



AMANDA MORATO DO CANTO

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM  
MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA

CAMPINAS

2015





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

AMANDA MORATO DO CANTO

Identificação de proteínas diferencialmente expressas em modelos animais  
de epilepsia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADOR: PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES  
COORIENTADOR: DR. ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA AMANDA MORATO DO CANTO E ORIENTADA PELA  
PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES.

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M797i Morato do Canto, Amanda, 1989-  
Identificação de proteínas diferencialmente expressas em modelos animais de epilepsia / Amanda Morato do Canto. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Iscia Teresinha Lopes Cendes.  
Coorientador: André Schwambach Vieira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. Proteômica. 3. Hipocampo. I. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Vieira, André Schwambach, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of differentially expressed proteins in animal models of epilepsy

Palavras-chave em inglês:

Epilepsy

Proteomics

Hippocampus

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ischia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Claudia Vianna Maurer Morelli

Daniel Martins de Souza

Data de defesa: 30-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**AMANDA MORATO DO CANTO**

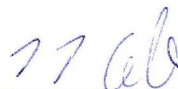
---

**Orientador (a) PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES**

---

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES



2. PROF(A). DR(A). CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI



3. PROF(A). DR(A). DANIEL MARTINS DE SOUZA



---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

**Data: 30 de junho de 2015**



## RESUMO

O uso de modelos animais para estudo de doenças humanas é importante para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos destas doenças. Particularmente, os modelos que reproduzem a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) em roedores, apresentam uma epileptogenicidade similar à encontrada em tecidos “epilépticos” humanos quando estudados *ex vivo*. A ELT afeta cerca de 40% dos pacientes adultos, e é caracterizada clinicamente por um desenvolvimento progressivo de crises epiléticas com foco no lobo temporal. Pacientes que apresentam ELT normalmente não respondem aos tratamentos. Destas, a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é a mais comum e se caracteriza pelo acometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, como no caso da Esclerose Hipocampal. A proteômica dispõe de ferramentas poderosas que nos permitem elucidar mecanismos biológicos complexos, encontrar proteínas alteradas em todo o organismo e descrever padrões de expressões proteicas em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Portanto, é relevante analisar esse padrão de expressão no hipocampo de modelos animais de ELTM usando técnicas de proteômica, a fim de gerar informações que nos auxiliem no entendimento dos mecanismos envolvidos na epileptogênese desses modelos. No presente estudo, as proteínas identificadas podem nos indicar novas vias envolvidas com a epileptogênese. Além disso, nossos dados demonstram que uma complexidade molecular adicional pode ser observada quando analisamos as diferentes sub-regiões do hipocampo separadamente. Portanto, acreditamos que a integração dos dados de proteômica com dados obtidos por outras “ômicas” podem gerar dados ainda mais informativos sobre esses processos neuronais.

Palavras-chave: Epilepsia, proteômica, hipocampo





## ABSTRACT

Studies about human diseases using animal models are really important to our understanding about the physiopathology mechanisms from those diseases. Particularly, the models that reproduce the Temporal Lobe Epilepsy (TLE) in rodents, presents epileptogenicity similar to that found in *ex vivo* human tissues. The TLE affects around 40% of the adult patients and it is clinic characterized by a progressive development of seizures with temporal lobe focus, caused by an unbalance between the excitatory and inhibitory neurotransmission. Patients who present that type of epilepsy normally don't respond well to the treatments. Of this type of epilepsy, the Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) is the most common one and it is characterized by the commitment of the mesial temporal lobe structures, such as in the Hippocampal Sclerosis. To realize these studies the proteomics has many powerful tools that allow us to elucidate complex biological mechanisms, to find altered proteins in the whole organism and describe protein expression patterns in different physiological and pathological conditions. Therefore, it's relevant to study this protein expression pattern in the hippocampus of animal models of MTLE using proteomics techniques, searching for informative data that lead us to the understanding of the involved mechanisms in the epileptogenicity. In this study we identified proteins that can indicate new pathways involved in the epileptogenesis processes. Furthermore, our data demonstrate that additional molecular complexity could be observed as hippocampal subfields were analyzed separately. We believe that the further integration of the proteomic data with other "omics" approaches could generate even more informative data about those neuronal processes.

Keywords: epilepsy, proteomics, hippocampus.



## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	11
MÉTODOS.....	11
RESULTADOS .....	17
DISCUSSÃO .....	50
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58



*“Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou e sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui, e em especial a minha amiga Talita e meu avô Paulo, que me levam sempre a buscar o melhor para os que precisam”*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu chegar até aqui e guiou os meus caminhos.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Íscia Lopes Cendes que me deu a oportunidade de fazer meu mestrado sob sua orientação e me acolheu em seu laboratório, pelos ensinamentos e valores que me foram passados e pelo grande exemplo profissional que se tornou para mim.

Ao Dr. André Vieira pela co-orientação, ensinamentos, valores, amizade, paciência e todo conhecimento que me foi passado durante esses anos.

Ao Alexandre, por todo seu tempo, ajuda, paciência e amizade durante esses anos.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências – LnBio

A FAPESP pelo apoio financeiro durante a realização deste mestrado.

Aos Drs. Rodrigo Secolin e Benilton Carvalho, por toda a ajuda e suporte na realização das análises estatísticas e de bioinformática.

A meus pais Luiz e Raquel, e meu irmão Bruno, que sempre acreditaram e investiram em mim, me apoiaram acima de tudo em qualquer decisão tomada por mim.

A meu marido Marcio por todo apoio, compreensão, paciência, pelo companheirismo e conselhos durante todo o tempo.

Por todos os outros membros de minha família, os quais sempre acreditaram em mim e na minha capacidade, sempre me apoiaram, choraram e festejaram comigo.

As companheiras de laboratório e amigas Camila, Amanda, Marcela, Isabella, Simoni que sempre estiveram comigo nos bons momentos e nos momentos difíceis, com quem compartilhei muitos momentos nesses últimos anos.

A todos os outros amigos e companheiros de laboratório Fabio, Marina, Marcella, Patrícia, Luciana Rezende, Fernando, Bia, Dani, Taty, Thais, Cynthia, Karina, Felipe, Renato, Luciana Bonadia, Marilza, Paty Aline, Sara, Mada, Murilo e Renata meu muito obrigado por tudo.

Aos amigos que mesmo longe continuam presentes Suzane, Danilo, Mariana e Luciana.

Muito Obrigada  
Amanda Morato do Canto





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema mostrando a região onde os eletrodos foram implatados para a estimulação da via perfurante. ....	19
Figura 2. Hipocampo microdissecado de rato controle. A, hipocampo intacto, B, hipocampo microdissecado. ....	20
Figura 3. Estrutura da ATP-sintase da bomba sódio/potássio. Heinzen et al., 2014. ....	51
Figura 4. Esquema mostra a proteína brevican (setas) na matriz extracelular. Seidenbecher et al., 2002. ....	52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação das proteínas obtidas por amostra, onde E refere-se a animal estimulado e EC a animal controle. ....	19
Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de Spectral Counting. Tabela mostra proteínas que apresentaram superexpressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	22
Tabela 3. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de Spectral Counting. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	23
Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de SC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	27
Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de SC. Tabela mostra proteínas que apresentaram super expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. ....	28
Tabela 6. As dez proteínas diferencialmente expressas em ambas as regiões do giro denteado, dorsal e ventral, obtidas pela análise SC. * Foldchange com valor negativo foi obtido usando $(-1/x)$ onde x = estimulado/controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão e azuis aumento de expressão. ....	32
Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	34
Tabela 8. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram super expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	35
Tabela 9. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. * proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ....	39
Tabela 10. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram	

super expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI). ..... 40

Tabela 11. Proteínas diferencialmente expressas comuns nas regiões dorsal e ventral do giro denteado, identificadas através da análise avTIC. Valores negativos de foldchange foram obtidos usando a formula  $(-1/x)$  onde  $x$  = estimulado/controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão e azuis aumento de expressão. .... 43

Tabela 12. Proteínas encontradas em ambas as análises, SC e avTIC. Valores negativos para foldchange foram obtidos utilizando  $(-1/x)$  onde  $x$  = estimulado/controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão. .... 45

Tabela 13. Proteínas encontradas em ambas as análises, avTIC e SC para a região ventral do giro denteado. Barras vermelhas representam baixa expressão e barras azuis representam aumento de expressão. .... 46

Tabela 14. Vias biológicas enriquecidas e suas respectivas proteínas diferencialmente expressas. Dados obtidos pela análise de SC. Azul, baixa expressão; Vermelho, superexpressão. .... 47

Tabela 15. Vias biológicas enriquecidas e suas respectivas proteínas diferencialmente expressas. Dados obtidos pela análise de avTIC. Azul, baixa expressão; Vermelho, super expressão..... 48

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas com relação ao total identificadas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise SC.....	21
Gráfico 2. Porcentagem de proteínas com baixa expressão e superexpressão com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC.....	21
Gráfico 3. Processos biológicos envolvendo as proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.....	24
Gráfico 4. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.....	25
Gráfico 5. Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise SC.....	26
Gráfico 6. Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise SC.....	26
Gráfico 7. Processos biológicos envolvendo as proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.....	29
Gráfico 8. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da porção ventral do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.....	30
Gráfico 9. Diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum entre as regiões dorsal e ventral do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Vermelho representa a região dorsal e verde representa a região ventral.....	31
Gráfico 10. Porcentagem de proteínas diferencialmente expressa na porção dorsal do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.....	33
Gráfico 11. Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.....	33
Gráfico 12. Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise avTIC. Panther Classification System.....	36

Gráfico 13. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região dorsal do giro denteado identificadas pela análise avTIC. Panther Classification System.....	37
Gráfico 14. Porcentagem de proteínas diferencialmente expressa na porcao ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.....	38
Gráfico 15. Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.....	38
Gráfico 16. Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas pela análise avTIC. Panther Classification System.....	41
Gráfico 17. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região ventral do giro denteado identificadas pela análise avTIC. Panther Classification System.....	42
Gráfico 18. Diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum entre as regiões dorsal e ventral do giro denteado, obtidas pela análise de avTIC. Vermelho representa a região dorsal e verde representa a região ventral.....	43
Gráfico 19. Diagrama de Venn mostrando as proteínas diferencialmente expressas obtidas pelos dois métodos de análise na região dorsal do giro denteado.....	44
Gráfico 20. Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em ambos os tipos de análise, SC e avTIC, para a região ventral do giro denteado.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- Adenosina trifosfato

avTIC – Average TIC

CA - Corno de amon

CEMIB - Centro multidisciplinar para investigação biológica

CSF – Fluido Cerebroespinal

DTT - Ditiotretitol

ELT – Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM – Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

EH – Esclerose Hipocampal

EMT – Esclerose Mesial Temporal

FDR - False discovery rate

GFAP - Glial fibrillary protein

IAA - Iodoacetamida

iCAT - Isotope-coded affinity tag

ILAE - International league against epilepsy

iTRAQ - Isobaric tag for relative and absolute quantitation

GD – Giro Denteado

GO - Gene ontology

LCM – Laser Capture Microdissection – Microdissecção a laser

LnBIO - Laboratorio nacional de biociências

MS- Espectrometria de massas

MS/MS – Espectrometria de Massas *em tandem*

MTLE - Mesial temporal lobe epilepsy

NADH - Dinucleotideo de nicotinamida e adenina

OMS - Organização mundial da saúde

SC – Spectral Counting

SE – Status Epilepticus

SILAC - Stable isotope labelling amino acid

SNC – Sistema Nervoso Central

TFA - Ácido trifluoracético

TIC – Total Ion Current

TLE - Temporal lobe epilepsy

TMT - Tandem mass tags

tTIC – Total TIC



# INTRODUÇÃO

## **Epilepsias**

As epilepsias formam um grupo de doenças neurológicas crônicas decorrentes de alterações das funções cerebrais associadas ou não a outras doenças neurológicas. Estas afetam aproximadamente 2% da população mundial (Hauser et al., 1996; Borges et al., 2004). Sendo assim, as epilepsias passaram a ser consideradas um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde, que estima que 50 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por alguma forma de epilepsia, muitas não respondendo aos tratamentos disponíveis (OMS website, 2012). Apresentam grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, gravidade e prognóstico. No entanto, há uma característica comum a todas essas síndromes que se dá pela ocorrência de crises epiléticas, que são causadas por descargas neuronais anormais que ocorrem de forma passageira, sincrônica e desorganizada, levando assim às manifestações clínicas dependentes da região (ou regiões) do sistema nervoso central afetada (Zielinski, 1988).

Dentre as diferentes síndromes epiléticas descritas, a epilepsia de lobo temporal (ELT) é a mais frequente em adultos, representando 40% dos casos, os quais frequentemente não respondem ao tratamento clínico (Kwan et al., 2011). Cerca de metade dos adultos com epilepsia apresenta a ELT e em menos de 50% desses pacientes ocorre controle completo das crises apenas com o tratamento clínico (Sander, 1993; Mattson, 1994). De maneira geral, a ELT se caracteriza por crises parciais simples e/ou complexas recorrentes, onde as crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas) são pouco frequentes. Os principais sintomas aparecem em decorrência do acometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, sendo a ELT mesial (ELTM) a forma mais comum de ELT (Blumcke et al., 1999; Guerreiro et al., 2000). O progresso nos tratamentos cirúrgicos associados aos avanços das técnicas moleculares têm tornado possível o estudo sobre as mudanças moleculares e as alterações eletrofisiológicas da

ELTM (Beck et al., 1996; Blumcke et al., 1999). No aspecto histopatológico, o achado mais frequente no espécime cirúrgico das ELTM intratáveis é a esclerose hipocampal (EH) (Kobayashi et al., 2003, Proper et al., 2000).

A Esclerose Hipocampal pode ser subdividida em 3 tipos segundo a classificação da ILAE (*International league against epilepsy*). Tipo 1: tipo mais comum de esclerose hipocampal, apresenta a região de CA1 mais afetada com mais de 80% de perda neuronal. As outras regiões também apresentam perda neuronal significativa sendo observada perda de 30-50% dos neurônios piramidais de CA2, 30-90% de CA3 e 40-90% dos neurônios de CA4. Já o Giro denteado apresenta cerca de 50-60% de perda neuronal. Tipo 2: este tipo apresenta perda neuronal predominante em CA1, afetando quase 80% destas células piramidais. Todas as outras regiões apresentam perda celular sendo aproximadamente 20% em CA2 e CA3 e 25% em CA4. Este padrão é incomum, sendo visto em aproximadamente 5-10% dos casos de ELT cirúrgicos. E por fim a Tipo 3: apresenta perda celular predominante em CA4, aproximadamente 50%, e Giro denteado, aproximadamente 35%, enquanto CA3 (<30%), CA2 (25%) e CA1 (20%) são moderadamente afetados. Também é uma variável rara e somente é detectado em aproximadamente 4-7% dos casos cirúrgicos de ELT (Bruton, 1988; Blumcke et al., 2007; Thom et al., 2010; Blumcke et al., 2013). Um segundo achado patológico que tem sido bem caracterizado em pacientes com ELTM é a reorganização axonal das células granulares (*mossy fibres sprouting*). Acredita-se que após um insulto precoce, que ocasione uma perda de células neuronais na região hilar do hipocampo, as células granulares sobreviventes formem sinapses aberrantes formando um circuito local de retroalimentação excitatório sobre as células granulares, contribuindo para a geração de crises crônicas (Mathern et al., 1995; Proper et al., 2000). Apesar da caracterização detalhada morfológica e funcional das estruturas mesiais (principalmente hipocampo), envolvidas na esclerose mesial temporal (EMT), pouco se conhece sobre os insultos que culminam com as alterações encontradas nessas estruturas e que levariam ao substrato patológico que é a esclerose mesial temporal na ELTM.

## **Formação Hipocampal**

Uma vez que a esclerose hipocampal está associada a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial, se faz necessário entendermos um pouco sobre as funções da formação hipocampal (CAs, Giro denteado e córtex entorrinal).

O hipocampo é uma estrutura do lobo temporal mesial que está criticamente envolvida com a formação de memória recente e a navegação espacial. Esta estrutura possui uma forma alongada e curva, e está presente em todas as ordens de mamíferos. Apresenta-se numa disposição longitudinal subdividida em dorsal (septal) e ventral (temporal) em roedores, correspondente aos eixos posterior e anterior, respectivamente, em humanos (Scoviller e Milner, 1957; O'Keefe e Nadel, 1978; Morris et al., 1982; Squire, 1992; Maguire et al., 1998; Strange et al., 1999; Buzsáki e Moser, 2013).

Ainda não há uma definição anatômica precisa para a porção dorsal (ou posterior) do hipocampo relativa a porção ventral (ou anterior), mas no geral, topologicamente, a porção dorsal está posicionada próximo ao córtex retrosplenial, enquanto a porção ventral está posicionada próximo ao complexo amigdalóide. Apesar de sua circuitaria ser conservada, as porções dorsal e ventral possuem diferentes conexões com as áreas cortical e subcortical, o que gera dúvidas sobre se o hipocampo é uma estrutura funcionalmente uniforme ao longo de seus eixos (Strange et al., 2014).

Sendo assim, muitos estudos foram realizados e, estudos eletrofisiológicos em roedores indicaram respostas a estímulos diferentes entre as regiões dorsal e ventral (Moser et al., 1992; Moser et al., 1995). Outros estudos mostraram que lesões restritas a porção dorsal do hipocampo, mas não na porção ventral, comprometeram a aprendizagem espacial (Gray e McNaughton, 1982; van Groen e Wyss, 1990). Foi proposto então que a porção ventral seja responsável pela mediação de respostas emocionais e relacionadas ao *stress*, devido as suas

conexões com a amígdala e o hipotálamo (Canteras e Swanson, 1992; Risold e Swanson, 1996). Complementando tais dados, estudos combinando genética e anatomia em cérebro de roedores começaram a revelar circuitos neuronais que compartilham de padrões de expressão gênica, o que indica uma sobreposição entre os níveis organizacionais anatômicos e genéticos ao longo do eixo hipocampal (Lein et al., 2007; Dong et al., 2009).

