

PATRÍCIA ALINE OLIVEIRA RIBEIRO DE AGUIAR ARAÚJO

***ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *Lgi1* DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
SEU SILENCIAMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DE
INTERFERÊNCIA POR RNA***

CAMPINAS

2008

PATRÍCIA ALINE OLIVEIRA RIBEIRO DE AGUIAR ARAÚJO

Análise de expressão do gene *Lgil* durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e seu silenciamento utilizando a técnica de interferência por RNA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Neurociências.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ISCIA LOPES-CENDES

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ar15a

Araújo, Patrícia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar

Análise de expressão do gene *Lgi1* durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e seu silenciamento utilizando a técnica de interferência por RNA / Patrícia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Iscia Lopes-Cendes

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. RNAi. 3. Neurogenética. I. Lopes-Cendes, Iscia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: *Lgi1* gene expression analysis during the central nervous system development and its silencing using the interference RNA technique

Keywords: • Epilepsy
• RNA interference
• Neurogenetics

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

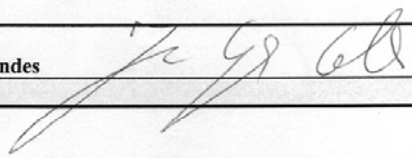
Área de concentração: Neurociências

Banca examinadora: Prof^ª Dr^a Iscia Lopes-Cendes
Prof. Dr. Jackson Bittencourt
Prof. Dr. Mario Pedrazzoli
Prof^ª Dr^a Maria de Fátima Sonati
Prof^ª Dr^a Mônica Barbosa de Melo

Data da defesa: 28 - 08 -2008

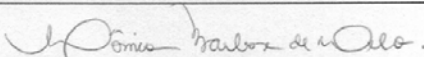
Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

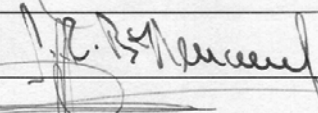


Membros:

Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo



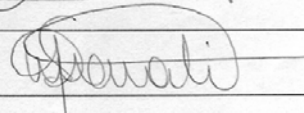
Professor (a) Doutor (a) Jackson Cioni Bitencourt



Professor (a) Doutor (a) Mario Pedrazzoli Neto



Professor (a) Doutor (a) Maria de Fátima Sonati



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/08/2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus maiores mestres,
meus pais e meu marido.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto do trabalho e colaboração de muitas pessoas, desta forma, gostaria de agradecer...

Primeiramente, a pessoa que mais esteve envolvida com esta tese, depois de mim é claro, João Henrique, meu marido. Um companheiro maravilhoso e amigo, que fez desse longo trecho da minha vida, que foi o doutorado, uma jornada mais agradável. Uma pessoa carinhosa e extremamente compreensiva, que várias vezes passou o domingo inteiro no laboratório me esperando fazer um experimento que era rapidinho...

A minha família: Chicão e Ieda, Marco e Alê, Jack e Bebê, os irmãos emprestados Art e Cabelinho, por sempre estarem presentes; por serem o conforto que uma família representa. Pai e mãe, parabéns pela nossa família e por tudo que vocês construíram juntos! Esta tese é de vocês também!

Tenho que agradecer imensamente à professora Iscia, por toda a oportunidade oferecida, desde o mestrado, e pela confiança depositada em meu trabalho. Muito obrigada!

A todo o pessoal do CEMIB - Silvio, Lenira, Márcia - a quem passei uma parte deste trabalho atormentando a vida e, principalmente, ao professor Rovilson, por me receber em seu laboratório e por todo suporte dado.

Ao professor Lourenço Sbragia e a aluna Azize pelo tempo e trabalho dedicados às cirurgias intra-útero.

Ao professor Francesco Langone pelo seu envolvimento com as padronizações das cirurgias em neonatos e por todo suporte oferecido. Também agradeço aos alunos André e Luis que se envolveram em parte destas realizações.

A Carol Bigarella, pela paciência e pelo seu precioso tempo gasto com os meus experimentos *in vitro*; mesmo em final de tese não se negou a dar uma grande ajuda. Também agradeço a professora Sarita pelo empréstimo do BTX, do seu laboratório e da sua aluna.

Ao Tiago, que além das discussões científicas, se dispôs a fazer todas as injeções veia caudal, independente do horário, mesmo nas noites de sexta-feira (lembrando que os experimentos da noite começavam entre onze e meia e meia-noite)...

A Camila, que mesmo chegando já no final, agarrou a causa dos experimentos *in vitro*.

Ao Fábio Augusto, esse grande cientista e amigo, além de companheiro de luta com nosso querido *LGI*!

À amiga Cláudia, pelas conversas e conselhos, pelos desabafos e também pelos abraços, que muitas vezes foram imprescindíveis...

Ao pessoal do DNA, que vira e mexe tinham, e continuam tendo, que me aturar por lá. Às amigas Danizinha, Luciana e Simone, pelos momentos de descontração, pelas risadas e pelos cafés. Lú, a você um obrigada especial por sempre estar por perto.

Às amigas Mariângela e Miriam, as pessoas mais bem humoradas que já conheci! Vocês não imaginam o bem que vocês me fizeram.

A Cris, por ter aturado nosso barulho com muita concentração. Obrigada por ter se segurado e não ter matado um....

Quero agradecer especialmente aos grandes amigos que fiz durante esse trabalho, pessoas com quem dividi bancada, computador, mastermix... Com quem compartilhei meus dias, minhas chatices, minhas alegrias. Pessoas que me ajudaram a amadurecer profissionalmente e, sobretudo, pessoalmente. São elas: Danyella, Fábio Conte, Mariana, Rafael e Vinícius (não está por ordem de importância, está por ordem alfabética, viu Fábio?!).

Dany, obrigada pela grande amizade, pela confiança e por toda força dada: anestesia, pontos, contas, vídeos e fotos das cirurgias, idéias, eletroporação à 1h00 da manhã... O que seria de mim sem você?!. “No mínimo, a gente se diverte!”.

Fábio, te agradeço por todos os momentos divertidos, de criatividade inigualável, que só você consegue proporcionar. E também pelos detalhes minuciosos das suas explicações técnicas que contribuíram para minha formação.

Mari, quero agradecer a sua amizade e seu companheirismo, pois sempre estive e está pronta para ajudar (na verdade, acho que é a vontade inconsciente de trabalhar com RNA...). É um privilégio trabalhar perto de você!

Oni, obrigada pelo convívio, por agüentar firme e forte meus momentos de rebeldia. Você é uma pessoa especial, alto astral, sempre disposto a ajudar (em pleno feriadão e nós no CEMIB fazendo cirurgia...) e ainda um ótimo chefe!

Vinícius, você, primeiro, merece os parabéns por aturar todos nós, com toda paciência e com bom humor; sem você nossos dias não seriam tão divertidos. Obrigada pelas discussões científicas e por toda ajuda com as benditas moléculas.

Vocês juntos provaram que um ambiente de trabalho pode e deve ser prazeroso!

Gostaria de finalizar fazendo o agradecimento mais importante: a Deus! Que me permitiu percorrer este caminho e conhecer todas essas pessoas; elas que de alguma forma contribuíram para a formação da pessoa que sou hoje.

Muito obrigada!

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

	página
RESUMO	37
ABSTRACT	41
1 – INTRODUÇÃO GERAL	45
2 – OBJETIVOS GERAIS	51
3 – CAPÍTULO 1: Estudo da expressão do gene <i>Lgil</i> em cérebro de camundongos	53
3.1 – Introdução	55
3.2 – Objetivos	59
3.3 – Materiais e métodos	63
3.4 – Resultados	71
3.5 – Discussão	85
4 – CAPÍTULO 2: Silenciamento gênico de <i>Lgil</i> por RNAi	89
4.1 – Introdução	91
4.2 – Objetivos	97
4.3 – Materiais e métodos	99
4.4 – Resultados	119
4.5 – Discussão	159
5 – CONCLUSÕES FINAIS	167
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
7 – ANEXOS	183

LISTA DE ABREVIATURAS

18S	subunidade ribossomal 18S
ADAM22	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 22</i>
AMPA	ácido propiônico a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
AP	ântero-posterior
cDNA	DNA complementar
CDS	seqüência codificante
CEMIB	Centro de Estudos Multidisciplinares de Investigação Biológica
Ct	Ciclo de <i>threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DV	dorso-ventral
dsRNA	dupla fita de RNA
DTT	ditiotreitól
E15	15 dias embrionários
EAR	repetição associada à epilepsia
EEG	eletroencefalograma
EPADSA	Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos
EPTP	domínio epitempina
esiRNA	<i>endoribonuclease-prepared siRNA</i>
Gapdh	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

HD	hemisfério direito
HE	hemisfério esquerdo
hpi	horas pós-injeção
Kv1.1	subunidade 1.1 do canal de potássio voltagem dependente
Kvbeta1	subunidade beta 1 do canal de potássio voltagem dependente
L	lateral
LGI1	<i>leucine rich, glioma inactivated 1</i>
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
Mecp2	<i>methyl-cpg-binding protein 2</i>
P1	1 dia pós-natal
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKR	proteína kinase dependente de dsRNA
RISC	complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	interferência por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
RQ	quantificação relativa
RQ _{max}	quantificação relativa máxima
RQ _{min}	quantificação relativa mínima
RT	transcrição reversa
RVG	glicoproteína do vírus da raiva
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecilsulfato de sódio

SFB	soro fetal bovino
sem	semanas de vida
siRNA	(<i>small interfering RNA</i>) pequenas moléculas interferentes
SNC	sistema nervoso central
SPF	livre de patógenos específicos
TA	temperatura ambiente
TBS	tampão salino Tris-HCl

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Resultado da validação dos diferentes ensaios utilizados	75
Tabela 2: Resultados da quantificação relativa da expressão de <i>Lgi1</i> , por PCR em tempo real, em diferentes idades	78
Tabela 3: Os quatro grupos apontados pelo teste de Tukey com padrões de expressão estatisticamente diferentes para os dois controles endógenos estudados	78
Tabela 4: Teste de anestésicos variando drogas, concentração e doses	106
Tabela 5: Tabela das coordenadas estereotáticas utilizadas para alcançar os diferentes pontos de injeção	107
Tabela 6: Coordenadas e volumes testados na padronização da estereotaxia em neonatos	115
Tabela 7: Localização das seqüências-alvo das moléculas de siRNA desenhadas contra o gene <i>Lgi1</i> de camundongo	119
Tabela 8: Resultado da validação dos diferentes ensaios utilizados	122
Tabela 9: Volume de cada droga necessário para o preparo de 1mL da mistura de anestésicos, de acordo com a concentração desejada	123
Tabela 10: Teste de diferentes misturas de anestésicos	125
Tabela 11: Amostras testadas por western blot para verificação de redução da proteína <i>Lgi1</i> , nos experimentos de silenciamento por eletroporação local	138
Tabela 12: Detalhamento dos experimentos com o uso de minibombas osmóticas	139
Tabela 13: Detalhamento dos experimentos em camundongos com o peptídeo RVG	141
Tabela 14: Teste 3 - Descrição dos volumes aplicados nas três injeções do terceiro teste de RVG:siRNA	145

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Cinética de amplificação	56
Figura 2: Porção do neocórtex retirada para análise de expressão gênica	63
Figura 3: Curva padrão para validação das reações de PCR em tempo real	66
Figura 4: Fotomicrografias de lavagem vaginal de camundongos	71
Figura 5: RNA total extraído de algumas amostras de cérebro de camundongo em diferentes idades	72
Figura 6: RT-PCR do gene <i>Lgil</i> e α - <i>tubulina</i>	72
Figura 7: Cinética de amplificação do gene <i>Lgil</i> da PCR em tempo real	73
Figura 8: Cinética de amplificação do gene <i>Gapdh</i>	74
Figura 9: Cinética de amplificação dos genes <i>Lgil</i> e β - <i>actina</i>	74
Figura 10: Validação dos ensaios utilizados	75
Figura 11: Último passo da validação	76
Figura 12: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgil</i> , utilizando <i>Gapdh</i> como controle endógeno	77
Figura 13: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgil</i> , utilizando β - <i>actina</i> como controle endógeno	77
Figura 14: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgil</i> nos hemisférios cerebrais de camundongos de diferentes idades, utilizando <i>Gapdh</i> como controle endógeno	79
Figura 15: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgil</i> nos hemisférios cerebrais de camundongos de diferentes idades, utilizando β - <i>actina</i> como controle endógeno	79
Figura 16: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgil</i> comparando três regiões do encéfalo de camundongos	80

Figura 17: Anticorpo purificado por cromatografia líquida	81
Figura 18: Western blot da proteína Lgi1 nas diferentes idades estudadas	82
Figura 19: Quantificação relativa da expressão da proteína Lgi1 nas diferentes idades estudadas	82
Figura 20: Diagrama de dispersão mostrando os resultados de PCR em tempo real, com <i>Gapdh</i> e β -actina como controles endógenos, e de western blot	83
Figura 21: Esquema da via de silenciamento gênico pós-transcricional de RNAi	92
Figura 22: Esquema demonstrando etapas para a produção de esiRNA	102
Figura 23: Esquema da calota craniana de um camundongo e suas suturas	106
Figura 24: Materiais necessários para a injeção em animais canulados	109
Figura 25: Eletroporação local	110
Figura 26: Preparação de minibomba associada à cânula	111
Figura 27: Minibomba associada à cânula	112
Figura 28: Injeção veia caudal	114
Figura 29: Verificação dos oligos senso e anti-senso	120
Figura 30: Verificação e quantificação das moléculas de RNA produzidas por transcrição <i>in vitro</i>	120
Figura 31: Preparação das moléculas de esiRNA	121
Figura 32: Alinhamento da sonda de PCR em tempo real para camundongo com a sequência de <i>Lgi1</i> de rato	122
Figura 33: Esquema de um corte coronal de cérebro de camundongo	126
Figura 34: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em animais controle e em quatro camundongos cujo neocórtex esquerdo recebeu si_Lgi1	127
Figura 35: Localização da injeção com as coordenadas para córtex auditivo	128
Figura 36: Confirmação do posicionamento da cânula em terceiro ventrículo	128

Figura 37: Verificação da qualidade da extração de RNA	130
Figura 38: Quantificação relativa da expressão do gene <i>Lgi1</i> em hipocampo dos camundongos tratados com as três moléculas de siRNA	130
Figura 39: Expressão do gene <i>Lgi1</i> em animais que receberam injeção de 100ng ou 1µg de si_Stealth, seguida de eletroporação local, com diferentes tempos de retirada do hipocampo	131
Figura 40: Esquema dos grupos de animais utilizados para o segundo experimento de injeção de si_Stealth seguido de eletroporação	132
Figura 41: Expressão do gene <i>Lgi1</i> em hipocampus tratados com 1µg de si_Stealth, seguidos de eletroporação local, utilizando dois eletroporadores	133
Figura 42: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em hipocampus de animais que receberam si_Lgi1 ou si_irrelevante (irrel), seguido de eletroporação local	134
Figura 43: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em hipocampus de animais que receberam si_Stealth seguido de eletroporação local e foram sacrificados 24 horas após a injeção	135
Figura 44: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em hipocampus de animais que receberam si_Stealth seguido de eletroporação local e foram sacrificados 3 dias após a injeção	135
Figura 45: Gráfico de dispersão das médias da expressão relativa dos hipocampus esquerdos nos diferentes tempos estudados	136
Figura 46: Diagrama de dispersão dos valores de expressão, por PCR em tempo real, dos hipocampus tratados (esquerdos) e não tratados (direitos) em conjunto	137
Figura 47: Western blot mostrando a expressão da proteína Lgi1 em algumas amostras da curva de tempo para o método de eletroporação local	138
Figura 48: Comparação entre as quantificações relativas por PCR em tempo real e western blot de hipocampus tratados com si_Stealth, seguidos de eletroporação local	139
Figura 49: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em animais que receberam si_Stealth continuamente por 8, 11 ou 14 dias	140

Figura 50: Teste de complexação do peptídeo com 100pmol de si_Stealth	141
Figura 51: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em animais que receberam três doses de si_Stealth complexado ao RVG	142
Figura 52: Quantificação relativa do gene <i>Gapdh</i> em animais que receberam três doses de si_Gapdh complexado ao RVG	143
Figura 53: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em animais que receberam três doses de si_Lgi1 ou si_Lgi1_dna complexado ao RVG	144
Figura 54: Quantificação relativa do gene <i>Gapdh</i> de animais tratados com si_Gapdh complexado ao RVG	144
Figura 55: Comparação da expressão do gene <i>Gapdh</i> entre os dois testes realizados com RVG:si_Gapdh	145
Figura 56: Quantificação relativa de <i>Lgi1</i> em animais referentes ao terceiro teste com RVG	146
Figura 57: Quantificação relativa de <i>Lgi1</i> em animais tratados com duas injeções de esiRNA, si_Amb, si_Lgi1, si_Stealth	147
Figura 58: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em ratos tratados com duas injeções de RVG:si_Amb	147
Figura 59: Adaptações para a cirurgia extereotóxica em camundongos neonatos	148
Figura 60: Corte coronal de encéfalos de neonatos P4	149
Figura 61: RT-PCR de <i>Mecp2</i> e do controle endógeno, <i>α-tubulina</i>	150
Figura 62: Quantificação relativa do gene <i>Lgi1</i> em hemisférios cerebrais de neonatos retirados em diferentes tempos após a injeção de si_Lgi1 no hemisfério esquerdo	151
Figura 63: Verificação da transfecção utilizando um siRNA marcado com fluorescência complexado à emulsão lipídica	151
Figura 64: Teste de expressão de <i>LGII/Lgi1</i> , <i>Gapdh</i> e <i>18S</i> em seis culturas celulares	152

Figura 65: Quantificação relativa de <i>LGII</i> em U138MG, utilizando <i>GAPDH</i> e <i>18S</i> como controles endógenos da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Amb	153
Figura 66: Quantificação relativa de <i>GAPDH</i> em U138MG, utilizando <i>18S</i> como controle endógeno da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Gapdh	153
Figura 67: Quantificação relativa de <i>LGII</i> em U138MG, utilizando <i>18S</i> como controle endógeno da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Gapdh	154
Figura 68: Quantificação relativa de <i>LGII</i> em células tratadas com 50nM e 200nM de si_GFP e si_Amb, após 48 horas	155
Figura 69: Comparação dos dados gerados pelo GeNorm para os três grupos estudados, analisando os tratamentos em conjunto, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis	155
Figura 70: Quantificação relativa de <i>LGII</i> em células tratadas com 50nM e 200nM de si_GFP, si_Gapdh e si_Amb, após 48 horas, utilizando <i>18S</i> como controle endógeno	156
Figura 71: Comparação dos dados gerados pela análise de <i>LGII</i> com <i>18S</i> para os quatro grupos estudados, analisando os tratamentos em conjunto, pelo teste de Kruskal-Wallis ...	156
Figura 72: Quantificação relativa do gene <i>GAPDH</i> em células U138MG, após 48 horas da transfecção, utilizando o ensaio para <i>18S</i> como controle endógeno	157
Figura 73: Quantificação relativa de <i>Lgi1</i> em células Neuro2a tratadas com si_Stealth ...	158
Figura 74: Quantificação relativa do gene <i>Gapdh</i> em células Neuro2a	158

RESUMO

Introdução/Objetivo: Mutações no gene *LGII* foram descritas como causa da Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos em algumas famílias. Alguns estudos apontam para um possível envolvimento do gene *LGII* com migração e/ou proliferação neuronal, porém a função exata desse gene permanece desconhecida. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de expressão do gene *Lgil* em cérebro de camundongos durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e na fase adulta e, ainda, silenciar este gene em cérebros de camundongos utilizando a técnica de interferência por RNA (RNAi). **Métodos:** Acasalamentos programados foram realizados, utilizando camundongos Balb/c, para a obtenção de fetos de diferentes idades. Os cérebros de três animais, nas seguintes idades, foram retirados e os hemisférios direito e esquerdo separados: E15, E17, E18 dias (E: dias embrionários), P1, P7, P14 dias (P: dias pós-natal), 4, 6, 8 e 24 semanas. Também utilizamos cabeças inteiras de animais E13. Além disso, foram utilizados três animais adultos para a análise do gene *Lgil* em neocórtex, hipocampo e cerebelo. O perfil de expressão gênico foi determinado pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan[®] e por western blot. A técnica de RNAi foi realizada utilizando diferentes métodos de introdução de pequenas moléculas interferentes no cérebro de animais neonatos e adultos. Utilizamos também vários parâmetros diferentes no que se refere ao desenho das moléculas interferentes, suas concentrações, o local e o número de injeções. Além disso, experimentos de RNAi *in vitro* foram realizados, utilizando uma linhagem celular de glioblastoma humano, a U138MG, e uma linhagem de neuroblastoma murino, a Neuro2a. A confirmação do silenciamento gênico foi feita por PCR em tempo real e, em alguns experimentos, também por western blot. **Resultados:** A expressão do gene *Lgil* se apresentou baixa durante as idades intra-uterinas, aumentando progressivamente. Os animais em idade adulta apresentaram um aumento de expressão de 35 vezes quando comparadas às amostras E13, utilizando *Gapdh* como normalizador e de aproximadamente 28 vezes, utilizando β -actina. Embora o teste estatístico não tenha encontrado diferença na expressão do gene *Lgil* entre os hemisférios cerebrais, ele revelou uma diferença significativa entre as idades estudadas. Os experimentos de western blot confirmaram o perfil de expressão determinado pelos estudos de PCR em tempo real, encontrando-se, a

proteína Lgi1, em maior quantidade nas idades mais avançadas analisadas. O estudo de expressão das três regiões do cérebro não resultou em diferença estatisticamente significativa. O silenciamento do gene *Lgi1* foi realizado com sucesso pela técnica de RNAi, em cérebro de animais adultos, sendo que os resultados mais consistentes, redução da expressão de aproximadamente 50%, foram observados com o método de eletroporação local e confirmação do silenciamento por PCR em tempo real. Além disso, nós conseguimos demonstrar silenciamento de até 99% do gene *Lgi1* em cultura de células.

Conclusões/Discussão: O padrão de expressão baixo do gene *Lgi1* durante o desenvolvimento, com aumento progressivo e alta expressão na idade adulta aponta para uma potencial função inibitória da proliferação celular. Tal suposição encontra apoio em achados de neuroimagem de alguns pacientes com mutação em *LGII*. O silenciamento do gene *Lgi1* em cérebro de camundongos, utilizando a técnica de RNAi, foi alcançado, porém com grande dificuldade técnica. Esses obstáculos encontrados apontam para a existência de possíveis características moleculares próprias do gene *LGII* que poderiam dificultar seu silenciamento pela técnica da RNAi, tais como: um RNA mensageiro rico em proteínas associadas, impedindo o acesso da maquinaria de RNAi ou, ainda, *LGII* poderia ser um gene essencial, onde a diminuição de sua expressão ativaria processos celulares compensatórios.

