

A Interleucina 1-beta Mostra uma Ação Protetora na Fase Aguda do Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina*

VDB Pascoal^a, RB Marchesini^a, AHB Matos^a, FF Conte^a, TC Pereira^b, R Gilioli^c, JM Malheiros^d, RS Polli^d, HH Buzzá^d, A Tannús^d, L Covolan^e, EA Cavalheiro^f, L Velloso^g, F Cendes^h, I Lopes-Cendes^a

FCM-UNICAMP, Campinas, SP

RESUMO

Introdução: Existem contradições na literatura quanto aos efeitos dos genes *il1β* e *il1m* nas epilepsias. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do silenciamento desses dois genes na fase aguda do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina. **Métodos:** Para alterar a expressão dos genes *il1β* e *il1m* utilizamos a técnica de interferência por RNA. **Resultados:** Obtivemos taxas de silenciamento significativas para os dois genes no sistema nervoso central. Observamos efeitos fenotípicos significativos, incluindo a alteração na taxa de mortalidade dos animais 5 dias após a indução do modelo. **Conclusões:** A *il1β* parece exercer um papel protetor na fase aguda do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina.

Unitermos: iRNA, *il1β*, *il1m*, modelo animal, silenciamento, siRNA.

ABSTRACT

*The *il1β* have a protective action in the acute phase of the pilocarpine-induced epilepsy model*

Introduction: There is contradictory information regarding the effects of *il1β* and *il1m* in epilepsy. We aimed to evaluate the effect of silencing both genes in the acute phase of the pilocarpine-induced epilepsy model. **Methods:** We used RNA interference in order to achieve gene silencing. **Results:** We obtained significant gene silencing in the central nervous system. In addition, we observed phenotypic effects including differences in mortality rates of animals 5 days after pilocarpine injections. **Conclusion:** Our results indicate that *il1β* seems to have a protective effect in the acute phase of the pilocarpine-induced epilepsy model.

Keywords: RNAi, *il1β*, *il1m*, animal model, silencing, siRNA.

* Trabalho premiado com o Prêmio Aristides Leão durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Epilepsia, 03-06 junho 2010 (Brasília/DF).

^a Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP, Campinas, SP. CINAPCE: Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisa sobre o Cérebro.

^b Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP, Campinas, SP. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

^c Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB)-UNICAMP, Campinas, SP.

^d Departamento de Física e Bioinformática, IFSC, USP, Laboratório de Ressonância Magnética, São Carlos, SP. CINAPCE: Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisa sobre o Cérebro.

^e Departamento de Fisiologia, UNIFESP/EPM, SP. CINAPCE: Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisa sobre o Cérebro.

^f Disciplina de Neurologia Experimental, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia UNIFESP/EPM, SP. CINAPCE: Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisa sobre o Cérebro.

^g Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP.

^h Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP, Campinas, SP. CINAPCE: Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisa sobre o Cérebro.

Received June 04, 2010; accepted June 11, 2010.

INTRODUÇÃO

A interleucina 1-beta (*il1β*), uma importante mediadora da resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC) contra traumas e processos patológicos, tem sua expressão aumentada em modelos animais de epilepsia, principalmente no induzido pela pilocarpina.¹ Em geral, o aumento na expressão do gene *il1β* tem sido relacionado com uma possível ação neurotóxica, o que resulta em efeitos pró-convulsivantes.²⁻⁴ Porém, essas observações são restritas a poucos relatos e obtidas em experimentos nos quais foram utilizados inibidores não específicos.⁵ Uma nova ferramenta para o estudo funcional de genes é a interferência por RNA (RNAi). Essa técnica tem por objetivo diminuir a expressão gênica de maneira potente e altamente específica através da degradação do RNA mensageiro (RNAm) induzido por pequenas moléculas de dupla fita de RNA (siRNAs) complementares ao RNAm do gene alvo.⁶⁻⁷

Com o intuito de ampliar o conhecimento a respeito do papel da *il1β* na homeostase neuronal e estudar sua possível ação no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, o objetivo de nosso trabalho foi analisar o efeito das alterações na expressão dos genes *il1β* e *il1rn* (antagonista endógeno da *il1β*), induzidos pela técnica de RNAi, sobre a excitabilidade neuronal durante a fase aguda do modelo.