Nas condições patológicas da ELTM, quando se trata dos animais, foi demonstrado que ocorre uma atividade epileptiforme maior na região ventral do que na região dorsal (Elul, 1964; Bragdon et al., 1986). Já em humanos, registros intracraniais em pacientes indicaram que o início das crises é mais frequente na porção anterior do hipocampo do que na porção posterior (Engel et al., 1990). E esse mesmo padrão se repete quando se trata de perda neuronal, ou seja, essa perda é maior na porção anterior que na porção posterior (Mouritzen Dam, 1980; Babb et al., 1984; O'Connor et al., 1996).

### **Os modelos experimentais**

Os modelos experimentais de epilepsia têm contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia dessa síndrome, tanto *in vitro* como *in vivo*. Particularmente, os modelos que reproduzem a ELTM humana em roedores. Os modelos de ELTM apresentam dados comportamentais, eletroencefalográficos e neuropatológicos, principalmente nas regiões límbicas, semelhantes àqueles observados nos pacientes com ELTM (Avanzini et al., 1993; Lothman et al., 1995; Engel et al., 1996; Isokawa et al., 1997). Contudo, em sua grande maioria, esses modelos são gerados pela utilização de quimio-convulsivantes (Púrpura and Gonzalez-Monteagudo 1960; Meldrum et al., 1974; Turski et al., 1983; Tauck and Nadler, 1985), que normalmente causam *status epilepticus* (SE) gerando um estado epiléptico permanente (Pisa et al., 1980; Nadler et al., 1981; Cavalheiro et al., 1982), e dano no sistema nervoso central (Schwob et al., 1980; Clifford et al.,

1987, Cadotte et al., 2009). Com esses modelos podemos utilizar uma série de ferramentas para investigar vários fenômenos e vias biológicas que se entrecruzam na determinação da epileptogênese na ELTM.

Os resultados obtidos nos modelos induzidos por pilocarpina, ácido caínico ou estimulação elétrica causam dano hipocampal variável e um grande dano extra-hipocampal (Roch et al., 2002; Tongiorgi et al., 2004; Nairismägi et al., 2004; Fabene et al., 2003, 2007; Harvey and Sloviter, 2005; Bumanglag and Sloviter, 2008; Mora et al., 2009), o qual é maior e significativamente mais difuso do que o encontrado nos pacientes com ELT mesial. Outro resultado deste modelos é a indução de anomalias vasculares tais como isquemia, que não se assemelham ao padrão patológico clássico de esclerose hipocampal encontrada em pacientes com ELTM (Sloviter et al., 2006; Biagini et al., 2008).

A pilocarpina é uma droga extraída do *Pilocarpus jaborandi* que atua nos receptores colinérgicos muscarínicos como um agonista parcial, induzindo uma atividade epiléptica de longa duração seguida de dano cerebral. Modelos animais induzidos por essa droga tiveram alterações estruturais relacionadas ao sofrimento e morte neuronal, mais evidentes nas regiões límbicas. Propõem-se, portanto, que essas e outras modificações funcionais podem ser responsáveis pelas alterações fisiopatológicas vistas no modelo da pilocarpina. Porém permanece ainda obscuro quais as vias moleculares são ativadas ou inibidas (genes e/ou vias de sinalização) e quais aquelas que seriam realmente críticas (suficientes e/ou necessários) para a determinação das lesões hipocampais específicas que levariam à epileptogênese intrínseca que é observada na fase crônica do modelo (Turski et al., 1983; Voutsinos-Porche et al., 2004). Até recentemente, as tentativas de gerar um dano equivalente à EMT humana por um único insulto em modelos animais tinham sido frustrados, fato que chegou mesmo a sugerir a hipótese de que esta lesão só poderia ser observada no final do processo epileptogênico e raramente após um insulto inicial (Cavazos and Sutula, 1990; Mathern et al., 1995; Kälviäinen et al., 1998; Tasch et al., 1999; Briellmann et al., 2002;). Essa observação foi, no entanto refutada por estudos

subsequentes (Pitkanen et al., 2002; Gorter et al., 2003). Foi somente em 2010 que Norwood e colaboradores descreveram um novo modelo animal de ELTM que não passa por SE e apresenta um dano tecidual mais restrito ao hipocampo. O modelo é induzido através de estimulações elétricas restritas e consecutivas na via perfurante (*cryptic injury*, dano oculto). Deste modo não são gerados efeitos motores identificados, tais como o SE, mas observa-se o mesmo padrão de esclerose hipocampal e crises recorrentes, semelhantes aos dos pacientes com ELTM e EMT (Meldrum & Bruton, 1992).

No trabalho de Norwood e colaboradores (2010) é descrito um modelo de estimulação que apresenta inúmeras vantagens quando comparado com os modelos utilizados atualmente. Um insulto não detectado clinicamente (sem ocorrência de SE) é gerado por um episódio de excitação moderada prolongada (8 horas) precedido por dois estímulos diários de 30 minutos. Tais estímulos não são capazes de gerar SE (durante a estimulação de 8 horas), porém levam à esclerose hipocampal clássica (Norwood et al., 2010). Além disso, esses animais apresentaram lesões mais restrita, semelhante aos achados em cortes histológicos de espécimes cirúrgicos de pacientes com ELTM. Entretanto, a estimulação induz descargas epileptiformes espontâneas nas células granulares do hipocampo que precedem e/ou acompanham o comportamento fenotípico de crise espontânea, o que leva os autores a acreditarem ser esse o primeiro modelo animal que realmente reproduz a histopatologia e a fisiopatologia da ELTM humana com esclerose hipocampal clássica.

Essas descrições recentes propiciam assim modelos de crises recorrentes espontâneas sem a observação fenotípica de SE, que por sua vez apresentam grande similaridade a epileptogênese em humanos, onde normalmente SE não é observado e muitas vezes o intervalo entre o insulto inicial e as primeiras crises recorrentes é amplo.

Ainda no contexto da epilepsia de lobo temporal, sabemos principalmente que a origem das crises tipicamente envolve a formação do hipocampo. Não somente o papel da neurogênese hipocampal em condições patológicas e

fisiológicas vem sendo investigado, mas também inúmeros mecanismos que são responsáveis pelos danos hipocâmpais e subsequente epileptogênese. Entretanto, apesar de todos os estudos fisiológicos, celulares e moleculares da epilepsia, sua patogênese continua pouco entendida (Wasterlain et al., 1993; Raza et al., 2004; Ming & Song., 2005). É nesse contexto que surge a possibilidade de se utilizar as mais novas tecnologias disponíveis para avançar nesses estudos moleculares, tais como a proteômica.

### **A proteômica**

Atualmente, a proteômica provê ferramentas poderosas que nos permitem elucidar mecanismos biológicos complexos e encontrar proteínas alteradas em células, tecidos ou organismos, como resposta a estados internos, estimulações externas ou mudanças no desenvolvimento, além de permitir a descrição de diferentes padrões de expressões proteicos (Krapfenbauer et al., 2003; Yang et al., 2005).

Proteômica é o estudo das proteínas expressas em células, tecidos ou organismo em um determinado momento (Wilkins et al., 1996). A disponibilidade de sequências genômicas de muitos organismos gerou um banco de dados de sequências preditas de proteínas que são fontes indispensáveis para a análise proteômica utilizando espectrometria de massas. O corpo humano é formado de pelo menos 250 tipos diferentes de células com diferenças temporais e espaciais no padrão de expressão proteico, *splicing* alternativo, mudanças pós-traducionais e interações transientes proteína-proteína. Para analisar amostras com tal complexidade, uma técnica amplamente utilizada é a proteômica baseada em espectrometria de massa (*mass spectrometry-based proteomics*) (Liao et al., 2009). No entanto, o campo da neuroproteômica enfrenta grandes desafios dada a complexidade da arquitetura celular do Sistema Nervoso Central (SNC). A maior parte dos estudos de proteômica envolvendo tecidos humanos utiliza material *post mortem* ou fluido cerebrospinal (CSF). Devido a isso, os modelos animais

certamente auxiliam o campo das pesquisas neurológicas especialmente da neuroproteômica (Liu et al., 2009).

Para tanto, a “*Shotgun*” proteômica é uma poderosa abordagem para identificar e quantificar proteínas. Nessa técnica, a mistura contendo as proteínas são inicialmente digeridas em peptídeos através de digestão trípica. Primeiramente esses peptídeos são fracionados para reduzir a complexidade da amostra, e então são ionizadas para análise em espectrometria de massa *em tandem* (MS/MS). Os íons são selecionados no primeiro estágio da análise (MS1) e fragmentados para análise em um segundo espectrômetro de massas (MS2), o qual gera um espectro que é comparado com o banco de dados para identificar a sequência de aminoácidos de cada peptídeo, que levará então a identificação das respectivas proteínas (Liu et al., 2009). Dentro da “*Shotgun*” proteômica, existem duas categorias principais de abordagens, a *Labeling* e a *Label-free*. Exemplos de técnicas de *Labeling* incluem as marcações do tipo iCAT, iTRAQ, TMT e SILAC (Gygi et al., 1999; Ong et al., 2002; Thompson et al., 2003; Ross et al., 2004). Já as abordagens de *Label-free* se tornaram vastamente utilizadas para detecção de diferenças na abundância de proteínas devido ao seu fácil uso e suas diversas aplicações (Bantscheff et al., 2007). Tais análises são ideais para experimentos de larga escala que possuem como objetivo detectar diferenças significativas entre estados biológicos e para orientar estudos futuros e mais aprofundados (Liu et al., 2004; Bantscheff et al., 2007; Nikolov et al., 2012). Uma das abordagens de quantificação *Label-free* é o uso da intensidade do íon como medida quantitativa. Essa abordagem se baseia no valor quantitativo do pico do íon precursor gerado por equipamentos de alta resolução (Zhu et al., 2010). Outra abordagem frequentemente utilizada para análises *Label-free* é a chamada “*Spectral Counting*” (SC), onde a abundância relativa das proteínas é medida pelo número de espectros MS/MS identificados para cada peptídeo associado a uma proteína (Liu et al., 2004). No entanto, SC análises são limitadas para proteínas com baixa abundância e seus valores quantitativos podem ser inexatos (Old et al., 2005). Uma alternativa para aumentar a acurácia das análises é utilizar uma abordagem baseada na média (*Average TIC* - avTIC) ou na soma total (Total TIC - tTIC) das



áreas sobre os picos contendo o espectro MS/MS de cada proteína (Wolf-Yadlin et al., 2007). Também foi demonstrado que tais métodos empregando TIC provêm uma maior sensibilidade na detecção de mudanças nas proteínas pouco abundantes quando comparados ao SC (Asara et al., 2008; Wu et al., 2012). Como as análises de SC e TIC podem ser facilmente empregadas dentro do mesmo experimento, Freund e Penni (2013) demonstraram que tais análises são complementares e que a utilização conjunta delas aumentam o valor do experimento através da detecção de um maior número de proteínas que indicam mudanças significativas dentre dois estados biológicos diferentes.

No campo da epilepsia, alguns trabalhos utilizando técnicas de proteômica já foram realizados. Meriaux e colaboradores (2014), utilizando “*Shotgun*” proteômica analisou tecidos hipocâmpais de pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) e controles, e identificou mudanças na expressão de neuropeptídeos precursores e receptores, assim como proteínas envolvidas na regeneração de axônios incluindo neurotrofinas, proteínas de superfície celular, de membrana, do citoesqueleto e supressores de tumor. Dentre os supressores de tumor foi identificado o LGI-1 (*Leucine-rich glioma inactivated 1*) que foi relacionado com uma forma hereditária de epilepsia, a epilepsia parcial autossômica dominante com sintomas auditivos (Fukata et al, 2006). Já Li e colaboradores (2010) analisaram a proteômica do giro dentado do hipocampo de camundongos com epilepsia induzidos pelo protocolo clássico da pilocarpina, ou seja com a presença de SE. O grupo identificou proteínas relacionadas a *stress* celular, tais como peroxiredoxina 6 e  $\alpha$ - $\beta$  cristalina. Também identificaram proteínas relacionadas com a atividade sináptica que apresentaram expressão maior em animais com epilepsia, como por exemplo  $\alpha$ -sinodeína e UCH-L1 (*ubiquitin C-terminal hydrolase*). Somando-se a isso, identificou também mudanças no padrão de expressão de proteínas estruturais como a  $\beta$ -actina, profilina-1 e vimentina.

## **Microdissecção a Laser (Laser capture microdissection – LCM)**

A preparação de amostras a partir de tecidos sólidos, como o tecido provindo de cérebros, costuma ser um desafio, uma vez que tecidos sólidos são estruturas complexas compostas de tipos celulares com morfologia e funções totalmente distintas. Sendo assim, os resultados obtidos quando da análise de tecidos totais são determinados pelo tipo de célula predominante, podendo assim mascarar mudanças biologicamente relevantes que ocorrem em células específicas (Graeme 2007). Métodos manuais de microdissecção existem há anos (Going e Lamb, 1996, Hernandez e Lloreta, 2006). Entretanto esses métodos são, em geral, demorados e requerem grande destreza do manipulador, além do alto risco de contaminação do material a ser analisado pela própria manipulação experimental. Buscando resolver tais dificuldades, foram desenvolvidos métodos de microdissecção a laser, o que revolucionou as análises de tecidos sólidos (Graeme 2007).

Baseado nisso, a combinação do uso da técnica de microdissecção a laser (LCM) com o uso de diferentes espectrômetros de massa abriu caminhos para encontrarmos e identificarmos proteínas que são específicas de determinados tipos celulares e tecidos. Essa combinação também permite analisar proteomas obtidos a partir de poucas células, 100-200 células (Mustafa et al., 2008). Sendo assim, a LCM tem papel importante na eficiência da obtenção de células-alvo, e, elimina com eficiência células não desejadas que possam interferir nos resultados finais (Xu et al., 2010).

Diante do aqui exposto, o presente trabalho tem por objetivo fazer uma análise proteômica buscando proteínas diferencialmente expressas nas diferentes regiões do hipocampo de ratos com epilepsia. Este trabalho se faz importante por utilizar o modelo de indução elétrica da via perfurante de 8h que possui características mais semelhantes as encontradas em pacientes, e por utilizar a proteômica, ferramenta pouco explorada na área da epilepsia somada a este modelo.

## OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi identificar proteínas diferencialmente expressas nas diferentes regiões do Giro Denteado (GD), dorsal e ventral, do hipocampo de animais induzidos por pilocarpina e animais induzidos pela estimulação elétrica da via perfurante (modelos animais de ELTM) e compará-los a seus respectivos controles, utilizando a proteômica baseada em espectrometria de massas.

## MÉTODOS

### **Animais**

Utilizamos ratos Wistar, os quais foram mantidos no biotério do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação e *ad libitum*. Os projetos envolvendo a utilização de animais de experimentação foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP.

## **Indução dos modelos**

### **Estimulação elétrica da via perfurante**

Depois de anestesiados com uma mistura de isofluorano e oxigênio, os animais foram colocados no aparelho estereotático tipo Kopf para ratos. Após corte longitudinal da pele da região dorsal do crânio, receberam implante dos eletrodos de registro unipolar bilateralmente na camada do giro dentado do hipocampo dorsalmente e eletrodos bipolares para estimulação nos feixes angular da via perfurante, como descrito anteriormente (Harvey e Sloviter, 2006; Bumanglag e Sloviter, 2008). Eletrodos estimuladores bipolares em aço inoxidável (Plastic One, USA) foram colocados bilateralmente nos feixes angular da via perfurante (4,5 mm lateral da sutura mediana e imediatamente rostral à sutura lambdóide). Eletrodos de registro unipolar de 0,125 mm de diâmetro em aço inox (Plastic One, USA) foram implantados no hipocampo bilateralmente (2 mm lateral da linha média, 3 mm caudal ao bregma e 3,5 mm abaixo a superfície do cérebro). A localização final da camada de células granulares foi alcançada através da otimização do potencial evocado por estimulação da via perfurante (Andersen et al., 1966). Uma camada de acrílico dental foi usada para fixar os eletrodos e os parafusos ao crânio. Conectores de plástico de 6 canais (Plastic One, USA) foram usados para fixar os eletrodos, sendo posteriormente fixados ao crânio com acrílico dental para formar um tampão mecanicamente estável.

Após um período de 7 dias de recuperação da cirurgia de implante de eletrodos os animais foram submetidos ao protocolo de estimulação elétrica da via perfurante. Estes protocolos de estimulação em ratos Wistar utiliza um paradigma desenhado para evocar e manter potenciais pós-estimulação nas células granulares do hipocampo durante todo o período de estimulação (Sloviter, 1983). Todos os protocolos de estimulação foram realizados em animais não anestesiados, possuindo livre movimentação. A estimulação da via perfurante se constituiu em estímulos contínuos, bilaterais de pulso-pareado de 2 Hz, com

intervalo interpulso de 40 ms, somado a uma sequência de 10 segundos de estímulos de pulso único de 20 Hz repetida uma vez por minuto, gerado utilizando-se um gerador de estímulo Grass Astro-Med S88. Todos os pulsos (0,1 ms) possuíram amplitude de 20 V. Concomitante à estimulação foi realizado o registro do potencial de campo do Giro Denteado utilizando-se um pré-amplificador em miniatura (ThomasRecording, 2 canais, 10x ganho, acoplado a corrente contínua, filtro passa alta 0,06Hz, filtro passa baixa 10kHz), ligado a um amplificador principal (ThomasRecording, 8 canais, 25x ganho, filtro passa alta 0,06Hz, filtro passa baixa 10kHz), sendo o sinal digitalizado a uma taxa de 10kHz (NIDaq).

Inicialmente os ratos foram pré-estimulados por 2 dias consecutivos durante 30 minutos usando o paradigma acima descrito, e no terceiro dia os animais foram estimulados por 8 horas consecutivas.

### Indução por pilocarpina

O modelo de indução por pilocarpina já é um modelo estabelecido e este método de indução já é de uso corrente em nosso laboratório (Cavalheiro 1982). Em resumo, os animais foram pré-tratados com metil-escopolamina (1mg/kg; subcutâneo; Sigma Co.) para limitar os efeitos colinérgicos periféricos. Trinta minutos após, eles receberam uma injeção sistêmica de pilocarpina (320 mg/kg; intraperitoneal). Aproximadamente 40 min após a injeção os animais entraram em *Status Epilepticus*. Estes foram observados durante 2h em SE e após esse tempo foi administrado injeção sistêmica de Diazepam (10mg/kg), para interrupção do SE. Esses animais foram monitorados por vídeo 24h durante 15 dias.