ABSTRACT

Introduction/Objectives: Mutations in the *LGII* gene were described in some patients with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features and preliminary functional studies point to a possible involvement of *LGII* with migration and/or neuronal proliferation. However, the precise function of *LGII* remains unknown. The objective of the present study was to determine the expression pattern of the *Lgi1* gene in mice brain during central nervous system (CNS) development and in adult animals. In addition, we aimed to silence *Lgi1* in mouse brain using RNA interference (RNAi). **Methods:** Programmed mating was carried with Balb/c mice in order to obtain embryos of different ages. The brains of three animals at the following ages were removed and the right and left hemispheres were separated: E15, E17, E18 days (E: embryo days), P1, P7, P14 (P: post-natal days), 4, 6, 8 and 24 weeks old. We also studied E13 whole head animals. In addition we studied three different regions from 5 weeks-old animal brains: neocortex, hippocampus and cerebellum. Gene expression assays were carried out using real time PCR with the TaqMan[®] system and western blot experiments. RNAi was performed using different methods for injection of interfering molecules into the neonate and adult brains. We also used different molecule designs and concentrations, as well as the number and the local of injections was varied. Furthermore, we performed *in vitro* RNAi experiments using a glioblastoma cell line, U138MG, and a murine cell line, Neuro2a. Gene silencing confirmation was carried out by real time PCR and western blot assays. **Results:** *Lgi1* gene expression was significantly low during the intrauterine ages increasing progressively until the adult stages. Samples from adult animals presented a 35 fold increase in expression as compared to E13 samples, using *Gapdh* as endogenous control, and when we use β -actin, adult samples presented approximately 28 fold increase in *Lgi1* expression. There were no statistical differences between *Lgi1* gene expression test between right and left hemispheres. However, a significant difference in expression was found among the different ages studied. The western blot showed higher expression of the Lgi1 protein in the most advanced ages analyzed, confirming the expression profile observed in the real time PCR studies. However, we did not find any statistic difference between the three regions of the brain studied. In addition, we achieved significant gene silencing of *Lgi1*, reduction of

expression of approximately 50%, in brain of adult animals using RNAi and the local electroporation method. In addition, we demonstrated up to 99% silencing of *LGII* in cell culture. Conclusions/Discussion: The *Lgil* expression profile, which is characterized by low expression in the initial stages of development with progressive increase as the animal developed, could be explained by a possible inhibitory functional role in neuronal proliferation during CNS development. *Lgil* gene silencing in adult brain using RNAi technique was achieved after several attempts. These difficulties in gene silencing, point to the presence of intrinsic molecular characteristics of *LGII* which could be preventing silencing by RNAi, such as a message RNA too rich of associated proteins that may impairing the action of RNAi machinery; or *LGII* could be an essential gene, with very strong and stringent compensatory mechanisms; therefore, when attempting to decreased its expression one would activate the compensatory processes.

1- INTRODUÇÃO GERAL

As epilepsias formam um grupo de síndromes neurológicas crônicas e possuem grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, graus de morbidade e prognóstico, podendo estar associadas ou não a outras condições patológicas. No entanto, a característica comum a todas as síndromes epiléticas é a ocorrência de crises. A crise epilética é causada por descargas neuronais anormais que ocorrem de forma passageira, sincrônica e desorganizada (Zielinski, 1988), tendo manifestações clínicas dependentes da região do cérebro envolvida.

A prevalência das epilepsias é alta, atingindo aproximadamente 1 a 1,5% da população geral, fazendo da epilepsia uma das alterações neurológicas mais comuns (Zielinski, 1988). Um estudo brasileiro, realizado na população urbana da cidade de São José do Rio Preto (SP), encontrou uma prevalência de epilepsia de 18,6 em 1000 habitantes (Borges et al., 2004). Destes, 8,2 por 1000 eram ativos, ou seja, tiveram pelo menos uma crise nos últimos dois anos. Tal observação já havia sido descrita anteriormente em populações de outras origens étnicas e geográficas (Hauser et al., 1990; 1991; Olafsson et al., 1996), demonstrando que as epilepsias se distribuem mundialmente com uma alta frequência.

Dentre os vários tipos de epilepsias existentes, a epilepsia do lobo temporal é a mais freqüente em adultos, representando cerca de 40% do total de casos (Sutula, 1990). Somente nos Estados Unidos são 2,5 milhões de pessoas afetadas, sendo cerca de 40% dos pacientes refratários ao tratamento (De Lanerolle et al., 2005).

Um dos subtipos de epilepsia do lobo temporal é a Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos (EPADSA) que é uma síndrome benigna com início das crises principalmente entre a segunda e a terceira década de vida e sem associação com crises febris. Os indivíduos portadores desta síndrome apresentam a ocorrência de aura com componente auditivo e/ou afasia ictal, algumas vezes disparadas por ruídos ou sons no ambiente, que precedem as crises parciais complexas (Cendes et al., 2005).

O primeiro relato de uma grande família com padrão de herança autossômico dominante com EPADSA foi realizado por Ottman e colaboradores (1995), que também descreveram ligação no cromossomo 10q para esta síndrome. Famílias com características

clínicas e padrão de herança similar foram descritas, tendo o *locus* mapeado na mesma região (Poza et al., 1999; Brodtkorb et al., 2002). Após oito anos de estudo, em 2002, Kalachikov et al. descreveram o gene *LGII* (*leucine-rich, glioma inactivated 1*) como sendo o responsável por essa síndrome. Estudos posteriores confirmaram a presença de diferentes mutações no gene *LGII* em várias famílias com EPADSA, levando a troca de aminoácido ou a uma proteína truncada (Gu et al., 2002; Morant-Redolat et al., 2002; Fertig et al., 2003; Kobayashi et al., 2003; Michelucci et al., 2003; Pizutti et al., 2003; Berkovic et al., 2004; Hedera et al., 2004; Ottman et al. 2004; Chabrol et al., 2007b). Entretanto, algumas famílias foram descritas com características clínicas similares porém sem alterações em *LGII* (Bisulli et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Torres, 2008).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou, utilizando exame de ressonância magnética, que os pacientes de uma família com EPADSA e mutações no gene *LGII* apresentam uma malformação de lobo temporal, caracterizada por aumento de volume do lobo temporal, principalmente do córtex temporal lateral (Kobayashi et al., 2003). Uma característica interessante é que essa hipertrofia do lobo temporal foi encontrada apenas no hemisfério esquerdo (Kobayashi et al., 2003), dados estes corroborados por Tessa e colaboradores (2007), mais recentemente. Além disso, foi descrita uma predominância de alterações em eletroencefalograma (EEG) no hemisfério esquerdo de pacientes com EPADSA (Gu et al., 2005) e também uma disfunção no processamento do córtex auditivo esquerdo em pacientes com essa síndrome (Brodtkorb et al., 2005; Pisano et al., 2005).

O gene *LGII* ocupa cerca de 40,3Kb e consiste de 8 exons que variam entre 72 e 1192 pares de base (pb) (Krex et al., 2002). O seu RNA mensageiro (RNAm) possui aproximadamente 2,4Kb e prediz uma proteína de 557 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 64kD (Chernova et al., 1998). A estrutura da proteína LGI1 possui, na porção N-terminal, um peptídeo sinal (sinalização para retículo endoplasmático) e três repetições funcionais ricas em leucina (LRR – *leucine rich repeat*), flanqueadas por seqüências ricas em cisteína (Chernova et al., 1998). A região C-terminal é composta por sete repetições diretas em *tandem* de 44 aminoácidos, denominados de domínios EPTP (*epitempin*) ou EAR (*epilepsy-associated repeat*) (Staub et al., 2002; Scheel et al., 2002) e um possível domínio transmembrana (Chernova et al., 1998). A seqüência de aminoácidos

de *LGII* possui 97% de homologia à mesma sequência em camundongos e 91% quando se compara a sequência de nucleotídeos (Somerville et al., 2000).

LGII e câncer

O gene *LGII* foi primeiramente descrito como um supressor tumoral em gliomas, uma vez que duas linhagens celulares de glioblastomas (um tipo de glioma) apresentavam rearranjos cromossômicos na região de *LGII*, resultando na ausência completa da expressão deste gene (Chernova et al., 1998). Corroborando estes resultados, Besleaga e colaboradores (2003) encontraram uma expressão diminuída de *LGII* em gliomas de alto grau, comparando com tumores de menor gravidade. Por outro lado, refutando a hipótese de supressão tumoral, mutações em *LGII* ou um padrão diferencial de metilação não foram encontradas em células de glioblastomas (Somerville et al., 2000; Krex et al., 2002; Piepoli et al., 2006). Além disso, não foi encontrado um aumento de risco de gliomas ou outros tumores cerebrais em pacientes com EPADSA portadores de mutação em *LGII* (Brodtkorb et al., 2005; Gu et al., 2005). Alguns trabalhos demonstraram que a expressão desse gene é predominantemente em neurônios (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002; Senechal et al., 2005; Piepoli et al., 2006), não sendo relevante em células gliais, o que implicaria em uma reconsideração do envolvimento de *LGII* em gliomas. Contudo, em 2007, um animal transgênico, contendo a expressão de *LGII* associada ao gene repórter GFP, revelou por imunoistoquímica a presença de *LGII* tanto em neurônios como em células da glia; além disso, foi identificada a presença dessa proteína fora do sistema nervoso central (SNC), em regiões específicas de diferentes órgãos, como nas ilhotas de Langerhans (apesar do pâncreas quase não apresentar sinal); e nas glândulas sebáceas, (embora a pele não expresse *LGII*; Head et al., 2007). Também foram encontrados níveis altos de expressão em regiões glandulares da próstata, túbulos renais, endométrio, ovário e testículos (Head et al., 2007). Recentemente, dois trabalhos, envolvendo carcinomas não relacionados com o SNC, descreveram alterações na expressão de *LGII* nos tecidos afetados (Fialka et al., 2008; Peng et al., 2008). Um dos estudos comparou amostras de tecido gástrico e de mucosa esofágica normais com amostras de adenocarcinomas associados com esôfago de Barret e encontrou uma redução de 100% da expressão de *LGII* nas amostras neoplásicas (Peng et al., 2008). O outro trabalho analisou carcinoma de

células escamosas oral, a forma de câncer mais comum de cabeça e pescoço, comparando tecido neoplásico e mucosa normal de dois grupos de pacientes, divididos de acordo com a gravidade do tumor (Fialka et al., 2008). Esses autores encontraram diminuição da expressão de *LGII* nas amostras de câncer em estágios iniciais, comparadas às normais, porém, nas amostras de pacientes com tumores em estágios mais avançados, foi observada uma redução em ambos os tecidos, neoplásicos e normais, sendo proposto pelos autores que a alta expressão desse gene poderia ajudar a prevenir a propagação tumoral (Fialka et al., 2008). Desse modo, apesar de não totalmente elucidado, parece haver um claro envolvimento de *LGII* em alguma etapa da formação e/ou propagação tumoral, pelo menos em carcinomas gástricos e de mucosa oral; já o papel inicial proposto na patogênese de gliomas permanece muito controverso (Chernova et al., 1998; Somerville et al., 2000; Krex et al., 2002; Besleaga et al., 2003; Gu et al., 2005; Piepoli et al., 2006).

LGII e epileptogênese

Apenas recentemente dados interessantes sobre os possíveis papéis do gene *LGII* na epileptogênese, assim como sua participação em eventos sinápticos, têm surgido. Schulte e seu grupo (2006) demonstraram por espectrometria de massas que a proteína LGI1 se complexa com Kv1.1, o maior constituinte dos canais pré-sinápticos tipo A que modulam a transmissão sináptica no SNC. Os autores propõem que a proteína LGI1 diminuiria a velocidade de inativação desses canais de potássio, mediada pela subunidade Kvbeta1 (Schulte et al., 2006). Outro trabalho, também utilizando espectrometria de massa, mostrou que ADAM22, uma proteína presente na membrana neuronal, funciona como um receptor para LGI1 e demonstra que essa ligação de LGI1 a ADAM22 levaria a um aumento da transmissão sináptica via receptores AMPA, um dos principais responsáveis por sinapses excitatórias (Fukata et al., 2006). Vale a pena mencionar que apesar das evidências de ligações de LGI1 com Kv1.1 e ADAM22, não foram encontradas mutações nos genes que codificam essas proteínas em famílias EPADSA, sem alterações em *LGII* (Chabrol et al., 2007a; Diani et al., 2008).

Porém, anteriormente, Senechal e colaboradores (2005) apresentaram evidências que a apontavam LGI1 como uma proteína que seria secretada, ou seja, não seria uma proteína transmembrana e, portanto, não poderia participar de mecanismos intracelulares,

como modular ligações com canais de potássio citosólicos. Sirerol-Piquer e colegas (2006) confirmaram a secreção celular da proteína LGI1, além de demonstrar que tal secreção apenas ocorre se a mesma estiver glicosilada e se seus domínios EPTP/EAR estiverem intactos.

Neste momento, os dois achados anteriores de certa forma parecem contraditórios, porém, não podemos nos furtar de propor a hipótese de que ambas evidências estejam corretas e que as formas secretadas e as que atuam intra-celularmente com Kv1.1 e ADAM22 simplesmente ocorram como variantes (decorrentes, por exemplo, de *splicing* alternativo) em tipos celulares diferentes, obedecendo as necessidades neurofisiológicas celulares específicas, sejam elas teciduais ou até de acordo com o estágio de desenvolvimento do organismo.

O gene *LGII* foi o primeiro gene identificado envolvido com epilepsias idiopáticas que não codifica um canal iônico ou um receptor de neurotransmissores e, apesar dos diversos estudos publicados até o momento, sua função exata e seu envolvimento na fisiopatologia da EPADSA permanecem controversos.

2- OBJETIVOS GERAIS

1. Estudar o padrão de expressão do gene *Lgil* em cérebro de camundongos adultos, neonatos e em desenvolvimento.
2. Silenciar o gene *Lgil* através da técnica de interferência por RNA.

De acordo com estes objetivos, a tese foi dividida em dois capítulos:

- **Capítulo 1:** Estudo da expressão do gene *Lgil* em cérebro de camundongos
- **Capítulo 2:** Silenciamento gênico de *Lgil* por RNAi

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE *Lgi1* EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS

3.1- INTRODUÇÃO

As características de um organismo são determinadas pela expressão dos seus genes, sendo esses níveis de expressão dinâmicos. Assim, o estudo da expressão gênica e também das mudanças nos padrões de expressão, podem ser cruciais para o entendimento de diversos processos biológicos (Roth, 2002).

Nos últimos anos, diversas ferramentas têm sido desenvolvidas para o estudo da expressão gênica, entre elas se destacam os *microarrays*, a análise em série de expressão gênica, ou SAGE, e a PCR em tempo real. Elas se baseiam no dogma central da biologia molecular, em que moléculas de DNA são transcritas em RNAs, que são traduzidos, gerando proteínas. Essas técnicas utilizam a quantificação do RNAm em um determinado tecido ou em amostras de células para a análise da expressão.

As técnicas de *microarrays* e SAGE permitem uma análise em paralelo de vários, no caso de *microarray*, de milhares de genes em poucas amostras, normalmente dois grupos de comparação, de uma só vez (Schena et al., 1995). Já a PCR em tempo real promove a quantificação de um número limitado de genes, porém, permitindo a análise simultânea de diferentes amostras ou tecidos (Vandesompele et al., 2002).

A PCR em tempo real, ou PCR quantitativa, ganhou muita popularidade e tem sido freqüentemente utilizada para a quantificação de transcritos, sendo a inovação mais promissora aplicada à RT-PCR convencional (Tanic et al., 2007; Vanguilder et al., 2008). Assim como a RT-PCR, a PCR quantitativa infere a quantidade inicial de um determinado cDNA pelo comportamento da cinética de amplificação, porém com resultados muito mais acurados e reprodutíveis.

A quantificação em tempo real é baseada no aumento da intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade de moléculas amplificadas. Existem vários tipos de moléculas fluorescentes utilizadas para a PCR quantitativa, que podem estar ligadas aos iniciadores ou às sondas empregadas ou podem estar presentes no tampão utilizado para a reação, como é o caso do SYBR®Green, que são moléculas com alta afinidade por duplas-fitas de DNA (Gachon et al., 2004). Esse sistema de detecção pode ser utilizado para qualquer seqüência, por isso oferece uma grande vantagem econômica para laboratórios que estudam um grande número de genes, porém, tem como desvantagem a

inespecificidade (Gachon et al., 2004). O equipamento de PCR em tempo real faz a leitura da fluorescência emitida pela formação de novas moléculas durante a reação de amplificação e faz a coleta de dados a cada ciclo de amplificação, permitindo a visualização em tempo real de toda as fases da cinética da reação.

A cinética de amplificação de uma PCR é composta por três fases, como ilustrado na Figura 1: a geométrica, caracterizada por apresentar alta precisão na duplicação do número de moléculas, uma vez que todos os reagentes necessários estão presentes em quantidade suficiente para todas as moléculas de DNA ou cDNA iniciarem sua replicação; na segunda fase, a linear, a taxa de produção de novas cadeias passa gradualmente de uma progressão geométrica para uma progressão linear, devido à diminuição na quantidade dos reagentes; e na última fase, chamada de platô, a produção de novas fitas é baixa ou nula. Vale ressaltar que no início da reação existe uma linha basal que corresponde a um número muito pequeno de produtos de PCR para ser detectado (Figura 1).

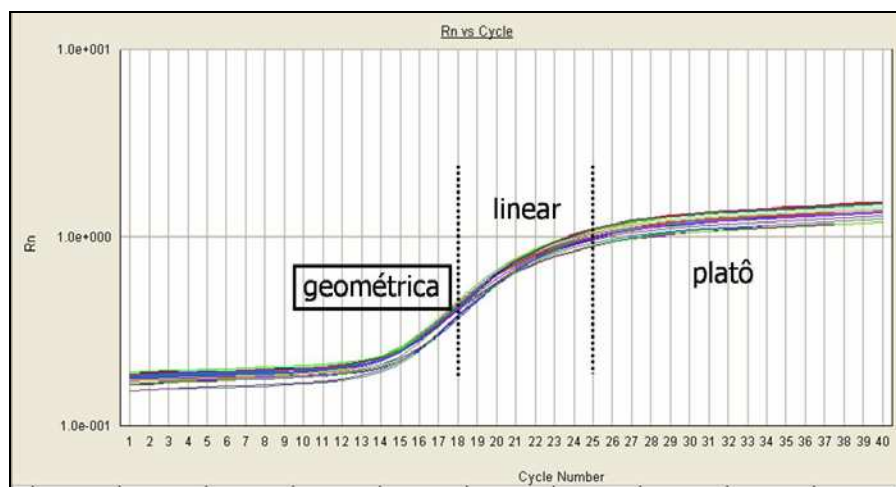


Figura 1: Cinética de amplificação, evidenciando-se a fase geométrica utilizada para a quantificação das moléculas iniciais de cDNA.

A fase geométrica, ou exponencial, por ser o momento de maior eficiência de amplificação, é a fase utilizada para o cálculo da quantidade inicial de moléculas, na PCR em tempo real.

A quantificação de expressão pode ser absoluta ou relativa (Livak e Schmittgen, 2001). Na quantificação absoluta são obtidos valores numéricos com uma unidade de

medida, como número de cópias ou nanogramas, utilizando-se amostras padrões com concentrações previamente conhecidas para comparação. Já a quantificação relativa descreve a expressão gênica de uma amostra relativa à outra, sendo assim, os resultados desta forma de quantificação representam ordens de grandeza, como por exemplo, duas vezes mais expresso ou cinco vezes menos expresso. A quantificação relativa é um método mais fácil e mais barato de se quantificar a expressão gênica, já que não necessita da utilização de uma curva padrão para cada corrida (Livak e Schmittgen, 2001).

Em ambos os tipos de quantificação é necessária a utilização de um controle endógeno, isto é, um gene de referência com expressão homogênea entre as amostras analisadas, para a normalização dos dados (Vandesompele et al., 2002; Tanic et al., 2007). A utilização de um controle interno corrige possíveis diferenças de amplificação causadas por erro de quantificação de RNA, de pipetagem ou variações na reação de transcrição reversa, levando a uma diferença na quantidade inicial de cDNA (Tanic et al., 2007).

Além da PCR em tempo real, existem outras técnicas que permitem a análise da expressão gênica através do RNAm, como northern blot e hibridização *in situ*, porém são métodos menos sensíveis, às vezes caros ou muito laboriosos para serem aplicados em um grande número de amostras (Richards e Poch, 2002).

3.2- OBJETIVOS

O objetivo principal deste capítulo foi determinar o perfil de expressão do gene *Lgi1* em cérebro de camundongos durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e na fase adulta.

Os objetivos específicos foram:

- obtenção de camundongos em idades precisas intra-útero e pós-natal;
- analisar a expressão de *Lgi1*:
 - em cérebros de diferentes idades;
 - nos hemisférios cerebrais nas diferentes idades;
 - em diferentes regiões do cérebro em animais adultos.

3.3- MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para os estudos de expressão gênica nós utilizamos camundongos (*Mus musculus*) SPF (*specific pathogen free*), pertencentes à linhagem BALB/c, com diferentes idades. Esses animais foram produzidos e mantidos no Centro de Estudos Multidisciplinares de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do IB – UNICAMP (CEEAA_IB 827-1, 8 jun 05).

Acasalamentos programados

Fêmeas prenhes, para a obtenção de animais em idades intra-útero, não são adquiridas facilmente em biotérios. Desta forma, foi necessária a realização de acasalamentos programados, para a obtenção de fetos com idades bem estabelecidas. Os animais em idades neonatais também foram obtidos por este método, que utiliza o conhecimento do ciclo estral das fêmeas para o acasalamento.

O ciclo estral (correspondente ao ciclo menstrual em mulheres) de camundongos tem duração de quatro a cinco dias e é composto por quatro fases: proestro (duração de aproximadamente 12 horas), estro (12h), metaestro (21h) e diestro (57h), sendo durante a fase de estro que a fêmea está receptiva ao macho (Guimarães e Mázaró, 2004; Hafez, 1970).

Essas fases podem ser determinadas pelos tipos celulares observados na lavagem vaginal, que é feito aplicando na vagina da fêmea 10µL de água destilada com auxílio de micropipeta e ponteira estéril. A secreção vaginal coletada é colocada sobre uma lâmina de vidro e o material pode ser observado diretamente em microscópio óptico (lentes de 10X e 40X), sem a utilização de corantes (Marcondes et al., 2002).

Na fase de proestro são observadas predominantemente células epiteliais (células redondas), já na fase de estro as células são cornificadas, em diestro há predominância de uma grande quantidade de leucócitos (células bem pequenas) e a fase de metaestro, que é intermediária entre as duas últimas citadas, apresenta os três tipos celulares em proporções semelhantes.

Foram utilizados dois grupos de nove fêmeas (um grupo em março e o outro em maio de 2005) e cinco machos, com 2 a 3 meses de idade. A lavagem vaginal era feita no período da manhã, entre 8h00 e 9h00, e as fêmeas que estavam em proestro ou em estro eram colocadas na presença de um macho, no período da tarde, entre 15h00 e 16h00. Eram colocadas de uma a três fêmeas com um macho, por gaiola, que eram separados no dia seguinte, pela manhã, para garantir a precisão na idade da gestação.

A confirmação da prenhez era feita pelo acompanhamento do peso e por apalpação abdominal (Onojafe, 2005).

Preparação dos tecidos

A retirada dos cérebros de camundongos neonatos e adultos foi realizada a partir da decaptação dos animais e posterior remoção com o auxílio de pinça e tesoura. Os cérebros dos animais em diferentes estágios de desenvolvimento intra-útero foram removidos cirurgicamente pelo Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP.

Os cérebros de animais foram cortados sagitalmente, separando os hemisférios cerebrais, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C , para posterior extração de RNA e proteína.

Foram coletados tecidos nervosos das seguintes idades: E15, E17, E18, P1, P7, P14, 4, 6, 8 e 24 semanas de idade (E: dias embrionários; P: dias pós-natal). Também utilizamos animais E13, porém destes foi utilizada a cabeça inteira, devido ao tamanho reduzido do animal. Vale ressaltar que a gestação de camundongos BALB/c dura cerca de 19 dias.

Também foram estudadas, em animais com 5 semanas de idade, três diferentes regiões do encéfalo: neocórtex, hipocampo e cerebelo. A porção do neocórtex removida foi uma área retangular: 3mm a partir do vértice do lambda, descendo até a porção mais inferior, na base do cérebro, como mostrado na Figura 2. Foram dissecados hipocampus direito e esquerdo e as regiões do neocórtex de ambos hemisférios, enquanto que o cerebelo foi retirado inteiro. Este procedimento foi auxiliado pelo Prof. Dr. Francesco Langone, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB-UNICAMP.

