfico da média de todos os valores de quantificação relativa de expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1 em tecidos controles e de pacientes. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: tecidos utilizados para os experimentos. Controle 1 foi tomado como referência de comparação, portanto seus valores são 1,00.

Por fim, as médias de todos os valores de quantificação relativa de expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1, para todos os pacientes e controles, estão apresentadas na figura 13.

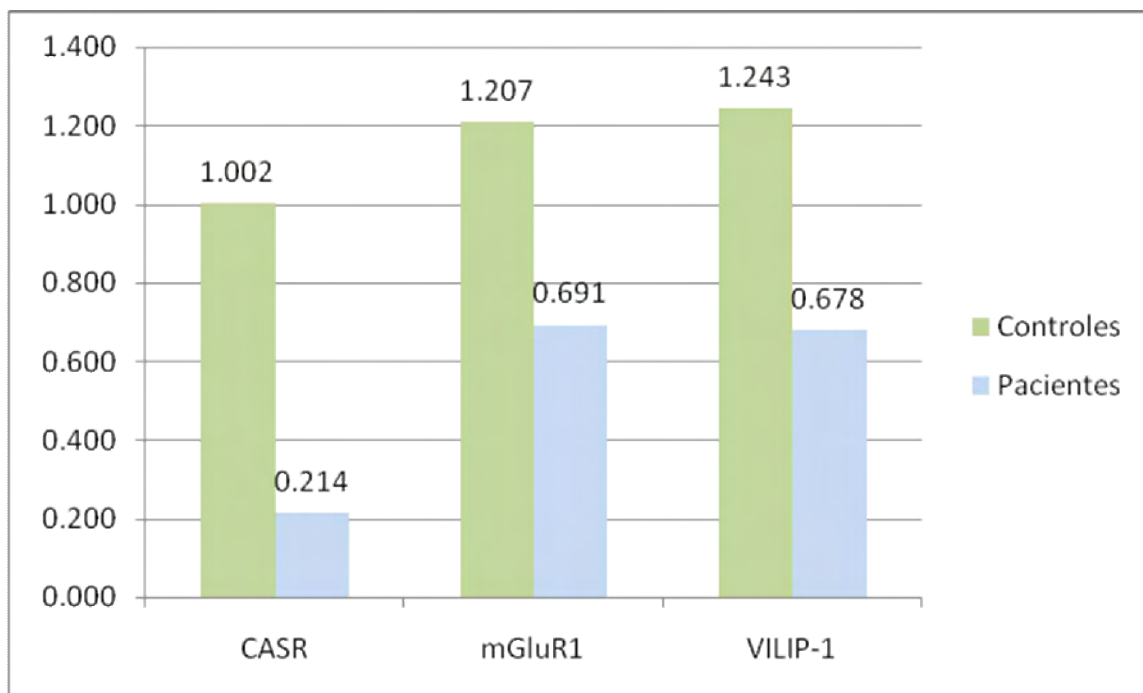


Figura 13: Médias de todos os valores de quantificação relativa de expressão gênica de CASR, mGluR1 e VILIP-1, congregando o grupo dos pacientes e o dos controles para cada um dos genes em estudo. Eixo Y: valores de quantificação relativa. Eixo X: genes em estudo.

9 - DISCUSSÃO

Expressão gênica de mGluR1

Os dados de expressão gênica obtidos neste estudo evidenciam expressão de mGluR1 reduzida nos tecidos de pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal quando comparados com tecidos de controles normais.

Evidências apontam para a participação de mGluR1 em síndromes neurológicas como a epilepsia. Cartmell & Schoepp (2000) mostraram que moléculas agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 aumentam a liberação de glutamato em culturas de hipocampo *in vitro*, potencializando, dessa forma, o efeito de hiperexcitabilidade dos neurônios, observado em crises de epilepsia do lobo temporal. Rutecki e Yang (1997), trabalhando com ratos, também constataram que à aplicação de agonistas de mGluRs do tipo 1 seguiram-se rapidamente descargas epiléticas. Analogamente, experimentos comprovaram que antagonistas de mGluR1 exercem atividade anticonvulsiva (THOMSEN et al., 1994). Alguns estudos de expressão gênica evidenciam um grau mais elevado de expressão gênica de mGluR1 em displasias corticais focais associadas com epilepsia (Aronica et al., 2003). Também foram observados graus de expressão de mGluR1 elevados em tecidos hipocâmpais com esclerose do corno de Amon (BLÜMCKE et al., 2000).