### Microdissecção a laser

Para a microdissecção a laser, os tecidos foram extraídos a partir de decapitação dos animais previamente anestesiados com isoflurano. O encéfalo

foi então deixado por cerca de 30 seg em solução salina a 4° C e depois foi colocado em N-hexano a -60° C e armazenado a -80° C. Para a confecção das lâminas, o tecido congelado foi cortado em Criostato a -15o C (Leica), em cortes de 60 µm de espessura, que foram montados em lâminas PEN (Zeiss). Após esse processo de corte, os mesmos receberam coloração seguindo os passos: 70% de etanol a -20° C por 2 min; 1% de acetato de cresil violeta por 2 min; lavagem com etanol 70% e secagem a temperatura ambiente. Em posse das lâminas as sub-regiões do hipocampo foram microdissecada a laser (Zeiss PALM LCM) e separadas para posterior extração das proteínas.

### **Extração proteica**

Ao tecido microdissecado foi adicionado 50 µL de Ureia 8M para homogeneização do mesmo. As amostras foram incubadas por 1h a temperatura ambiente. Seguiu-se então com centrifugação para a retirada das proteínas que não entraram em solução, isolando o sobrenadante e utilizando este para as análises posteriores. A quantificação foi feita utilizando-se *Protein Assay Kit para Qubit* (Invitrogen).

### **Digestão triptica**

Para a análise em espectrometria de massas (MS) foi feita a digestão das proteínas com tripsina para gerar peptídeos que foram analisados pelo equipamento de MS. Depois de acertada a concentração de ureia, foi feita a redução adicionando solução de DTT (Ditiotreitol) 5mM e incubando por 25 min a 56°C. Seguiu-se com a alquilação dos peptídeos adicionando 14mM de IAA (iodoacetamida) incubando por 30 min a temperatura ambiente protegido da luz. Adicionou-se então solução de DTT 5mM e incubou-se durante 15 min a temperatura ambiente protegido da luz. A amostra foi diluída na proporção de 1:5v

em solução de bicarbonato de amônio 50mM reduzindo a concentração da ureia para 1.6 M. Adicionou-se solução de  $\text{CaCl}_2$  (cloreto de cálcio) 1mM e solução de tripsina 20ng/ L (1:50v) e incubou-se a 37°C por 18h. Passado o período de incubação foi adicionado TFA (ácido trifluoracético) concentração final 0,4% e verificou-se o pH para que este estivesse abaixo de dois. As amostras foram então centrifugadas a 2500 G por 10 min em temperatura ambiente, foram então dessalinizadas utilizando-se colunas *SepPack*(Waters) e foram secas a vácuo em concentrador SpeedVac (Eppendorf).

### **Análise por Espectrometria de Massas (MS/MS)**

As amostras secas foram então ressuspendidas em 67,5 L de 0.1% de ácido fórmico. Uma alíquota de 4.5 L de cada amostra foi analisada em um espectrômetro de massas ETD Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) conectado ao EASY-nLC system (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, USA) através de um Proxeon nanoelectrospray ion source. Os peptídeos foram então separados com um gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0.1% de ácido fórmico utilizando uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x ID75  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  particle size, New Objective) num fluxo contínuo de 300nL.min<sup>-1</sup> por 85 min. A voltagem do nanoelectrospray foi configurada para 2.2kV e a temperatura para 275°C. Todos os métodos instrumentais foram configurados em modo de aquisição de dados dependente. Todos os espectros (m/z 300-1600) foram obtidos pelo analisador Orbitrap após acumulação do valor alvo de  $1 \times 10^6$ . A resolução do Orbitrap foi configurada para  $r = 60000$  e os 20 íons com carga  $\geq 2$  mais intensos foram isolados sequencialmente para um valor alvo de 5000 e estes foram fragmentados no ion *trap* linear usando baixa energia CID (normalized collision energy of 35%). O sinal de limiar para o disparo de um evento MS/MS foi configurado para 1000 contagens. Exclusões dinâmicas foram ativadas com uma lista de exclusão de tamanho 500, exclusões durante 60s e uma contagem repetida de 1. Uma ativação  $q = 0.25$  e tempo de aquisição de 10 ms foram

usadas (Kawahara et al., 2014).

### **Identificação de proteínas e análise quantitativa**

A tolerância de massa inicial foi definida para 20ppm por precursor e depois foi definido para 6ppm para busca principal e 0.5Da por fragmento. A especificidade enzimática foi definida para tripsina com falta máxima de duas clivagens. Carbamidometilação de cisteínas foi selecionada como modificação fixa, oxidação de metioninas e acetilação N-terminal da proteína foram selecionados como modificações variáveis. O comprimento mínimo para peptídeos foi de 6 aminoácidos. A taxa de falso positivo (FDR) para peptídeos foi de 0.01% (Kawahara et al., 2014).

Os espectros obtidos foram submetidos ao banco de dados do NCBI e do UniProt-KB através do software *ProteomeDiscovery*, seguindo a taxonomia de *Rattus norvegicus*, e também foram submetidos a um banco de dados reverso para reduzir o número de falsos positivos. O *threshold* definido para as análises foi *peptide threshold* = 60%, *protein Threshold* = 99%, *min peptide* = 1 e a taxa de falsos positivos (FDR) foi determinada para 1,3%. As análises quantitativas foram feitas utilizando o software Scaffold versão 4.0, e foram feitas utilizando análise por Total Spectral Counting e por Average TIC.

### **Análise Estatística dos dados**

Todos os dados obtidos pela análise de SC foram analisados pelo *Fisher's exact teste* para os dados obtidos por avTIC foi feito Teste T Student, ambos os testes foram feitos utilizando software Scaffold versão 4.0 e foi feita correção para múltiplos testes (FDR) utilizando o software R versão 2.12.2 com significância estatística definida como  $p < 0.05$ .



### **Análise biológica dos dados**

Para as análises biológicas dos dados, os dados foram transformados em tabelas contendo os seguintes dados: *Gl number* (Número de acesso), valor de p e valor de foldchange. Essas tabelas foram inseridas no Metacore (Thomson-Reuters) e foram geradas análises das vias enriquecidas, as quais foram feitas comparando os dados de proteômica com o banco de dados do NCBI para *Rattus norvegicus*. Primeiramente foi analisado cada amostra separadamente, e posteriormente foi feita comparações de região dorsal com ventral dentro de cada análise quantitativa (GD dorsal SC x GD ventral SC e GD dorsal SC x GD ventral avTIC), e comparações usando os dois tipos de análises (GD dorsal SC x GD dorsal avTIC; GD ventral SC x GD dorsal avTIC). E para a busca dos processos biológicos e funções moleculares as quais pertencem as proteínas encontradas, uma lista com os números de acesso de cada grupo de amostra foi submetido ao *Panther Classification System* e as análises foram geradas utilizando o banco de dados de *Rattus norvegicus*.

## **RESULTADOS**

### **Animais induzidos por pilocarpina**

Foram induzidos 5 animais com pilocarpina e 5 controles (com injeção de solução salina). Tais animais foram microdissecados e as regiões do giro denteado foram separadas em dorsal e ventral. No entanto, devido a limitação no número de amostras que poderiam ser analisadas utilizando o LTQ-Orbitrap pertencente ao LnBio, onde as análises foram feitas, não foi possível analisar todas as amostras obtidas pela indução com pilocarpina. Foram analisados apenas duas amostras do controle e duas do tratamento, para a região dorsal e

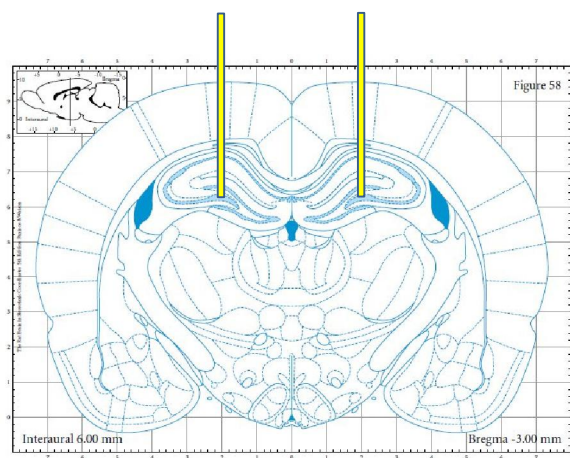
uma amostra para controle e uma para tratamento, para a região ventral. Portanto, não foi alcançado um N mínimo significativo para que pudéssemos realizar qualquer teste estatístico e assim obter as proteínas diferencialmente expressas. No entanto, as amostras obtidas desses animais serão analisadas assim que o equipamento estiver disponível para uso novamente. Assim, foi dada preferência para analisar as amostras do modelo de estimulação elétrica da via perfurante pois trata-se de um modelo menos estudado quando comparado ao de pilocarpina, e também pelo modelo apresentar um padrão de lesão mais restrito, semelhante ao dos pacientes.

### **Animais induzidos pela estimulação elétrica da via perfurante**

Foram analisados 3 animais induzidos pela estimulação elétrica da via perfurante e 4 animais controles Sham (que receberam o implante dos eletrodos na região dorsal mas não receberam estímulos). Na Tabela 1 podemos observar as concentrações obtidas para cada amostra, sendo uma média de 850 g/ml para os animais estimulados da região dorsal e 960 g/ml para os controles da região dorsal, e uma média de 760 g/ml para os animais estimulados da região ventral e 960 g/ml dos animais controles da região ventral. Destas amostras foram utilizadas 30 g de cada uma para digestão com tripsina. Na imagem 1 podemos observar um esquema mostrando onde foram implantados os eletrodos. Na imagem 2 podemos observar o resultado da microdissecção a laser de um corte do hipocampo dorsal de um animal controle e um estimulado.

Animal	Região Giro denteado	[ g/ml]
E8	Dorsal	632
E8	Ventral	673
E16	Dorsal	979
E15	Ventral	629
E7	Dorsal	864
E7	Ventral	815
EC6	Dorsal	778
EC6	Ventral	838
EC10	Dorsal	1060
EC10	Ventral	798
EC5	Dorsal	1040
EC5	Ventral	931
EC12	Dorsal	1040
EC12	Ventral	664

**Tabela 1. Quantificação das proteínas obtidas por amostra, onde E refere-se a animal estimulado e EC a animal controle.**



**Figura 1. Esquema mostrando a região onde os eletrodos foram implantados para a registro da atividade induzida pela estimulação da via perfurante. Adaptado de Paxinos e Franklin, 2012.**

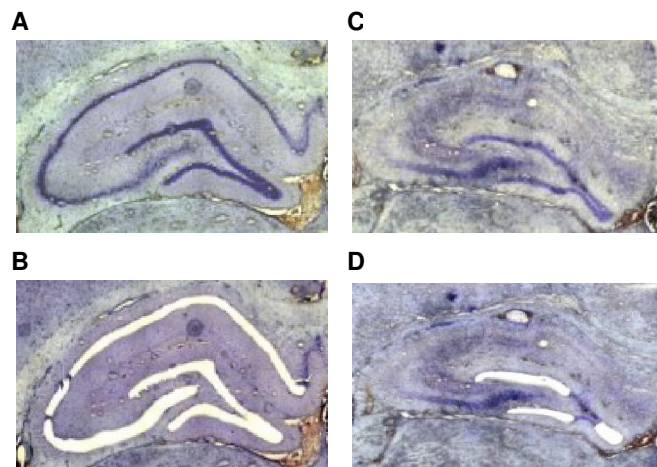


Figura 2. Hipocampo microdissecado de rato controle e estimulado. A, hipocampo controle intacto, B, hipocampo microdissecado, C, hipocampo de animal estimulado intacto, D, hipocampo de animal estimulado microdissecado.

### Análise comparativa da região dorsal dos animais estimulados com a região dorsal dos controles pela análise spectral counting

Um total de 1271 proteínas foram identificadas das quais 42 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas pelo teste de Fisher, quando comparadas com o controle. O teste de Fisher foi escolhido neste tipo de análise por se tratar de contagem de espectros. Após a realização da correção para múltiplos testes (FDR) , apenas 3 proteínas destas 42 foram significativas com valor de  $p < 0.05$ . No Gráfico 1, podemos observar que 3% das proteínas analisadas foram diferencialmente expressas, e no Gráfico 2 podemos observar que 33% das proteínas diferencialmente expressas estavam com baixa expressão comparado ao controle, e que os outros 67% estavam superexpressos. Olhando a tabela 2 podemos observar as 28 proteínas identificadas que estavam com superexpressão e na tabela 3 as 14 que estavam com baixa expressão, assim como as informações de seus genes, *foldchange* (para valores negativos de *foldchange* foi utilizada a formula  $[-1/x]$  sendo  $x = \text{estimulado/controlado}$ ) e valor de  $p$ . As proteínas marcadas com asterisco (\*) foram significativas após a correção para múltiplos testes. Destas três proteínas significativas, a GFAP (3.7 vezes) e a

vimentina (13.5 vezes) estavam superexpressas enquanto que a subunidade  $\beta$  da ATP-sintase mitocondrial (1.6 vezes) estava com expressão diminuída.



**Gráfico 21.** Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas com relação ao total identificadas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise SC.



**Gráfico 22.** Porcentagem de proteínas com baixa expressão e superexpressão com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC.

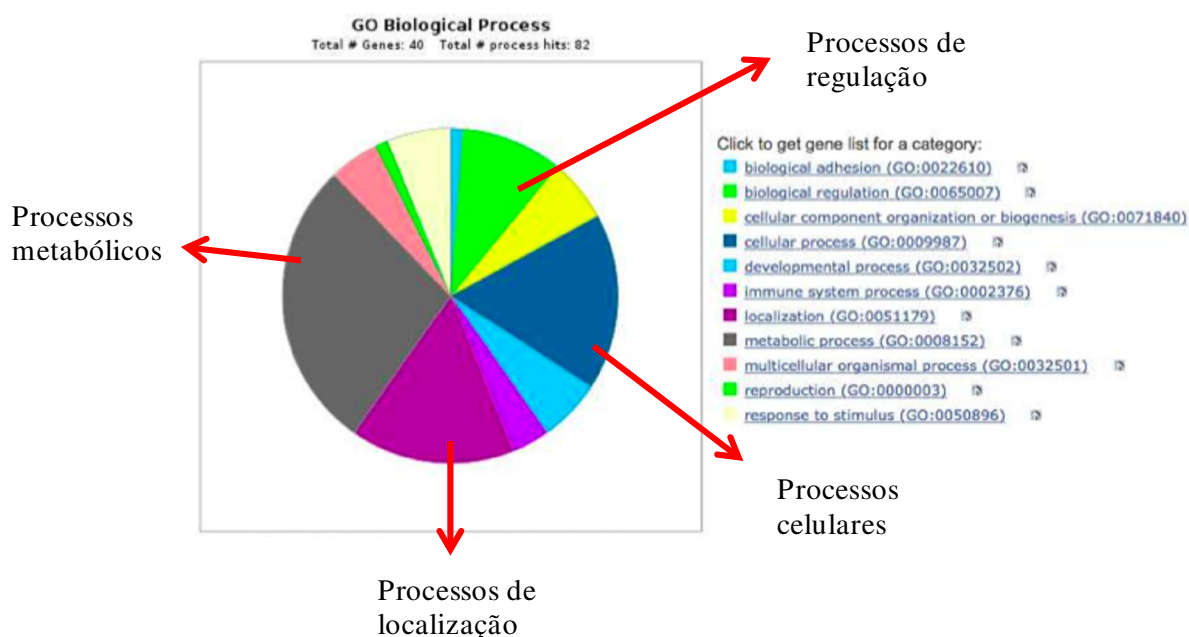
Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange	Gene	%Cobertura	M in. Pep.
Glial fibrillary acidic protein*	gi  115311597	< 0,00010	3.73	Gfap	56.7	20
Vimentin, isoform CRA_b *	gi  149021114	< 0,00010	13.56	Vim	44.8	16
Complement C3 precursor	gi  158138561	0.00096	2.66	C3	8.66	3
Serum albumin	gi  124028612	0.0018	1.80	Alb	32.2	19
Fatty acid-binding protein, brain	gi  1706751	0.0019	3.78	Fabp7	40.9	4
Annexin A3	gi  122065130	0.0022	4.67	Anxa3	4.9	2
heat shock 27kDa protein 1	gi  149063018	0.0055	2.00	Hspb1	42.7	3
Heterochromatin protein 1, binding protein 3	gi  149024363	0.0055	2.00		18.9	6
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	gi  19855078	0.0072	1.74	Atp1a3	39.2	25
Serotransferrin	gi  122066515	0.0093	3.47	Tf	10.9	8
Ras-related protein Rab-2A	gi  131789	0.012	4.44	Rab2a	19.8	6
60S ribosomal protein L7a	gi  54039228	0.013	1.66	Rpl7a	22.9	4
60S ribosomal protein L11	gi  51702792	0.013	1.66	Rpl11	12.9	2
rCG28547, isoform CRA_c	gi  149025834	0.013	1.66	+	19.9	2
MAGUK p55 subfamily member 2	gi  281306759	0.014	3.67	Mpp2	11.1	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	gi  293359746	0.025	8.00	HnrnpII	11	2
Haptoglobin	gi  124053462	0.025	8.00	Hp	13.5	4
Clu protein	gi  38181879	0.025	8.00	Clu	10.7	3
Sderoflexin-1	gi  20139869	0.031	1.33	Sfxn1	22	4
Lysosomal alpha-glucosidase isoform X1	gi  564375664	0.031	1.33	Gaa	4.72	2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	gi  81884616	0.031	1.33	Eif3d	7.85	2
Full=Sulfated glycoprotein 1	gi  134219	0.034	2.22	Psap	12.8	5
hepatoma-derived growth factor-related protein 3 isoform X1	gi  672036978	0.038	1.50	Hdgfrp3	23.2	3
Cell division control protein 42 homolog	gi  122063303	0.038	1.50	Cdc42	19.9	2
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	gi  114379	0.039	1.58	Atp1a2	18.5	3
Thioredoxin	gi  135776	0.04	3.56	Txn	51.4	6
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	gi  729378	0.048	2.67	Dync1h1	7.71	19
Phosphoglucomutase-1	gi  77627971	0.048	2.67	Pgm 1	18.5	5

**Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro dentado de animais estimulados, obtidas através da análise de Spectral Counting. Tabela mostra proteínas que apresentaram superexpressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).**

Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange	Gene	%Cobertura	M in. Pep.
ATP synthase subunit beta, mitochondrial *	gi  114562	0.00011	-1.56	Atp5b	72.2	27
transcription elongation factor A protein-like 5	gi  672088350	0.00084	-3.25	Tceal5	24	5
Neurocalcin-delta	gi  81909955	0.0014	-7.13	Ncald	16.6	2
Alpha-internexin	gi  223718723	0.015	-2.25	Ina	58.1	4
cytochrome c oxidase subunit 6B1	gi  149028150	0.015	-4.00	Cox6b1	17.1	7
KH-type splicing regulatory protein, isoform CRA_a	gi  157822175	0.019	-2.75	+	22.2	3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	gi  51338689	0.022	-7.50	Ndufb10	22.2	3
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	gi  149054471	0.026	-1.63	Atp6v1b2	19.8	11
N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, isoform CRA_b	gi  51702230	0.034	-1.66	Nsf	?	1
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	gi  564393741	0.035	-1.39	Hspd1	9.94	2
gamma-soluble NSF attachment protein isoform X1	gi  672036978	0.036	-6.75	Napg	13.1	3
transcription elongation factor A protein-like 3	gi  122063303	0.043	-4.13	Tceal1	14.7	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi  672032584	0.046	-1.24	Gapdh	20.1	2
brevican core protein isoform X2	gi  122065190	0.049	-2.81	Bcan	63.4	13

**Tabela 3. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de Spectral Counting. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).**

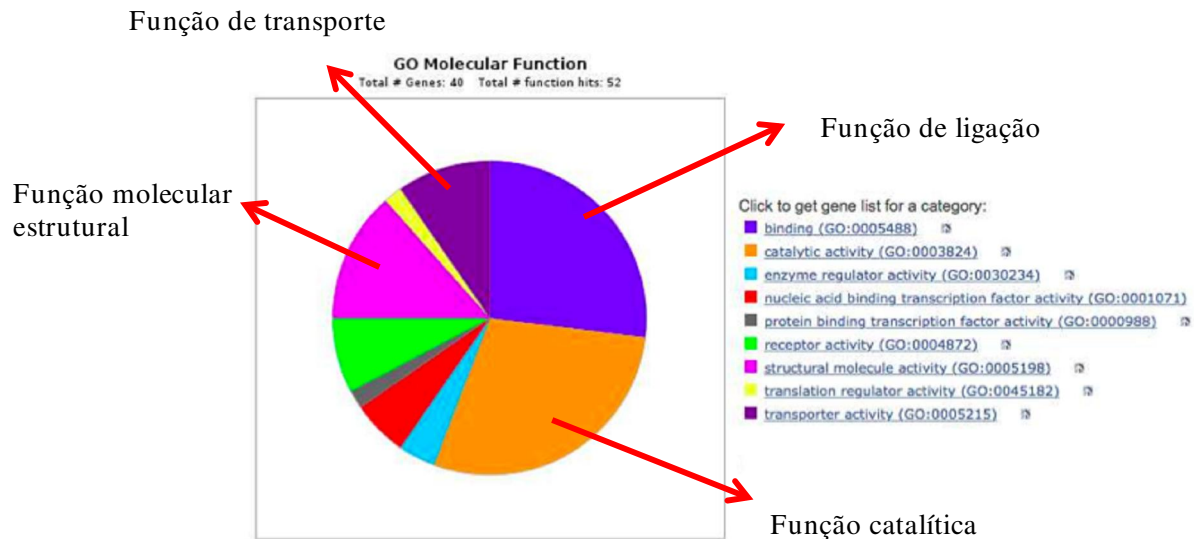
Fazendo análise dos processos biológicos envolvendo essas 42 proteínas diferencialmente expressas na região dorsal, nós temos, 1 proteína envolvida em processos de adesão, 8 envolvidas com processos de regulação, 5 foram componentes celulares ou de biogênese, 14 proteínas envolvidas com processos celulares, 5 com processos de desenvolvimento, 3 com processos do sistema imune, 13 com localização, 23 envolvidas com processos metabólicos, 4 com processos de organismos multicelulares, 1 com reprodução e 5 foram respostas a estímulos (Gráfico 3).



**Gráfico 23. Processos biológicos envolvendo as proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.**

Já para as análises de função molecular nós temos que, 14 proteínas estão envolvidas com função de ligação, 15 com atividade catalítica, 2 com atividades reguladoras de enzimas, 3 com atividades de fatores de transcrição regulados por ácido nucleico, 1 atividade de fatores de transcrição regulados por proteínas, 4 com atividades de receptores, 7 com atividade estrutural molecular, 1 atividade reguladora de tradução e 5 com atividade de transporte (Gráfico 4).





**Gráfico 24. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região dorsal do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.**

## Análise comparativa da região ventral dos animais estimulados com a região ventral dos controles

Novamente, um total de 1271 proteínas foram identificadas, mas destas, 49 proteínas foram diferencialmente expressas pelo teste de Fisher. Destas 49, apenas 3 foram significativas com  $p < 0.05$  após a correção por FDR. No gráfico 5 nós podemos observar que aproximadamente 4% das proteínas identificadas foram diferencialmente expressas sendo destas aproximadamente 65% estavam com baixa expressão e 35% estavam superexpressas, quando comparadas a expressão dos controles. Já na tabela 4, podemos analisar as proteínas diferencialmente expressas da região ventral que estavam com baixa expressão, e suas informações mais detalhadas. Assim como na tabela 5 podemos observar as proteínas com superexpressão e suas informações. Novamente, proteínas marcadas com um asterisco (\*) foram significantes após correção FDR. Também para o valor negativo de Foldchange foi utilizada a formula matemática  $(-1/x)$ . Considerando as proteínas significantes podemos observar que, a proteína GFAP (2.18 vezes) e vimentina (3.5 vezes) apresentaram um aumento na expressão enquanto que a subunidade  $\alpha 3$  da

ATPase da bomba sódio/potássio apresentou uma baixa na expressão.

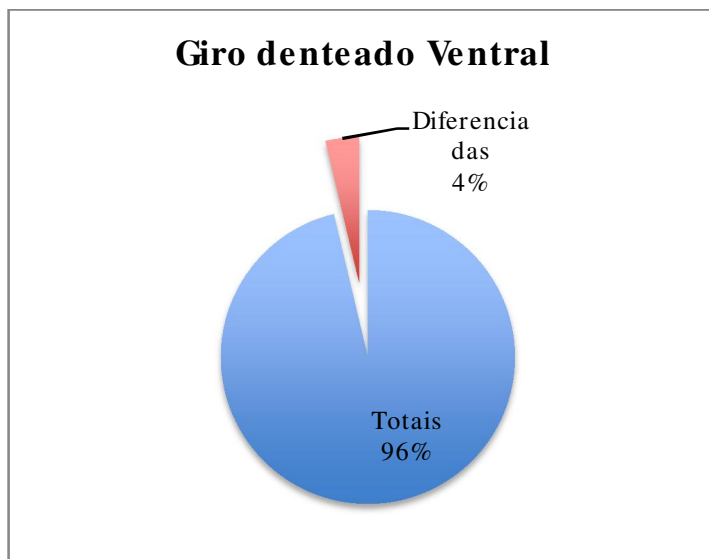


Gráfico 25. Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise SC.

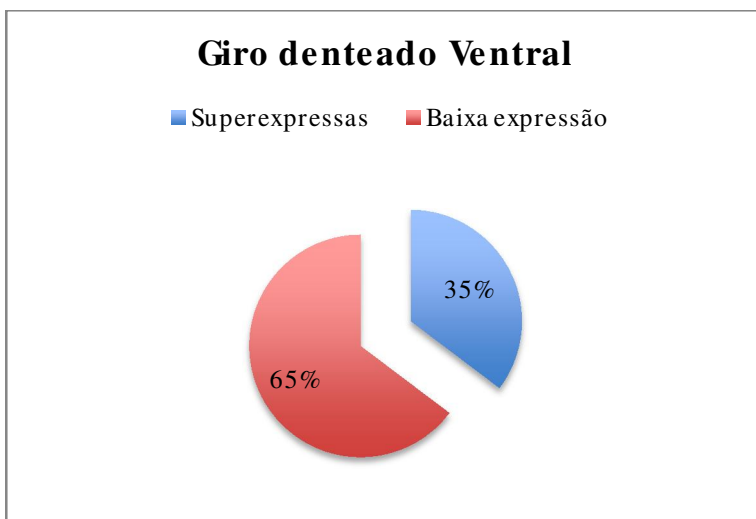


Gráfico 26. Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise SC.

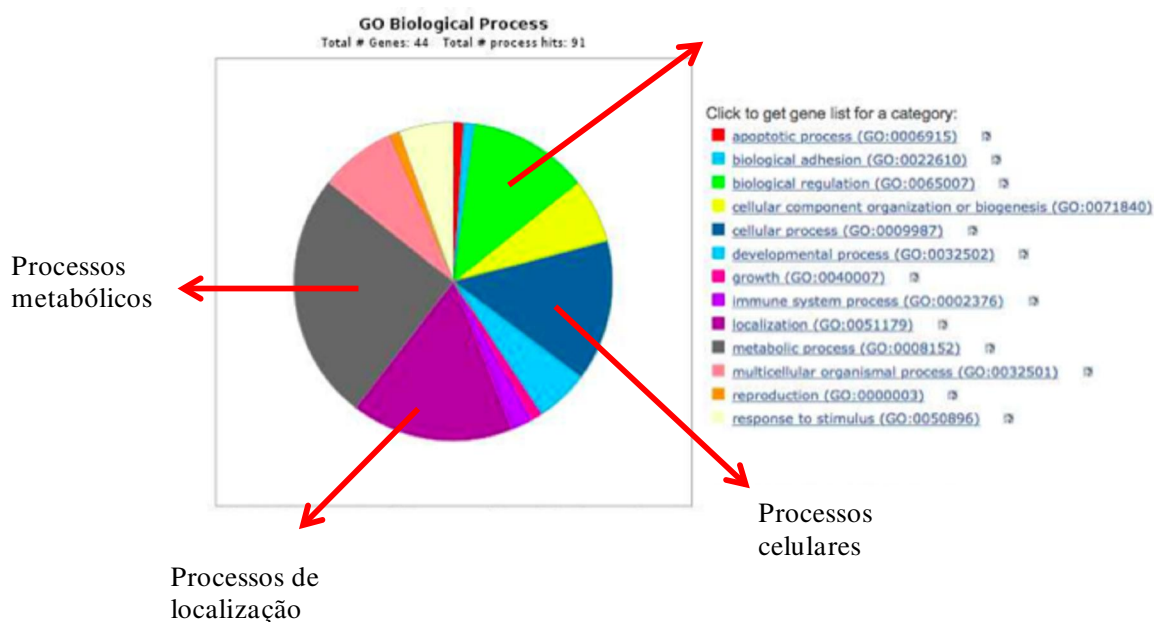
Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange (-1/ x)	Gene	%Cobertura	Min. Pep.
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3*	gi  19855078	< 0.00010	-5.16	Atp1a3	39.2	25
Clathrin heavy chain 1	gi  116514	0.0013	-3.5	cltc	9.6	2
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	gi  114379	0.0016	-4.07	Atp1a2	18	3
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	gi  114376	0.0036	3.57	Atp1a1	15	2
Ankyrin-2 isoform X2	gi  293354862	0.012	-5	+	2	6
Transaldolase 1, isoform CRA_a	gi  149061610	0.012	-6.43	Taldo1	24.1	7
Aminopeptidase puromycin sensitive	gi  149054035	0.016	-2.25	Npepps	8.12	4
G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 isoform X1	gi  564319540	0.016	-2.25	+	9.2	3
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	gi  16758008	0.016	-2.25	Atp2b1	9.1	6
Brevican core protein isoform X2	gi  564337070	0.017	-6.06	Bcan	10.2	6
Complement C3 precursor	gi  158138561	0.018	1.33	C3	8.66	7
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	gi  729378	0.02	-3.6	Dync1h1	7.99	19
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	gi  122066611	0.023	-4.5	Uqcrc2	25	7
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	gi  14286100	0.026	-2	Atp2b2	6.28	3
Neurochondrin	gi  172044486	0.026	-3.46	Ncdn	18	8
Transketolase	gi  12018252	0.027	-3	tkt	22	8
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 Y	gi  672081893	0.032	-4.25	+	15.4	6
Heat shock protein HSP 90-alpha	gi  122065208	0.033	-1.89	Hsp90aa1	32.7	20
40S ribosomal protein S19	gi  133857	0.033	-8.33	Rps19	24.1	3
POTE ankyrin domain family member F	gi  293354862	0.038	-1.135	POTEF	66.7	20
Coronin-1A	gi  81916300	0.039	-3	Coro1a	26	6
Ca2+ dependent secretion activator, isoform CRA_a	gi  149040049	0.041	-1.75	Cadps	2.25	2
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	gi  15214186	0.041	-1.75	Vdac3	20.1	3
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 isoform X7	gi  672088946	0.041	-1.75	Atp3b3	6.12	1
Galactokinase 1, isoform CRA_a	gi  149054817	0.041	-1.75	Galk1	1.14	3
Excitatory amino acid transporter 2 (sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 2)	gi  417074	0.043	-4	Slc1a2	13.4	6
Ap-2 complex subunit um	gi  51316971	0.048	-7.57	Ap2m1	12.9	4
Neurocalcin-delta	gi  81909955	0.048	-7.57	Ncald	17.6	2

**Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de SC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).**

Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange	Gene	%Cobertura	M in. Pep.
Vimentin, isoform CRA_b*	gi  149021114	< 0,00010	3.5	Vim	52.8	17
Glial fibrillary acidic protein GFAP*	gi  115311597	< 0,00010	2.18	Gfap	57.7	22
Serum albumin; precursor	gi  124028612	0.00025	1.69	Alb	41.9	20
Cystatin-C; Cystatin-3	gi  83301921	0.0049	9.33	Cst3	20	2
Microtubule-associated protein 4 isoform X1	gi  564365554	0.015	4.6	Map4	2.91	4
26Sprotease regulatory subunit 10B	gi  213972598	0.015	4.6	GW7_00242	14.6	4
Endoplasmic reticulum resident protein 29	gi  2507015	0.017	2.28	Erp29	26.9	5
Serotransferrin; tranferrin	gi  122066515	0.017	2.28	Tf	13.8	8
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform 2	gi  310703617	0.018	2.44	GW7_07680	1.99	6
Haptoglobin	gi  124053462	0.028	6.66	Hp	13.6	4
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2, mitochondrial	gi  157817027	0.028	6.66	Chchd2	11.5	2
proteasome subunit alpha type-2	gi  130851	0.031	2.09	Psma2	21.8	3
Profilin-1	gi  51702769	0.033	2.4	Pfn1	39.3	4
Eukaryotic translation initiation factor 4H isoform X1	gi  564378864	0.033	2.4	Eif4h	17.8	3
Apolipoprotein E	gi  1703338	0.033	1.64	Apoe	19.6	6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C isoform 1	gi  478621135	0.033	1.48	Hnrnpc	26.5	6
disks large homolog 2, isoform CRA_a	gi  149068973	0.034	3.11	Dlg2	8.73	5
Sadenosylmethionine synthase isoform type-2	gi  127043	0.049	1	Mat2a	10.4	3
Bisphosphate 3'-nucleotidase 1, isoform CRA_c	gi  149040962	0.049	1	Bpnt1	8.42	1
Similar to phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	gi  149061303	0.049	1	+	18	2
WASH complex subunit FAM21 isoform X1	gi  564348482	0.049	1	Fam21	1.68	1

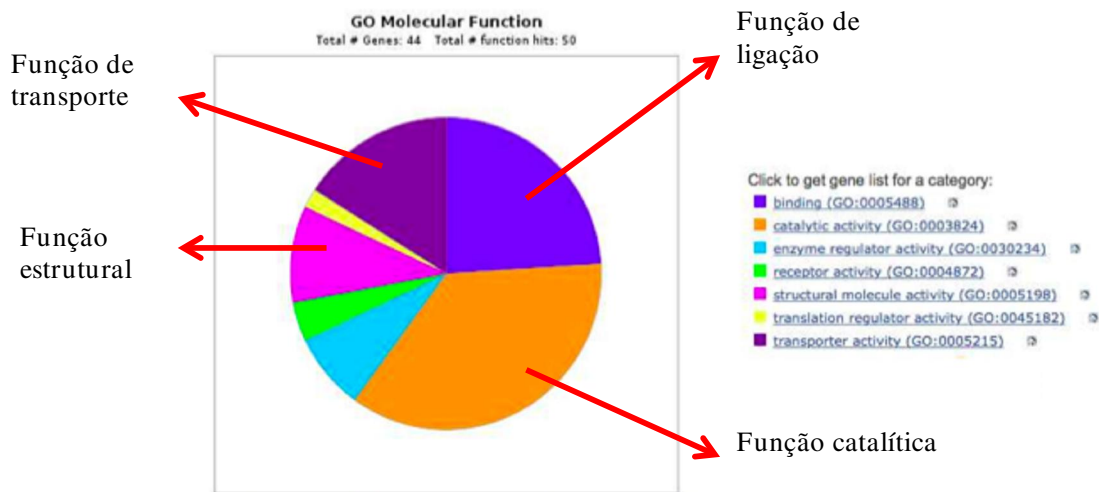
**Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de SC. Tabela mostra proteínas que estavam superexpressas. \* proteínas significantes após correção por FDR.**

Na análise dos processos biológicos envolvendo essas 49 proteínas diferencialmente expressas na região ventral, nós temos, 1 proteína envolvida com apoptose, 1 proteína envolvida em processos de adesão, 11 envolvidas com processos de regulação, 6 foram componentes celulares ou de biogênese, 13 proteínas envolvidas com processos celulares, 5 com processos de desenvolvimento, 2 com processos do sistema imune, 15 com localização, 23 envolvidas com processos metabólicos, 7 com processos de organismos multicelulares, 1 com reprodução, 5 foram respostas a estímulos e 1 com crescimento (Gráfico 7).



**Gráfico 27. Processos biológicos envolvendo as proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Panther Classification System.**

E, para as análises de função molecular nós temos que, 12 proteínas estão envolvidas com função de ligação, 18 com atividade catalítica, 4 com atividades reguladoras de enzimas, 2 com atividades de receptores, 5 com atividade estrutural molecular, 1 atividade reguladora de tradução e 8 com atividade de transporte (Gráfico 8).