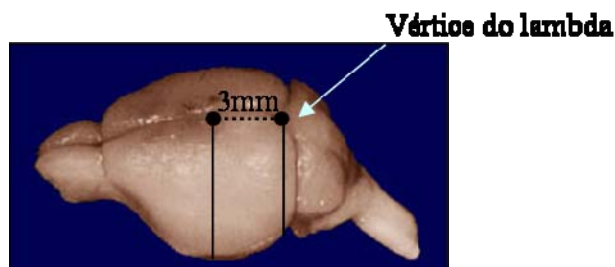


Figura 2: Porção do neocórtex retirada para análise de expressão gênica.

PCR em tempo real

O padrão de expressão do gene *Lgi1* foi verificado por PCR em tempo real, utilizando cérebro de três camundongos nas 11 diferentes idades estudadas. Igualmente, para as análises das diferentes regiões cerebrais, foram utilizados três animais.

O RNA total foi extraído a partir dos tecidos nervosos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo-se protocolo do fornecedor. A determinação da concentração e pureza do material foi realizada com o auxílio do aparelho GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences). A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com SYBR Safe (Invitrogen).

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas de RNA total de cérebro de camundongo foram incubados com 250ng de oligos randômicos (Invitrogen), 1μL de dNTP mix (10mM) e água para um volume de 14μL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4μL de 5x First-Strand Buffer, 1μL de DTT (0,1M) e 200U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

Antes de iniciarmos os experimentos de PCR em tempo real, fizemos algumas reações de RT-PCR, a fim de testar a transcrição reversa, utilizando 1U da enzima Taq DNA Polymerase (Fermentas), 10pmol de iniciadores específicos para o gene *Lgi1* (senso: 5'AAGTTGAAGTGGCTGGTGGAA e anti-senso: 5'ATAACAGGGCGCTGAGAACTA) e para o controle endógeno *α-tubulina* (senso: 5'CTCTCTGTGGATTACGGAAAG e anti-senso: 5'GGTGATCTCTGCTACAGAAAG). Os ciclos da reação de PCR foram: um ciclo

de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, seguido de um ciclo a 72°C por 10 minutos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system), utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems), que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com fluoróforo. Foi utilizado um ensaio já otimizado e validado (Assays-on-DemandSM - Applied Biosystems) para o nosso gene de interesse (Mm00522315_m1), o qual a empresa apenas fornece a sequência da sonda (5'GCTGCAGCTCTTGTTATTTACGTCG), mantendo em sigilo as dos iniciadores. Essa sonda é marcada com o fluoróforo FAM e está localizada no final do exon 2 e início do exon 3, evitando contaminação de DNA, na posição 276 da sequência do CDS do *Lgi1* (NM_020278; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os genes escolhidos como controles endógenos das reações de PCR quantitativo foram *Gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e β -*actina*, sendo estes ensaios marcados com VIC e também já otimizados (Mouse GAPD endogenous control e Mouse ACTB Endogenous Control; Applied Biosystems).

Decidiu-se fazer os experimentos de expressão gênica utilizando o sistema TaqMan® devido a sua grande especificidade ao gene de interesse e também a grande reprodutibilidade dos resultados. Uma outra vantagem do sistema é reduzir as chances de competição por reagentes devido a contaminação da reação com DNA, uma vez que a sonda é desenhada no limite de dois exons. A escolha por ensaios já otimizados nos reduziu tempo e reagente gastos com padronizações de experimentos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata ou triplicatas, a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de iniciadores e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA; com volume final de 12,5µL. As reações para o gene alvo e para o controle endógeno foram realizadas separadamente, na mesma placa (*singleplex*). Os reagentes, com exceção do cDNA, foram todos pipetados dentro de um fluxo laminar (livre de ácidos nucleicos), a fim de proteger os reagentes de contaminação de cDNA de experimentos anteriores. Para todas as corridas e para cada par de iniciadores foi feito um “branco” (reação com todos os reagentes e água substituindo o cDNA). As condições de ciclagem para amplificação utilizadas foram: 50°C por 2 minutos,

95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo.

As análises de quantificação relativa de *Lgi1* foram calculadas pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). “Ct” vem da sigla em inglês *threshold cycle* e quer dizer, ciclo em que cada curva de amplificação atravessa *threshold*, sendo esta uma linha de referência estabelecida pelo usuário. Essa linha de referência (*threshold*) deve ser posicionada na região de amplificação exponencial da reação, servindo como base para comparação entre amostras.

O método de Ct comparativo é determinado pela equação (Livak e Schmittgen, 2001):

$$RQ = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

A média dos Cts de cada amostra é calculada, tanto para o gene alvo, como para o controle endógeno e, então, é determinado o valor de ΔCt ($\bar{X} Ct_{\text{alvo}} - \bar{X} Ct_{\text{endog}}$). O $\Delta\Delta Ct$ é calculado, subtraindo-se o ΔCt do calibrador pelo ΔCt da amostra. O calibrador é a amostra escolhida pelo usuário como referência, que terá o valor de $RQ = 1$ (Livak e Schmittgen, 2001). O valor de RQ (*Relative Quantification*) expressa quantas vezes a amostra em questão está mais expressa em relação ao calibrador.

Os cálculos de RQ, para a análise da expressão, são realizados pelo aplicativo 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). As barras verticais presentes nos gráficos resultantes dessas análises representam os valores máximos e mínimos obtidos.

Validação dos ensaios

Para se iniciar os experimentos de PCR em tempo real foi necessário primeiramente fazer a validação dos ensaios utilizados, demonstrando que as eficiências de amplificação dos iniciadores para o gene de interesse e para o controle endógeno eram semelhantes.

A eficiência é calculada através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1,$$

onde *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: *log* da concentração das

amostras x Ct (Figura 3). O valor da eficiência deve ser $1 \pm 0,1$, ou seja próxima a 100% e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R2 também gerado a partir da curva padrão indica o quanto as réplicas estão parecidas, ou seja, indica o grau de confiabilidade dos dados. Este valor deve ser maior que 0,95, o que indica maior de 95% de confiabilidade.

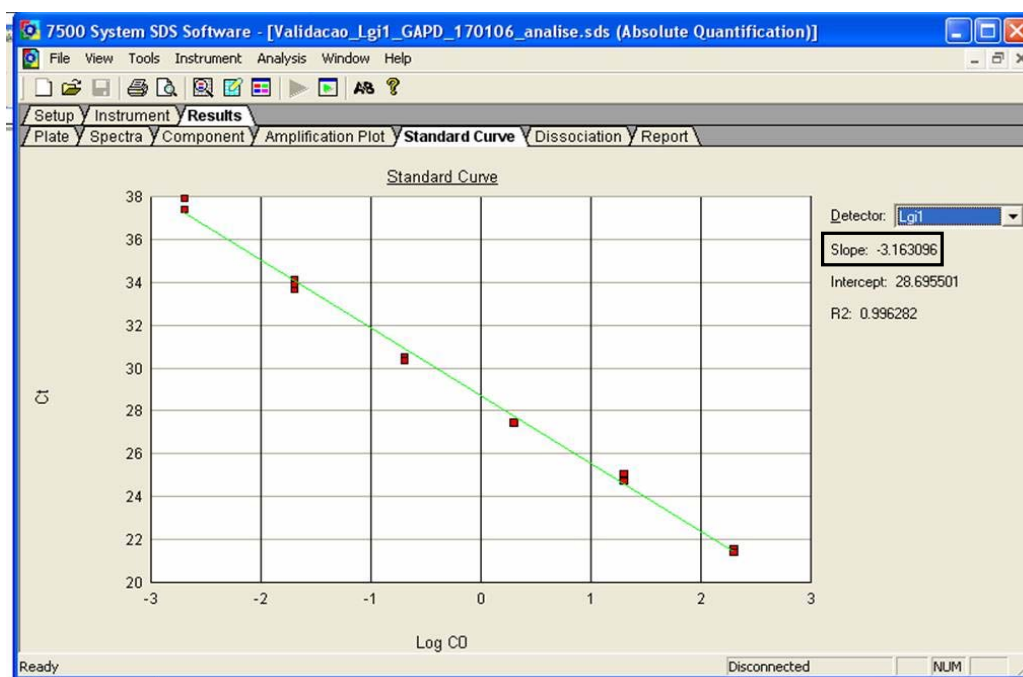


Figura 3: Curva padrão para validação das reações de PCR em tempo real. Tela do aplicativo “7500 System SDS Software” mostrando a curva padrão gerada a partir do *log* da concentração das amostras (eixo x) e os Cts (eixo y). Notar quadro destacando o valor de *slope* (inclinação da reta) que é utilizado no cálculo da eficiência da amplificação.

Para a validação dos três ensaios, *Lgi1*, *Gapdh* e β -actina, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de cérebro de camundongo com diferentes concentrações (diluições seriadas de 1 *log* = 10 vezes menos concentradas; e de 0,7 *log* para *Gapdh* e β -actina, respectivamente). Essa grande variação de concentrações nos permite conhecer se posteriormente poderemos trabalhar com segurança com possíveis amostras que tenham a expressão muito baixa, por exemplo.

Após o cálculo das eficiências de amplificação dos genes alvo e endógeno, foi construída uma curva, como indicado pelo protocolo, fora do aplicativo do “7500 System SDS Software”, utilizando no eixo x os mesmos valores de *log* da concentração das amostras e no eixo y a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e dos Cts do gene de interesse. O valor da inclinação da curva deve ser menor que 0,1.

Desta forma, a validação é importante para dar confiabilidade para os resultados: primeiro, garantindo que o controle endógeno escolhido tenha uma eficiência parecida ao do gene alvo e, portanto, podem ser utilizados juntos; segundo, validando a faixa de valores de Ct confiáveis, tanto para endógeno como para alvo, para se aceitar os resultados de RQ gerados.

Western blot

A análise semiquantitativa da proteína Lgi1 foi realizada por western blot, utilizando extratos protéicos de cérebro de um animal E13 e do hemisfério direito de um animal nas idades E15, E17, E18, P1, P7, P14 e 8 semanas de vida.

A extração de proteínas do tecido nervoso desses animais foi realizada conforme descrito por Deshane e colaboradores (2004), com pequenas modificações. O tecido foi homogeneizado em tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, [(3-colamidopropil) dimetilamônio,]-1- propanossulfonato (CHAPS) a 4%, DTT 70mM e amidosulfobetaina-14 (ASB-14) a 2%, suplementado com coquetel de inibidores de proteases a 1%), com o auxílio do aparelho Politron (Fischer Scientific). Após centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas foi obtida pelo método de Bradford.

Nos experimentos de western blot foram testados dois anticorpos policlonais contra Lgi1: P01C258 e sc-9583 (Santa Cruz Biotechnology[®], inc). O primeiro foi produzido pelo grupo de Morante-Redolat (2002) contra uma sequência na porção N-terminal, localizada entre os aminoácidos 201-220. O segundo é um anticorpo comercial, produzido contra a porção C-terminal da proteína.

O anticorpo contra Lgi1 P01C258 nos foi gentilmente cedido pelo Prof^o Jordi Perez-Tur, do Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biomedicina de Valência, Espanha. Esse anticorpo estava em uma solução de sulfato de amônio e, para utilizá-lo, fez-

se necessária purificação por cromatografia líquida (ÄKTA FLPC, GE Healthcare). Inicialmente foi realizada uma diálise do anticorpo em tampão de fosfato (20mM) durante a noite e, no dia seguinte, esta amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Utilizamos uma coluna de Sefarose A, Hitrap rPrtotein AFF (GE Healthcare) para a purificação. As amostras coletadas foram verificadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10% (Sambrook et al., 1989), utilizando 3µL do purificado adicionado a 3µL de tampão da amostra 2X SDS (0,125M Tris-HCl pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 10%), que foram aquecidas a 95°C por 3 minutos antes de serem aplicadas no gel. A corrida do gel foi realizada a 60V por 2 horas, seguido de 120V por mais 25 minutos e a coloração foi feita com Coomassie brilliant blue R 250.

Para os experimentos de western blot, o extrato proteico total foi separado em gel de SDS-PAGE 10% (Sambrook et al., 1989) a 120V por 1 hora e 30 minutos e transferido para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (GE Healthcare) usando o aparelho de eletroblot Multiphor II (GE Healthcare) a 3500V por 2 horas. O bloqueio foi realizado em solução de TBS 1X contendo 5% de leite em pó magro por 2 horas e lavado duas vezes com TBS 1X. Em seguida, a membrana foi incubada por 16 horas com os anticorpos primários, em diferentes concentrações, contra a proteína Lgi1 e contra β-actina (Abcam), utilizada como controle. No dia seguinte, a membrana foi lavada duas vezes com TBS 1X e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído 1:20000) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich). As bandas foram detectadas pela incubação da membrana com tampão de revelação acrescido de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol-fosfatase) e NBT (NitroBlue Tetrazólico) (ambos da Sigma-Aldrich). Para os experimentos com o anticorpo sc-9583 foi acrescido um passo anterior à incubação com anticorpo secundário, pois ele foi produzido em cabra não sendo reconhecido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho. Desta forma, a membrana foi incubada com um anti-IgG de cabra produzido em coelho (Sigma-Aldrich) (diluído 1:5000) por 2 horas, permitindo o reconhecimento pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

Para a densitometria das bandas dos géis de western blot foi utilizado o programa ImageJ (Abramoff et al., 2004), com o objetivo de quantificar a presença da proteína Lgi1 normalizada com a β-actina presente no cérebro dos animais estudados.

Análises estatísticas

Para verificar a existência de diferenças na expressão gênica entre as idades e entre os dois hemisférios, foi empregado o teste estatístico ANOVA. Quando uma variação significativa foi encontrada, utilizou-se o teste de Tukey para identificar diferenças entre grupos específicos.

A diferença entre as regiões do cérebro estudadas foi verificada pelo teste de Friedman. Já o teste de Wilcoxon foi aplicado para testar diferenças entre os lados direito e esquerdo do neocórtex e hipocampo.

Para as análises estatísticas foram empregados o aplicativo SAS Systems for Windows (SAS v8.02) e o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003). O nível de significância utilizado foi 5%.

3.4- RESULTADOS

Acasalamentos programados

Para se adquirir fêmeas prenhes e ainda com idade gestacional exata, faz-se necessário fazer um cronograma de acasalamento juntamente com os funcionários do CEMIB (UNICAMP) e, mesmo assim, existe a possibilidade de se obter um número pequeno ou nulo de animais prenhes. Isso ocorreu por duas vezes, o que nos fez perder dois meses de trabalho esperando fêmeas que não ficaram prenhes. Por esse motivo resolvemos fazer o acasalamento dos animais.

Iniciamos os acasalamentos baseados na lavagem vaginal que indicava a fase do ciclo estral na qual a fêmea se encontrava (Figura 4).

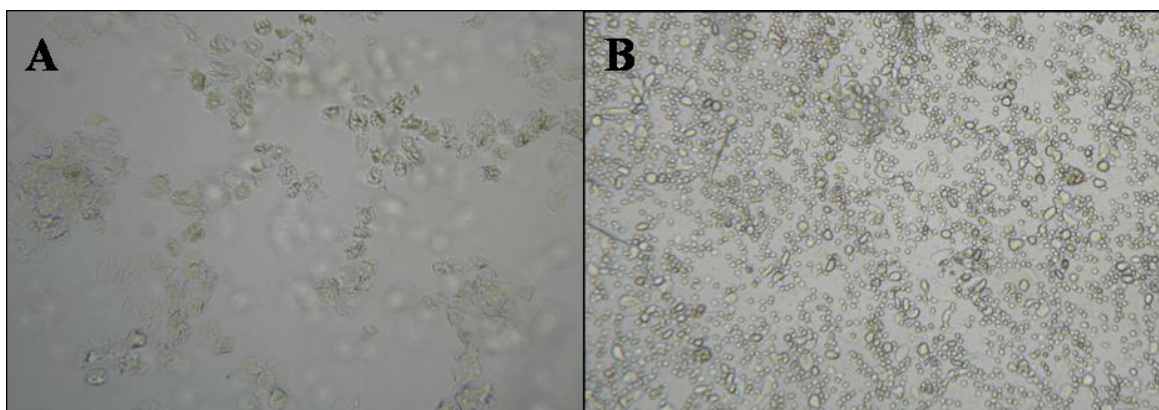


Figura 4: Fotomicrografias de lavagem vaginal de camundongos (aumento de 40X). **A. Estro:** presença de células cornificadas (fêmeas receptivas ao macho); **B. Diestro tardio:** presença de grande quantidade de leucócitos e início do aparecimento de células epiteliais que caracteriza a fase seguinte, o proestro.

Durante quatro meses trabalhamos com os acasalamentos e obtivemos fêmeas prenhes para a retirada do encéfalo de 10 fetos com 15 dias de desenvolvimento (E15), 16 fetos com 17 dias (E17) e 16 com 18 dias (E18). Desses acasalamentos também utilizamos neonatos com 1, 7 e 14 dias de vida para a retirada do encéfalo: 12 animais P1, 8 P7 e 9 P14.

PCR em tempo real

O RNA total de 63 amostras foi extraído para a curva de expressão de *Lgi1* (hemisférios direito e esquerdo de dez idades e cabeça inteira de uma idade, sendo três animais por idade, temos $3 \times [(10 \times 2) + 1] = 63$ amostras) e para a análise das três regiões foi extraído RNA de outras 15 amostras (hipocampus e neocórtex direito e esquerdo de três animais e cerebelo também de três animais, $3 \times 2 \times 2 + 3$). A qualidade dos RNAs foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, como mostra a Figura 5.

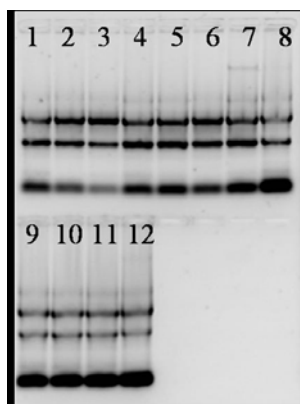


Figura 5: RNA total extraído de algumas amostras de cérebro de camundongo em diferentes idades. Gel de agarose 1%. **1.** E15_HD; **2.** E15_HE; **3.** E17_HD; **4.** E17_HE; **5.** E18_HD; **6.** E18_HE; **7.** P1_HD; **8.** P1_HE; **9.** P7_HD; **10.** P7_HE; **11.** P14_HD; **12.** P14_HE. HD: hemisfério direito; HE: hemisfério esquerdo.

Antes de utilizarmos o equipamento para PCR em tempo real, fizemos testes de RT-PCR para confirmação das reações de transcrição reversa (Figura 6).

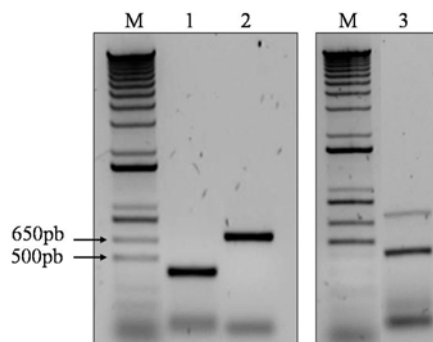


Figura 6: RT-PCR do gene *Lgi1* e α -tubulina. Gel de agarose 1%. **1.** α -tubulina (430pb); **2.** *Lgi1* (692pb); **3.** α -tubulina + *Lgi1*. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen).

Validação dos ensaios

A validação para *Lgi1* e *Gapdh* foi realizada utilizando sete concentrações de cDNA, iniciando as diluições com 200ng (200; 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002ng) (Figuras 7 e 8). Já para a validação de *Lgi1* e β -actina utilizou-se seis concentrações, iniciando com 100ng de cDNA (100; 20; 4; 0,8; 0,16; 0,032ng) (Figura 9). Essa massa de cDNA inicial é estimada, levando em consideração que a conversão de RNA durante a reação de RT tem 100% de eficiência. A massa exata de cDNA que se está iniciando a reação não é importante, visto que a validação trabalha com a relação dos números e o que nos importará para as análises futuras são os Cts encontrados.

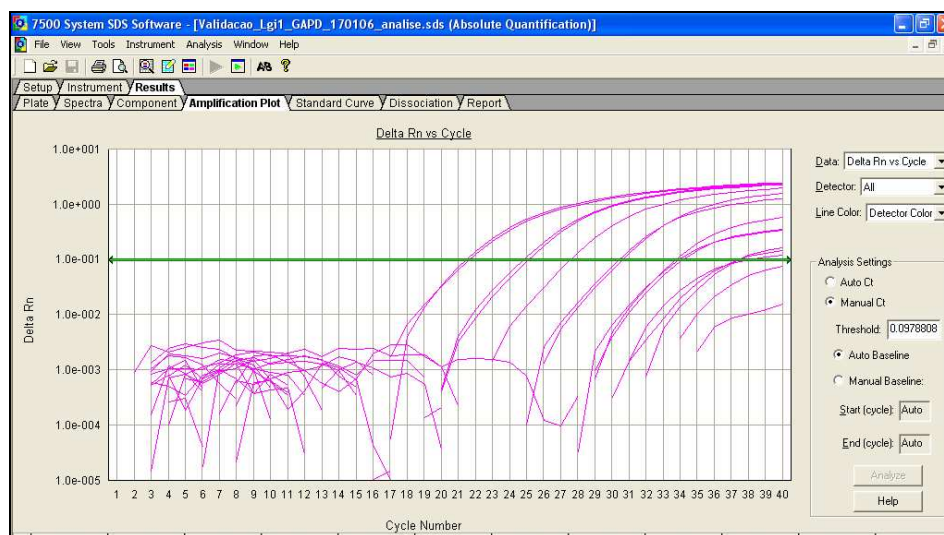


Figura 7: Cinética de amplificação do gene *Lgi1* da PCR em tempo real. Gráfico gerado pelo programa “7500 System SDS Software” mostrando a cinética de amplificação em escala logarítmica do gene *Lgi1* com diferentes concentrações de cDNA.

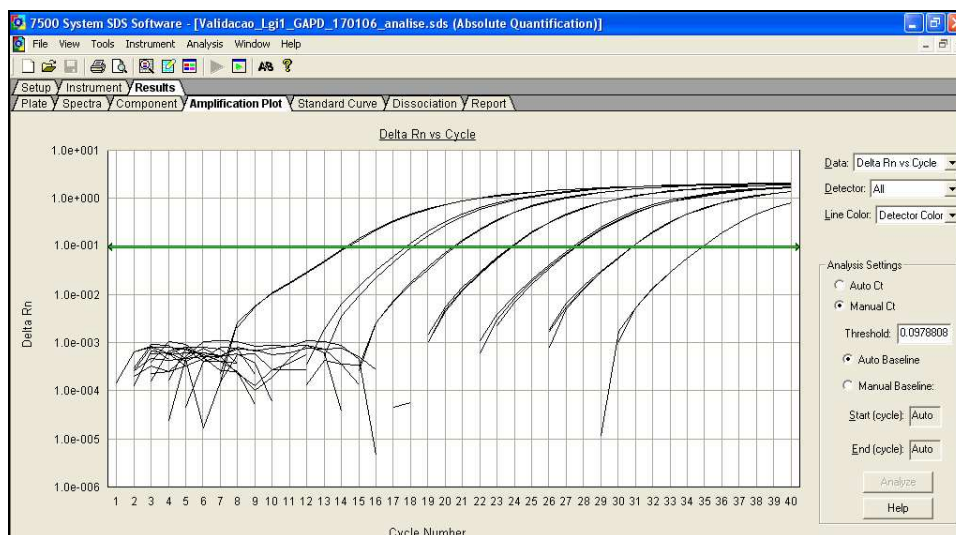


Figura 8: Cinética de amplificação do gene *Gapdh*. Gráfico gerado pelo programa “7500 System SDS Software” mostrando a cinética de amplificação em escala logarítmica do controle endógeno *Gapdh* com diferentes concentrações de cDNA.