Todos esses estudos corroboram a hipótese de que mGluR1 está envolvido diretamente com casos clínicos de epilepsia do lobo temporal. Esses achados, contudo, não contradizem os dados obtidos no presente estudo, os quais, por sua vez, vêm complementar a literatura sobre essa classe de receptor metabotrópico de glutamato. Isto é, malgrado o padrão reduzido de expressão gênica de mGluR1 obtido neste trabalho, esses dados vão de encontro com a literatura a respeito.

A interpretação dos dados obtidos está diretamente ligada à fase da síndrome da epilepsia do lobo temporal em que se encontram os pacientes analisados. A fase aguda, na qual as crises epiléticas são mais frequentes e intensas, é a fase analisada em muitos estudos que usam animais de experimentação; em muitos deles utiliza-se o modelo da Pilocarpina, no qual ocorre indução do status epilético em animais de estudo por meio de administração de pilocarpina, o que acarreta a síndrome de excitabilidade aumentada de populações de neurônios. A fase crônica, por outro lado, caracteriza-se por crises menos frequentes e graus de excitabilidade variados nos períodos em que não se observam as crises, com relação à fase aguda, que se caracteriza pela presença de esclerose e gliose com diminuição importante do

número de neurônios. Outros estudos se valeram da técnica do PCR quantitativo em tempo real para quantificação relativa de expressão gênica de mGluR1 em tecidos com epilepsia em fase crônica. Chen et al. (2005) analisaram os graus de expressão gênica de três classes de receptores metabotrópicos de glutamato, incluindo mGluR1, em tecidos experimentais de ratos em fase crônica de epilepsia do lobo temporal. Foi observado que o gene de mGluR1 encontra-se com expressão reduzida em duas das três regiões analisadas do lobo temporal, resultados esses os quais corroboram os dados de expressão do presente trabalho.

Ademais, outros estudos abordaram análise simultânea de expressão gênica de mGluRs especificamente em cada fase da síndrome de epilepsia hipocampal (AKBAR et al., 1996). Esses autores, aplicando a técnica de “*kindling*” para promoção do status epiléptico, analisaram separadamente tecidos de ratos sacrificados 24 horas, 7 dias, ou 28 dias após a última estimulação elétrica para indução do estado de epilepsia. Foi constatado expressão aumentada de mGluR1 nos animais analisados 24 horas após a indução da atividade epileptiforme. Não obstante, nos tecidos analisados 7 dias após essa indução, a expressão desse gene se mostrou pouco alterada ou já igual aos níveis dos controles; por fim, os graus de expressão haviam voltado aos níveis basais nos animais analisados 28 dias após a indução epiléptica. Os intervalos de 7 e 28 dias representariam, analogamente, as fases crônicas da epilepsia do lobo temporal.

Por esses estudos, nota-se uma correlação com o presente trabalho, cujos dados reafirmam a hipótese de regulação descendente –“*downregulation*” – de mGluR1 na fase crônica da epilepsia, isto é, graus de expressão gênica reduzidos nessa fase da síndrome.

Expressão gênica de CASR

O receptor sensor de cálcio guarda homologia significativa com os receptores metabotrópicos de glutamato. Os dados obtidos no presente estudo permitem denotar um grau de similaridade específico de mGluR1 com CASR, o que pode indicar o envolvimento de ambos na gênese da epilepsia do lobo temporal.

Durante a transmissão sináptica, cálcio e glutamato podem atuar conjuntamente. No início da transmissão sináptica, a concentração de cálcio dentro das vesículas sinápticas pode ser alta, sendo essa alta concentração liberada juntamente com o glutamato para a ativação das sinapses excitatórias; o cálcio atua, portanto, como neurotransmissor ou neuromodulador.

Além disso, após a liberação dos íons cálcio no interior da sinapse, a presença do glutamato faz com que os Ca^{2+} sejam captados pelo neurônio pós-sináptico (GEREAU & CONN, 1995).

Ademais, estudos com outros tipos de mGluRs – tipos 2, 3, 4, 6, 7 e 8 (TAKAHASHI et al., 1996), demonstraram ser esses receptores possíveis mediadores de inibição pré-sináptica, sendo que mGluR1 não foi detectado como inibidor. Esse mecanismo de inibição, um provável tratamento das crises de epilepsia, está diretamente ligado aos íons cálcio, e possivelmente com receptores sensores de cálcio. Os referidos mGluRs poderiam atuar por meio da supressão da liberação de cálcio pré-sináptico (KNÖPLFEL, 1995), por meio de inibição da maquinaria exocitótica após a liberação de cálcio ou ainda atuando diretamente em canais de cálcio (TAKAHASHI et al., 1996).