**Gráfico 28. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da porção ventral do giro denteado, obtidas pela SC. Panther Classification System.**











### Análise comparativa das proteínas diferencialmente expressas encontradas na região Dorsal e Ventral obtidas por SC

Ao compararmos os dados obtidos nas análises de dorsal e ventral, o gráfico 9 nos mostra que apenas 10 proteínas das diferencialmente expressas estão presentes tanto na região dorsal quanto na região ventral. Sendo assim, 32 proteínas diferencialmente expressas foram exclusivas da região dorsal do GD e 39 proteínas diferencialmente expressas foram exclusivas da região ventral.



**Gráfico 29. Diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum entre as regiões dorsal e ventral do giro denteado, obtidas pela análise de SC. Vermelho representa a região dorsal e verde representa a região ventral.**

Observando a tabela 6, nós vemos que dessas 10 proteínas comuns nem todas apresentaram o mesmo padrão de expressão. Por exemplo, a subunidade  $\alpha 3$  da ATPase da bomba sódio/potássio apresentou uma superexpressão na região dorsal e uma baixa expressão na ventral. O mesmo padrão pode ser observado com as proteínas Dineína e a subunidade  $\alpha 2$  da ATPase da bomba sódio/potássio. Outro fato importante é que das 3 proteínas significativas citadas anteriormente, duas delas são comuns para dorsal e ventral, a GFAP e a Vimentina e em ambas as regiões elas se apresentaram superexpressas. Já as outras duas proteínas significantes, uma para dorsal (subunidade  $\beta$  da ATP-sintase mitocondrial) e outra para ventral (subunidade  $\alpha 3$  da ATPase da bomba sódio/potássio) apresentaram baixa expressão quando comparadas aos respectivos controle.

Nome	p-value GDd	p-value GDv	Foldchange GDd	Foldchange GDv	Gene	GDd/GDv
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	0.0072	< 0.00010	1.73	-5.16	Atp1a3	
Glial fibrillary acidic protein GFAP	< 0.00010	< 0.00010	3.728	2.18	Gfap	
Vimentin, isoform CRA_b	< 0.00010	< 0.00010	13.55	3.5	Vim	
Haptoglobin	0.025	0.028	8	6.66	Hp	
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	0.048	0.02	2.66	-3.6	Dync1h1	
Complement C3 precursor	0.00096	0.018	2.66	1.33	C3	
Brevican core protein isoform X2	0.049	0.017	-2.81	-6.06	Bcan	
Serotransferrin; transferrin	0.0093	0.017	3.46	2.28	Tf	
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	0.039	0.0016	1.58	-4.07	Atp1a2	
Serum albumin; precursor	0.0018	0.00025	1.8	1.69	Alb	

**Tabela 6. As dez proteínas diferencialmente expressas em ambas as regiões do giro denteado, dorsal e ventral, obtidas pela análise SC. \* Foldchange com valor negativo foi obtido usando  $(-1/x)$  onde  $x$  = estimulado/ controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão e azuis aumento de expressão.**

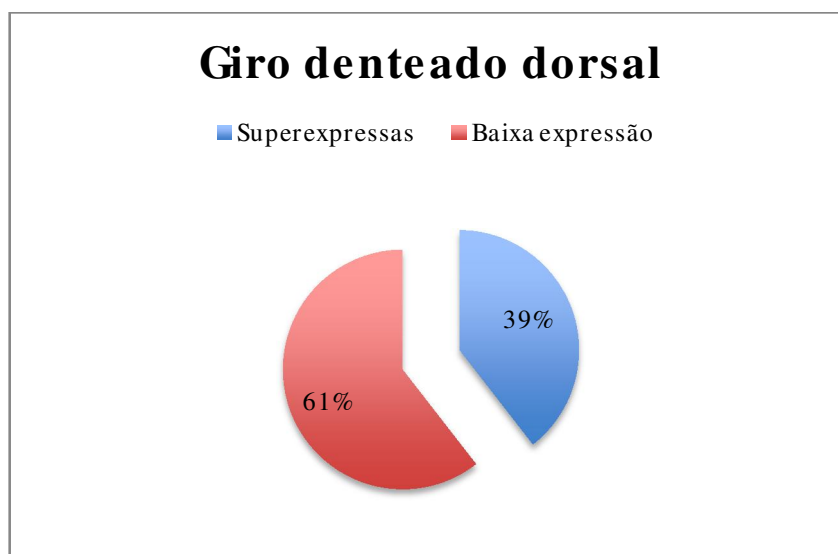
### Análise comparativa da região dorsal dos animais estimulados com a região dorsal dos controles pela análise average tic (avTIC)

No total foram identificadas 1271 proteínas das quais 38 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas pelo teste *t de Student*, quando comparadas com o controle. O teste *t de Student* foi escolhido neste caso pelo fato de o parâmetro quantitativo ser a média da área sobre os picos dos espectros gerados no MS/MS. Após a realização da correção para múltiplos testes (FDR) , 2 proteínas destas 38 foram significativas com valor de  $p < 0.05$ . No Gráfico 10, podemos observar que aproximadamente 3% das proteínas analisadas foram diferencialmente expressas, e no Gráfico 11 podemos observar que aproximadamente 61% das proteínas diferencialmente expressas estavam com baixa expressão comparado ao controle, e que os outros 39% estavam superexpressos. Olhando a tabela 7 podemos observar as 23 proteínas identificadas que estavam com baixa expressão e na tabela 8 as 15 que estavam superexpressas, assim como as informações de seus genes, foldchange (novamente para valores negativos de foldchange foi utilizada a formula  $[-1/x]$  sendo  $x$  = estimulado/controle) e valor de  $p$ . As proteínas marcadas com asterisco (\*) foram significativas após a correção para múltiplos testes. As duas proteínas significativas, CAP-2 (4.86 vezes) e a *Early endosome antigen 1* (7.92 vezes) estavam superexpressas.





**Gráfico 30.** Porcentagem de proteínas diferencialmente expressa na porção dorsal do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.



**Gráfico 31.** Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.

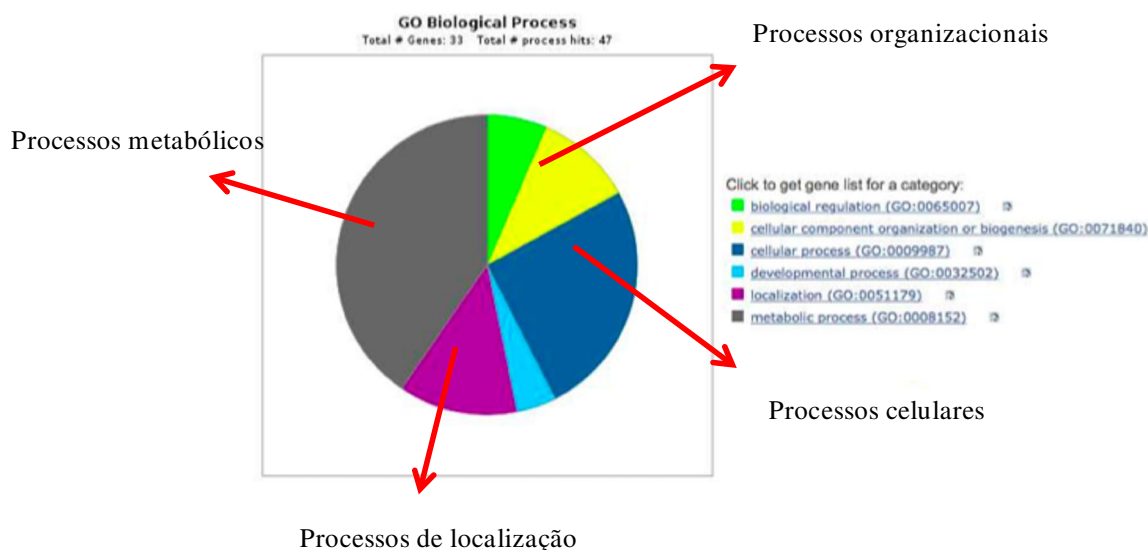
Nome	Número de Acesso	p-Value	Foldchange (-1/ x)	Gene	%Cobertura	Min.Pep
rCG44996	gi  149028177	0.002	-1902552.1	+	9	2
Protein IMPACT	gi  81862081	0.0064	-3.468057873	Impact	24.3	4
Beta-soluble NSF attachment protein	gi  300794871	0.0075	-1.794926074	Napb	43	7
Dynamin-1	gi  190358918	0.01	-1.721396253	Dnm1	26.5	17
ADP-ribosylation factor 3	gi  47117640	0.011	-1.901382073	Arf3	68.5	8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	gi  157822175	0.015	-12.69797135	Ndufb10	22.2	3
Transcription elongation factor A protein-like 3	gi  672032584	0.016	-8.197069345	LOC102548 415	20.1	2
Amphiphysin	gi  14916529	0.017	-2.555226317	Amph	14.6	6
Transcription elongation factor A protein-like 5	gi  672088350	0.021	-1448754.628	Tceal5	24	5
Methionine--tRNA ligase cytoplasmic	gi  189083764	0.023	-5.362928386	Mars	5.76	2
Endophilin-A1	gi  160406738	0.024	-3.677235321	Sh3gl2	18.5	4
Reticulocalbin 2	gi  149041736	0.025	-229994.4312	Rcn2	10	2
Alpha-internexin	gi  1703221	0.026	-2.856254912	Ina	28.3	9
Gamma-soluble NSF attachment protein	gi  564393741	0.028	-8.488564803	Napg	13.1	3
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-Sprotein 3	gi  149022594	0.033	-7.479994234	Ndufs3	17.7	4
Septin 6	gi  149033860	0.034	-1.861629779	6-Sep	15.4	4
RuvB-like 1	gi  38605681	0.034	-2.871669916	Ruvbl1	7.46	2
CaM kinase-like vesicle-associated protein	gi  81910540	0.035	-2.430388016	Camkv	7.14	3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	gi  66773787	0.037	-5.058517958	Ppid	13	3
S-formylglutathione hydrolase	gi  193806001	0.038	-14.67321081	Esd	17.7	3
Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial	gi  81884378	0.039	-1.54874568	Uqcrc1	32.9	7
Peroxisome oxidoreductin-6	gi  5902791	0.039	-2.066904045	Prdx6	40.6	6
4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial	gi  122065191	0.042	-1.883316963	Abat	18.8	5

**Tabela 7.** Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).

Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange	Gene	%Coverage	M in. Pep.
Adenylyl cyclase-associated protein 2; Short=CAP 2*	gi  1705586	0.0022	4.86	Cap2	7.55	2
Early endosome antigen 1*	gi  157821387	0.0023	7.92	Eea1	3.47	2
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	gi  672055787	0.009	2.27	Dld	31.2	6
Similar to putative anion transporter	gi  149066618	0.0092	14.37	RGD1564851	1.14	1
Splicing factor 3A subunit 1	gi  157821905	0.021	19.10	Sf3a1	5.56	2
Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	gi  1352174	0.021	18.27	Cox6a1	26.1	1
Alpha-synuclein	gi  586065	0.025	3.07	Snca	44.3	6
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	gi  125285	0.031	1.70	Camk2a	28.7	7
Serine/arginine-rich splicing factor 1	gi  157818019	0.032	2.85	Srsf1	25.8	4
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	gi  564385071	0.035	12.20	Ugp2	3.62	1
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondria	gi  544415	0.043	4.77	Gpd2	2.48	2
60S acidic ribosomal protein P2	gi  133063	0.045	1.29	Rplp2	59.1	3
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	gi  672039752	0.046	3.81	Qpsf7	5.31	1
rCG50739, CRA_c	gi  149031922	0.047	2.31	+	37.5	3
Myotrophin	gi  51317410	0.047	2.70	Mtpn	43.2	4

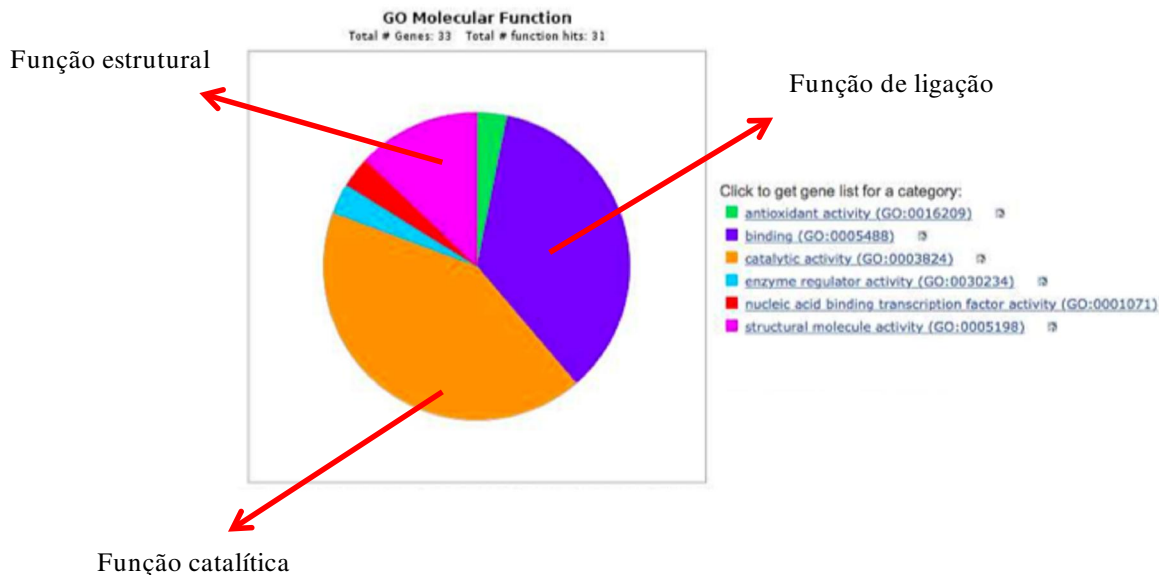
**Tabela 8. Proteínas diferencialmente expressas na região dorsal do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram superexpressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).**

Como resultado da análise dos processos biológicos envolvendo essas 38 proteínas diferencialmente expressas na região dorsal obtidas pela análise avTIC, nós temos 3 proteínas envolvidas com processos de regulação biológica, 6 componentes celulares ou de biogênese, 12 proteínas envolvidas com processos celulares, 2 com processos de desenvolvimento, 6 com localização e 19 envolvidas com processos metabólicos (Gráfico 12).



**Gráfico 32. Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas na porção dorsal do giro denteado, obtidas pela análise avTIC. Panther Classification System.**

E, neste caso, para as análises de função molecular nós temos, 1 proteína com função antioxidante, 11 proteínas com função de ligação, 13 com atividade catalítica, 1 com atividade reguladora de enzimas, 4 com atividade estrutural molecular e 1 relacionada a atividade de fatores de transcrição reguladas por ácidos nucleicos (Gráfico 13).

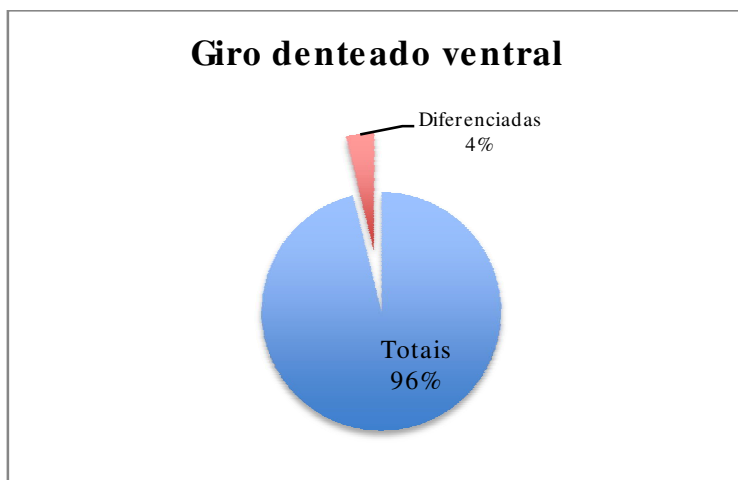


**Gráfico 33. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região dorsal do giro denteado identificadas pela análise avTIC. Panther Classification System.**

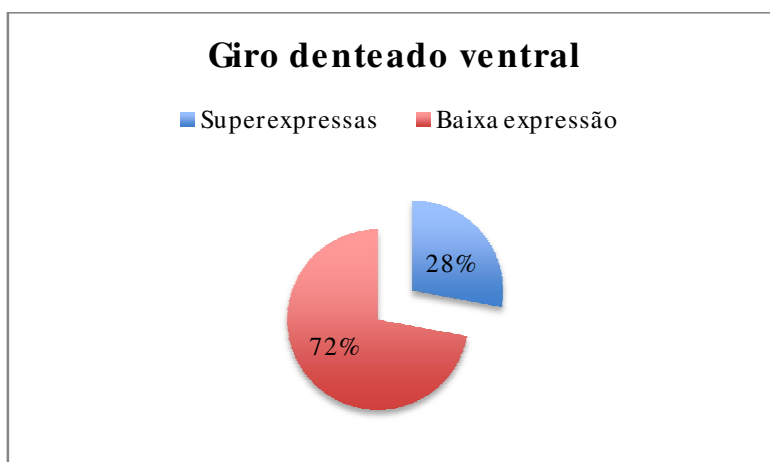
Análise comparativa da região ventral dos animais estimulados com a região ventral dos controles pela análise average tic (avTIC)

Nesta análise foram identificadas um total de 1271 proteínas. Destas, 44 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas pelo teste *t de Student*, quando comparadas com o controle. O teste *t de Student* foi escolhido neste caso pelo fato de o parâmetro quantitativo também se tratar da média da área sobre os picos dos espectros gerados no MS/MS. Destas 38, 3 proteínas foram significativas com valor de  $p < 0.05$ , após a realização da correção para múltiplos testes (FDR). No Gráfico 14, podemos observar que aproximadamente 4% das proteínas analisadas foram diferencialmente expressas, e no Gráfico 15 podemos observar que aproximadamente 72% das proteínas diferencialmente expressas estavam com baixa expressão comparado ao controle, e que os outros 28% estavam superexpressos. Na tabela 9 temos as 32 proteínas identificadas que apresentaram baixa expressão e na tabela 10 as 12 que apresentaram superexpressão, e suas respectivas informações tais como seus genes, foldchange (para valores negativos de foldchange foi utilizada a formula  $[-1/x]$

sendo x = estimulado/controle) e valor de p. As proteínas marcadas com asterisco (\*) foram significativas após a correção para múltiplos testes. As três proteínas significativas, a proteína Cadeia-A (foldchange 1.6) e a Subunidade  $\beta$ -2 da proteína G ligante de nucleotídeos (foldchange 2.44) estavam superexpressas enquanto a proteína Serina-tRNA ligase (foldchange -365632) estava com baixa expressão.