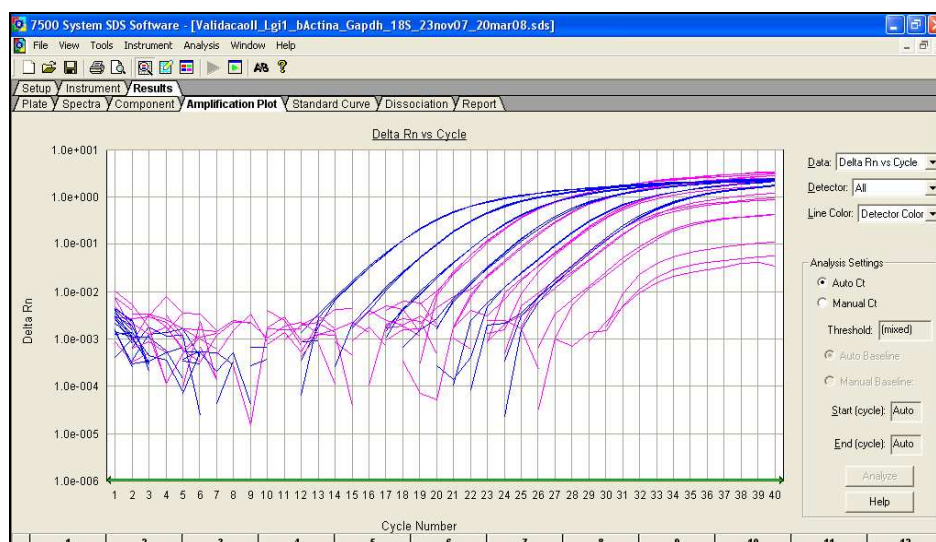


Figura 9: Cinética de amplificação dos genes *Lgi1* e β -actina. Gráfico gerado pelo programa “7500 System SDS Software” mostrando a cinética de amplificação em escala logarítmica de *Lgi1* (rosa) e do controle endógeno β -actina (azul) com diferentes concentrações de cDNA.

Com os dados da cinética das reações de amplificação, o programa “7500 System SDS Software” constrói uma curva padrão para cada ensaio (Figura 10), cuja inclinação

(*slope*) é utilizada para calcular a eficiência. Os valores das eficiências se apresentaram iguais (*Lgi1* e β -*actina*) ou semelhantes (*Lgi1* e *Gapdh*) nos nossos ensaios, estando dentro do valor indicado de $1 \pm 0,1$ (Tabela 1). A confiabilidade desses resultados, medida pelo parâmetro R2, foi superior a 99% para todas as reações (Tabela 1).

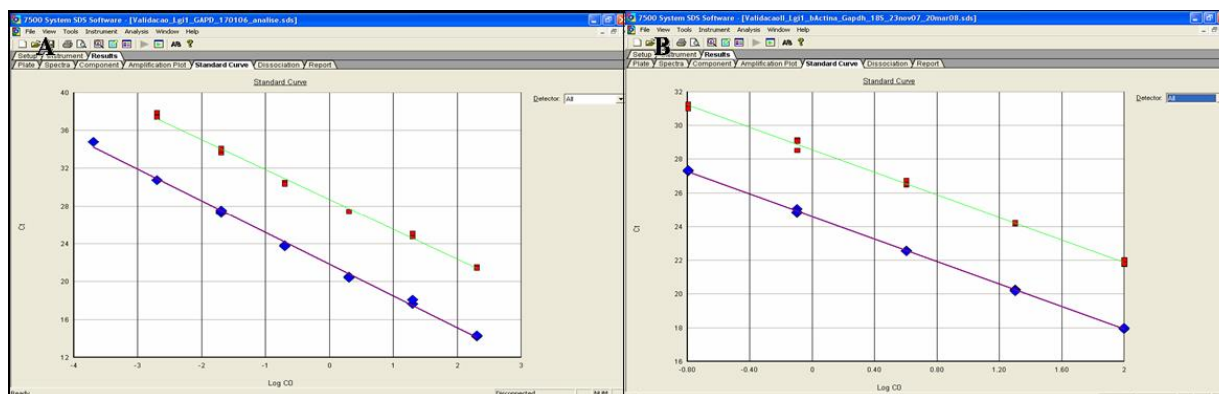


Figura 10: Validação dos iniciadores e sondas (ensaios) utilizados. **A.** Curvas padrão de *Lgi1* (verde) e *Gapdh* (roxo). **B.** Curvas padrão de *Lgi1* (verde) e β -*actina* (roxo). Notar que as inclinações das curvas, utilizadas para o cálculo da eficiência das reações, são semelhantes entre o alvo e controle endógeno nas duas figuras.

Tabela 1: Resultado da validação dos diferentes iniciadores e sondas (ensaios) utilizados. Valores de *slope*, utilizados para cálculo da eficiência, e de R2 são gerados pelo programa SDS Software v1.3 (Applied Biosystems).

Ensaio	Inclinação (<i>slope</i>)	Eficiência	R2
<i>Lgi1</i>	-3,163	1,07	0,996
<i>Gapdh</i>	-3,317	1,00	0,997
<i>Lgi1</i>	-3,336	0,99	0,997
β - <i>actina</i>	-3,336	0,99	0,999

Finalizando nossas validações, plotamos em um gráfico o *log* das concentrações de cDNA utilizadas inicialmente nas reações (eixo x) e a diferença de Cts entre o gene de interesse e o normalizador (eixo y). Com isso obtivemos uma reta com inclinação igual a 0,0763 para *Lgi1* e *Gapdh* e 0,0124 para *Lgi1* e β -*actina*, valores menores que 0,1, mostrando que o Δ Ct das nossas amostras não estão variando significativamente entre as diferentes diluições (Figura 11).

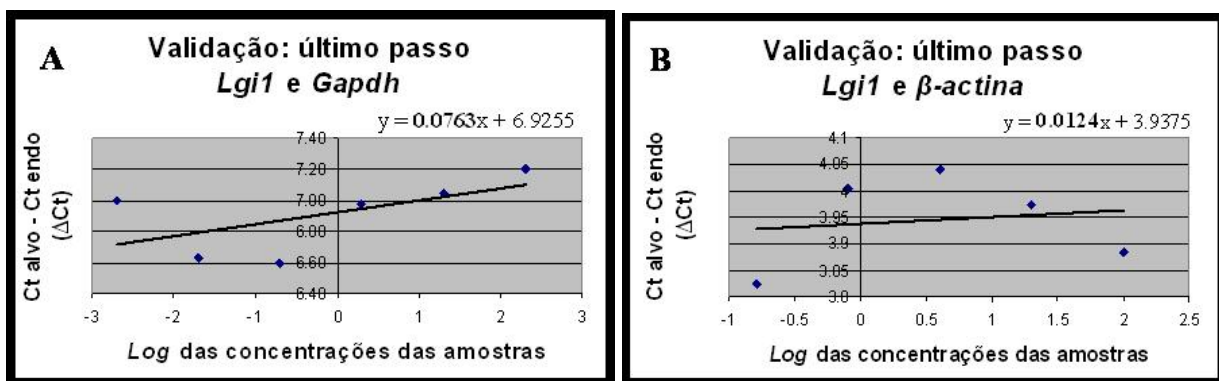


Figura 11: Último passo da validação. Gráficos mostrando que não há diferença significativa entre os Δ Cts nas diferentes concentrações analisadas (valor de “a” da equação da reta deve ser menor que 0,1). **A.** *Lgi1* e *Gapdh* com inclinação de 0,0763. **B.** *Lgi1* e β -actina com inclinação de 0,0124.

Desta forma, validamos todos os ensaios. Para *Lgi1* e *Gapdh* foram validados seis pontos, de 200 a 0,002ng, com Cts entre 21 e 37 para *Lgi1* e 14 e 30 para *Gapdh*. Para *Lgi1* e β -actina foram validados de 100 a 0,16ng, correspondendo a Cts entre 21 e 31 para *Lgi1* e 18 e 27 para β -actina. Utilizamos 100ng de cDNA para todas as reações de de PCR em tempo real.

Perfil de expressão do gene *Lgi1*

A expressão do gene *Lgi1* se apresentou baixa durante as idades intrauterinas, aumentando até a idade adulta (Figuras 12 e 13; Tabela 2). Analisando os hemisférios direito e esquerdo dos três animais em conjunto, observamos que as idades de 4, 6, 8 e 24 semanas apresentaram em média um aumento da expressão de 34 vezes, quando comparadas à idade E13 (calibrador), utilizando o *Gapdh* como controle endógeno (Figura 12). Quando utilizamos a β -actina como controle endógeno, observamos um aumento médio da expressão nas idades adultas de 28 vezes (Figura 13).

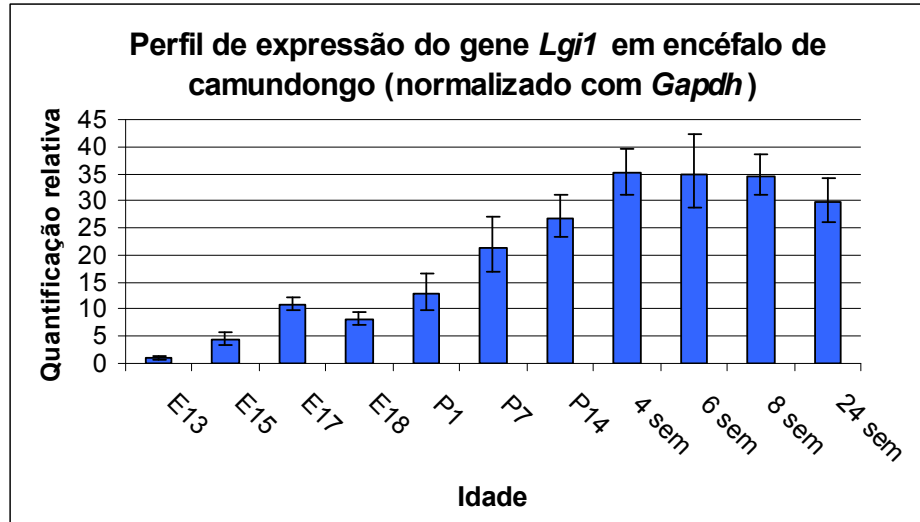


Figura 12: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1*, por PCR em tempo real, em encéfalo de camundongos de diferentes idades, utilizando *Gapdh* como controle endógeno e como calibrador a idade E13. Os valores de cada idade são referentes aos dados agrupados dos hemisférios direito e esquerdo dos três animais analisados. Barras verticais indicam quantificação relativa mínima e máxima (RQmin e RQmax).

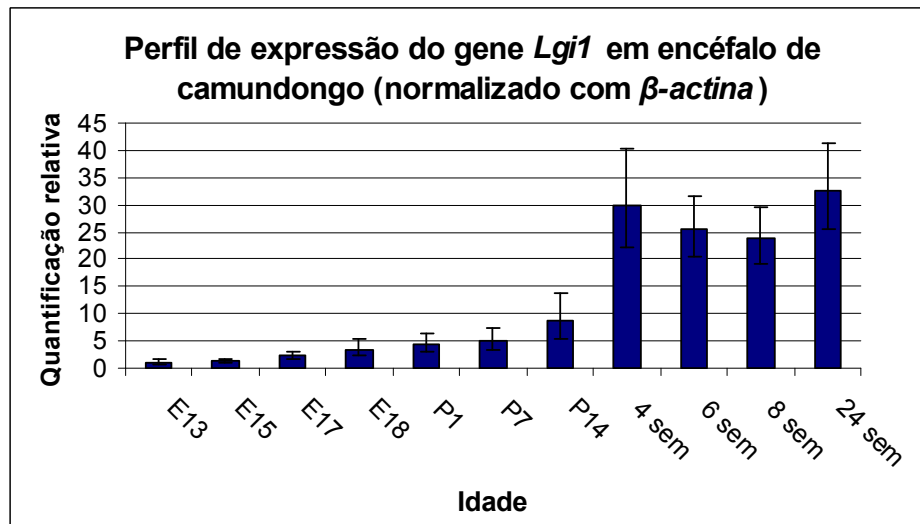


Figura 13: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1*, por PCR em tempo real, em encéfalo de camundongos de diferentes idades, utilizando como calibrador a idade E13 e como controle endógeno β -actina. Os valores de cada idade são referentes aos dados agrupados dos hemisférios direito e esquerdo dos três animais estudados. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Tabela 2: Resultados da quantificação relativa da expressão de *Lgil*, por PCR em tempo real, em diferentes idades, utilizando E13 como calibrador.

Idade	<i>Gapdh</i>			<i>β-actina</i>		
	RQ	RQ min	RQ max	RQ	RQ min	RQ Max
E13	1.00	0.76	1.32	1.00	0.63	1.59
E15	4.48	3.47	5.77	1.18	0.87	1.59
E17	10.90	9.69	12.27	2.39	1.84	3.10
E18	8.17	6.97	9.57	3.46	2.30	5.22
P1	12.77	9.74	16.74	4.44	3.17	6.22
P7	21.40	16.97	27.00	4.95	3.33	7.37
P14	26.81	23.18	31.01	8.67	5.41	13.90
4 sem	35.05	31.11	39.50	29.85	22.08	40.37
6 sem	34.80	28.62	42.32	25.41	20.55	31.42
8 sem	34.68	31.29	38.43	23.72	19.08	29.49
24 sem	29.75	26.02	34.01	32.60	25.66	41.41

A análise estatística ANOVA revelou uma diferença significativa da expressão de *Lgil* entre as idades estudadas, quando normalizada com *Gapdh* ($p = 0,0001$) e com *β -actina* ($p < 0,0001$). O teste de Tukey indicou a presença de quatro grupos com diferentes padrões de expressão, que são diferentes entre os dois controles endógenos (Tabela 3). As amostras E13 não foram incluídas nas análises estatísticas pois não tínhamos os valores dos hemisférios direito e esquerdo desta idade.

Tabela 3: Os quatro grupos apontados pelo teste de Tukey com padrões de expressão estatisticamente diferentes para os dois controles endógenos estudados.

<i>Gapdh</i>	<i>β-actina</i>
E15, E17, E18	E15, E17
E17, E18, P1	E17, E18, P1, P7
P7, P14, 24 sem	E18, P1, P7, P14
P14, 4, 6, 8, 24 sem	4, 6, 8, 24 sem

Quando analisamos os hemisférios cerebrais separadamente nas diferentes idades, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa de expressão do gene *Lgil*, para ambos normalizadores (ANOVA, $p = 0,7969$ para *Gapdh* e $p = 0,8329$ para *β -actina*) (Figuras 14 e 15). As amostras da idade E13 não participaram desta análise, já que nesses animais não separamos os hemisférios cerebrais.

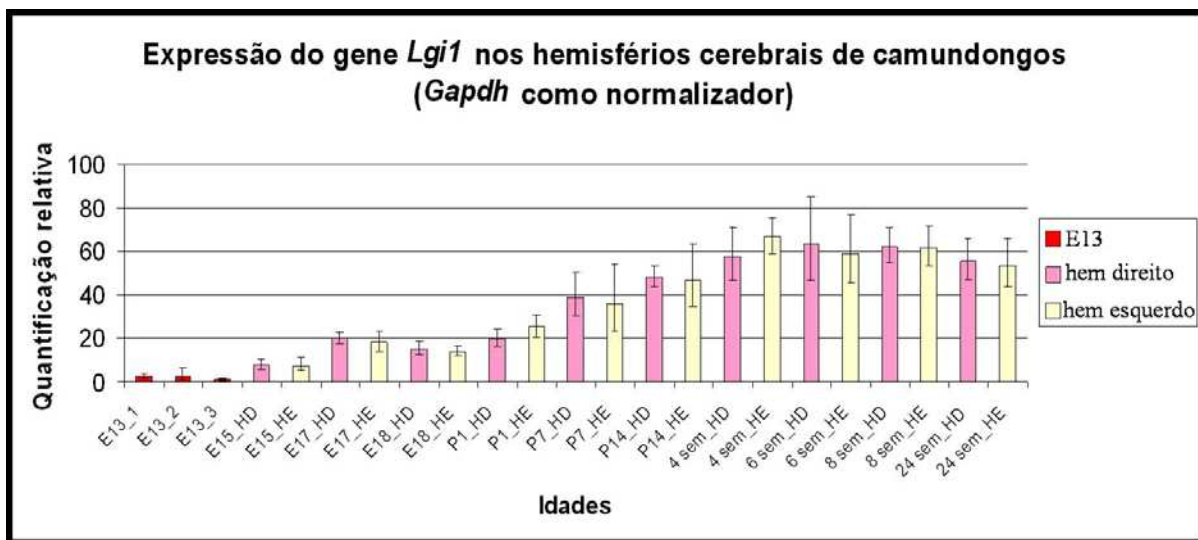


Figura 14: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1*, por PCR em tempo real, nos hemisférios cerebrais de camundongos de diferentes idades, utilizando como calibrador a amostra E13_3 e *Gapdh* como controle endógeno. Os valores de cada idade são referentes aos dados agrupados dos três animais estudados. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

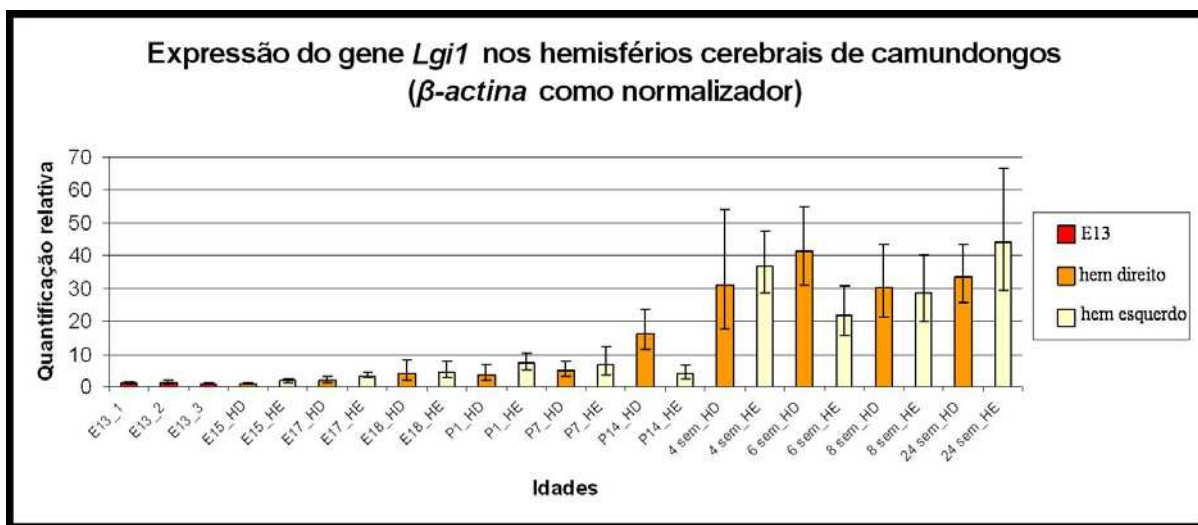


Figura 15: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1*, por PCR em tempo real, nos hemisférios cerebrais de camundongos de diferentes idades, utilizando como calibrador a amostra E13_3 e β -actina como controle endógeno. Os valores de cada idade são referentes aos dados agrupados dos três animais estudados. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

As análises realizadas a partir dos dados de PCR em tempo real das três regiões do cérebro estudadas revelaram uma maior expressão de *Lgi1* em hipocampo, quando comparado ao neocórtex e ao cerebelo, porém o teste de Friedman não apontou diferenças estatisticamente significativas para ambos os controles endógenos ($p = 0,097$) (Figura 16). Não encontramos diferenças na expressão entre os lados direito e esquerdo em neocórtex e hipocampo.

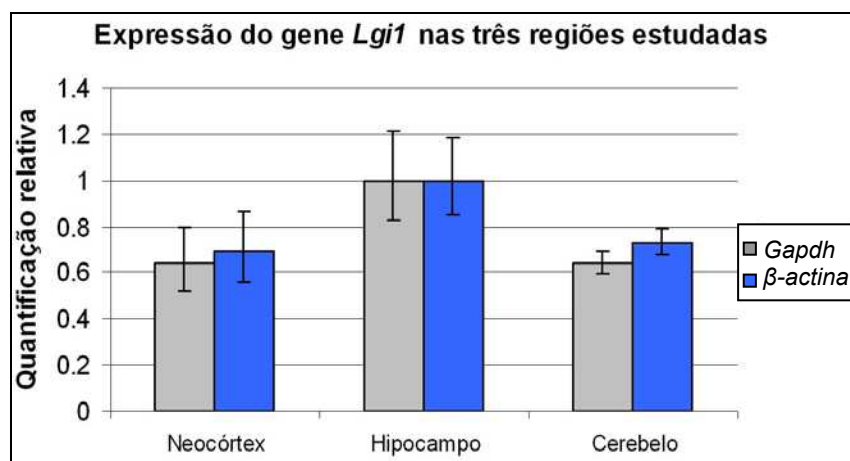


Figura 16: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1* comparando três regiões do encéfalo de camundongos com cinco semanas de idade, utilizando como calibrador a amostra de hipocampo, para os normalizadores *Gapdh* e β -actina. Os valores de cada região são referentes aos dados agrupados dos três animais estudados e, para hipocampo e neocórtex, também estão reunidas amostras dos hemisférios direito e esquerdo. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Western blot

Para os experimentos de western blot, nós testamos dois anticorpos policlonais contra *Lgi1*: P01C258, produzido pelo grupo de Morante-Redolat (2002), e sc-9583 (Santa Cruz Biotechnology[®], inc).

Antes de utilizar o anticorpo P01C258, foi necessária uma purificação por cromatografia líquida. Algumas alíquotas resultantes dessa purificação foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, que mostrou a eficiência da purificação a partir da alíquota 23 e o desaparecimento do anticorpo a partir da alíquota 24A (Figura 17).

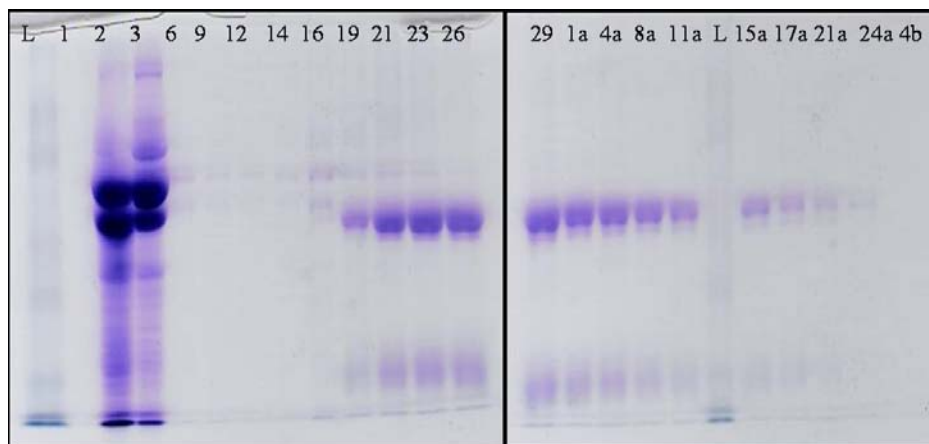


Figura 17: Anticorpo purificado por cromatografia líquida. Algumas das amostras resultantes da purificação do anticorpo P01C258 em gel SDS-PAGE 10%.

Foram realizados três experimentos de western blot testando diferentes diluições da alíquota 1a do anticorpo P01C258, 1:1000, 1:500 e 1:200 e utilizando o anticorpo contra β -actina na diluição de 1:4000. Aplicamos de 30 a 60 μ g de extrato protéico de cérebro, porém todos os testes mostraram uma marcação muito fraca da proteína Lgi1, levando-nos a testar o anticorpo sc-9583.