O presente estudo sugere uma interação direta entre CASR e mGluR1. É comprovada relativamente alta a expressão de CASR em hipocampo normal (DUNN et al., 1994; RUAT et al., 1995); malgrado isso, no presente estudo os graus de expressão desse receptor nos tecidos de pacientes com ELT foram reduzidos, bem como o foram os graus de expressão de mGluR1. Os dados concordantes de expressão gênica obtidos para os dois receptores vêm ressaltar a já comprovada semelhança de interação com seus respectivos ligantes e homologia topológica. Os dois receptores podem possuir, portanto, ações comuns, podendo inclusive interagir entre si na potencialização das sinapses excitatórias. Com isso, infere-se que CASR e mGluR1 podem estar envolvidos na gênese da epilepsia do lobo temporal. Ademais, estudos já comprovam o mecanismo do sensor de cálcio extracelular mesmo em células defeituosas em CASR (HINSON, 1997), o que permite inferir ser provável que ambos os receptores possam também responder ao mesmo ligante, o cálcio. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar inequivocamente tal assertiva.

Expressão gênica de VILIP-1

No presente estudo demonstrou-se que os graus de expressão de VILIP-1 foram semelhantes aos de mGluR1. Esses resultados sugerem consonância com a literatura a respeito, na qual consta que os graus de expressão de VILIP-1 em hipocampo, tanto *in vitro* como *in vivo*, são controlados pela ativação de mGluR1 (BRAUNEWELL et al., 2003; BRACKMANN et al., 2004). Outro estudo comprovou a co-expressão de mGluR1 e VILIP-1 em regiões do hipocampo, por meio de sobreposição de marcadores fluorescentes (GIERKE et al., 2008).

Visto que VILIP-1 e mGluR1 estão intimamente relacionados, no que se refere à regulação de um pelo outro, pode-se inferir a relevância dos dados de expressão gênica de VILIP-1 no presente estudo. Foi demonstrado que, tanto mGluR1 quanto VILIP-1 (BRAUNEWELL et al, 2003), estão regulados positivamente – “*upregulated*” – durante a indução da plasticidade sináptica, o que significa que esses dois genes apresentam expressão aumentada devido à ação de outro mecanismo iniciador de cadeia de expressão. Um tipo de Potenciação de Longa Duração, um dos processos envolvidos na plasticidade sináptica, depende da ativação de mGluR1 e consequente elevação de Ca^{2+} pós-sináptico (PEREZ et al., 2001; LAPOINTE et al., 2004). É muito provável, por conseguinte, que a PLD e o complicado mecanismo envolvido no processo de plasticidade sináptica estejam diretamente ligados ao aumento da expressão de VILIP-1.

Tendo em vista os baixos graus de expressão obtidos para mGluR1 no presente estudo, justifica-se os dados de expressão semelhantes observados para VILIP-1. Dessa maneira, como essas duas proteínas estão fortemente correlacionados, é provável que o processo de liberação excessiva de íons cálcio pelo neurônio pré-sináptico, com consequente aumento da excitabilidade neuronal, seja regulado por ambas. Além disso, dada a interação direta entre mGluR1 e CASR, percebe-se a importância do receptor sensor de cálcio na síndrome de epilepsia do lobo temporal.

Ademais, é possível que VILIP-1 esteja envolvido em processos de apoptose relacionados com altas concentrações de cálcio intracelular (SCHNURRA et al., 2001), uma das conseqüências comumente apresentadas por pacientes com ELT.

10 – CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo observamos que os genes de CASR, mGluR1 e VILIP-1 encontraram-se com expressão reduzida nos tecidos de pacientes com ELT. Os tecidos dos pacientes, em grau crônico da doença, justificam os graus de expressão obtidos para os três genes.

Comprovada pela literatura a semelhança de interação de CASR e mGluR1 com seus respectivos ligantes e a homologia topológica entre esses dois receptores, o presente estudo, por sua vez, sugere uma possível interação entre CASR e mGluR1. Estes dois receptores podem possuir ações comuns, podendo até mesmo interagir para a promoção da potencialização das sinapses excitatórias, uma das causas da epilepsia do lobo temporal. Isto posto, inferimos que CASR e mGluR1 podem estar envolvidos na gênese da ELT. Além disso, ainda que se careça de maiores comprovações, é altamente provável que ambos os receptores possam também responder ao mesmo ligante, o íon cálcio.