**Gráfico 34.** Porcentagem de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.



**Gráfico 35.** Porcentagem de proteínas superexpressas e com baixa expressão, com relação ao total de proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas a partir da análise avTIC.

Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange (-1/ x)	Gene	%Cobertura	M in. Pep.
Serine--tRNA ligase*	gi  564338360	0.00028	-365632.6631	Sars	6.16	2
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	gi  564398411	0.0014	-1.247563835	Uba1	21.5	14
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	gi  1352167	0.0023	-28211.93371	Cox5b	27.9	2
Actin-related protein 3	gi  81907889	0.008	-2.792212704	Actr3	22.5	6
Prostaglandin E synthase 3	gi  148841197	0.0081	-6.950971845	Ptges3	26.2	3
Visinin-like protein 1	gi  51338688	0.0087	-1.672727426	Vsnl1	27.7	4
60S acidic ribosomal protein P2	gi  133063	0.01	-3.477703515	Rplp2	67	4
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	gi  134625	0.011	-5.658424672	Sod1	42.2	6
AP-2 complex subunit mu	gi  51316971	0.011	-13.54143683	Ap2m1	10.1	4
Contactin-1; AltName Neural cell surface protein F3; Flags Precursor	gi  17432928	0.012	-2.198291637	Cntn1	14.4	9
cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	gi  672039752	0.015	0	Cpsf7	5.31	1
60S ribosomal protein L10	gi  50403574	0.016	-6.442430394	Rpl10	13.6	2
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	gi  81884209	0.018	-2.312227301	Ndufs1	20.9	10
Excitatory amino acid transporter 2 member 2	gi  417074	0.019	-5.412352324	Slc1a2	13.4	6
Lon protease homolog, mitochondrial	gi  81916424	0.022	-396853.8499	Lonp1	4.42	2
G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 isoform X1	gi  564319540	0.023	-28957.06883	Gprin1	9.2	3
Ca2+-dependent secretion activator	gi  149040049	0.026	-292179.7359	Cadps	2.62	2
Sideroflexin-1	gi  20139869	0.027	-3.756699348	Sfxn1	18.3	4
Eukaryotic initiation factor 4A-II	gi  564377367	0.031	-4.557910573	Eif4a2	20.1	5
Tripartite motif-containing protein 2	gi  157818847	0.031	-7.760543093	Trim2	6.44	3
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	gi  81884378	0.033	-1.559316602	Uqcrc1	32.9	7
Protein kinase C gamma type	gi  54037692	0.034	-8.613640402	Prkcg	4.88	2
F-actin-capping protein subunit alpha-2	gi  123780911	0.035	-2.629489698	Capza2	32.2	4
Amphiphysin	gi  14916529	0.036	-2.881415684	Amph	14.4	6
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	gi  158749584	0.037	-2.194191637	Sucla2	23.9	5
CaM kinase-like vesicle-associated protein	gi  81910540	0.038	-3.87861207	Camkv	7.14	3
AP-2 complex subunit alpha-2	gi  162138932	0.04	-3.491738363	Ap2a2	9.37	6
ATP-dependent RNA helicase A	gi  157821633	0.044	-3.466303189	Dhx9	7.42	5
Glutathione S-transferase Mu 5	gi  81917962	0.044	-6.916175831	Gstm5	18.7	2
Adenylate kinase isoenzyme 5	gi  157822279	0.045	-3.537273616	LOC365985	7.47	3
Drebrin	gi  2498314	0.047	-2.103303387	Dbrn1	13.4	5
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	gi  68051964	0.047	-2.41085435	Idh3B	28.1	5
Toll interacting protein	gi  149061685	0.047	-9.861350169	Tollip	25.6	3

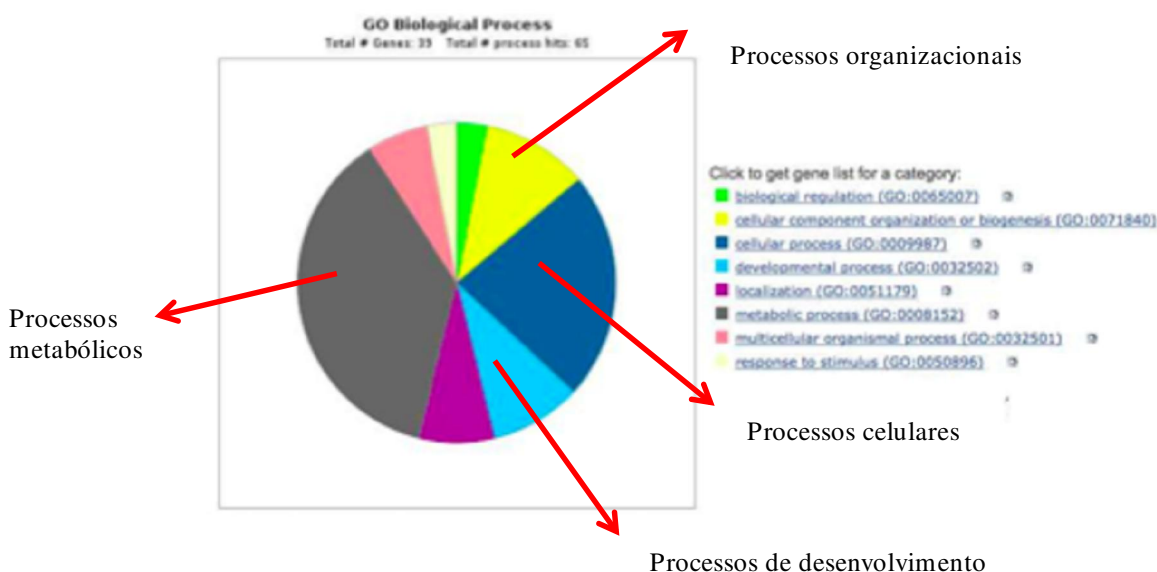
**Tabela 9. Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram baixa expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).**

Nome	Número de Acesso	p-value	Foldchange	Gene	%Cobertura	Min. Pep.
Chain A, Revised Structure Of The Munc18a-Syntaxin1 Complex*	gi  170785225	0.00097	1.604904428	+	26.2	7
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2*	gi  51338712	0.0011	2.445883567	Gnb2	40.9	5
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	gi  134678	0.0048	3.108876455	Sod2	22.5	3
Annexin A3	gi  122065130	0.01	2.81578727	Anxa3	27.5	7
Vimentin	gi  149021114	0.013	3.676978794	Vim	52.8	17
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M a	gi  158186698	0.014	2.029366946	Hnrnp	26.5	6
Lamin A	gi  149048131	0.016	2.416260479	Lmna	11.5	4
Chain B, Crystal Structure Of The Beta2 Adrenergic Receptor-Gs Protein Complex	gi  340780680	0.017	1.972971945	+	55.3	12
Transcriptional activator protein Pur-beta	gi  81863556	0.019	2.865203611	Purb	36.8	6
rOG32122	gi  149042824	0.04	6.90783239		8.47	2
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	gi  157822175	0.041	4.357591397	Ndufb10	23.9	3
Endoplasmin	gi  205716800	0.043	1.864606811	Hsp90b1	24.4	13
rOG26771	gi  149022783	0.05	2.588669799	+	11.7	4

**Tabela 10.** Proteínas diferencialmente expressas na região ventral do giro denteado de animais estimulados, obtidas através da análise de avTIC. Tabela mostra proteínas que apresentaram super expressão. \* proteínas significantes após correção por FDR. Gene com + não possuem uma denominação no banco de dados (NCBI).

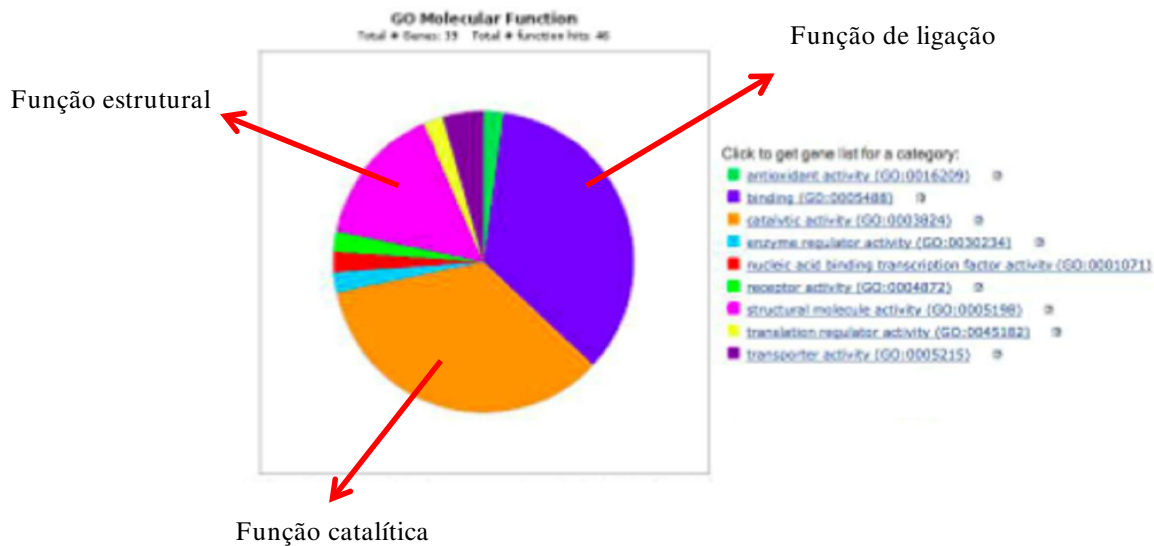


Os dados obtidos da análise dos processos biológicos envolvendo essas 44 proteínas diferencialmente expressas na região ventral a partir da análise avTIC, foram: 2 proteínas envolvidas com processos de regulação biológica, 7 componentes celulares ou de biogênese, 15 proteínas envolvidas com processos celulares, 6 com processos de desenvolvimento, 5 com localização, 24 envolvidas com processos metabólicos, 4 com processos de organismos multicelulares e 2 com resposta a estímulos (Gráfico 16).



**Gráfico 36. Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas na porção ventral do giro denteado, obtidas pela análise avTIC. Panther Classification System.**

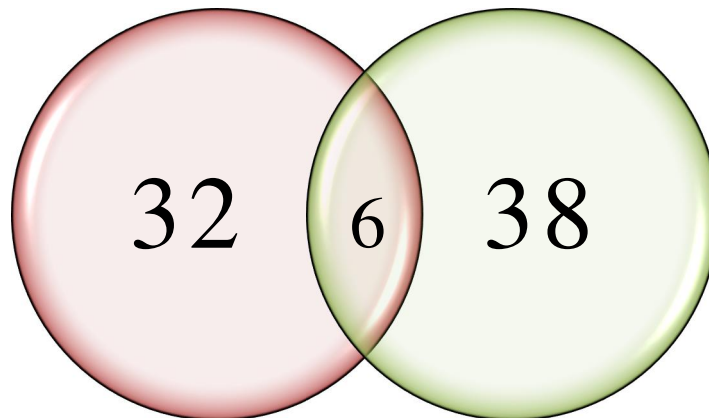
E para as análises de função molecular nós temos 1 proteína com função antioxidante, 16 proteínas com função de ligação, 16 com atividade catalítica, 1 com atividade reguladora de enzimas, 7 com atividade estrutural molecular, 1 relacionada a atividade de fatores de transcrição reguladas por ácidos nucleicos, 1 atividade de receptores, 1 relacionada a tradução proteica e 2 relacionadas a transporte (Gráfico 17).



**Gráfico 37. Funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas da região ventral do giro denteado identificadas pela análise avTIC. Panther Classification System.**

### Análise comparativa das proteínas diferencialmente expressas encontradas na região Dorsal e Ventral obtidas por avTIC

Comparando os dados obtidos nas análises de dorsal e ventral identificadas pela análise avTIC, o gráfico 18 nos mostra que 6 proteínas das diferencialmente expressas estão presentes em ambas as regiões. Sendo assim, 32 proteínas diferencialmente expressas foram exclusivas da região dorsal do giro denteado e 38 proteínas foram exclusivas da região ventral.



**Gráfico 38. Diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum entre as regiões dorsal e ventral do giro denteado, obtidas pela análise de avTIC. Vermelho representa a região dorsal e verde representa a região ventral.**

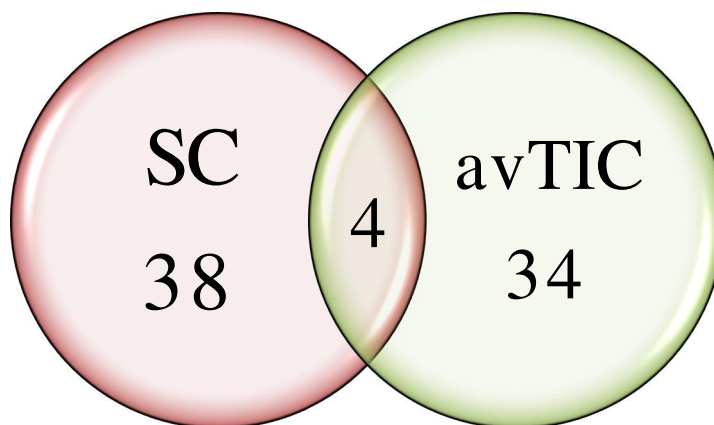
Enquanto isso, na tabela 11, podemos observar que dentre essas 6 proteínas comuns algumas não apresentaram o mesmo padrão de expressão, como é o caso do subcomplexo  $\beta$  NADH dehydrogenase que apresentou uma baixa expressão na região dorsal e superexpressão na ventral. Já a 60S P2 ribossomal também apresentou baixa expressão na região dorsal e alta expressão na ventral.

Nome	Numero de Acesso	p-value dGD	p-value vGD	Foldchange dGD	Foldchange vGD	Gene	Expressão dGD/ vGD
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	gil 157822175	0.015	0.018	-24.39	4.35	Ndubf10	
Amphiphysin	gil 14916529	0.017	0.036	-2.55	-2.88	Amph	
CaM kinase-like vesicle-associated protein	gil 81910540	0.035	0.038	-2.43	-3.87	Camkv	
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	gil 81884378	0.039	0.033	-1.54	-1.55	Uqcrc1	
60S acidic ribosomal protein P2	gil 133063	0.045	0.01	1.28	-3.47	Pplp2	
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 isoform X2	gil 672039752	0.046	0.015	3.81	0.00	Cpst7	

**Tabela 11. Proteínas diferencialmente expressas comuns nas regiões dorsal e ventral do giro denteado, identificadas através da análise avTIC. Valores negativos de foldchange foram obtidos usando a formula  $(-1/x)$  onde  $x$  = estimulado/ controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão e azuis aumento**

## Análise comparativa das proteínas diferencialmente expressas encontradas através da análise SC e avTIC para a região dorsal

Comparando os dados obtidos através dos dois tipos diferentes de análises, Spectral Counting (SC) e Average TIC (avTIC) obtivemos que das 42 proteínas diferencialmente expressas encontradas pela análise SC, 4 proteínas foram também identificadas dentre as 38 diferencialmente expressas obtidas pela análise avTIC (Gráfico 19).



**Gráfico 39. Diagrama de Venn mostrando as proteínas diferencialmente expressas obtidas pelos dois métodos de análise na região dorsal do giro dentado.**

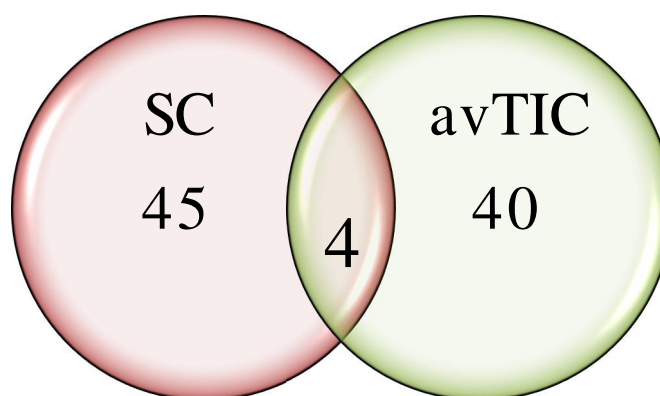
Na tabela 12, esta representado as 4 proteínas em comuns encontradas em ambas as análises e suas respectivas expressões. Podemos observar que todas apresentaram o mesmo padrão de expressão, que neste caso foi de baixa expressão.

Nome	Numero de Acesso	Foldchange avTIC	Foldchange SC	Gene	Expressão avTIC/ SC	
Transcription elongation factor A protein-like 5	gi  672088350	-1448754.63	-3.25	Tceal5	<div></div>	<div></div>
Alpha-internexin	gi  1703221	-2.86	-2.25	Ina	<div></div>	<div></div>
Gamma-soluble NSF attachment protein	gi  564393741	-8.49	-6.75	Napg	<div></div>	<div></div>
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex	gi  157822175	-12.70	-7.5	Ndufb10	<div></div>	<div></div>

**Tabela 12. Proteínas encontradas em ambas as análises, SC e avTIC. Valores negativos para foldchange foram obtidos utilizando  $(-1/x)$  onde  $x$  = estimulado/ controle. Barras vermelhas indicam baixa expressão.**









Análise comparativa das proteínas diferencialmente expressas encontradas através da análise SC e avTIC para a região ventral

Com relação aos dados obtidos através dos dois tipos diferentes de análises, Spectral Counting (SC) e Average TIC (avTIC) para a região ventral, nos obtivemos que das 44 proteínas diferencialmente expressas encontradas pela análise avTIC, 2 proteínas também foram identificadas dentre as 49 diferencialmente expressas obtidas pela análise SC (Gráfico 20).



**Gráfico 40. Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em ambos os tipos de análise, SC e avTIC, para a região ventral do giro denteado.**

Na tabela 13, estão representadas as 4 proteínas encontradas em ambas as análises e suas respectivas expressões e informações. Mais uma vez, as proteínas apresentaram o mesmo padrão de expressão, que neste caso apenas para a Vimentina houve um aumento de expressão.

