



# **Análise da expressão gênica em larga escala do tecido cerebral de um modelo animal genético de epilepsia generalizada com crises de ausência**

**Palavras-Chave:** PCR em tempo real; epilepsia generalizada; bioinformática

**Autor:** Marcos Adriano Vaz Barbosa – FCM

**Coautores:** Dr. Alexandre Hilário Berenguer de Matos e Dr.<sup>a</sup> Patricia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar Araujo

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iscia Lopes-Cendes – Laboratório de Genética Molecular, departamento de Medicina Translacional. FCM-UNICAMP.

**Co-orientador:** Dr. Rodrigo Secolin

---

## **INTRODUÇÃO:**

As epilepsias são classificadas em dois tipos principais, de acordo com a origem das crises: focais e generalizadas. Essa última classe, por sua vez, corresponde a um terço de dos pacientes com epilepsia (PANAYIOTOPOULOS, 2005 apud BETTING & GUERREIRO, 2008). Dentro das epilepsias generalizadas, temos aquelas com crises de ausência. As epilepsias de ausência infantil e de ausência juvenil são classificadas como epilepsias generalizadas com crise de ausência (*generalized epilepsy with absence seizures* - GEAS) e têm sido associadas na literatura com causas genéticas (URAK et al., 2006; TANAKA et al., 2008; WALLACE et al., 2001; HERON et al., 2004; SANDER et al., 1997; HAUG et al., 2003; STOGMANN et al., 2006). Para estudar as epilepsias com crises de ausência, têm-se utilizado um modelo animal com muitas semelhanças com as crises humanas, denominado GEAS (MATOS, 2013). Assim, o presente trabalho visa investigar a expressão gênica do modelo animal GEAS a fim de identificar diferenças entre ratos com crises de ausência e sem crises de ausência a partir de microarranjos de DNA.

## **MÉTODOS:**

### **Análise de bioinformática dos dados obtidos nos experimentos de microarranjo (já realizada)**

Na primeira etapa do projeto foram analisados dados de expressão de 10 animais (5 ratos GEAS e 5 ratos Wistar, como controle), a partir da plataforma GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA), já disponíveis no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica da FCM-UNICAMP. Estes dados

foram processados e analisados por meio dos pacotes limma e affy dentro do programa R (<https://www.r-project.org/>). O algoritmo RMA foi usado para a normalização dos dados, ajuste de background e transformação dos valores de intensidade de sinal. Os transcritos que não apresentarem valores de expressão em nenhuma das amostras foram removidos das análises estatísticas. Para as análises estatísticas, foi utilizado modelos de regressão linear pelo pacote limma, estimando valores de expressão (fold-change-FC) e valores de p (WASSERSTEIN et al., 2016), os quais foram ajustados para múltiplas comparações por meio de False Discovery Rate (FDR) (RITCHIE et al., 2015).

### Escolha de validação de transcritos diferencialmente expressos usando PCR quantitativo (em curso)

Os transcritos que apresentaram valores de FC maiores ou menores do que 1,5 e valores de FDR menores do que 0,05 foram considerados candidatos para validação por meio de PCR quantitativo em tempo real. As mesmas amostras utilizadas na obtenção das intensidades de sinal nos chips de expressão estão sendo investigadas nas validações. Os experimentos de validação por PCR em tempo real estão sendo realizados por meio do iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix kit (BIO-RAD Laboratories®, Hercules, California, USA), e as intensidades de sinal estão sendo obtidas pelo equipamento Applied 7500 real-time PCR (ThermoFisher Scientific®). Os primers foram desenhados através do software Primer Blast® (Ye et al., 2012). A quantificação relativa (RQ) está sendo estimada pelo método  $2^{-\Delta\text{ct}\Delta\text{ct}}$  utilizando os genes gapdh and hprt1 como referência. Os valores de RQ serão transformados em logaritmos para realização de um teste de regressão linear generalizado por meio de Generalized Estimating Equation (GEE) (HALEKOH; HØJSGAARD; YAN, 2006), pelo pacote geepack no programa R, a fim de identificar diferenças na expressão dos genes entre os ratos GEAS e controles Wistar, os quais serão comparados com os resultados encontrados pelas análises de microarranjos.