Fizemos um teste com 30 μ g de proteína de duas amostras (P7 e P14) utilizando a diluição de 1:200 do anticorpo sc-9583 e 1:1000 do anticorpo contra β -actina e obtivemos uma boa marcação. Desta forma, partimos para o experimento aplicando 30 μ g de extrato protéico das idades E13, E15, E17, E18, P1, P7, P14 e 8 semanas, utilizando as mesmas diluições usadas no teste.

A proteína Lgi1 apresentou-se em maior quantidade nas idades mais velhas estudadas, P14 e 8 semanas de vida (Figuras 18, 19 e 20). A densitometria de bandas revelou uma diferença pequena entre as idades intra-útero, aparecendo um aumento da presença da proteína nas primeiras semanas de vida e apresentando a maior quantidade com 8 semanas de idade, onde obtivemos 89 vezes maior quantidade de Lgi1, quando comparada à amostra E13 (Figura 19 e 20).

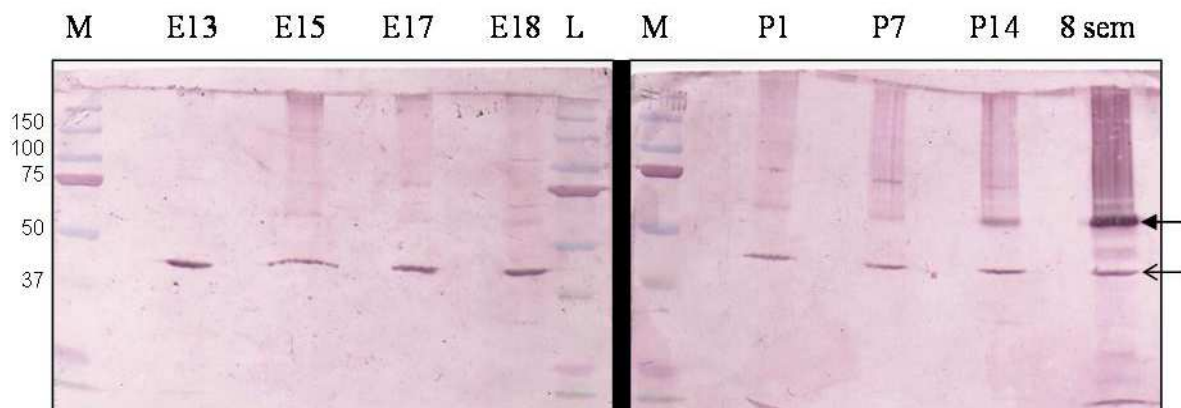


Figura 18: Western blot da proteína Lgi1 (~60KDa) nas diferentes idades estudadas, em gel SDS-PAGE 10%. Como controle interno foi utilizada a β -actina (41,7KDa). As amostras são referentes ao hemisfério direito de cada idade, com exceção de E13, proveniente de cabeça inteira. M: marcador de peso molecular de proteína.

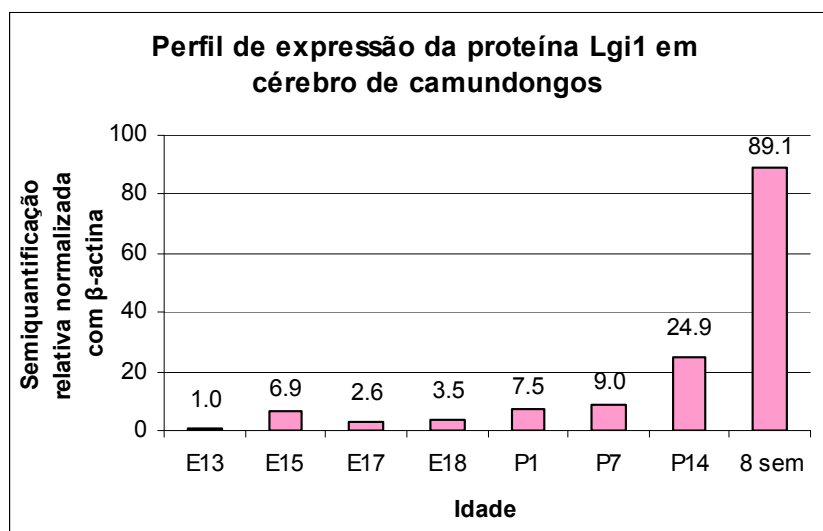


Figura 19: Quantificação relativa da expressão da proteína Lgi1 nas diferentes idades estudadas, realizada por densitometria de bandas resultantes dos experimentos de western blot (Figura 18), utilizando o programa ImageJ (Abramoff et al., 2004). A idade E13 foi utilizada como calibrador.

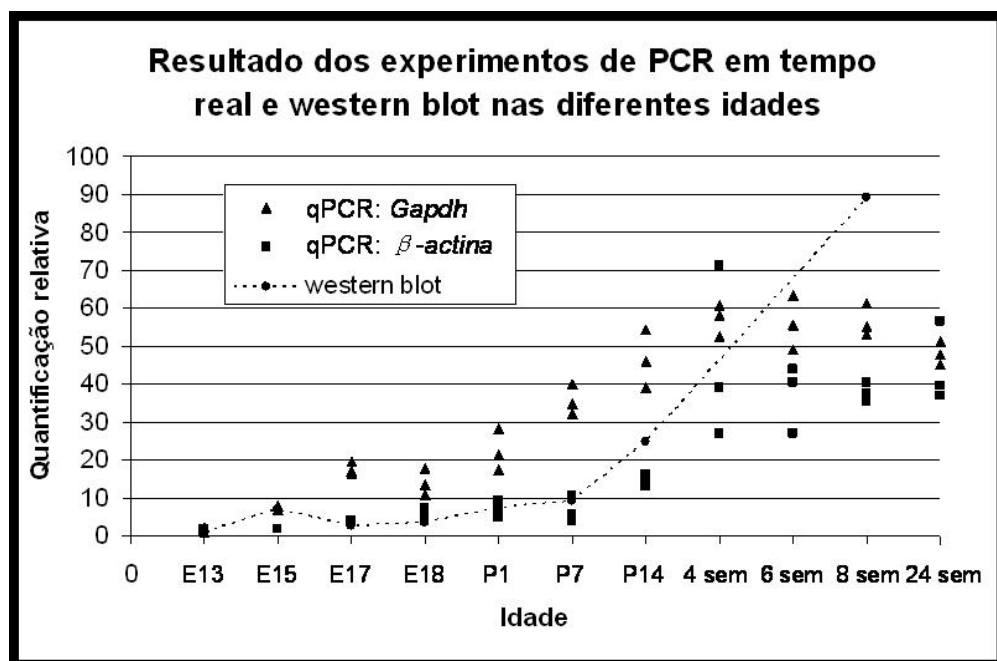


Figura 20: Diagrama de dispersão mostrando os resultados de PCR em tempo real, com *Gapdh* e β -actina como controles endógenos, e de western blot, utilizando como calibrador a idade E13. Para os experimentos de PCR em tempo real, estão representados os três animais estudados em cada idade, analisando em conjunto apenas os hemisférios direito e esquerdo, como uma única amostra, com exceção de E13.

3.5- DISCUSSÃO

A técnica de PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada na análise de expressão gênica, porém, diversos parâmetros precisam ser controlados para a obtenção de uma quantificação confiável. Alguns desses parâmetros são: quantificação inicial da amostra, integridade do RNA e, principalmente, a normalização dos dados (Tanic et al., 2007). Para normalizar a reação é imprescindível o uso de um gene como controle endógeno, cuja expressão não seja influenciada pelas variáveis experimentais. Em nossos estudos essas variáveis foram a idade dos animais, as regiões e os hemisférios cerebrais. Desta forma, nós nos preocupamos em selecionar cautelosamente dois genes para serem utilizados como controles endógenos, *Gapdh* e *β -actina*. Esses genes foram observados como os mais estáveis em estudos de quantificação de expressão, quando se analisou córtex de rato em diferentes idades (Tanic et al., 2007). Além disso, um outro aspecto importante a se considerar, em relação à confiabilidade dos experimentos de quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real, é a especificidade da sonda utilizada. No sistema TaqMan[®] (Applied Biosystems), a sonda é composta por duas fluorescências: repórter e *quencher*. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade da fluorescência *quencher* reduz expressivamente a fluorescência emitida pelo repórter. Quando a sequência alvo de cDNA está presente, a sonda se anela e é clivada durante a amplificação do fragmento, pela atividade da DNA polimerase. A quantificação em tempo real é baseada no aumento da intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicons* produzidos. Conseqüentemente, a especificidade da sonda é um fator crítico para a quantificação. Para confirmar essa especificidade, nós fizemos uma busca por seqüências complementares à sonda utilizada por nós (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) e encontramos complementaridade apenas com o gene *Lgi1*.

Nós decidimos fazer nossos experimentos de expressão gênica utilizando o sistema TaqMan[®] devido a sua grande especificidade ao gene de interesse e também a grande reprodutibilidade dos resultados. Uma outra vantagem do sistema é reduzir as chances de competição por reagentes devido à contaminação da reação com DNA, uma vez que a sonda é desenhada no limite de dois exons (final do exon 2 e início do exon 3). A escolha

por ensaios já otimizados nos reduziu tempo e reagentes gastos com padronizações de experimentos.

Alguns estudos, utilizando imunoistoquímica ou hibridização *in situ*, determinaram a expressão de *Lgi1* em cérebro de camundongos adultos (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002; Senechal et al., 2005; Piepoli et al., 2006; www.gensat.org). Embora esses métodos localizem precisamente a proteína Lgi1 ou seu RNAm em compartimentos celulares específicos, eles não são métodos quantitativos. Com isso, nossos resultados determinam, pela primeira vez, exatamente a expressão de *Lgi1* durante o desenvolvimento do SNC e a compara com os níveis de expressão encontrados em animais adultos. Nossos dados mostraram claramente um aumento da expressão de *Lgi1* durante o desenvolvimento até as idades adultas, onde encontramos os níveis mais elevados de expressão.

Trabalhos recentes indicam uma possível dupla função para LGI1, atuando de forma pré-sináptica, modulando a taxa de inativação de canais de potássio (Schulte et al., 2006) e de maneira pós-sináptica, sendo secretada e regulando a expressão de receptores AMPA (Fukata et al., 2006). Já que os receptores AMPA e as subunidades Kv1.1 aumentam com o envelhecimento do animal (Liao et al., 1999; Grosse et al., 2000), devido ao aumento da ativação dos circuitos neuronais, é possível que o aumento gradual na expressão de *Lgi1* durante o desenvolvimento do SNC esteja simplesmente refletindo a maturação dos circuitos neuronais, uma vez que os animais adultos têm novas experiências, aumentando seus estímulos sensoriais.

Alternativamente, nós propomos que o perfil crescente de expressão de *Lgi1* e sua estagnação nas idades adultas, poderia ser explicado por uma função inibitória da proliferação neuronal. Assim, em idades mais avançadas, quando os neurônios já estão diferenciados, sua função inibitória seria importante, o que pode ser sugerida pela alta expressão encontrada no cérebro dos animais adultos. Kunapuli e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão forçada de *LGII* em linhagens celulares de glioma reduziu significativamente a habilidade de proliferação e de migração destas células. Desta forma, nós levantamos a hipótese de que o aumento do lobo temporal lateral, encontrado em pacientes com EPADSA (Kobayashi et al., 2003), poderia estar relacionado à perda de função de *LGII* devido às mutações encontradas neste gene.

Os experimentos de western blot corroboraram a quantificação de *Lgi1* por PCR em tempo real (Figura 20), mostrando uma expressão aumentada da proteína Lgi1 nos estágios de desenvolvimento mais avançados estudados (P14 e 8 semanas). Um estudo anterior, utilizando esse mesmo método de quantificação, também identificou um aumento progressivo da proteína Lgi1 durante a maturação do animal (Fukata et al., 2006). Existem algumas limitações com os experimentos de western blot: além de ser um método semiquantitativo, há relatos de reação cruzada entre o anticorpo contra LGI1 (Santa Cruz Biotechnology®, inc) e as outras proteínas da família LGI (Senechal et al., 2005; Head et al., 2007), fazendo da quantificação de RNAm um método mais confiável.

Além disso, nós observamos uma expressão mais elevada de *Lgi1* em hipocampo, quando comparado ao neocórtex e ao cerebelo, em camundongos adultos; entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Estudos prévios com imunistoquímica (Morante-Redolat et al., 2002; Schulte et al., 2006) e hibridização *in situ* (Kalachikov et al., 2002; Senechal et al., 2005; Fukata et al., 2006) mostraram igualmente uma expressão mais alta de *Lgi1* em hipocampo, porém, ambas as técnicas não são quantitativas e podem apresentar um viés devido ao grande número de corpos celulares presentes na região do hipocampo. Este efeito não está presente na técnica de PCR em tempo real usado em nosso trabalho.

A compreensão de padrões de expressão gênica pode nos fornecer pistas sobre os complexos mecanismos neurobiológicos envolvidos na epileptogênese e em outras síndromes neurológicas. Este estudo foi o primeiro a determinar um perfil específico da expressão do gene *Lgi1* durante o desenvolvimento do SNC, sugerindo uma possível função inibitória durante o desenvolvimento. Apesar de não encontrarmos diferenças na expressão de *Lgi1* nos hemisférios cerebrais que pudessem explicar a predominância de alterações no lado esquerdo em pacientes com EPADSA.

Os resultados apresentados neste capítulo geraram uma publicação científica, “Expression Profile of *Lgi1* Gene in Mouse Brain During Development” na revista *Journal of Molecular Neuroscience*, 2008; 35(3):323-9 (Anexo 1).

O trabalho que realizamos para obtenção de cérebro de camundongos em diferentes idades, apesar de ter consumido vários meses de trabalho, resultou em amostras suficientes para que outros colegas pudessem também utilizá-las, o que resultou em mais uma

publicação científica, já aceita: Danyella B. Dogini, Patrícia A. O. Ribeiro, Cristiane Rocha, Tiago C. Pereira, Iscia Lopes-Cendes. “MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development”. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2008; 35(3):331-7 (Anexo 2); além de outras possíveis produções para os próximos meses.

CAPÍTULO 2

SILENCIAMENTO GÊNICO DE *Lgi1* POR RNAi

4.1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um grande número de novos genes foi identificado e agora, na era pós-genômica, tem-se a necessidade de conhecer a função de tais genes. A técnica de interferência por RNA surgiu recentemente e, desde então, vêm contribuindo de maneira significativa com tais estudos funcionais, pela genética reversa: silencia-se um gene e observa-se o fenótipo.

O termo “interferência por RNA”, ou RNAi, foi primeiramente usado por Fire e colaboradores, em 1998, para definir o silenciamento gênico potente e específico encontrado, utilizando duplas-fitas de RNA (dsRNA). Esse grupo estudava a função de genes do nemátoda *Caenorhabditis elegans*, utilizando a técnica de RNA anti-senso, que consiste na inoculação de moléculas longas de RNA (no caso deste trabalho, 369 a 1033pb), complementares ao RNA alvo, levando a um bloqueio da tradução da proteína de interesse e conseqüente inibição da expressão gênica (Fire et al., 1998). Esses pesquisadores, além de testarem apenas as moléculas anti-senso, também fizeram a injeção de uma mistura de moléculas senso e anti-senso nos vermes, descobrindo um silenciamento cem vezes mais efetivo do que utilizando somente oligo anti-senso (Fire et al., 1998).

A RNAi é uma técnica que se utiliza de uma via endógena presente nos organismos, com a função de defesa celular, ativada na presença de dsRNAs, que são geradas na replicação viral ou mobilização de elementos transponíveis (Rutz e Scheffold, 2004; Duchaine et al, 2006). Assim, dsRNAs sinalizam perigo e dão início a um processo de reconhecimento e degradação de RNAs que são similares à molécula estranha de dsRNA, utilizando a própria como modelo para esta busca. Essa via natural de defesa é conhecida como PTGS, para a sigla em inglês de silenciamento gênico pós-transcricional.

O início do processo de RNAi se dá com a presença de dsRNAs nas células que são reconhecidas por Dicer, uma endonuclease citoplasmática do tipo III (Bernstein et al., 2001), clivando-as em pequenos duplexes de 21 a 25 nucleotídeos, denominados pequenos RNA de interferência ou siRNAs (*small interfering RNAs*) (Hamilton e Baulcombe, 1999) (Figura 21). Essas pequenas moléculas possuem um grupo fosfato nas extremidades 5' e dois nucleotídeos não pareados nas extremidades 3', o que define sua assinatura molecular. O siRNA é reconhecido por uma proteína acoplada à Dicer, a R2D2, cuja função é analisar

a estabilidade termodinâmica das extremidades das moléculas (Tomari et al., 2004). R2D2 se liga ao oligo do duplex cuja extremidade 5' é mais estável e uma proteína RNA helicase separa as duas fitas do siRNA (Dalmay et al., 2001). O oligo com extremidade 5' menos estável, chamado de fita funcional, é preferencialmente transferido para um complexo proteico denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Hammond et al., 2000), que efetivará o silenciamento gênico. O complexo RISC busca no transcriptoma um RNA complementar a fita funcional associada a ele e, depois de identificado, o RNA alvo é clivado por RISC e degradado, promovendo o silenciamento gênico (Figura 21). A fita funcional permanece intacta e associada ao complexo, permitindo sua utilização no silenciamento de no mínimo mais outros nove RNAs (Hutvagner e Zamore, 2002) (Figura 21).

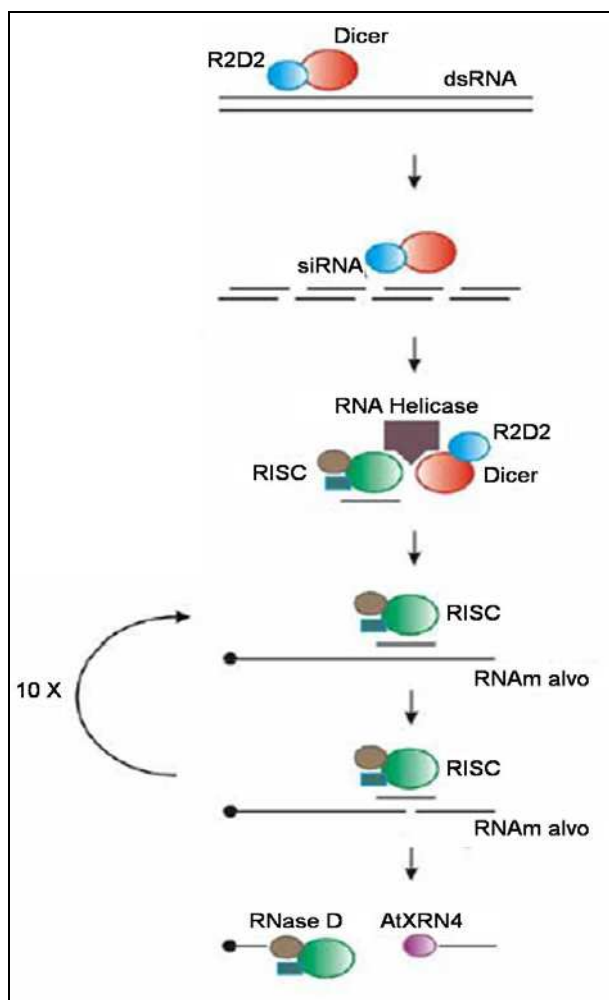


Figura 21: Esquema da via de silenciamento gênico pós-transcricional de RNAi (modificado de Pereira, 2008).

Essa via que leva ao silenciamento gênico através de dsRNA é extremamente conservada, ocorrendo na grande maioria dos eucariotos (Hannon, 2002; Duchaine et al, 2006; Lee et al., 2006).

Vários trabalhos foram realizados demonstrando silenciamento gênico através de RNAi em diferentes organismos, como protozoários, plantas, cnidários, invertebrados (Ngô et al., 1998; Hamilton e Baulcombe, 1999; Lohmann et al., 1999; Hughes e Kaufman, 2000; Klink e Wolniak, 2000; Schoppmeier e Damen, 2001), porém em células de mamíferos os resultados não foram promissores (Caplen et al, 2000; Ui-Tei et al., 2000).

Moléculas de dsRNA maiores que 30pb, introduzidas em células de mamíferos, ativam a via da proteína kinase dependente de dsRNA (PKR), levando a uma resposta interferon e conseqüente morte celular (Elbashir et al, 2001). Desta forma, em 2001, um grupo demonstrou silenciamento gênico, em várias culturas celulares de mamíferos, sem induzir a resposta interferon, com a inoculação de oligos de siRNA de 21 a 22 nucleotídeos, imitando o produto da enzima Dicer (Elbashir et al, 2001). A partir deste trabalho, inúmeros outros foram realizados e publicados utilizando linhagem celulares de mamíferos e também aplicando RNAi *in vivo*.

Os primeiros artigos que demonstraram silenciamento em SNC foram publicados em 2002, analisando áreas específicas do cérebro de camundongos adultos (Makimura et al., 2002; Xia et al., 2002). O primeiro estudo silenciou um gene exógeno, o *GFP* (Xia et al., 2002), e o outro, um gene endógeno, *Agrp* (Makimura et al., 2002). Os dois trabalhos utilizaram cassetes de expressão, que produziam dentro da célula as moléculas de RNA, os chamados shRNAs, ou seja, pequenas moléculas de RNA em formato de *hairpin*. Makimura e colaboradores (2002) também injetaram oligos de siRNA e obtiveram redução de 50% na expressão do gene *Agrp*. O shRNA é um siRNA contendo um *loop* de cinco a nove nucleotídeos, mantendo as fitas senso e anti-senso conectadas (Fountaine et al., 2005). Essas moléculas são transcritas no núcleo da célula e processadas por Dicer, que elimina o *loop* e forma o siRNA funcional. Essa estratégia permite um silenciamento mais duradouro, porém, além de ser uma metodologia mais laboriosa, a dificuldade da entrada das moléculas é aumentada, no caso dos plasmídeos, uma vez que elas são maiores e precisam alcançar o núcleo celular. Já a utilização de vetores virais é limitada pelas questões de biossegurança.

A técnica de RNAi tem sido amplamente aplicada devido a suas vantagens frente a outros sistemas de silenciamento gênico, como por exemplo, a sua maior eficiência quando comparada à técnica de RNA anti-senso, uma vez que, utilizando apenas uma molécula de siRNA, consegue-se silenciar pelo menos dez RNAs alvo, enquanto que a técnica de anti-senso tem uma estequiometria 1:1, ou seja, para cada oligo inoculado, apenas um RNA alvo não é traduzido. Por ser mais eficiente, se torna mais econômica, pois a quantidade de oligos utilizada é menor, além disso, o tamanho das moléculas também são menores, diminuindo o seu custo.

A utilização de siRNA também apresenta vantagens quando comparada à produção de um animal *knockout*: primeiro, é mais rápida e mais econômica; segundo, a função de genes, cujo *knockout* em cérebro é letal, ainda pode ser estudada pela inoculação de siRNAs; e terceiro, a possibilidade de se reduzir a expressão de uma proteína, ao invés de eliminá-la completamente, evita uma possível indução de mecanismos compensatórios observados em alguns animais *knockout* (Bai et al., 2003; Zeringue e Constantine-Paton, 2004).

Estudar a função de um gene, ou de genes, como na genômica funcional (Fraser et al., 2000; Gönczy et al., 2000), não é a única aplicação da técnica de RNAi, que também já tem sido utilizada na produção de modelos animais (Bai et al., 2003; Kunath et al., 2003; Fedoriw et al., 2004), no combate a patógenos, como os vírus da influenza e da hepatite B (Tompkins et al., 2004; Uprichard et al., 2005), malária (Mohammed et al., 2003; Magalhães et al., 2008), *Schistosoma mansoni* (Pereira et al., 2008), além da possibilidade desta técnica de ter uma função terapêutica em doenças genéticas, como Huntington (Harper et al., 2005), e até mesmo em doenças que seja necessário o silenciamento apenas do alelo mutado, como é o caso da esclerose lateral amiotrófica, utilizando uma terapia alelo-específica (Xia et al., 2006).