MÉTODOS

Os animais utilizados foram previamente tratados com injeções intravenosas (veia caudal) de moléculas de siRNA contra os genes *Il1β* e *Il1rn* conjugadas a um peptídeo presente no capsídeo que reveste o vírus da raiva, o RVG (*Rabies Virus Glycoprotein*). Este complexo siRNA:RVG teve por finalidade transportar os siRNAs através da barreira hematoencefálica (BHE), possibilitando a transfecção de células no sistema nervoso central.⁸

Injetou-se cada animal duas vezes com doses de 25 μg de siRNA em uma razão molar de 1:10 siRNA:RVG, respeitando oito horas de intervalo entre as injeções. Foram utilizados dois grupos controle (animais injetados apenas com tampão PBS ou com siGFP) e dois grupos experimentais injetados com *siil1β* e *siil1rn*. Todos os grupos foram compostos por cinco animais, e os experimentos foram sempre realizados com no mínimo uma duplicata biológica. O modelo da pilocarpina foi induzido 48 h após as injeções de siRNA pela via intraperitoneal.⁹⁻¹⁰

O tempo para a primeira crise, para o *status epilepticus* e o número de crises durante a fase aguda foram quantificados por dois observadores cegos. Os cérebros dos animais foram coletados, o RNA total foi extraído pelo método do Trizol e o cDNA foi sintetizado usando a Super Script III (ambos os procedimentos conforme especificações do fabricante). Os níveis de expressão dos genes *il1β*, *il1ra*, *nfκβ*, *tnfa* e do *scl1α3* foram analisados através da quantificação dos

transcritos pela técnica de PCR em Tempo Real. Uma parte do tecido também foi utilizada para extração total de proteínas, as quais foram quantificadas pelo método de Bradford. Em seguida, procedeu-se com experimentos de *Western Blotting* para a determinação da abundância das proteínas alvos. Tanto no PCR em Tempo Real quanto no *Western Blotting* as quantificações foram corrigidas em relação aos controles endógenos *Gapdh/Hprt1* e β-actina, respectivamente.

Alguns animais foram observados fenotipicamente através de monitorização por câmera com gravação contínua (vídeo-monitorização 24h) até o momento do sacrifício. O tecido destes animais foi também utilizado para análise histológica com colorações de Neo-Timm e Cressil.

RESULTADOS

Primeiramente, verificou-se o quão efetivo foi o silenciamento gênico causado pela inoculação dos siRNAs contra os genes *il1β* e *il1rn*. Como resultado, observou-se uma diminuição na expressão do gene *il1β* e na abundância da proteína de aproximadamente 65%. Foi possível verificar também que o silenciamento já podia ser detectado 24 h após as injeções de siRNA, atingindo o ápice após 48 h (coincidindo exatamente com o momento em que foi induzido o modelo da pilocarpina) e mantendo-se significativo por até 96h após as injeções. Além disso, observou-se que a expressão de dois genes (*Trk2*, *Plat*) não relacionados à via de sinalização da *il1β* não sofreram alteração com o silenciamento de *il1β*, o que comprovou a especificidade do sistema utilizado. Além disso, demonstrou-se que o silenciamento ocorreu em diversas regiões do SNC (córtex frontal, hipocampo, cerebelo e bulbo olfatório), mas não na medula espinhal e tronco encefálico.

Como foi utilizado um complexo formado pela molécula de siRNA conjugada ao peptídeo RVG, investigou-se se não houve quebra da BHE com a injeção deste complexo. Para esse fim, foram utilizadas imagens de ressonância magnética dos animais 3 horas após a injeção do siRNA:RVG, utilizando gadolínio como contraste.¹¹ Os resultados não evidenciaram qualquer sinal de quebra de BHE com a injeção do complexo siRNA:RVG em comparação com os controles positivos (animais após SE).¹²

A análise fenotípica dos animais demonstrou que o grupo que recebeu *siil1β* demorou menos tempo para ter a primeira crise, assim como para entrar em SE ($p < 0,05$ ANOVA); efeito exatamente oposto foi visto nos animais que receberam *siil1rn* ($p < 0,05$ ANOVA). Observou-se também que a taxa de recuperação dos animais nos cinco dias posteriores ao SE foi diferente entre os grupos analisados: a taxa de mortalidade dos animais controle foi de 50%, a dos tratados com *siil1b* foi de 75%, e dos tratados com o

siil1m, de 35%. Portanto, a análise fenotípica da fase aguda demonstra um efeito benéfico da *il1β* na fase imediatamente pós-dano induzido pela pilocarpina no SNC, sendo que os animais que tiveram a expressão do gene *il1β* diminuída nessa fase apresentaram uma evolução menos favorável. O efeito oposto aconteceu com os animais que tiveram o antagonista endógeno da *il1β* silenciado (aumentando a ligação da *il1β* ao seu receptor específico).