Para a validação por PCR, desenhamos primers por meio do software Primer BLAST® da plataforma NCBI conforme mostram as **tabelas 1 e 2** a seguir:

**Tabela 1** – Primers selecionados ou desenhados para cada gene

Gene	Forward1	Reverse1	Origem
Rtn4	5' - ATCCAAAGCGGGCAGATTC - 3'	5' - ATGATCTATCTGCACCTGATGCC - 3'	Primer Blast
Trim2	5' - CGGAAGGGGTCTCCTACTT - 3'	5' - CGACTGCAGCACTTTGTGTT - 3'	Primer Blast
Ywhaq	5' - CACTGGCTAAAACGGCTT - 3'	5' - TGCATAAGGAAACGCCCTGT - 3'	Primer Blast
Rnf165	5' - GGCTATCTCGTGCTTCCAGT - 3'	5' - TCCTGGGGTCTTCGCTTCTT - 3'	Primer Blast
NLGN2	5' - ACTTCGCCAAGACTGGTGAC - 3'	5' - TATAGTCGGGTGGACAGGCA - 3'	Primer Blast
Gdi2	5' - TTCTCGCTCCCTTCTCTACG - 3'	5' - CAGGATACATTCCGTCAGGC - 3'	Primer Blast
ADCY9	5' - TGAACCTCCCTCTGGAGCTG - 3'	5' - AACAGGTCAGGGGTACCTGG - 3'	Primer Blast

**Tabela 2** – Primers selecionados ou desenhados para cada gene

Gene	Forward2	Reverse2	Origem
Rtn4	5' - TTACCTGTCTTGACTGCC - 3'	5' - TACAGCTTAAACCACAATGG - 3'	(Novak <i>et al.</i> , 2002)
Trim2	5' - ACATCTGCTGACCCGCTGTAT - 3'	5' - CGATAGACCTTGAAGCAGTGG - 3'	(Fang <i>et al.</i> , 2016)
Rnf165	5' - GCTATCTCGTGCTTCCAGTGT - 3'	5' - CCTGGGGTCTTCGCTTCTTAT - 3'	Primer Blast
NLGN2	5' - CCAAAGTGGGCTGTGACC - 3'	5' - CCAAAGGCAATGTGGTAGC - 3'	(Kohl <i>et al.</i> , 2013)
Gdi2	5' - TCGCTCCCTTCTCTACGGTG - 3'	5' - ACAGGATACATTCCGTCAGGC - 3'	Primer Blast
ADCY9	5' - AAGGCCTCCATCCAGAAAGC - 3'	5' - CCTCCAGAAGCCTTGGTGC - 3'	Primer Blast

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Através da análise de bioinformática, reunimos os 20 genes com maior diferencial de expressão no grupo GEAS em comparação com o grupo Wistar, desses 10 são considerados como super-expressos, e 10 sub-expressos para cada uma das regiões: hipocampo e córtex. A partir dessa lista e dos valores obtidos de p ajustado (<0.05) e FDR, extraímos os genes que mais estariam relacionados com a epilepsia por meio da pesquisa de suas funções. Assim, selecionamos os genes *RTN4*, *GDI2*, *TRIM2*, *YWHAQ*, *RNF165*, *NLGN2* e *ADCY9* para os experimentos de validação por PCR em tempo real. As características principais desses genes estão descritas na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Genes selecionados com base em sua relação fisiopatológica com a epilepsia.