Porém, existem vários fatores que interfere na eficiência do silenciamento gênico, e podem inviabilizar alguns experimentos, alguns deles são:

Desenho das moléculas

A efetividade da interferência por RNA depende em grande parte da sequência da molécula a ser utilizada, assim sendo, o desenho do siRNA requer muita cautela. Um dos

A especificidade dos oligos de siRNA é um outro fator importante para o desenho de moléculas interferentes efetivas. Alguns autores consideram que há a necessidade de total complementariedade entre o siRNA e o RNA mensageiro alvo para o silenciamento, porém, outros trabalhos demonstraram que a similaridade de sequência de 11 nucleotídeos contíguos, ou menos, já seria suficiente para a redução da expressão gênica (Sijen et al., 2001; Jackson et al., 2003; Haley e Zamore, 2004; Lewis et al., 2005). Apesar dessa questão ainda ser controversa, a análise da identidade dos siRNAs frente ao transcriptoma do organismo em estudo é de extrema importância para evitar possíveis alvos inespecíficos (*off-target*).

Os siRNAs devem ter um conteúdo de GC entre 30 e 52% e devem-se evitar em sua sequência repetições invertidas (Reynolds et al., 2004).

Um dos parâmetros cruciais é a estabilidade termodinâmica das extremidades da molécula, pois é isto que define qual das fitas, senso ou anti-senso, será transferida para o complexo RISC. Se a fita senso, ou seja, a molécula homóloga a sequência do RNAm alvo, ficar em RISC, ao invés da fita funcional anti-senso, complementar à região, não haverá silenciamento, uma vez que não existirá complementaridade com o RNAm (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al., 2003).

Entrega das moléculas

Um outro fator limitante para a utilização de RNAi é a entrega das moléculas, tanto siRNAs, como shRNAs, dentro das células, já que são moléculas altamente carregadas e não atravessam as membranas celulares por difusão passiva (Oliveira et al., 2006; Akhtar e Benter, 2007; Pardridge, 2007). Quando se trabalha com RNAi *in vivo* e no SNC, existe mais um obstáculo, a barreira hematoencefálica, formada pelo endotélio diferenciado dos capilares cerebrais, que controlam o fluxo entre o cérebro e o sangue. Desta forma, a injeção local, diretamente no cérebro, tem sido usada para o silenciamento de genes envolvidos em processos do SNC (Makimura et al., 2002; Xia et al., 2002; Bai et al., 2003;

Diferentes estratégias foram descritas, associadas às injeções no cérebro, para promover a entrada dos oligos ou dos vetores nas células, promovendo silenciamento gênico. Entre elas está a utilização de emulsões lipídicas associadas aos siRNAs, que por afinidade de composição com as membranas celulares lipoproteicas, facilita a transfecção dos oligos (Makimura et al., 2002; Salahpour et al., 2007). Uma outra técnica utilizada, é a eletroporação aplicada após a injeção, como descrito por Bai e colaboradores (2003), com a utilização de plasmídeos codificando shRNAs em cérebro de ratos intra-útero. Uma variação da eletroporação para a transfecção de siRNAs, foi descrita por Akaneya e colegas (2005): a eletroporação local, que ao invés de eletroporar toda a cabeça do animal, como realizado pelo grupo de Bai (2003), dois eletrodos foram introduzidos próximos ao local da injeção, dentro do cérebro dos ratos. Um outro método empregado é a utilização de uma minibomba osmótica que permite a injeção contínua de siRNA no cérebro dos animais, por até duas semanas (Dorn et al., 2004; Thakker et al., 2004), que apesar de não promover a entrada das moléculas nas células, aumenta a disponibilidade dos siRNAs, contribuindo para um aumento na taxa de transfecção. Ainda que diferentes estratégias tenham sido utilizadas, como descrito acima, para a promoção de silenciamento no SNC, Makimura et al. (2002) também descreveram redução da expressão gênica utilizando apenas água como veículo para a injeção de siRNA no hipotálamo de camundongos.

Alguns pesquisadores criaram vetores não virais para promover silenciamento gênico no SNC, utilizando como rota de entrada, a injeção na veia caudal (Zhang et al., 2003; Kumar et al., 2007). Um dos trabalhos utilizou lipossomos para encapsular as moléculas de shRNAs, protegendo-as de degradação no organismo, e conjugado ao lipossomo, utilizaram moléculas de polietileno glicol associadas a peptídeos, que permitiam esta construção atravessar a barreira hematoencefálica (Zhang et al., 2003). Um outro estudo, utilizando um sistema mais simples, descreve a inoculação de moléculas de siRNA complexadas a um peptídeo derivado da glicoproteína do vírus da raiva (RVG). Esse peptídeo de 41 aminoácidos, além de permitir a passagem pela barreira hematoencefálica, é neurotrófico, facilitando a entrega das moléculas interferentes nos neurônios (Kumar et al., 2007).

4.2- **OBJETIVOS**

O objetivo principal deste capítulo foi silenciar o gene *Lgi1* através da técnica de interferência por RNA em cérebro de camundongos e em culturas celulares.

Os objetivos específicos foram:

- desenhar moléculas de siRNA contra *Lgi1*;
- silenciar o gene *Lgi1* em cérebro de camundongos;
- silenciar o gene *LGII/Lgi1* em diferentes culturas celulares.

4.3- MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os animais utilizados em nossos experimentos foram camundongos (*Mus musculus*) BALB/c/UNI e, para apenas um experimento, ratos Wistar/UNI (*Rattus norvegicus*), ambos SPF. Eles foram produzidos e mantidos no Centro de Estudos Multidisciplinares de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

Os camundongos adultos utilizados eram fêmeas e tinham idades que variaram de cinco a treze semanas de idade, os ratos possuíam cinco semanas e eram machos. Já os neonatos utilizados foram de ambos os sexos com idade de três a quatro dias de vida.

Todos os procedimentos relativos aos experimentos com animais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP (CEEA_IB 827-1 e 1275-1).

Culturas celulares

As culturas de células utilizadas para os experimentos de RNAi foram a U138MG e a Neuro2a. A primeira linhagem é de origem humana, proveniente de glioblastoma e a segunda é uma linhagem de neuroblastoma de camundongos.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100µg/mL de penicilina-streptomicina e foram mantidas em ambiente controlado a 5% de CO₂ e 37°C (Yoshizawa et al., 2001).

Moléculas de siRNA

Desenho das moléculas

Partindo da sequência codificante do gene *Lgi1* (NM_020278; www.ncbi.nlm.gov), foram desenhadas seis moléculas de siRNA: si_Lgi1, si_Lgi1_dna, si_Lgi1_in vitro, si_Lgi1_b, si_Stealth e si_Amb. As sequências foram desenhadas a partir do programa *Strand Analysis* (Pereira et al., 2007), com exceção da molécula si_Stealth, que foi desenhada por um programa disponível na página da empresa Invitrogen (www.invitrogen.com) e da si_Amb, cujo desenho se deu na página da Ambion (www.ambion.com).

O programa *Strand Analysis* (Pereira et al., 2007), desenvolvido pelo nosso grupo de trabalho, analisa, entre outros parâmetros, a energia livre de Gibbs (ΔG). ΔG é a diferença de energia dos quatro primeiros nucleotídeos da extremidade 5' entre as duas fitas (senso e anti-senso) dos siRNAs gerados. Quanto maior o valor deste parâmetro, maior o número de fitas funcionais (anti-senso do duplex de RNA) preferencialmente transferidas para o complexo enzimático RISC, sendo, portanto, mais eficiente na promoção do silenciamento. Foi calculado o ΔG para todas as moléculas, inclusive para aquelas desenhadas fora do *Strand Analysis*.

Após o cálculo de ΔG , as seqüências de siRNAs foram submetidas a um *BLAST Search for Short, Nearly Exact Matches* (www.ncbi.nlm.gov/BLAST/) contra o genoma de camundongo, verificando se os siRNAs teriam homologia apenas com nosso gene de interesse, o *Lgi1*, para evitar um silenciamento inespecífico.

O último passo no desenho das moléculas foi a análise de estruturas secundárias presentes nos siRNAs, pela função *Oligo Analysis*, do programa *GeneRunner*.

Obtenção dos siRNAs

As fitas senso e anti-senso das moléculas si_*Lgi1*, si_*Lgi1_dna*, si_*Lgi1_b* e si_*Amb* foram solicitadas separadamente, da mesma forma como se costuma pedir iniciadores, e foram anelados em nosso laboratório a 95° C por 5 minutos, seguido de 30 minutos a temperatura ambiente.

A molécula si_*Lgi1_in vitro* foi produzida em nosso laboratório por transcrição *in vitro*, utilizando o kit Ampliscribe T7 High Yield Transcription (Epicentre® Biotechnologies) e um par de oligos de DNA de 40mer, correspondente aos 21 nucleotídeos do siRNA adicionados à seqüência do promotor T7 (seqüência do promotor T7 sublinhada; senso: 5' GTTCTTATATTCGGTGGGCTATAGTGAGTCGTATTACC; anti-senso: 5' AGGCCACCGGAATATAAGAATATAGTGAGTCGTATTACC).

O si_*Stealth* foi o único siRNA utilizado que já veio da empresa anelado, pronto para uso.

Obtenção de esiRNA

O esiRNA (*endoribonuclease-prepared siRNA*) é uma estratégia de produção de siRNAs *in vitro*, partindo de duplas fitas de RNA (dsRNA) longas que são clivadas em pequenos RNAs de 21 a 22nt pela Dicer, em laboratório, gerando um *pool* de siRNAs contra o gene de interesse (Figura 22), neste caso, o *Lgi1*.

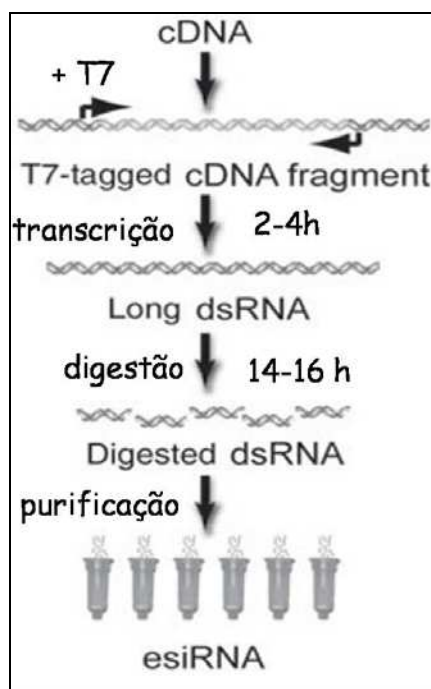


Figura 22: Esquema demonstrando etapas para a produção de esiRNA (modificado de Kittler et al., 2005).

Para a produção do esiRNA, foi escolhida uma região do cDNA do gene de interesse sem homologia com os outros genes da família *Lgi* ou com qualquer outro gene do camundongo, no exon 8. Partiu-se de um cDNA de camundongo, transcrito por iniciadores randômicos (Invitrogen), para fazer a amplificação da região escolhida, a qual chamamos de PCR 1, utilizando os seguintes iniciadores: senso 5' ATACCTTGAAATAGCCAGAC e anti-senso 5' ATGCGCTTAAGTCAACTATG. Em seguida, foi realizada a PCR 2 para a adição do promotor T7, utilizando os seguintes iniciadores (seqüência do promotor T7 sublinhada): senso 5' GGTAATACGACTCACTATAGATACCTTGAAATAGCCAGAC e anti-senso 5'

GGTAATACGACTCACTATGCGCTTAAGTCAACTATG. Para a transcrição das dsRNA foi utilizado o AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre® Biotechnologies) e para posterior obtenção dos esiRNAs foi utilizado o BLOCK-iT™ Dicer RNAi Kit (Invitrogen). A verificação do esiRNA foi realizada em gel de agarose 4% e a sua quantificação por espectrofotometria (GeneQuant *pro*, Amersham Biosciences).

Controles

Em alguns experimentos foi utilizada como controle positivo uma molécula contra o gene *Gapdh* (*Silencer*® GAPDH siRNA, Ambion), a qual foi chamada se si_*Gapdh*.

Como controle negativo foram utilizados dois siRNAs cujas seqüências não têm homologia com qualquer região do genoma murino ou humano, um chamado de si_irrelevante (senso 5': GGTATTCGTATCGAAGAAGTTAA e anti-senso 5': AACUUCUUCGAUACGAUACCGG), adquirido juntamente com o si_*Stealth* (Invitrogen) e o outro, si_*GFP* (senso 5': CAGGCUACUUGGAGUGUAUdTdT e anti-senso 5': AUACACUCCAAGUAGCCUGdTdT; extremidades 3' com nucleotídeos de DNA).

Também foi usado um siRNA fluorescente, que consiste de um oligo irrelevante marcado com fluoresceína (BLOCK-iT™ Fluorecent Oligo, Invitrogen) também foi utilizado. Este fluoróforo permitiu a localização do oligo e a investigação da eficiência da transfecção.

Confirmação do silenciamento gênico

Todos os experimentos de interferência por RNA foram sucedidos por reações de PCR em tempo real para verificação do silenciamento.

Para alguns experimentos, além da análise por PCR quantitativa, foram realizados experimentos de western blot para a verificação da proteína Lgi1.

PCR em tempo real

Os passos para a extração de RNA e posterior obtenção de cDNA, necessários para a PCR em tempo real, assim como as reações de PCR quantitativo foram detalhados no Capítulo 1.

Resumidamente, a extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, e o cDNA obtido pela utilização da enzima SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicatas ou triplicatas, no equipamento ABI 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems), utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems). As análises de quantificação relativa de *Lgi1* foram calculadas pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Em alguns experimentos foi utilizado o aplicativo GeNorm (<http://medgen.ugent.be/genorm/>), que também é baseado no método de Ct comparativo, porém permite a quantificação relativa de um gene utilizando a normalização com dois ou mais controles endógenos, em conjunto.

Para a amplificação e quantificação do gene *Lgi1* em camundongos, ratos e células humanas, foi utilizado o mesmo ensaio, já otimizado, Mm00522315_m1 (Applied Biosystems), que contém iniciadores e sonda específicos para *Lgi1*.

Para a normalização das reações foram utilizados, como controles endógenos, ensaios específicos para cada espécie estudada. Para os experimentos com camundongos foram utilizados os genes *Gapdh* (Mouse GAPD endogenous control) e β -actina (Mouse ACTB Endogenous Control). Para os experimentos com células humanas, *GAPDH* (Human GAPD Endogenous Control) e *18S* (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control) e com ratos, o gene *Gapdh* (Rat GAPD Endogenous Control).

As validações desses ensaios, imprescindíveis para se iniciar as reações de PCR em tempo real com segurança, foram realizadas como descrito no Capítulo 1.

As reações para PCR quantitativa foram realizadas em duplicata ou triplicata, com volume final de 12,5µL: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de iniciadores e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (100ng para todos os experimentos com exceção do experimento com ratos, no qual foi utilizado 4ng). Foram utilizadas as mesmas condições de ciclagem do Capítulo 1, recomendadas pelo fornecedor.

Após as corridas foi empregado o aplicativo 7500 System SDS Software (Applied Biosystems) para a análise da expressão, referente ao calibrador escolhido (amostra escolhida como referência para comparação). As barras verticais presentes nos gráficos, resultantes dessas análises, representam os valores máximos e mínimos obtidos.

Western blot

A extração de proteína de encéfalo ou de hipocampo de camundongos foi realizada a partir da segunda fase formada pelo Trizol (Invitrogen) durante a extração de RNA, conforme protocolo recomendado pelo fabricante, com alteração de um passo.

Para cada 1mL de Trizol utilizado na amostra, adicionou-se 1,5mL de isopropanol, que foi incubado a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos e centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e foram feitas três lavagens com 2mL de uréia 0,3M em etanol 95%, para cada 1mL de Trizol. As lavagens foram realizadas adicionando a solução de uréia às amostras, incubando-as a TA por 20 minutos, seguido por centrifugação a 7500g por 5 minutos a 4°C e remoção do sobrenadante. Após a última lavagem, adicionou-se 1,2mL de etanol 100%, agitado em vórtex, seguido por incubação de 20 minutos a TA e centrifugação a 7500g por 5 minutos a 4°C. Após a retirada do etanol, a amostra foi deixada secando por aproximadamente 20 minutos, sobre a bancada. O extrato protéico foi solubilizado em solução de SDS 1% e incubação em banho-maria a 50°C.

A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria (GeneQuant *pro*, GE Helathcare) e a integridade do extrato total de proteínas foi verificada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% de acordo com Sambrook et al. (1989).

Os procedimentos para a realização do western blot estão detalhados no Capítulo 1. De forma resumida: 30µg de extrato proteico total foi separado em gel de SDS-PAGE 10% e eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (GE Healthcare) por cuba semi-seca (Eletroblot Multiphor II; GE Healthcare). O bloqueio da membrana foi realizado em solução de leite 5% e a incubação com os anticorpos primários foi realizada durante a noite. No dia seguinte, após a incubação com os anticorpos secundários, foi feita a revelação das bandas na própria membrana.

Foram utilizados como anticorpos primários o policlonal contra Lgi1 sc-9583 (Santa Cruz Biotechnology®, inc) e o anticorpo contra β -actina (Abcam), utilizado como controle interno. Como anticorpo secundário foram utilizados o anti-IgG de cabra, para Lgi1, e de coelho, para β -actina, ambos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich).

Para a densitometria das bandas dos géis de western blot foi utilizado o programa ImageJ (Abramoff et al., 2004), com o objetivo de quantificar a presença da proteína Lgi1 normalizada com a β -actina presente no cérebro dos animais estudados.

Silenciamento do gene *Lgi1* por RNAi *in vivo*

Os experimentos *in vivo* de silenciamento do gene *Lgi1* foram realizados em camundongos, com idade adulta ou neonatos, e em ratos adultos.

Os experimentos de RNAi em camundongos adultos foram feitos basicamente por dois métodos: injeção local, via cirurgia estereotáxica, e injeção veia caudal.

A injeção local, diretamente no cérebro dos camundongos, foi realizada com algumas diferenças entre os experimentos, podendo ser dividida em quatro procedimentos:

- cirurgia estereotáxica apenas,
- cirurgia estereotáxica acompanhada de canulação,
- cirurgia estereotáxica seguida de eletroporação local,
- cirurgia estereotáxica associada ao implante de uma minibomba osmótica.

Para os animais neonatos foi utilizada apenas a cirurgia estereotáxica como método para a introdução das moléculas de siRNA no cérebro desses animais.

O único experimento de silenciamento em ratos ocorreu pelo método de injeção via veia caudal.

Uma tabela resumindo todas as cirurgias realizadas se encontra no Anexo 3.

Injeção local em camundongos adultos

Padronização da anestesia

Para o início dos experimentos com animais adultos, fez-se necessário primeiramente a padronização da anestesia devido a grande variação de resposta ao anestésico entre as diferentes linhagens de camundongos (Flecknell, 1993; Arras et al., 2001).

Foram feitos cinco testes utilizando dois animais de seis a nove semanas de idade para cada um, avaliando diferentes concentrações da combinação de ketamina (Dopalen, Vetbrands) e xilasina (Rompun 2%, Bayer HealthCare) e também a adição de acepromazina (Acepran 0,2%, UNIVET) a esta mistura (Tabela 4), como proposto por Arras et al. (2001). Também foi testada para uma das misturas (120ket/15xil) a aplicação de duas doses, sendo a segunda aplicada 15 minutos após a primeira dose e equivalente a um terço do volume inicial. A mistura de anestésicos foi preparada utilizando soro fisiológico para a utilização de 10µL da mistura por grama do animal, o que facilita os cálculos no

momento de aplicar o anestésico (é necessário apenas multiplicar o peso do animal por 10 para se ter o volume em μL a ser injetado) e foi aplicada via intraperitoneal.

Durante os testes foram monitorados a cada 10 minutos a frequência respiratória dos animais e o reflexo interdigital, sendo este último realizado com o auxílio de uma pinça, pressionando entre os dedos do animal (Gardner et al., 1995; Arras et al., 2001). Também foi observado o período de recuperação, levando em consideração o tempo que o animal voltava a se movimentar.

Tabela 4: Teste de anestésicos variando drogas, concentração e doses.

Teste	Dose	Ketamina (mg/Kg)	Xilasina (mg/Kg)	Acepromazina (mg/Kg)
1	1	100	10	-
2	1	100	20	-
3	1	120	15	-
4	1 + 1/3 (15' após 1ª)	120	15	-
5	1	100	20	3

Cirurgia estereotáxica

A injeção das moléculas de siRNA diretamente no cérebro dos animais foi realizada pelo procedimento da estereotaxia, utilizando um aparelho estereotáxico (Insight[®]), o qual nos permite localizar um determinado ponto precisamente no encéfalo do animal. As coordenadas necessárias para alcançar o ponto desejado no cérebro do animal foram fornecidas pelo atlas estereotáxico de camundongos (Paxinos e Franklin, 2001), que utiliza o bregma (Figura 23), junção das suturas sagital e coronal dos ossos do crânio, como “ponto zero”.

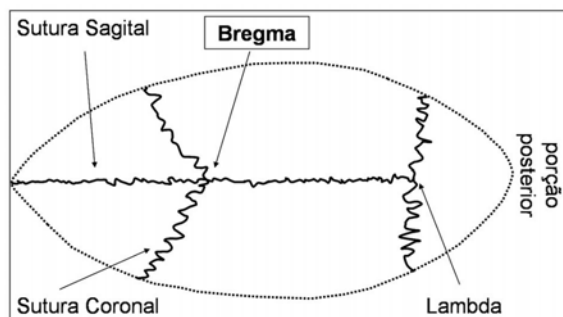


Figura 23: Esquema da calota craniana de um camundongo e suas suturas, evidenciando-se o bregma.

A anestesia foi aplicada e, passado alguns minutos, após o animal dormir, foi feita a tricotomia dos pêlos da cabeça do animal, da região próxima aos olhos até a altura das orelhas, utilizando o tosador MiniMax™ (Oster). O animal só foi posicionado no estereotáxico para o procedimento cirúrgico quando não apresentou mais nenhum reflexo interdigital.

Uma pomada oftalmológica (Terramicina, Pfizer) foi aplicada sobre os olhos do animal, para evitar lesão da córnea (Messier et al., 1999), e em seguida a região da cabeça foi limpa com etanol 70%. Com auxílio de bisturi foi feita uma pequena incisão de aproximadamente um centímetro na pele da cabeça do camundongo. Com um cotonete foi aplicada água oxigenada 10 volumes na calota craniana, de modo que o bregma ficasse ressaltado. Após a localização do bregma, o aparelho estereotáxico foi ajustado para os pontos de interesse ântero-posterior e lateral (Tabela 5) e este local da calota craniana foi perfurado com o auxílio de uma broca de trepanação para posterior passagem da agulha que iria introduzir as moléculas de siRNA.

Tabela 5: Tabela das coordenadas estereotáxicas utilizadas para alcançar os diferentes pontos de injeção. As medidas laterais positivas indicam que a injeção é feita no hemisfério esquerdo do animal.

Local	Ântero-posterior (AP)	Lateral (L)	Dorso-ventral (DV)
ventrículo lateral esquerdo	-0,22	1,0	-2,5
neocórtex esquerdo (córtex primário auditivo)	-2,5	4,0	-2,3
3º ventrículo	-0,5	0	-3,0
hipocampo esquerdo	-1,9	1,8	-2,0

Para a injeção das moléculas, um tubo de polietileno (ID = 0,38mm; BD) foi conectado a uma agulha gengival 30G curta, que foram acoplados a uma microseringa de vidro (10µL; SGE). Esta agulha gengival fixada ao aparelho estereotáxico foi posicionada no furo até a introdução do bisel (ponta da agulha) na calota craniana, onde se estabeleceu que seria o “zero” para alcançar a profundidade desejada, de acordo com a coordenada dorso-ventral (Tabela 5). Em seguida a descida da agulha, que foi feita lentamente, aguardou-se um minuto antes da injeção, para acomodação dos tecidos. A duração da injeção variou de acordo com o volume injetado. Após a injeção, foram esperados dois

minutos para a retirada da agulha, que foi realizada de forma lenta, para evitar extravasamento da injeção. A sutura foi feita com o auxílio de uma agulha cuticular e linha nº 5. A recuperação pós-operatória do animal foi realizada sobre uma placa aquecedora a 37°C.