Nome	Numero de Acesso	Foldchange SC (-1/ x)	Foldchange avTIC	Gene	Expressão SC/ avTIC	
AP-2 complex subunit mu	gi  51316971	-7.57	-13.54	Ap2m1		
Excitatory amino acid transporter 2member 2	gi  417074	-4	-5.41	Sc1a2		
Ca2+-dependent secretion activator	gi  149040049	-1.75	-292179.7359	Cadps		
Vimentin	gi  149021114	3.5	3.676978794	Vim		

**Tabela 13. Proteínas encontradas em ambas as análises, avTIC e SC para a região ventral do giro denteado. Barras vermelhas representam baixa expressão e barras azuis representam aumento de expressão.**

## Análise das vias biológicas enriquecidas contendo as proteínas diferencialmente expressas

Para analisarmos as vias de sinalização e processos biológicos que apresentaram componentes enriquecidos em nosso conjunto de dados utilizamos o software Metacore (Thomas-Reuter) a fim de obtermos as principais vias enriquecidas em que essas proteínas alteradas pudessem estar envolvidas

### Análise por Spectral Counting

As principais vias e processos biológicos enriquecidos que apresentaram proteínas diferencialmente expressas para o GD dorsal e GD ventral estão representados na tabela 14.

<i>Vias enriquecidas na região dorsal e ventral de animais estimulados com relação aos controles, utilizando a análise SC</i>	
Neurofilamentos: criticamente envolvida com o controle da forma celular e com a força mecânica intracelular.	Glial fibrillary acidic protein, Vimentin, alpha-interneixin
Via do desenvolvimento neural: via de diferenciação de células tronco em células neurais e da glia.	Vimentina, Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2, Glial fibrillary acidic protein,
Diferenciação de astrocitos: via de regulação do desenvolvimento de astrocitos	Glial fibrillary acidic protein, Vimentin,

**Tabela 14. Vias biológicas enriquecidas e suas respectivas proteínas diferencialmente expressas. Dados obtidos pela análise de SC. Azul, baixa expressão; Vermelho, superexpressão.**

### Análise por average TIC

As vias mais enriquecidas encontradas com as proteínas diferencialmente expressas obtidas pela análise por avTIC, foram distintas para a porção dorsal do GD e para a porção ventral do GD, e podem ser observadas na tabela 15.

<i>Vias enriquecidas na região dorsal de animais estimulados com relação aos controles, utilizando a análise avTIC</i>	
Via de fusão e reciclagem de vesículas sinápticas: importante mecanismo na regulação de funções sinápticas.	

	<p>Dynamin-1, Amphiphysin, Endophilin-A1, Alpha-synuclein</p>
<p>Fosforilação Oxidativa: via metabólica onde as mitocôndrias usam a energia liberada pela oxidação de nutrientes para formar ATP.</p>	<p>Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta sub complex subunit 10, NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial</p>
<p><i>Vias enriquecidas na região ventral de animais estimulados comparados aos controles, utilizando a análise avTIC.</i></p>	
<p>Via constitutiva e atividade dependente sináptica de receptores AMPA: um dos dois tipos de via de tráfego de receptores AMPA. Responsável pelo fortalecimento sináptico e formação inicial de novas memórias.</p>	<p>AP-2 complex subunit alpha-2, AP-2 complex subunit mu, Protein kinase C gamma, Actin-related protein 3</p>



Complexo motor dineína-dinactina no transporte axonal em neurônios: transporte axonal de organelas, vesículas e proteínas em neurônios.	F-actin-capping protein subunit alpha-2, Vimentin
---	--

**Tabela 15. Vias biológicas enriquecidas e suas respectivas proteínas diferencialmente expressas. Dados obtidos pela análise de avTIC. Azul, baixa expressão; Vermelho, super expressão.**

## DISCUSSÃO

### Análise por Spectral Counting

Considerando as proteínas diferencialmente expressas encontradas pela análise de SC, duas delas estavam superexpressas tanto no GD dorsal como GD ventral, GFAP e Vimentina, assim como estão presentes em todas as vias enriquecidas encontradas. A mudança na expressão dessas proteínas indicam um ativo processo de astrogliose e dano tecidual. Astrogliose é um aumento anormal no número de astrócitos causado pela morte de neurônios no SNC devido a algum tipo de dano (Gordon et al., 2007). Os astrócitos podem sofrer mudanças que podem alterar suas atividades gerando assim neuroproteção e reparo, cicatriz ou até a regulação de processos inflamatórios no SNC (Fawcett et al., 1999). Contudo, a astrogliose característica da epilepsia e de outras doenças neurodegenerativas, apresenta astrócitos com morfologia alterada e superexpressão da proteína GFAP (Guerreiro et al., 2003; Margakis e Rothstein, 2006). Portanto, este aumento observado nessas proteínas estruturais provavelmente foi induzido pela morte neuronal resultado da estimulação elétrica do modelo, nos levando a supor que estes dados são uma consequência do processo epileptogênico nesses animais.

Também foi observado uma diminuição na expressão da subunidade  $\alpha 3$  da ATPase da bomba sódio/potássio exclusivamente na porção ventral do GD dos ratos estimulados. Paciorkowski e colaboradores em 2015 reportaram dois casos severos e independentes de epilepsia da infância os quais apresentavam mutações no gene ATP1A3, as quais não estavam presentes nos pais. Além disso, os autores demonstraram que estas mutações resultaram em perda de função dessa proteína e morte celular. O gene ATP1A3 codifica a subunidade  $\alpha 3$  da bomba de sódio/ potássio (Figura 3) e é responsável pela quebra de ATP utilizada por ela (Vaillend et al., 2002; Dobretsov et al., 2005). Trata-se de uma

proteína muito sensível a variações funcionais, resultando na observação de que pacientes com tais mutações podem vir a desenvolver doenças severas (Heinzen et al., 2014). Sendo assim, a redução na expressão da subunidade  $\alpha 3$  da ATPase da bomba sódio/potássio observada em nossos dados, pode indicar mudanças na função da bomba sódio/potássio que poderiam prejudicar a homeostase dos íons resultando em mudanças na excitabilidade elétrica do GD ventral. Esse processo poderia estar envolvido de alguma forma com os processos de causa na epileptogênese do modelo de estimulação elétrica da via perforante.

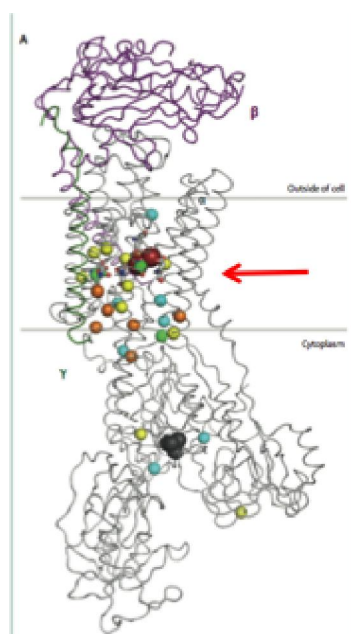


Figura 3. Estrutura da ATP-sintase da bomba sódio/ potássio. Heinzen et al., 2014.

Além disso, foi observado uma diminuição na expressão da proteína Brevican tanto na região dorsal como na região ventral do GD. Zarnecnik e colaboradores (2012) analisaram tecidos de pacientes com displasia cortical focal (FCD) e observaram que há uma diminuição na presença dessa proteína nos tecidos de paciente com displasia cortical focal do tipo II. A Displasia Cortical Focal (FCD) é uma desordem cerebral resultante do desenvolvimento anormal dos

neurônios do córtex cerebral, e é uma das maiores causas de epilepsia refratária (Marin-Valencia et al., 2014). A Brevican é um dos componentes mais proeminentes da matriz extracelular, e sua porção N-terminal se liga ao ácido hialurônico responsável pela organização da matriz (Figura 4). Sabe-se que clivagens proteolíticas podem separar suas porções N e C terminais e assim implicar em defeitos na integridade e nas características biofísicas da matriz (Seidenbecher et al., 2002). A hipótese levantada pelos autores deste trabalho diz que essas mudanças podem alterar o volume da transmissão do meio extracelular levando a uma maior exposição do tecido a substâncias excitatórias como glutamato e potássio, e assim se tornaria um fator na contribuição do processo epileptogênico (Zarnecki 2012). Considerando assim que nossos dados mostraram diminuição significativa na expressão dessa proteína, nós podemos supor que esse também seria um importante processo de causa da epileptogênese no modelo estudado, uma vez que a falta desta proteína estaria causando uma desestabilização da matriz extracelular e levando o tecido a ficar mais exposto a atividades excitatórias, como já dito anteriormente.

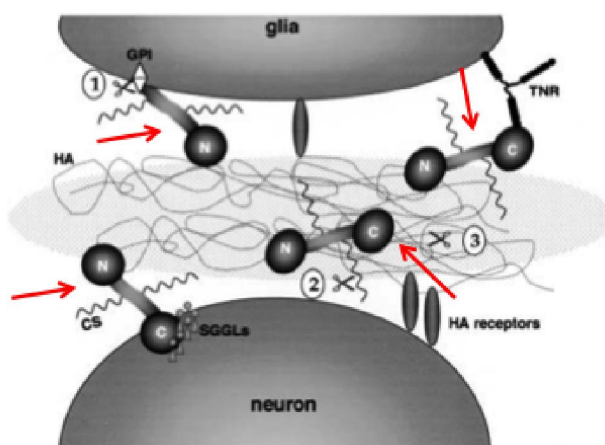


Figura 4. Esquema mostra a proteína brevican (setas) na matriz extracelular. Seidenbecher et al., 2002.

## Análise por avTIC

- Fusão e Reciclagem de Vesículas

A proteína *Amphiphysin I* nos nossos dados estava 2.88 vezes menos expressa com relação ao controle, assim como as proteínas dinamina e endofilina estavam com expressão reduzida. Já a proteína  $\alpha$ -sinucleína apresentou aumento de expressão. A *Amphiphysin I* é conhecida como ligante da dinamina e possui papel importante na endocitose mediada por clatrina de vesículas sinápticas. Essa proteína media a invaginação e fissão de vesículas sinápticas e estimula a atividade de GTPase da dinamina (De Camilli et al., 1993). Sob condições fisiológicas normais, a *Amphiphysin I* e algumas outras proteínas endocíticas são conhecidas por serem reguladas por fosforilação. Já durante condições de hiperexcitabilidade, dados recentes mostram que a *Amphiphysin I* é truncada pela protease calpaína diante de altas estimulações por potássio no hipocampo (Ramjaun et al., 1997; Wigge et al., 1997). Isto sugere que a *Amphiphysin I* tenha um importante papel regulador da endocitose de vesículas sinápticas em doenças neurodegenerativas como epilepsia, AVC, Alzheimer, etc. (Wu et al., 2009).

Estudos mostraram que camundongos *Knockout* para *Amphiphysin I* eram mais susceptíveis a crises epiléticas e apresentavam viabilidade reduzida (Di Paolo et al., 2002) sugerindo assim um envolvimento desta proteína no mecanismo de prevenção da hiperexcitação neuronal, levando os autores a sugerirem um papel neuroprotetor para a *Amphiphysin I* quando clivada pela calpaína, uma vez que essa inibe o processo de endocitose (Wu et al., 2007).

Considerando o acima exposto, podemos sugerir que esta proteína esteja sendo clivada numa tentativa de compensação da hiperexcitabilidade causada pela indução da epilepsia no modelo da estimulação elétrica da via perfurante, sendo assim esse resultado seria uma consequência ao processo epileptogênico.

Analizando ainda as proteínas presentes nessa via, podemos observar que a dinamina 1 apresentou uma diminuição na expressão de 1.7 vezes. Mecanismos associados com essa proteína tem sido sugeridos como um possível alvo para novas drogas antiepilépticas, uma vez que foi demonstrado que a inibição da ligação entre a dinamina e a sindapina gera uma diminuição na transmissão sináptica (Anggono et al., 2006). Sugeriu-se então que essa abordagem possa inibir seletivamente o disparo neuronal que ocorre durante as crises epilépticas enquanto permite que a neurotransmissão ocorra normalmente (Anggono et al., 2006). Sendo assim, podemos supor que essa diminuição seja uma forma de resposta ao processo epileptogênico que esta sendo induzido, a fim de amenizar o desequilíbrio na neurotransmissão.

Já a respeito do aumento na expressão da  $\alpha$ -sinucleína (3.04), é sabido que a ELTM é caracterizada pelo depósito anormal dessa proteína no giro denteado (Li et al., 2010) e recentemente foi demonstrado que o aumento dessa proteína no soro sanguíneo e no CSF de pacientes com epilepsias intratáveis pode ser usado como potencial biomarcador para facilitar o diagnóstico desse tipo de epilepsia (Hu et al., 2015). Dessa forma, o aumento observado nos nossos dados estaria condizente com esses estudos, indicando assim um caminho a se aprofundar na busca de mais informações sobre o processo epileptogênico.

- Fosforilação Oxidativa

Podemos observar em nossos dados que na região dorsal do GD uma das principais vias enriquecidas foi a via da Fosforilação Oxidativa onde 4 proteínas estavam diferencialmente expressas (NDUFB10, COX6A1, NDUFS3, UQCRC1), e, dentre elas 3 estavam com baixa expressão (NDUFB10 [-12.7], NDUFS3 [-7.4], UQCRC1 [-1.54]).

A fosforilação Oxidativa mitocondrial é responsável pela maior fonte de ATP nos neurônios (Kalckar, 1974; Filosto et al., 2011). Defeitos na fosforilação oxidativa no sistema nervoso central são característicos de encefalopatias

mitocondriais, e em uma grande variedade dessas doenças, crises epiléticas podem ser observadas (Kunz et al., 2002). Em pacientes com esclerose hipocampal, patologias ultra estruturais mitocondriais foram descritas como uma característica dos neurônios hilares, presentes no giro denteado (Kudin et al., 1999; Kunz et al., 1999). Além das alterações no substrato de oxidação mitocondrial e na síntese de ATP causadas por mutações, também a inibição parcial de enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, tais como citocromo c oxidase, podem gerar crises epiléticas (Kunz et al., 2000; Kudin et al., 2002). A combinação direta observada de defeitos da função mitocondrial e o aumento da excitabilidade neuronal gera uma diminuição intracelular dos níveis de ATP e alterações na homeostase de cálcio neuronal (Kudin et al., 2002). Como a fosforilação oxidativa mitocondrial é a maior fonte de ATP nos neurônios isso leva essa via de produção energética também a ser responsável pela manutenção adequada dos níveis de ATP que mantém o potencial de membrana via a ATPase da bomba sódio/potássio, que consome cerca de 40% da energia total (Varlamov et al., 2002; Kudin et al., 2002). Posto isso, as proteínas com expressão diminuída, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta sub complex subunit 10, NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, Cytochrome b-c1 são enzimas do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial o qual participa da transferência de elétrons do NADH para a cadeia respiratória (Murray et al., 2011). Já a proteína Cytochrome c oxidase subunit 6A1 é uma subunidade do Complexo IV, responsável por acoplar a transferência de elétrons a espécies moleculares de oxigênio contribuindo assim para o gradiente eletroquímico na produção de ATP (Wong-Riley M, et al., 2000). Sendo assim, podemos supor que essa redução na expressão dessas proteínas seja consequência de uma redução no metabolismo devido a morte celular, podendo vir a ser um importante aspecto para a epileptogênese desses animais.

- Receptores AMPA

As proteínas AP2A2 (-3.4), AP2M1 (-13.5), PKCG (-8.6) e ACTR3 (-2.8) apresentaram redução de expressão quando comparadas aos controles, indicando assim a via enriquecida de receptores AMPA.

Receptores AMPA são receptores de glutamato e canais de cátions que são relacionados a plasticidade e transmissão sináptica em muitas membranas pós-sinápticas (Mayer, 2005). Mediam atividade excitatória rápida dentro e entre as regiões do cérebro relevantes para a epilepsia (Rogawski, 2013). Esses receptores estão em constante movimento para dentro e fora da membrana plasmática, sendo endocitado, reciclado e reinserido (Fleming and England, 2010; Anggogo and Hugarir, 2012). Os receptores AMPA são críticos para a sincronização e geração de descargas epiléticas em epilepsias humanas (Rogawski, 2013). Considerando assim os dados aqui apresentados, a região ventral do GD apresentou a via sináptica de receptores AMPA alterada, e suas 4 proteínas diferencialmente expressas apresentaram uma diminuição na expressão. Essas proteínas são componentes de complexos envolvidos com o transporte de proteínas e formação de vesículas (Owen et al., 2004; Nakatsu e Ohno, 2003), participando assim de processos de endocitose e transporte vesiculares (Owen et al., 2004). Podemos então supor que a falta dessas proteínas possa estar prejudicando o processo de reciclagem dos receptores AMPA, levando assim a um atraso na sincronização de descargas epiléticas no modelo. No entanto, como não foi identificado nenhum receptor ou proteína específica dessa via, e considerando o fato de que as proteínas alteradas encontradas fazem parte do processo de endocitose, nós não podemos afirmar que esta via realmente esteja alterada uma vez que tais proteínas podem fazer parte de outras vias dependentes de endocitose.



## CONCLUSÃO

Considerando os dados aqui apresentados, concluímos que o uso dos dois tipos de análise quantitativa nos permitiu ter uma visão mais abrangente dos processos biológicos que possam estar ocorrendo no modelo. Também concluímos que as regiões dorsal e ventral do giro denteado apresentam padrões de expressão proteico diferentes nos animais epiléticos estimulados. As principais vias biológicas alteradas obtidas através do nosso estudo foram: processo de astrogliose (consequência), ATP1A3 (causa), Brevican (causa), fusão e reciclagem de vesículas (consequência); fosforilação oxidativa (consequência) e de receptores AMPA (causa ou consequência). E isso nos levou a inferir que o processo epileptogênico no modelo de estimulação elétrica da via perfurante pode estar envolvido com vias biológicas como fosforilação oxidativa, receptores AMPA, com processos de endocitose e componentes estruturais.