Confirmamos a relação entre VILIP-1 e mGluR1, no que se refere à regulação de um pelo outro, uma vez que os dados de expressão gênica desses dois genes foram consonantes. Inferimos, pelos dados obtidos e confronto com a literatura, ser provável que VILIP-1 e mGluR1 estejam envolvidos, por meio da potenciação de longa duração, no desencadeamento de excitabilidade excessiva neuronal em hipocampo, um dos fatores constatados em pacientes com ELT.

Ademais, como a PLD é acarretada por aumento excessivo de íons cálcio no neurônio pós-sináptico, infere-se que tanto VILIP-1 como mGluR1 podem regular esse processo. Além disso, a importância do receptor sensor de cálcio na síndrome de epilepsia do lobo temporal é evidente, tendo em vista a possível interação entre CASR e mGluR1.

O papel do íon cálcio no cérebro é de extrema relevância e concluímos que CASR e mGluR1, por meio de resposta direta a esse íon, podem estar envolvidos sobremaneira na gênese da epilepsia do lobo temporal.

11- REFERÊNCIAS

AKBAR, M. T. et al. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. **Molecular Brain Research**, v.43, p.105–116, 1996.

ALBERTS, B. et al. **Comunicação celular**. In. ALBERTS, B. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; LEITE, J. P. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. **J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.**, v.12(1), p.31-36, 2006.

ARONICA, E. et al. Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v.44, p.785–795, 2003.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP P. Calcium signalling. **Curr. Biol.**, v.9(5), p.R157-159, 1999.

BLÜMCKE, I. et al. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. **J. Neuropathol. Exp. Neurol**, v.59, p.1–10, 2000.

BRACKMANN M, et al. mGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene arg3.1/arc in the hippocampus in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.322, p.1073–79, 2004.

BRAUNEWELL, K. H.; BRACKMANN, M.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Group I mGlu receptors regulate the expression of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in vitro and in vivo: implications for mGlu receptor-dependent hippocampal plasticity?. **Neuropharmacology.**, v.44(6), p.707-715, 2003.

BRAUNEWELL, K. H.; GUNDELFINGER, E. D. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. **Cell Tissue Res.**, v.295, p.1–12, 1999.

BROWN, E. M. et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature.**, v.366, p.575-580, 1993.

BROWN, E. M. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell functions, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. **Physiol. Rev.**, v.71, p.371-411, 1991.

BROWN, E. M.; POLLAC, M.; SEIDMAN, C.E.; SEIDMAN, J. G.; CHOU, Y. H.; RICCARDI, D.; HEBERT, S. C. Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. **N. Engl. J. Med.**, v.333(4), p.234-240, 1995.

BROWN, E. M.; VASSILEV, P. M.; HEBERT, S. C. Calcium ions as extracellular messengers. **Cell.**, v.83(5), p.679-682, 1995.

BURGOYNE, R. D.; WEISS, J. L. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. **Biochem. J.**, v.353, p.1–12, 2001.

CARTMELL, J.; SCHOEPP, D.D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. **J. Neurochem.**, v.75, p.889– 907, 2000.

CHEN, J. et al. Expression analysis of metabotropic glutamate receptors I and III in mouse strains with different susceptibility to experimental temporal lobe epilepsy. **Neuroscience Letters**, v.375, p.192–197, 2005.

CHUANG, S. C.; BIANCHI, R.; KIM, D.; SHIN, H. S.; WONG, R. K. S. Group 1 metabotropic glutamate receptors elicit epileptiform discharges in the hippocampus through PLCβ1 signaling. **J. Physiol.**, v.541, p.113-121, 2001.

CONKLIN, B. R. ; BOURNE, H. R. Homeostatic signals. Marriage of the flytrap and the serpent. **Nature.**, v.367(6458), p.22, 1994.

CONN, P. J.; PIN, J.-P. Pharmacology and Functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.37, p.205-237, 1997.

DUNN, C. K. Localization of calcium receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization. **Abstracts of the Neuroscience Meeting**, p.1061, 1994.

GEREAU, R. W.; CONN, P. J. Multiple presynaptic metabotropic receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. **J. Neurosci.**, v.15, p.6879-89, 1995.

GIERKE, P. et al. Implication of neuronal Ca²⁺-sensor protein VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia. **Neurobiology of Disease**, v.32, p.162–175, 2008.

GUERREIRO, C. A. M. **Aspectos gerais**. In: GUERREIRO, C. A. M; GUERREIRO, M. M. Epilepsia. 2. ed. São Paulo: Lemos Editorial e Gráficos Ltda., v.1. cap.1, 1996.