É importante ressaltar que foi preparado um novo tubo de polietileno conectado a uma nova agulha gengival para cada tratamento utilizado.

Dois experimentos foram realizados utilizando apenas a cirurgia estereotáxica para a introdução das moléculas de siRNA no cérebro dos animais. Foram injetados de 5 a 10µg de si_Lgi1, em um volume de 1 a 2µl. No primeiro experimento, os oligos de siRNA foram associados a uma emulsão lipídica, Lipofectamine 2000 (Invitrogen), que facilita a entrada das moléculas nas células. Os cérebros foram coletados 24 ou 48 horas após a cirurgia.

Canulação dos animais

A canulação é um procedimento que consiste na fixação de uma cânula em um ponto de interesse no cérebro do camundongo, permitindo a entrada de uma agulha várias vezes, sem que seja necessário todo procedimento cirúrgico. Com o objetivo de fazer repetidas injeções de siRNA, foram realizadas canulações em terceiro ventrículo e hipocampo de alguns animais.

As cânulas foram preparadas lixando-se as duas extremidades de uma agulha 22G, deixando-as retas e com comprimento de 12mm. Um ponto de solda foi aplicado na metade do comprimento da cânula para aumentar a sua fixação ao animal. Com o auxílio de uma agulha gengival foi feita a limpeza do interior das cânulas que, posteriormente, foram lavadas em água corrente e autoclavadas, antes do uso.

O procedimento cirúrgico para a implantação da cânula foi o mesmo descrito acima para a injeção direta no cérebro, porém, ao invés de entrar no cérebro com uma agulha gengival, entrou-se com a cânula. A fixação da cânula foi feita com resina acrílica de dentista (Jet) aplicado junto à cânula até a altura do ponto de solda e sobre a calota craniana.

As injeções foram iniciadas quatro dias após a canulação e foi utilizada uma microseringa de vidro acoplada a um tubo de polietileno, que estava fixado a uma agulha gengival (Figura 24). A porção da agulha gengival, que entrava na cânula para as injeções,

tinha o tamanho da cânula, 12mm, adicionado o tamanho de metade do bicel, que foi lixado para evitar lesão do tecido. Desta forma, a ponta da agulha ficaria para fora da cânula, no interior do cérebro do animal e para se obter este tamanho ideal de agulha, colocou-se um pedaço de tubo de polietileno na porção superior da agulha (Figura 24). Antes de cada injeção, o interior da cânula era limpo com uma agulha semelhante a da injeção (limpador de cânula, Figura 24).

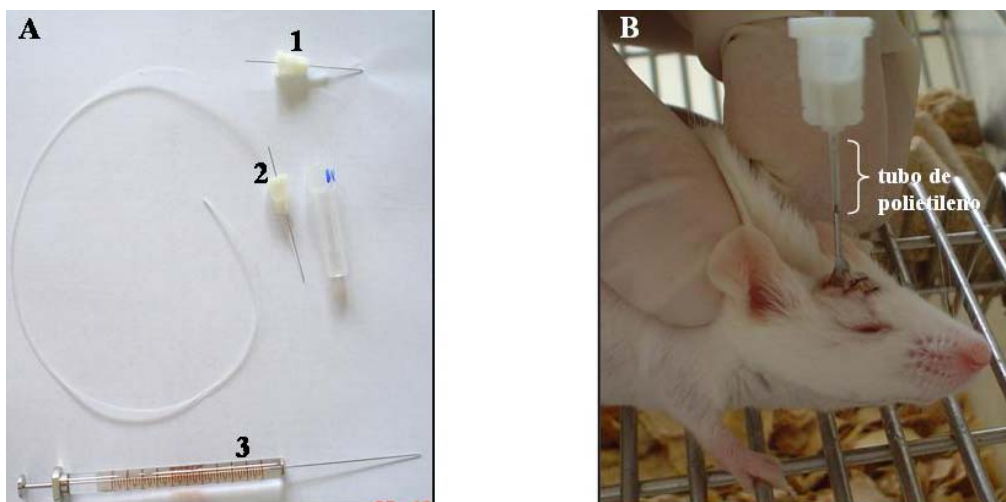


Figura 24: Materiais necessários para a injeção em animais canulados. **A.** 1: limpador de cânula; 2: agulha conectada ao tubo de polietileno; 3: microseringa de vidro. **B.** Agulha gengival no momento da injeção; notar que existe um pedaço de tubo de polietileno na agulha para fixar a entrada da agulha sempre na mesma altura (final da cânula).

Utilizando a canulação, foram realizados dois experimentos independentes, nos quais foram testadas as moléculas si_Lgi1, si_Lgi1 *in vitro* e si_Stealth, associadas à emulsão lipídica Lipofectamine 2000 (Invitrogen), usando 14ng ou 10µg de siRNA em 2µl, por injeção. Foram realizadas, no total, seis e dez injeções e os cérebros foram coletados 24 horas após a última injeção.

Eletroporação local

O método de eletroporação local consiste na injeção do siRNA em uma determinada região no encéfalo do animal, por cirurgia estereotáxica, seguida de eletroporação próxima à região injetada.

A injeção de moléculas de siRNA foi realizada em hipocampo e, 30 minutos após a injeção, foi feita a eletroporação local com a utilização de eletrodos especiais, chamados por nós de eletrodos-agulha (LGC Biotecnologia) (Figura 25A), que são posicionados dentro do cérebro, próximo ao local de injeção (Figura 25B).

A eletroporação consistiu de dois pulsos (100V, 600 μ s e 5V, 2s) e o tempo de intervalo entre eles variou de acordo com o procedimento. Os primeiros experimentos foram realizados utilizando apenas um eletroporador, demorando cerca de dez segundos entre os dois pulsos. Quando foram empregados dois equipamentos, o intervalo foi de aproximadamente dois segundos. Os dois eletroporadores utilizados eram do mesmo modelo, ECM 830 Electroporation System (BTX[®]).

Para a entrada dos eletrodos foram necessárias mais duas perfurações na calota craniana distando entre si de 3mm, realizadas com o auxílio da broca de trepanação (Figura 25B). O orifício utilizado para a injeção dos oligos deveria estar posicionado entre esses dois outros e o eletrodo-agulha deveria ser posicionado de modo que o pólo positivo estivesse no orifício anterior (mais próximo aos olhos) (Figura 25B).

Com esse método foram testadas as moléculas si_Lgil, si_Stealth e si_irrelevante, aproximadamente 100ng (7,5pmol) ou 1 μ g (75pmol) de moléculas, em um volume de injeção de 5 μ L e uma taxa de 0,85 μ L/min. A retirada dos hipocampos ocorreu de 1 hora a 7 dias após a injeção.

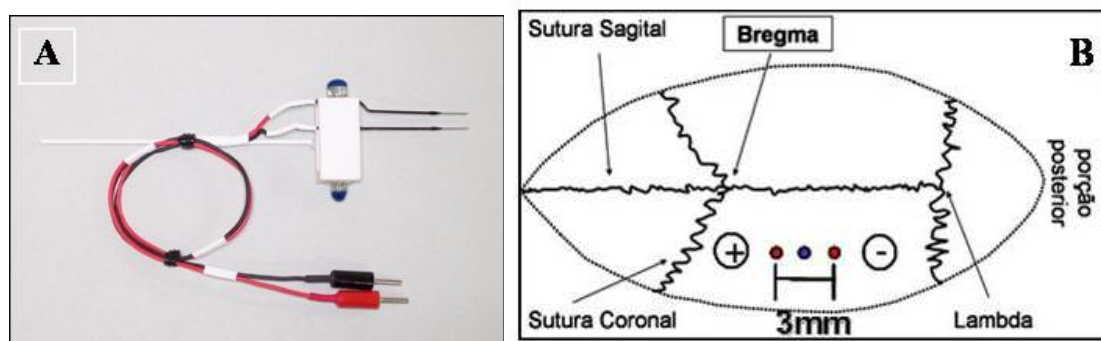


Figura 25: Eletroporação local. **A.** Eletrodo-agulha. **B.** Esquema mostrando posicionamento dos eletrodos (pólos positivo e negativo) próximo ao local da injeção.

Além da quantificação por PCR em tempo real, também foram realizados western blots para a verificação da expressão da proteína Lgi1, nos experimentos com eletroporação local. A comparação da expressão foi realizada utilizando o hipocampo direito de cada animal como controle (calibrador).

Para a análise estatística foram utilizados, quando necessários, os testes de Wilcoxon e ANOVA pareado.

Minibomba osmótica

As minibombas osmóticas (Alzet[®]) permitem a liberação contínua de substâncias em pequenos animais de laboratório, de modo subcutâneo, intraperitoneal ou diretamente no cérebro, através da ligação da bomba a um cateter acoplado em uma cânula implantada na região de interesse no cérebro (Figura 26). Seu funcionamento se dá pela presença de uma solução concentrada de sal, que forma uma camada osmótica, atraindo água dos tecidos próximos a minibomba e forçando a saída do siRNA presente no seu interior (Figura 26).

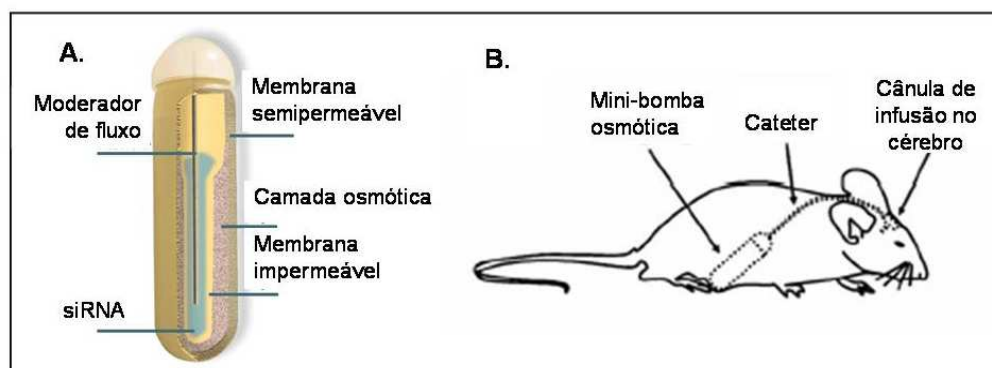


Figura 26: Esquema da minibomba osmótica (Alzet[®]). **A.** Composição da minibomba (modificado de www.alzet.com/products/howdoesitwork.php); **B.** Colocação subcutânea da minibomba em camundongo e sua ligação ao cérebro do animal pelo cateter e cânula (modificado de Thakker et al., 2004).

A preparação da minibomba, com a cânula associada, foi realizada no dia anterior a sua implantação. Primeiro, foi feito o preenchimento do sistema “cânula – cateter – moderador de fluxo” com siRNA (Figura 27). Para isso, a cânula foi ligada ao cateter

(~3cm), que foi conectado ao moderador de fluxo, e também a um pequeno pedaço de cateter extra na sua outra extremidade, por onde foi feito o preenchimento utilizando uma seringa e agulha (Figura 27). Esse cateter extra foi utilizado apenas durante o enchimento do sistema, para evitar a formação de bolhas de ar, sendo retirado para o posterior encaixamento do moderador de fluxo à bomba. Em seguida, a minibomba foi preenchida com 100 μ L de siRNA, utilizando uma seringa de 1mL acoplada a uma agulha específica, que vem juntamente com a bomba. Finalmente, o sistema “cânula – cateter – moderador de fluxo” foi conectado a minibomba (Figura 27). A minibomba montada foi deixada em soro fisiológico estéril à 37°C por no mínimo seis horas, preferencialmente *overnight*, antes da sua colocação. Desta forma, observou-se, antes da implantação da bomba, se o sistema estava funcionando e também garantiu a liberação de moléculas assim que foi colocada, evitando a oclusão da cânula.

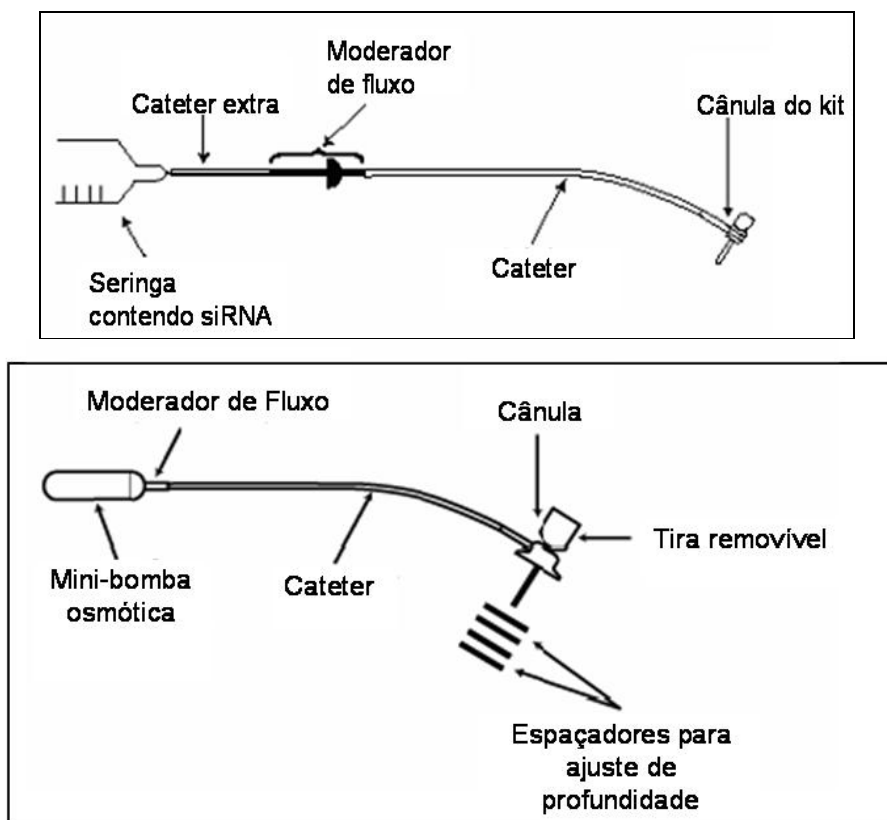


Figura 27: Preparação de minibomba associada à cânula. Primeiro preenche-se o sistema “cânula – cateter – moderador de fluxo”, que será conectado pelo moderador de fluxo à minibomba (modificado de www.alzet.com/products/brainkits_howto.php).

Juntamente com a minibomba osmótica pode-se comprar um kit (ALZET Brain Infusion Kit, Alzet[®]) que acompanha a cânula, o cateter e espaçadores para regular a profundidade do posicionamento da cânula no cérebro do animal (Figura 27). Além desse sistema, foi testado o uso das cânulas produzidas em nosso laboratório, utilizando agulha 22G, como descrito no item “Canulação dos animais”, com apenas uma alteração, a cânula foi dobrada, formando 90°, para a conexão com o cateter que se direcionou para o dorso do animal.

A implantação da minibomba osmótica foi realizada no dorso do camundongo. O animal foi anestesiado, posicionado no aparelho estereotático e, por um corte feito no dorso do animal, próximo à cabeça, divulsionou-se os tecidos musculares, abrindo espaço para a colocação da minibomba subcutaneamente. Após a colocação da bomba, foi realizada uma cirurgia estereotática para a implantação da cânula no terceiro ventrículo. Terminada a cirurgia, o animal foi suturado, colocado para recuperação em berço-térmico à 37°C e medicado subcutaneamente com Ketofen[®] (Merial) (10mg/Kg).

Foram utilizados dois modelos de minibomba osmótica: 1007D e 1002 (Alzet[®]). Ambas têm capacidade para 100µL, porém distinguindo-se pela taxa de liberação, 0,5µL/h para a primeira e 0,25µL/h para a segunda. Desta forma, o modelo 1007D tem duração de sete dias após a implantação e o modelo 1002, 14 dias. Os animais devem ser sacrificados no máximo 10 dias após o implante do modelo 1007D e 21 dias, para o modelo 1002, isso porque a bomba continua atraindo água e pode liberar a solução concentrada de sal presente no seu interior, tendo por resultado a irritação local dos tecidos em torno da bomba.

Os siRNAs testados com a minibomba osmótica foram: si_Lgi1, si_Stealth e si_irrelevante. A massa total injetada variou de aproximadamente 20 a 840µg.

Injeção veia caudal

A introdução de moléculas de siRNA foi realizada pelo sistema vascular em camundongos e ratos adultos, com a associação do siRNA a um pequeno peptídeo viral, derivado do vírus da raiva (RVG, do inglês *rabies virus glycoprotein*) (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR) (Sigma-Aldrich).

As moléculas de siRNA foram complexadas ao RVG na proporção molar de 10:1 (RVG:siRNA) por 15 minutos a 20°C, depois o complexo siRNA-RVG foi misturado à glicose 5%, veículo usado para injeção que foi realizada na veia caudal do animal.

O procedimento para a injeção foi o mesmo para os dois tipos de roedores utilizados. Primeiramente, a cauda do animal foi mergulhada em água morna (37°C) para dilatação das veias; depois, o animal é colocado dentro da gaiola e imobilizado segurando a cauda para injeção na veia caudal (Figura 28A), com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha de insulina, para ratos, e agulha gengival acoplada a um cateter, para os camundongos (Figura 28B). O volume de injeção para camundongos foi de 200µL e para ratos, 500µL.

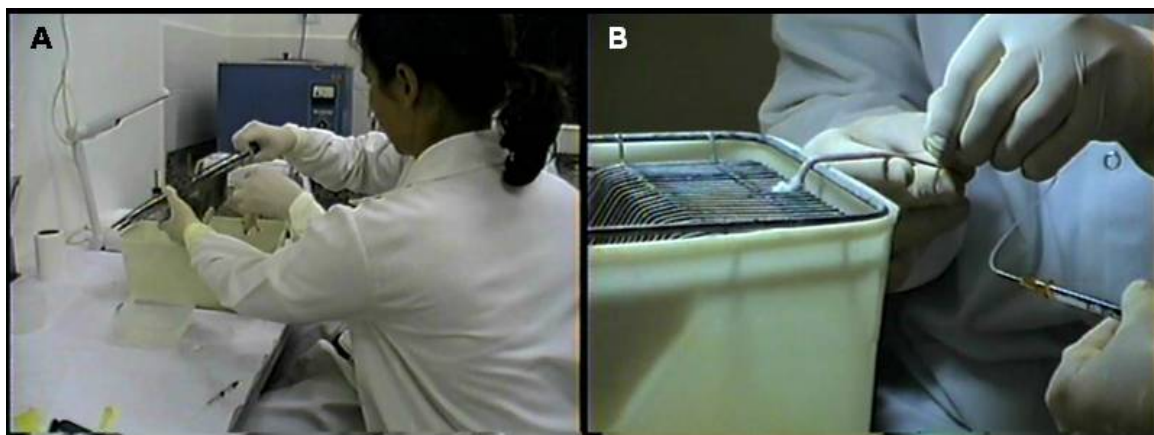


Figura 28: Injeção veia caudal. **A.** Imobilização do animal; **B.** Injeção com agulha gengival ligada a um cateter que está acoplado à seringa.

Nos experimentos com camundongos foram utilizadas as moléculas de esiRNA e também cinco moléculas de siRNA, contra o gene *Lgi1*, associadas ao peptídeo: si_*Lgi1*, si_*Lgi1_dna*, si_*Lgi1_b*, si_*Amb*, si_*Stealth*. Também foi utilizado o controle positivo si_*Gapdh*. Foram feitas três injeções, de oito em oito horas, com 50µg (4nmol) de siRNA e aproximadamente 5µg (0,4nmol) de esiRNA, por injeção. Os encéfalos foram coletados 24 ou 72 horas após a primeira injeção.

O experimento de injeção veia caudal em ratos foi realizado uma vez, com duas injeções de oito em oito horas, utilizando 25µg (2nmol) de si_*Amb* por injeção. A coleta dos encéfalos foi feita 48 horas após a primeira injeção.

Quando necessário, foi empregado o teste estatístico de Mann-Whitney (três ou mais amostras) ou teste T (2 amostras) para verificação de diferenças de expressão entre os dois grupos, tratado e o controle.

Cirurgia estereotáxica em animais neonatos

Padronização da cirurgia

A cirurgia estereotáxica em camundongos em desenvolvimento foi padronizada em animais com 4 dias de vida (P4), utilizando o corante azul de Evans. Esta etapa contou com a colaboração do Prof. Dr. Francesco Langone, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB-UNICAMP.

O neonato foi anestesiado por 5 minutos no gelo e depois posicionado e preso com uma fita sobre uma base adaptada contendo gelo (garrafa para cultura de célula). Uma borracha com 3mm de espessura foi colocada embaixo da cabeça do animal a fim de manter a área da injeção plana.

Antes do início da injeção, a região da cabeça do animal foi limpa com etanol 70%. Após a localização do bregma, utilizamos o estereotáxico para encontrar o ponto da injeção. Foram testadas as seguintes coordenadas (Tabela 6):

Tabela 6: Coordenadas e volumes testados na padronização da estereotaxia em neonatos.

Teste	Ântero-posterior (AP)	Lateral (L)	Dorso-ventral (DV)	Volume (µL)
1	- 3,0	+ 0,5	- 2,5	0,5
2	- 3,0	+ 0,5	- 2,5	1,0
3	- 3,5	+ 1,5	- 3,0	1,0

Após o posicionamento da agulha nas coordenadas escolhidas (AP e L), desceu-se com a agulha até a introdução de metade do bisel (ponta da agulha) na pele, onde se estabeleceu que seria o “zero” para alcançar a profundidade desejada. Em seguida a descida da agulha, que foi realizada lentamente, esperou-se um minuto para acomodação dos tecidos. Após a injeção, se aguardou dois minutos e a agulha foi retirada lentamente, evitando extravasamento do volume injetado. A recuperação pós-cirúrgica foi realizada posicionando o animal em decúbito dorsal próximo ao calor e uma fonte de luz e também estimulando o coração do animal, pressionando levemente seu peito, e a respiração,

passando no focinho um pedaço de papel higiênico. Para verificação se houve a entrada do corante, após 30 minutos do término da cirurgia, o encéfalo do animal foi retirado.

Injeção de siRNA

As tentativas de RNAi em animais neonatos foram realizadas utilizando-se duas moléculas, si_Lgi1 e si_Stealth, em volumes que variaram de 1 a 5µl e em diferentes concentrações (50ng a 10µg). Como veículo das injeções foram utilizados a emulsão lipídica Lipofectamine 2000 (Invitrogen™) ou tampão PBS. Além disso, também foi utilizado uma molécula de siRNA contra o gene *Mecp2* em um experimento.

Também foi realizada a injeção de um siRNA fluorescente (BLOCK-iT™ Fluorecent Oligo, Invitrogen) em um camundongo P4. Após uma hora e meia da injeção, o cérebro inteiro foi retirado e congelado em Tissue-Tek para histologia. Foram feitos cortes coronais com 10µm de espessura, com o auxílio de um criostato, que foram analisados utilizando um microscópio de fluorescência.

Silenciamento do gene *LGII/Lgi1* por RNAi *in vitro*

A expressão do gene *LGII/Lgi1* foi testada, por PCR em tempo real, em sete linhagens celulares: U138MG, U87MG, T98G, A172, Neuro2a, L929 e cultura de cardiomiócito, sendo as quatro primeiras de origem humana e as três seguintes de origem murina.