## REFERÊNCIAS

- Andersen, P., Holmqvist, B. and Voorhoeve, P.E. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol Scand*, 1966.
- Anggogo, V., Huganir, R.L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neuro-biol*, 2012.
- Anggono, V., Smillie, K.J., Graham, M.E., Valora, V.A., Cousin, M.A., Robinson, P.J. Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat neurosc*, 2006.
- Asara, J.M., Christofk, H.R., Freemark, L.M., Cantley, L.C. A label-free quantification method by MS/ MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics*, 2008.
- Avanzini, G., Vergnes, M., Spreafico, R., Marescaux, C. Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats. *Epilepsia*, 1993.
- Babb, T. L. *et al*. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 1984.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anall bioanall chem*, 2007.
- Beck, H., Blumcke, I., Kral, T., Clusmann, H., Schramm, J., Wiestler, O.D., Heinemann, U., Elger, C.E. Properties of a delayed rectifier potassium current in dentate cells isolated from the hippocampus of patients with chronical lobe epilepsy. *Epilepsia*, 1996.
- Biagini, G., Baldelli, E., Longo, D., Contri, M.B., Guerrini, U., Sironi, L., Gelosa, P., Zini, I., Ragsdale, D.S., Avoli, M. Proepileptic influence of a focal vascular lesion affecting entorhinal cortex-CA3 connections after status epilepticus. *J Neuropathol*

exp neurol, 2008.

Blumcke, I., Beck, H., Lie, A.A. and Wiestler, O.D. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy res*, 1999.

Blumcke, I., Pauli, E., Clusmann, H., Schramm, J., Becker, A., Elger, C., Merschhemke, M., Meencke, H.J., Lehmann, T., von Deimling, A., Scheiwe, C., Zentner, J., Volk, B., Romstock, J., Stefan, H., Hildebrandt, M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 2007.

Blumcke, I., et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 2013.

Borges, M.A., Min, L.L., Guerreiro, C.A., Yacubian, E.M., Cordeiro, J.A., Tognola, W.A., Borges, A.P., Zanetta, D.M. Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, 2004.

Bragdon, A. C., Taylor, D. M., Wilson, W. A. Potassium-induced epileptiform activity in area CA3 varies markedly along the septotemporal axis of the rat hippocampus. *Brain Res*, 1986.

Briellmann, R.S., Berkovic, S.F., Syngienotis, A., King, M.A., Jackson, G.D. Seizure-associated hippocampal volume loss: a longitudinal magnetic resonance study of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 2002.

Bruton C.J. The neuropathology of temporal lobe epilepsy. In Russel G, Marley E, Williams P (Eds) *Maudsley monographs. Oxford University Press*, London, 1988.

Bumanglag, A.V., Sloviter, R.S. Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *J Comp Neurol*, 2008.

Buzsáki, G., Moser, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neurosci*, 2013.

Cadotte, A.J., Mareci, T.H., DeMarse, T.B., Parekh, M.B., Rajagovindan, R., Ditto, W.L., Talathi, S.S., Hwang, D.U., Carney, P.R. Temporal lobe epilepsy: anatomical and effective connectivity. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, 2009.

Canteras, N., Swanson, L. W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHA-L anterograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol*, 1992.

Cavalheiro, E.A., Riche, D.A., Le Gal La Salle, G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr clin neurophysiol*, 1982.

Cavazos, J.E., Sutula, T.P. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain*, 1990.

Clifford, D.B., Olney, J.W., Maniotis, A., Collins, R.C., Zorumski, C.F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 1987.

De Camilli, P., Thomas, A., Cofield, R., Folli, F., Lichte, B., Piccolo, G., Meinck, H.M., Austoni, M., Fassetta, G., Bottazzo, G., Bates, D., Cartlidge, N., Solimena, M., W. Kilimann M. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med*, 1993.

Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M.R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B.J., Flavell, R., Picciotto, M.R., Ryan, T.A., Cremona, O., De Camilli, P. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron*, 2002.

Dobretsov, M., Stimers, J.R. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci*, 2005.

Dong, H. W., Swanson, L. W., Chen, L., Faselow, M. S., Toga, A. W. Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc.*

Natl Acad Sci USA, 2009.

Elul, R. Regional differences in the hippocampus of the cat. I. Specific discharge patterns of the dorsal and ventral hippocampus and their role in generalized seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1964.

Engel J. Jr.*et al.* Presurgical evaluation for partial epilepsy: relative contributions of chronic depth- electrode recordings versus FDG-PET and scalp- sphenoidal ictal EEG. *Neurology*, 1990.

Engel, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 1996. Review.

Fabene, P.F., Marzola, P., Sbarbati, A., Bentivoglio, M. Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps, and direct correlation with tissue and cell damage. *Neuroimage*, 2003.

Fabene, P.F., Merigo, F., Galiè, M., Benati, D., Bernardi, P., Farace, P., Nicolato, E., Marzola, P., Sbarbati A. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms. *PLoS One*, 2007.

Fawcett, J.W., Asher, R.A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain res bul*, 1999.

Filosto, M., Scarpelli, M., Cotelli, M.S. *et al.* The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *J neurol*, 2011.

Fleming, J.J., England, P.M. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nat Chem Biol*, 2010.

Freundi, D.M., Prenni, J.E. Improved detection of quantitative differences using a combination of spectral counting and MS/MS Total Ion Current. *J Proteome Res*. 2013.

Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., Fukata, M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*, 2006.

Hu, R., Luo, J., Wang, W., Wang, X., Xi, Z. Alpha-synuclein is a potential biomarker in the serum and CSF of patients with intractable epilepsy. *Seizures*, 2015.

Going, J.J., Lamb, R.F. Practical histological microdissection for PCR analysis. *J Pathol*, 1996.

Gordon, G.R.J., Mulligan, S.J., MacVicar, B. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 2007.

Gorter J.A., Goncalves Pereira P.M., van Vliet E.A., Aronica E., Lopes da Silva F.H., Lucassen P.J. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia*, 2003.

Graeme I. Murray. An overview of laser microdissection Technologies. *Acta histochemica*, 2007.

Gray, J. A., McNaughton, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo- Hippocampal System(Oxford Univ. Press,1982).

Guerreiro, C.A.M., Guerreiro, M.M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. Considerações Gerais. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I (eds). *Epilepsia*, segunda edição, Lemos Editorial, São Paulo, 2000: pp 1-10.

Guerreiro, M.,M., Quesney, L.F., Salanova, V., Snipes, G.J. Continuous electrocortigram epileptiforme discharges due to brain gliosis. *J clin neurophysiol*, 2003.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology*, 1999.

Harvey, B.D., Sloviter, R.S. Hippocampal granule cell activity and c-Fos expression during spontaneous seizures in awake, chronically epileptic, pilocarpine-treated rats: implications for hippocampal epileptogenesis. *J Comp Neurol*, 2006.

Hauser, W. A. et al. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. Mayo Clin., 1996.

Heinzen, E.L., Arzimanoglou, A., Brashear, A., Clapcote, S.J., Gurrieri, F., Goldstein, D.B., Jóhannesson, S.H., Mikati, M.A., Neville, B., Nicole, S., Ozelius, L.J., Poulsen, H., Schyngs, T., Sweadner, K.J., van den Maagdenberg, A., Vilsen, B. ATP1A3 Working Group. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. Lancet Neurol. 2014.

Hernandez, S., Lloreta, J. Manual versus laser microdissection in molecular biology. Ultrastruct Pathol, 2006.

Isokawa, M. Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. Brain Res, 1997.

Kalckar, H. Origins of the concept oxidative phosphorylation. Mol cell biochem, 1974.

Kawahara, R., Lima, R.N., Domingues, R.R., Pauletti, B.A., Meirelles, G.V., Assis, M., Figueira, A.C., Paes Leme, A.F. Deciphering the role of the ADAM17-dependent secretome in cell signaling. J Proteome Res, 2014.

Kälviäinen, R., Salmenperä, T., Partanen, K., Vainio, P., Riekkinen, P., Pitkänen, A. Recurrent seizures may cause hippocampal damage in temporal lobe epilepsy. Neurology, 1998.

Kobayashi, E., D'Agostino, M.D., Lopes-Cendes, I., Andermann, E., Dubeau, F., Guerreiro, C.A., Schenka, A.A., Queiroz, L.S., Olivier, A., Cendes, F., Andermann, F. Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 2003.

Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. Brain Res, 2003.

Kunz, W.S., Goussakov, I.V., Beck, H., Elger, C.E. Altered mitochondrial oxidative phosphorylation in hippocampal slices of kainate-treated rats. *Brain Res*, 1999.

Kunz, W.S., Kudin, A.P., Vielhaber, S., Blümcke, I., Zusratter, W., Schramm, J., Beck, H., Elger, C.E. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 2000.

Kunz, W.S. The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr. Opin. Neurol.*, 2002.

Kudin, A., Vielhaber, S., Beck, H., Elger, C.E., Kunz, W.S. Quantitative investigation of mitochondrial function in single hippocampal slices: A novel application of high-resolution respirometry and laser-excited fluorescence spectroscopy. *Brain Res Prot*, 1999.

Kudin, A.P., Kudina, T.A., Seyfried, J., Vielhaber, S., Beck, H., Elger, C.E., Kunz, W.S. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2002.

Kwan, P., Schachter, S., Brodie, M.J. Drug-resistant epilepsy. *N Eng J med*, 2011. Review.

Lein, E. S. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 2007.

Li, A., Choi, X., Dziema, H., Cao, R., Cho, H., Jung, Y.J., Obrietan, K. Proteomic profiling of the epileptic dentate gyrus. *Brain Pathol*, 2010.

Liao, L., McClatchy, D.B., Yates, J.R. Shotgun proteomics in neuroscience. *Neuron primer*, 2009.

Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., Wei, Y. A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. *Mass Spect Rev*, 2009.

Liu, H., Sadygov, R.G., Yates, J.R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 2004.



Lothman, E.W., Rempe, D.A., Mangan, P.S. Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol*, 1995.

Maguire, E. A. *et al.* Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*, 1998.

Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat clin pract neurol*, 2006.

Marin-Valencia I, Guerrini R, Gleeson JG. Pathogenetic mechanisms of focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 2014.

Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Babb, T.L. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neurondensities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg*, 1995.

Mattson, R. H. Current challenges in the treatment of epilepsy. *Neurology*, 1994.

Mayer, M.L. Glutamate receptor ion channel. *Curr opin neurol*, 2005.

Meldrum, B.S, Horton, R.W., Brierley, J.B. Epileptic brain damage in adolescent baboons following seizures induced by allylglycine. *Brain*, 1974.

Meldrum B.S., Bruton. Epilepsy. In: Adams JH, Duchen LW, editors. *Greenfield's Neuropathology*. New York: Oxford University Press, 1992.

Meriaux, C., Franck, J., Park, D.B., Kim, Y.H., Chung, C.K., Park, Y.M., Steinbusch, H., Salzert, M., Fournier, I. Human temporal lobe epilepsy analyses by tissues proteomic. *Hippocampus*, 2014.

Ming, G.L., Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.*, 2005.

Mora, G.N., Bramanti, P., Osculati, F., Chakir, A., Nicolato, E., Marzola, P., Sbarbati, A. and Fabene, P.F. Does pilocarpine-induced epilepsy in adult rats require status epilepticus? *PLoS One*, 2009.

Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., O'Keefe, J. Place navigation impaired in

rats with hippocampal lesions. *Nature*, 1982.

Moser, E., Moser, M. B., Andersen, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 1993.

Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., Morris, R. G. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995.

Mouritzen, D. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia*, 1980.

Murray, J., Zhang, B., Taylor, S.W., Oglesbee, D., Fahy, E., Marusich, M.F., Ghosh, S.S., Capaldi, R.A.J. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J Biol Chem*, 2011.

Mustafa, D., Kros, J.M., Luidert, T. Combining laser capture microdissection and proteomic techniques. *Methods Mol Biol*, 2008.

Nadler, J.V., Evenson, D.A., Cuthbertson, G.J. Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 1981.

Nairismägi, J., Gröhn, O.H., Kettunen, M.I., Nissinen, J., Kauppinen, R.A., Pitkänen, A. Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2004.

Nakatsu, F., Ohno, H. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct*, 2003.

Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. *MethodMol Biol*, 2012.

Norwood, B.A., Bumanglag, A.V., Osculati, F., Sbarbati, A., Marzola, P., Nicolato, E., Fabene, P.F., Sloviter, R.S. Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single "cryptic" episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J Comp Neurol*, 2010.

Old, W.M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K.G., Mendoza, A., Sevinsky, J.R., Resing, K.A., Ahn, N.G. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2005.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Prot*, 2002.

O'Connor, W. M. *et al.* Hippocampal cell distributions in temporal lobe epilepsy: a comparison between patients with and without an early risk factor. *Epilepsia*, 1996.

O'Keefe, J., Nadel, L. *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Clarendon, 1978).

Owen, D.J., Collins, B., M., Evans, P.R. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev Cell Dev*, 2004.

Paciorkowski, A.R., McDaniel, S.S., Jansen, L.A., Tully, H., Tuttle, E., Ghoneim, D.H., Tupal, S., Gunter, S.A., Vasta, V., Zhang, Q., Tran, T., Liu, Y.B., Ozelius, L.J., Brashear, A., Sweadner, K.J., Dobyns, W.B., Hahn, S. Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia*, 2015.

Pisa, M., Sanberg, P.R., Corcoran, M.E., Fibiger, H.C. Spontaneously recurrent seizures after intracerebral injections of kainic acid in rat: a possible model of human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, 1980.

Pitkänen, A., Nissinen, J., Nairismägi, J., Lukasiuk, K., Gröhn, O.H., Miettinen, R., Kauppinen, R. Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res*, 2002.

Proper, E.A., Oestreicher, A.B., Jansen, G.H., Veelen, C.W.M.v., van Rijen, P.C., Gispen, W.H., Graan, P.N.E. Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain*, 2000.

Púrpura, D.P., Gonzalez-Monteagudo, B. Acute effects of methoxypyridoxine on hippocampal end-blade neurons: an experimental study of "special pathocclisis" in the cerebral cortex. J Neuropathol Exp Neurol, 1960.

Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I., McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. J Biol Chem, 1997.

Raza, M., Blair, R. E., Sombati, S., Carter, D. S., Deshpande, L.S., DeLorenzo, R.J. Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogeneses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004.

Risold, P. Y., Swanson, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. Science, 1996.

Roch, C., Leroy, C., Nehlig, A., Namer, I.J. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. Epilepsia, 2002.

Rogawski, M.A. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. Acta Neurol Scand, 2013.

Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Prot, 2004.

Sander, J.W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. Epilepsia, 1993.

Seidenbecher, C.I., Smalla, K., Fischer, N., Gundelfinger, E., Kreutz, M.R. Brevican isoforms associate with neural membranes. J Neurochem, 2002.

Schwob, J.E., Fuller, T., Price, J.L., Olney, J.W. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. Neuroscience, 1980.

Scoville, W. B., Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal

lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1957.

Sloviter, R.S. A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. Brain Res Bull, 1983.

Sloviter, R.S., Zappone, C.A., Harvey, B.D., Frotscher, M. Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyper-inhibition in chronically epileptic rats. J Comp Neurol, 2006.

Squire, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev, 1992.

Strange, B. A., Fletcher, P. C., Henson, R. N. A., Friston, K. J., Dolan, R. J. Segregating the functions of human hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA, 1999.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat rev, 2014.

Tasch, E., Cendes, F., Li, L.M., Dubeau, F., Andermann, F., Arnold, D.L. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. Ann Neurol, 1999.

Tauck, D.L., Nadler, J.V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. J Neurosci, 1985.

Thom, M., Liagkouras, I., Elliot, K.J., Martinian, L., Harkness, W., McEvoy, A., Caboclo, L.O., Sisodiya, S.M. Reliability of patterns of hippocampal sclerosis as predictors of postsurgical outcome. Epilepsia, 2010.

Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. Anal Chem, 2003.

Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P.G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A. and Simonato, M. Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger

epileptogenesis. J Neurosci, 2004.

Turski, W.A., et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res, 1983.

Wasterlain, C. G., Fujikawa, D. G., Penix, L., Sankar, R. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. Epilepsia, 1993.

Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996.

Wigge, P., Köhler, K., Vallis, Y., Doyle, C.A., Owen, D., Hunt, S.P., McMahon, H.T. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. Mol Biol Cell, 1997.

Wolf-Yadlin, A., Hautaniemi, S., Lauffenburger, D.A., White, F.M. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. Proc Natl Acad Sci U S A., 2007.

Wong-Riley, M. et al. Human COX6A1 gene: promoter analysis, cDNA isolation and expression in the monkey brain. Gene, 2000.

Wu, Y., Liang, S., Oda, Y., Ohmori, I., Nishiki, T., Takei, K., Matsui, H., Tomizawa, K. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. EMBO J, 2007.

Wu, Y., Matsui, H., Tomizawa, K. Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. Acta Med Okayama, 2009.

Wu, Q., Zhao, Q., Liang, Z., Qu, Y., Zhang, L., Zhang, Y. NSI and NSMT: usages of MS/MS fragment ion intensity for sensitive differential proteome detection and accurate protein fold change calculation in relative label-free proteome quantification. The Analyst, 2012.

van Groen, T., Wyss, J. M. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation

projections. J. Comp. Neurol, 1990.

Vaillend, C., Mason, S.E., Cuttle, M.F., Alger, B.E. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. J Neurophysiol, 2002.

Varlamov, D.A., Kudin, A.P., Vielhaber, S., Schröder, R., Sassen, R., Becker, A., Kunz, D., Haug, K., Rebstock, J., Heils, A., Elger, C.E., Kunz, W.S. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA COI gene. Hum Mol Genet, 2002.

Voutsinos-Porche, B., Koning, E., Kaplan, H., Ferrandon, A., Guenounou, M., Nehlig, A., Motte, J. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis, 2004

Xu, B.J. Combining laser capture microdissection and proteomics: methodologies and clinical applications. Proteomics Clin Appl, 2010.

Yang, J. W., Czech, T., Gelpi, E., Lubec, G. Extravasation of plasma proteins can confound interpretation of proteomic studies of brain: A lesson from apo A-I in mesial temporal lobe epilepsy. Mol Brain Res, 2005.

Zarnecnik, J., Homola, A., Cicanic, M., Kuncova, K., Marusic, P., Krsek, P., Sykova, E., Vargova, L. The extracellular matrix and diffusion barriers in focal cortical dysplasias. Eur J Neurosci, 2012.

Zielinski, J.J. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw J, Richens A e Oxley J (eds) A textbook of epilepsy, Third edition, Churchill livingstone, New York, pp: 21-48, 1988.

Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. J biomed biotech. 2010.