Com a finalidade de se investigar o possível efeito da *il1β* na excitabilidade neuronal após a injeção da pilocarpina, prosseguiu-se com o estudo de alguns genes/vias de sinalização nesse processo. Para isso, a expressão dos genes *il1β*, *il1m*, *il1r1*, *nfκβ* (*p65*), *p-Ikk*, e *Scl1α3* foi avaliada pelas técnicas de PCR em Tempo Real e *Western Blotting*. Como resultado, observou-se uma diferença significativa tanto da abundância de *nfκβ* quanto de sua atividade, medida pela taxa de fosforilação da *ikk*. Além disso, houve uma diminuição na expressão de *Scl1α3* (25%) nos animais silenciados para *il1β* e um aumento (30%) nos animais silenciados para *il1ra*. *Scl1α3* é um dos principais recaptadores de glutamato no SNC e tem sua via de sinalização regulada pelo fator de transcrição *nfκβ*.¹³

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a *il1β* parece contribuir indiretamente para a regulação dos níveis de expressão dos genes codificadores de recaptadores de glutamato no SNC, atuando na modulação da expressão de fatores de transcrição, como o *nfκβ*.

A análise por Neo-Timm dos animais que sofreram crises recorrentes após 2 meses de observação (fase crônica) e que haviam sido injetados com *siil1m* + pilocarpina não demonstrou diferença significativa quando comparados com os animais injetados apenas com pilocarpina. Entretanto, a análise feita nos corte corados por Nissl evidenciaram uma diminuição da morte neuronal nas regiões do hipocampo dos animais pré-tratados com os *siil1m*.

DISCUSSÃO

A *il1β* parece exercer um papel protetor no SNC contra eventos excitotóxicos induzidos pela pilocarpina na fase aguda do modelo. O mecanismo pelo qual a *il1β* atua parece estar relacionado à alteração da expressão e atividade de fatores de transcrições (*nfκβ*), que por sua vez alteram a expressão de recaptadores de glutamato (*Scl1α3*).

Entretanto, esse efeito protetor da *il1β*, induzido indiretamente pelo silenciamento de seu antagonista

endógeno (*il1m*), não foi capaz de impedir a ocorrência de crises (incluindo o SE) e a reorganização sináptica na fase crônica, evidenciando a complexidade dos mecanismos envolvidos na epileptogênese.

REFERÊNCIAS

1. 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;17:385-402.
2. Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J. Neurosci.* 1999;19:5054-65.
3. Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, De Luigi A, De Simoni MG, Sperk G, Andell-Jonsson S, Lundkvist J, Iverfeldt K, Bartfai T. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97:11534-9.
4. Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows S, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG. Functional role of inflammatory cytokines and anti-inflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 2002;43(Suppl. 5):30-5.
5. Rijkers K, Majoie HJ, Hoogland G, Kenis G, De Baets M, Vles JS. The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Exp Neurol.* 2009 Apr;216(2):258-71. Epub 2008 Dec 31.
6. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
7. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-51.
8. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007 July 5;448(7149):39-43. Epub 2007 June 17.
9. Turski WA, et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983 Sept;9(3):315-35.
10. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 1995 Feb-Mar;16(1-2):33-7. Review.
11. Prior MJ, Brown AM, Mavroudis G, Lister T, Ray DE. MRI characterisation of a novel rat model of focal astrocyte loss. *MAGMA.* 2004 Dec;17(3-6):125-32.
12. Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 2007 Apr;48(4):732-42.
13. Rodriguez-Kern A, Gegelashvili M, Schousboe A, Zhang J, Sung L, Gegelashvili G. Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-κβ. *Neurochem Int.* 2003 Sept/Oct;43(4-5):363-70.

Endereço para correspondência:

Isclia Lopes-Cendes
Departamento de Genética Médica – FCM-UNICAMP
Campinas, SP
E-mail: icendes@unicamp.br