Gene	Nome	Função	Hipocampo	Córtex
<i>RTN4</i>	<i>Reticulon 4</i>	Secreção neuroendócrina e tráfego de membrana em células neuroendócrinas.	Super-expresso	Super-expresso
<i>GDI2</i>	<i>Guanosine Diphosphate Dissociation Inhibitor 2</i>	Regula a reação de troca de GDP / GTP da maioria das proteínas Rab, inibindo a dissociação de GDP e a subsequente ligação de GTP as mesmas.	-	Super-expresso
<i>TRIM2</i>	<i>Tripartite Motif Containing 2</i>	Tem papel neuroprotetivo e atua na degradação de proteínas (ubiquitinação). Mutações podem causar neuropatia axonal precoce.	Super-expresso	-
<i>YWHAQ</i>	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Theta</i>	É super-expresso em pacientes com esclerose lateral amiotrófica e participa da transdução de sinais através de sua ligação com proteína com fosfoserina.	Super-expresso	Super-expresso
<i>RNF165</i>	<i>Ring Finger Protein 165</i>	Regulador do alongamento do axônio motor.	Sub-expresso	Sub-expresso
<i>NLGN2</i>	<i>Neuroigin 2</i>	Proteína de superfície de neurônios. Formação e	-	Sub-expresso

		remodelamento das sinapses no sistema nervoso central.		
ADCY9	<i>Adenylate Cyclase Type 9</i>	Enzima ligada à membrana que catalisa a formação de AMP cíclico a partir do ATP. É regulado por uma família de receptores acoplados à proteína G, proteínas quinases e cálcio. É amplamente distribuída e estimulada pela ativação do receptor beta-adrenérgico, mas é insensível à fosfocolina, cálcio e somatostatina.	-	Sub-expresso

**Fonte:** National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [citado em 10 Fev 2020]. Disponível em: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

## CONCLUSÕES:

A validação dos transcritos com diferenças na expressão gênica usando técnicas de PCR quantitativo já está sendo finalizada e está sendo realizada com base nos dados obtidos do microarranjos de DNA do tecido cerebral de ratos do modelo GEAS. Assim que terminarmos a validação, iremos comparar os dados gerados através da análise com o PCR em tempo real com aqueles encontrados pela análise em microarray. Esperamos que com esse trabalho possamos contribuir no avanço do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos nas epilepsias generalizadas com crises de ausência.

## BIBLIOGRAFIA:

WASSERSTEIN, Ronald L.; LAZAR, Nicole A.. The ASA's Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. **The American Statistician**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.129-133, 2 abr. 2016.

RITCHIE, Matthew E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.47-47, 20 jan. 2015.

FANG, C. *et al.* MicroRNA-181c Ameliorates Cognitive Impairment Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. **Molecular Neurobiology** 2016 **54:10**, v. 54, n. 10, p. 8370–8385, 8 dez. 2016.

KOHL, C. *et al.* Hippocampal Neuroligin-2 Overexpression Leads to Reduced Aggression and Inhibited Novelty Reactivity in Rats. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56871, 22 fev. 2013.

NOVAK, G. *et al.* Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. **Molecular Brain Research**, v. 107, n. 2, p. 183–189, 15 nov. 2002.

HALEKOH, Ulrich; HØJSGAARD, Søren; YAN, Jun. The RPackagegeepackfor Generalized Estimating Equations. **Journal Of Statistical Software**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.1-11, 2006.

BETTING, Luiz Eduardo; GUERREIRO, Carlos A. M.. Tratamento das epilepsias generalizadas idiopáticas. **Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.20-24, nov. 2008.

SANDLER, T. et al. Allelic association of juvenile absence epilepsy with a glur5 kainate receptor gene (grik1) polymorphism. **American Journal of Medical Genetics**, [s.l.], v. 74, n.1, p.416-421, jan. 1997.

STOGMANN, E. et al. Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. **Neurology**, [s.l.], v. 67, n. 11, p.2029-2031, 11 dez. 2006.

TANAKA, Miyabi et al. Hyperglycosylation and Reduced GABA Currents of Mutated GABRB3 Polypeptide in Remitting Childhood Absence Epilepsy. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 82, n. 6, p.1249-1261, jun. 2008.

URAK, Lydia et al. A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 15, n. 16, p.2533-2541, 11 jul. 2006.

WALLACE, Robyn H. et al. Mutant GABAA receptor  $\gamma 2$ -subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.49-52, maio 2001.

HAUG, Karsten et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.527-532, 3 mar. 2003.

MATOS, Alexandre Hilário Berenguer de. **Expressão gênica em larga escala em modelos genéticos de epilepsia**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP. 2013