HINSON, T. K. et al. Identification of putative transmembrane receptor sequences homologous to the calcium-sensing G-protein-coupled receptor. **Genomics**, v.45, p.279–289, 1997.

HOLLMAN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.17, p.31-108, 1994.

JACK, C. R. et al. Temporal lobe seizures: lateralization with MR volume measurements of the hippocampal formation. **Radiology.** ,v.175, p.423-429, 1990.

KNÖPLFEL, T.; KUHN, R.; ALLGEIER, H. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. **J. Med. Chem.**, v.38, p.1417-1426, 1995.

LAPOINTE, V. et al. Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. **J. Physiol.**, v.555 p.125–135, 2004.

LENZ, S. E. et al. The neuronal EF-hand Ca(2+)-binding protein VILIP: interaction with cell membrane and actin-based cytoskeleton. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.225(3), p.1078-83, 1996.

MANAHAN-VAUGHAN, D.; BRAUNEWELL, K.-H. Metabotropic glutamate receptor activation regulates expression of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in the hippocampus of freely moving rats: Implication in long-term potentiation. **Neuropharmacology.**, v.38, p.A28, 1999.

MCDONALD, J. W.; FIX, A. S.; TIZZANO, J. P.; SCHOEPP, D.D. Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S,3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist. **J. Neurosci.**, v.13, p.4445-55, 1993.

MEENCKE, H. J.; VEITH, G. Hippocampal sclerosis in epilepsy. In: LUDERS, H. Epilepsy surgery. 1. ed. **New York: Raven Press.**, v.1, p.689-703, 1991.

MERLIN, L. R.; WONG, R. K. S. Role of group 1 metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. **J. Neurophysiol.**, v.78, p.539-544, 1997.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science.**, v.258, p.597-603, 1992.

O'HARA, P. J. et al. The ligand binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. **Neuron.**, v.11, p.41-52, 1993.

OKAMOTO, T. et al. Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. **J Biol. Chem.**, v.273(21), p.13089-96, 1998.

PEREZ, Y.; MORIN, F.; LACAILLE, J. A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.98, p.9401–06, 2001

PITSCH, J. et al. Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. **Neurobiol. Dis.**, v.26(3), p.623-633, 2007.

RUAT, M.; MOLLIVER, M. E.; SNOWMAN, A. M.; SYDNEY, S. H. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.3161-3165, 1995.

RUTECKI, P.A.; YANG, Y. Metabotropic glutamate receptor activation modulates epileptiform activity in the hippocampus. **Neuroscience**, v.81, p.927-935, 1997.

SACAAN, A. I.; SCHOEPP, D. D. Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. **Neurosci. Lett.**, v.138, p.77-82, 1992.

SAYIN, U.; RUTECKI, P. A. Group I metabotropic glutamate receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus. **Epilepsy Res.**, v.53, p.186-195, 2003.

SCHÄFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. **Trends in Biochemical Sciences**, v.21(04), p.134-140, 1996.

SCHNURRA, I. et al. The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimers disease? **Neurobiol. Dis.**, v.8, p.900-909, 2001.

SPIPKER, C.; DRESBACH, T.; BRAUNEWELL, K. H. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. **J. Neurosci.**, v.22(17), p.7331-39, 2002.

STABEL, J.; ARENS, J.; LAMBERT, J. D. C.; HEINEMANN, U. Effects of lowering $[Na^+]_o$ and $[K^+]_o$ and of ouabain on quisqualate-induced ionic changes in area CA1 of rat hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v.110(1-2), p.60-65, 1990.

TAKAHASHI, T et al. Presynaptic calcium current modulation by a metabotrópico glutamate receptor. **Science**, v.274, p 594-597, 1996.

TAYLOR, G. W.; MERLIN, L. R. ; WONG, R. K. S. Synchronized oscillations in hippocampal CA3 neurons induced by metabotropic glutamate receptor activation. **J. Neurosci.**, v.15, p.8039-8052, 1995.

THOMSEN, C. et al. (S)-4-Carboxy-3-hydroxy-phenylglycine, an antagonist of metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) and an agonist of mGluR2, protect against audiogenic seizures in DBA/2 mice. **J. Neurochem.**, v.62: p.2492- 5, 1994.

WERNER, C. G. et al. Differential role of mGlu1 and mGlu5 receptors in rat hippocampal slice models of ischemic tolerance. **Eur. J. Neurosci.**, v.25(12), p.3597-3604, 2007.

WONG, R. K. S. et al. Role of metabotropic glutamate receptors in epilepsy. **Adv. Neurol.**, v.79, p.685-698, 1999.