A técnica de RNAi *in vitro* foi realizada utilizando as linhagens celulares U138MG e Neuro2a, conforme o seguinte protocolo. No dia anterior a transfecção, células foram semeadas em número de 2×10^5 por placa p60 (Corning). A transfecção foi realizada conforme as recomendações do fabricante, utilizando 50nM ou 200nM de siRNA e 10ul de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) para volume final de 2mL (5µg/mL). Após 5 horas de incubação com a mistura de transfecção (siRNA/Lipofectamine e meio de cultura sem soro) esta foi trocada por meio DMEM - 10% SFB. O conteúdo de células contido em cada placa de transfecção foi tripsinizado, coletado 24, 48 ou 72 horas após a transfecção e transferido para tubo contendo 1mL de Trizol (Invitrogen), para posterior extração de RNA.

Para os experimentos com a cultura celular U138MG foram utilizadas as moléculas si_Amb, si_Gapdh (controle positivo) e, além do si_GFP, também foi utilizado como

controle negativo o tratamento *mock*, que consiste em tratar a cultura com todos os reagentes, incluindo a Lipofectamine 2000 (Invitrogen), porém sem siRNA. Nos experimentos em que utilizamos duas concentrações diferentes de siRNA, foi aplicado o teste estatístico T, a fim de comparar os dois tratamentos (50 e 200nM) nos quatro grupos estudados. Quando não se encontrou diferença entre os dois tratamentos, as amostras foram agrupadas e, empregando o teste Kruskal-Wallis, comparou-se os quatro grupos. Toda experimentação utilizando a linhagem U138MG foi realizada com a colaboração da Prof^a Dr^a Sara Saad e de sua aluna de doutorado Carolina Bigarella, do laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica, no departamento de Clínica Médica (FCM – UNICAMP).

Para a cultura Neuro2a foram utilizadas as moléculas si_Stealth, si_Gapdh e si_irrelevante a 50nM.

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas empregadas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 3.0 (Ayes et al., 2003). O nível de significância considerado foi 5%.

4.4- RESULTADOS

Moléculas de siRNA

Desenho das moléculas

Nós desenhamos um total de seis moléculas de siRNA contra o gene *Lgi1* (Tabela 7): si_*Lgi1*, si_*Lgi1_dna*, si_*Lgi1_in vitro*, si_*Lgi1_b*, si_*Stealth* e si_*Amb*. As moléculas si_*Lgi1_in vitro* e si_*Lgi1_dna* possuem a mesma sequência da si_*Lgi1*, porém, a primeira foi produzida por transcrição *in vitro* e a segunda, é uma molécula modificada, composta por dois nucleotídeos de DNA na extremidade da porção 3', aumentando assim a sua estabilidade. O oligo si_*Lgi1_b* também possui nucleotídeos de DNA na extremidade 3' o que também aumenta sua estabilidade. As moléculas de siRNA foram todas sintetizadas com um grupo fosfato na porção 5' da fita funcional (anti-senso do duplex), garantindo assim sua funcionalidade. Nós verificamos a energia livre (ΔG) de todas as sequências de siRNA desenhadas (Tabela 7), através do programa *Strand Analysis* (Pereira et al., 2007) assegurando o uso de moléculas contendo um alto ΔG e portando uma maior probabilidade de eficiência. Um outro cuidado foi a checagem contra homologia com sequências no genoma do camundongo, através do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Tabela 7: Localização das sequências-alvo das moléculas de siRNA desenhadas contra o gene *Lgi1* de camundongo (posição relativa a NM_020278, www.ncbi.nlm.nih.gov).

siRNA	Sequência-alvo	Posição	Exon	ΔG^*
si_ <i>Lgi1</i> , si_ <i>Lgi1_in vitro</i> , si_ <i>Lgi1_dna</i>	GCCACCCGGAATATAAGAAAC	706	6	5,9
si_ <i>Lgi1_b</i>	AATGCCCTGCCGTGTGTACTTGT	223	1	5,8
si_ <i>Stealth</i>	CCGTGTGTACTTGTAGCAAAGATAA	232	1	2,5
si_ <i>Amb</i>	TCCGGAATTATGACAACATTACA	916	7	3,5

ΔG^* : energia livre de Gibbs

Obtenção dos siRNAs

Os oligos de RNA senso e anti-senso referentes às moléculas si_*Lgi1*, si_*Lgi1_dna*, si_*Lgi1_b* e si_*Amb* foram anelados e verificados em gel de agarose antes dos experimentos de silenciamento gênico (Figura 29).

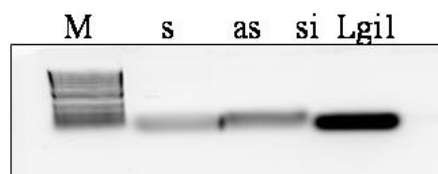


Figura 29: Verificação dos oligos senso (s) e anti-senso (as), em estoque, referentes ao si_Lgi1 e o siRNA anelado, pronto para uso. Gel de agarose 1%, 0,5µl de amostra e 10 minutos de corrida a 70V. M: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

As moléculas de si_Lgi1 *in vitro* foram transcritas e visualizadas em gel de agarose, juntamente com a aplicação de 1 e 3µL de uma amostra com massa conhecida (1µg) (Figura 30) para quantificação, empregando o programa ImageJ (Abramoff et al., 2004), que resultou nas seguintes concentrações: 44,75 e 5,42ng/µL, senso e anti-senso, respectivamente. Utilizamos a mesma massa de ambas moléculas (134,25ng) para o anelamento, resultando em 27,8µl de siRNA a 9,66ng/µL, equivalente a aproximadamente 1,5pmol/µL.

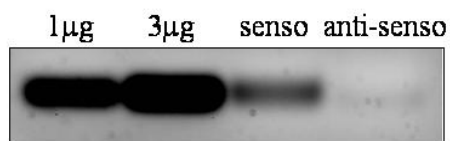


Figura 30: Verificação e quantificação das moléculas de RNA produzidas por transcrição *in vitro*, por gel de agarose 1%.

As moléculas foram desenhadas para trabalharmos com camundongos, porém com a necessidade de realizarmos experimentos com ratos e também com culturas de células humanas, foi necessária a verificação da complementaridade dessas moléculas, pelo programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), com a sequência do gene *Lgi1/LGII* de ratos e humanos. Os oligos si_Lgi1_b e si_Amb apresentaram 100% de identidade com o gene humano e si_Amb também apresentou 100% de identidade com a sequência de *Lgi1* de ratos. Com isso, essas moléculas poderiam ser utilizadas para os experimentos de silenciamento em cultura de células e com ratos.

Obtenção de esiRNA

As moléculas de esiRNA foram produzidas a partir de uma sequência de cDNA de 524pb (PCR 1; Figura 31A) do exon 8, na posição 1250 a 1754 (relativa a NM_020278, www.ncbi.nlm.nih.gov). A adição do promotor T7 (PCR 2) a essa sequência para a produção de dsRNA resultou em um fragmento de 545pb (Figura 31B). Após a digestão da dsRNA, obtivemos 60ul de moléculas de esiRNA, quantificadas por espectrofotometria, a aproximadamente 0,5µg/µL (Figura 31C).

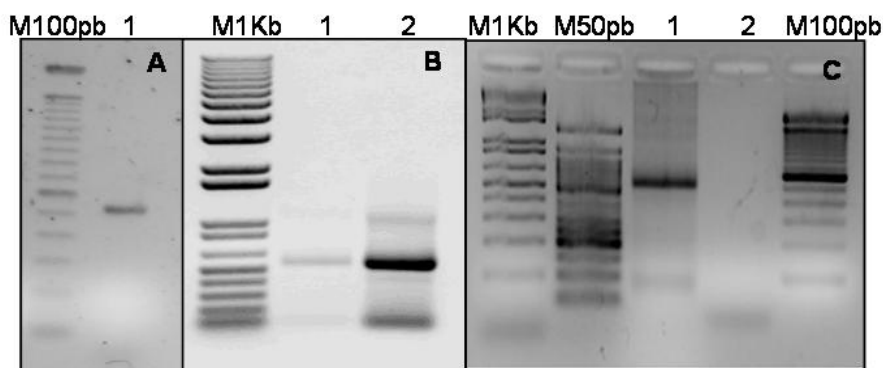


Figura 31: Preparação das moléculas de esiRNA. **A.** PCR 1, fragmento de 524pb; **B.** PCR 2, 545pb (T7 adicionado ao fragmento de interesse), **B1.** 3µL da PCR, **B2.** 1µL da PCR purificada; **C1.** 2µL de dsRNA, **C2.** 2µL de esiRNA. M: marcador de peso molecular.

Confirmação do silenciamento gênico

A verificação do silenciamento gênico dos experimentos foi realizada por PCR em tempo real. A técnica de western blot foi aplicada apenas em alguns experimentos de eletroporação local.

PCR em tempo real

A quantificação do gene *Lgi1* foi realizada em tecido nervoso de camundongos e ratos e também em linhagem celulares de glioblastoma humano, utilizando o mesmo ensaio que inicialmente foi pedido para camundongo. Fizemos o alinhamento (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) da sonda para *Lgi1* de camundongo Mm00522315_m1 (Applied Biosystems) com o gene *Lgi1* humano e de rato e encontramos 100% de identidade com a sequência de humanos e 96% com rato (Figura 32). Testes iniciais de PCR em tempo real com o ensaio de *Lgi1* para camundongo, mostraram boa

amplificação de cDNAs de rato e humano com o ensaio Taqman[®] (Applied Biosystems) para murinos.

1	GCTGCAGCTCTTGTTATTTACGTCG	25	Sonda de PCR em tempo real
276	GCTGCAGCTCTTGTTATTCACGTCG	300	<i>Lgi1</i> de rato

Figura 32: Alinhamento da sonda de PCR em tempo real para camundongo com a sequência de *Lgi1* de rato.

As validações dos diferentes ensaios utilizados, necessárias para se iniciar os experimentos de PCR quantitativa foram realizadas para os diversos endógenos utilizados, juntamente com o ensaio para *Lgi1* (Tabela 8).

Para camundongo, validamos o ensaio para *Lgi1*, *Gapdh* e β -actina, o que possibilitou também a quantificação do gene *Gapdh* como alvo, utilizando β -actina como endógeno, quando o experimento envolveu a utilização do si_*Gapdh* (Tabela 8).

Para rato, validamos os ensaios para *Lgi1* juntamente com *Gapdh* específico para rato e para trabalhar com cultura de células humanas, validamos os ensaios *Lgi1*, *GAPDH* e *18S* (Tabela 8).

Tabela 8: Resultado da validação dos diferentes iniciadores e sondas (ensaios) utilizados. Valores de *slope*, utilizados para cálculo da eficiência, e R2 são gerados pelo programa SDS Software v1.3 (Applied Biosystems).

	Ensaio	<i>Slope</i>	Eficiência	R2
Camundongo	<i>Lgi1</i>	-3,3363	0,99	0,9971
	<i>Gapdh</i>	-3,4489	0,95	0,9996
	β -actina	-3,3363	0,99	0,9996
Rato	<i>Lgi1</i>	-3,1139	1,09	0,9808
	<i>Gapdh</i>	-3,1143	1,09	0,9974
Humano	<i>Lgi1</i>	-31519	1,08	0,9954
	<i>GAPDH</i>	-3,2378	1,04	0,9986
	<i>18S</i>	-3,3301	1,00	0,9949

Silenciamento do gene *Lgil* por RNAi *in vivo*

Os experimentos de silenciamento gênico em cérebro de camundongos adultos foram realizadas por dois métodos principais: a injeção local, via cirurgia estereotáxica e a injeção veia caudal (resumo dos procedimentos no Anexo 3).

Injeção local em camundongos adultos

Para iniciarmos as cirurgias estereotáxicas, que permitiriam a injeção de siRNA no cérebro dos camundongos adultos, fez-se necessário primeiramente a padronização da anestesia nesses animais.

Padronização da anestesia

Testamos, em cinco grupos de animais, quatro diferentes concentrações de anestésicos, que foram preparadas para um volume final de 1mL baseada nas concentrações de cada droga: ketamina: 116mg/ml; xilasina: 20mg/mL; acepromazina: 2mg/mL (Tabela 9). Para garantirmos um completo monitoramento durante os testes, avaliamos apenas dois animais por dia de teste.

Tabela 9: Volume de cada droga necessário para o preparo de 1mL da mistura de anestésicos, de acordo com a concentração desejada.

Droga	Concentração (mg/Kg)			
	100/10	100/20	120/15	100/20/3
Ketamina (Dopalen [®]) (µL)	86	86	103	86,2
Xilasina (Rompun [®]) (µL)	50	100	75	100
Acepromazina (Acepran) (µL)	-	-	-	150
Soro fisiológico (µL)	864	814	822	663,8

A primeira concentração de anestésico testada (100/10) manteve os animais sem reflexo por um curto período de tempo, de 10 a 20 minutos, insuficiente para a cirurgia (Tabela 10). Com o aumento da quantidade de xilasina para 20mg/Kg no segundo teste, conseguimos a anestesia de 30 minutos para um dos animais testados, porém o outro não perdeu o reflexo interdigital, nem mesmo com a injeção de uma segunda dose (Tabela 10).

Desta forma, variamos a concentração para 120/15 e observamos que uma dose não parecia ser suficiente para que o animal perdesse o reflexo e quanto maior era o período entre a primeira dose e a segunda, menor efeito esta tinha em potencializar a primeira

(Tabela 10). Com isso, resolvemos testar a mesma concentração, porém com uma segunda dose após 15 minutos, obtendo um período de anestesia por mais de uma hora e com uma recuperação de aproximadamente 40 minutos, o que se mostrou mais eficiente que a dose (100/20/3) indicada por Arras et al., (2001), anestesiando apenas um dos animais e o deixando com dificuldades para respirar por quatro horas após a anestesia (Tabela 10).

Portanto, escolhemos para nossos experimentos em animais adultos, a mistura de ketamina e xilasina de 120/15 com duas doses.

Tabela 10: Teste de diferentes misturas de anestésicos.

		Ketamina/Xilasina								Ket/Xil/Acepro	
		100/10		100/20		120/15		120/15 + 1/3 da 1ª dose		100/20 /3	
Animal		1	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10**
Peso (g)		25,0	22,5	24,4	23,5	23,5	25,1	27,3	25,9	24,3	27,4
Anestésico (µl)		250	230	240	230	230-gota p/ fora	250	270	260	240	270
Início		10h19	10h35	07h43	07h49	7h58	8h19	9h28	9h33	10h08	9h53
2ª dose após 15' (µl)		-	-	-	-	-	-	100	100	-	-
10'	FR reflexos	160 ausência	188 ausência	132 presença	108 presença	168 presença	160 presença	140 ausência	140 ausência	160 presença	148 ausência
20'	FR reflexos	108 ausência	172 presença +70µl	128 ausência	128 presença	132 presença	148 presença	136 ausência	136 ausência	160 presença	132 ausência
30'	FR reflexos	148 presença	160 presença	104 ausência	172 retorno mov +90µl	132 presença +80µl	- 8h46 +90µl	144 ausência	144 ausência	160 presença	132 ausência
40'	FR reflexos	136 presença	- -	112 ausência	148 presença	144 presença	136 ausência	140 ausência	140 ausência	- presença	128 ausência
50'	FR reflexos	- presença	retorno c/ movimentos	8h39 retorno c/ movimentos	160 presença	176 presença	168 ausência	164 ausência	164 ausência	168 presença	124 presença
60'	FR reflexos	retorno c/ movimentos	- -		retorno c/ movimentos	168 presença	148 ausência	168 ausência	168 ausência		140 ausência
70'	FR reflexos	Se arrastando	Se arrastando			retorno c/ movimentos	128 ausência	176 ausência	176 ausência		156 ausência
80'							retorno c/ movimentos	164 ausência	164 ausência		172 presença
90'								retorno c/ movimentos	retorno c/ movimentos	retorno c/ movimentos	retorno c/ movimentos
				9h00 caixa	9h13 caixa	9h10 caixa	10h10 caixa	11h30 caixa	11h30 caixa	13h00 caixa	13h00 caixa

FR: frequência respiratória em movimentos por minuto.; caixa: devolvido para a gaiola

* animal difícil de imobilizar.

** animal 10 parecia estar com dificuldades para respirar após 4h da anestesia.

Cirurgia estereotáxica

Realizamos a injeção em ventrículo lateral, de si_Lgi1 (7,5µg em 1,5µL) complexado à emulsão lipídica na proporção 1:1, utilizando as coordenadas indicadas na Tabela 11, em dois animais e dois controles (sem injeção). Retiramos o cérebro de dois animais, um controle e um injetado com siRNA, após 24 horas da injeção e dos outros dois após 48 horas. A quantificação por PCR em tempo real de todo o encéfalo não mostrou silenciamento de *Lgi1*. Desta forma, resolvemos delimitar uma região do cérebro para a injeção e posterior retirada e análise. Escolhemos uma região que continha o córtex auditivo do camundongo. Com o auxílio do atlas estereotáxico para camundongos (Paxinos e Franklin, 2001), localizamos o córtex auditivo primário (Figura 33) e estabelecemos as coordenadas da injeção no hemisfério esquerdo (Tabela 5). Definimos retirar para análise, a porção cerebral três milímetros a partir do vértice do lambda, descendo até a porção mais inferior, na base do cérebro, delimitando uma área retangular de neocórtex, como mostrado na Figura 2 do Capítulo 1.

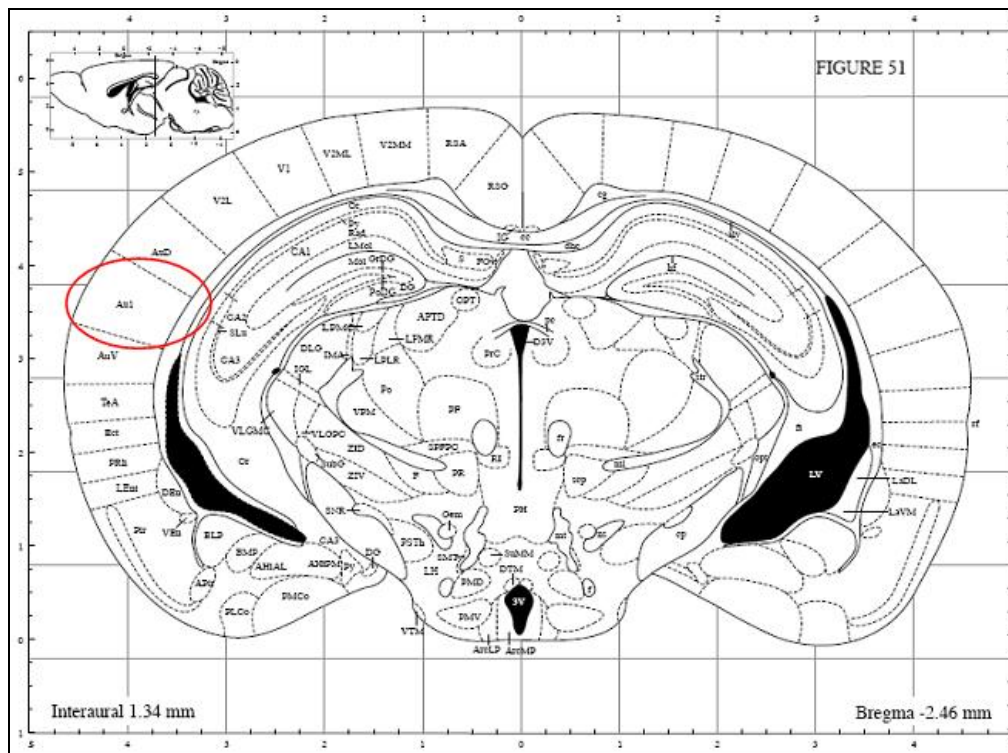


Figura 33: Esquema de um corte coronal de cérebro de camundongo (Paxinos e Franklin, 2001) evidenciando a região do córtex primário auditivo.

Executamos a injeção de 5 e 10µg (1 ou 2µL, injetados em 5 minutos) de si_Lgi1 diluído em PBS (1:1) no córtex esquerdo de quatro animais, dois por tratamento, e retiramos os neocórtex esquerdo e direito 24 horas após a injeção. A análise de PCR em tempo real não mostrou diminuição na expressão do gene *Lgi1* nos animais tratados, quando comparados às amostras de neocórtex de três animais controles sem injeção (Figura 34). Apesar do hemisfério esquerdo do animal 4, que recebeu 10µg de si_Lgi1, aparentar expressão diminuída, o ponto máximo de variação dessa amostra se aproximou do valor 2,0 de RQ (quantificação relativa), desqualificando um possível silenciamento.

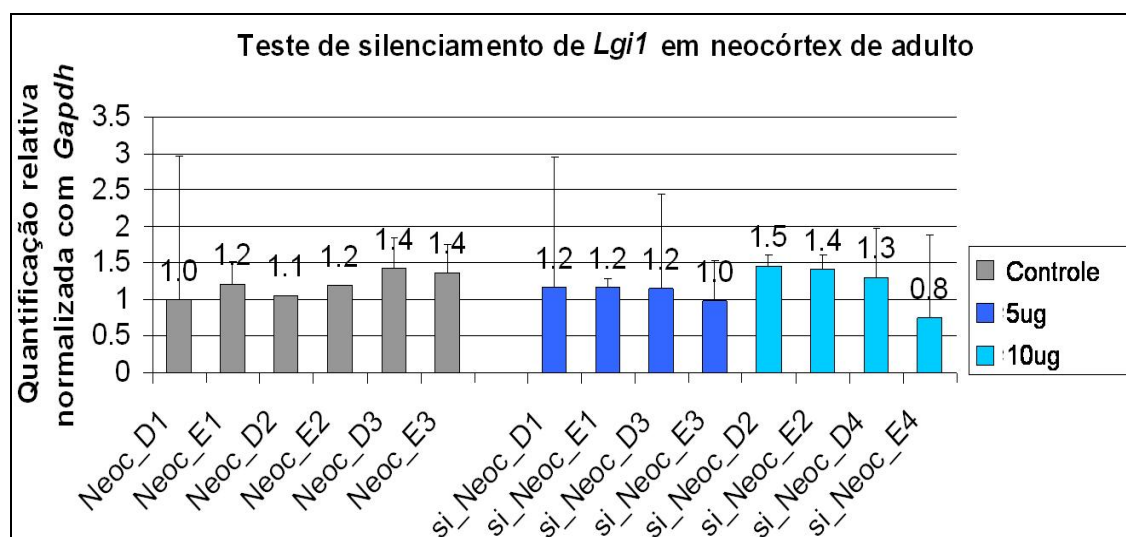


Figura 34: Quantificação relativa de *Lgi1* em animais controle e em quatro camundongos cujo neocórtex esquerdo recebeu si_Lgi1 (5 ou 10µg) 24 horas antes de sua retirada.

Para confirmar se estava havendo uma correlação entre o local injetado e a porção de neocórtex retirada, injetamos 1µL de azul (tinta Parker) em dois animais com as coordenadas para córtex auditivo e coletamos o material em seguida. Observamos o corante na região de interesse, porém aparecendo em maior quantidade difundido em regiões mais internas, como o hipocampo, alcançando também o sistema ventricular (Figura 35).



Figura 35: Localização da injeção com as coordenadas para córtex auditivo, mostrando uma difusão do corante em outras regiões além do neocórtex .

Canulação dos animais

Inicialmente, realizamos a canulação em terceiro ventrículo (Tabela 5) de dois animais apenas para nos certificarmos do posicionamento correto da cânula. No dia seguinte a canulação, injetamos 0,5 μ L de azul (tinta Parker) e retiramos o cérebro em seguida, observando uma distribuição do corante no sistema ventricular, o que confirmou a localização da cânula em ventrículo (Figura 36).

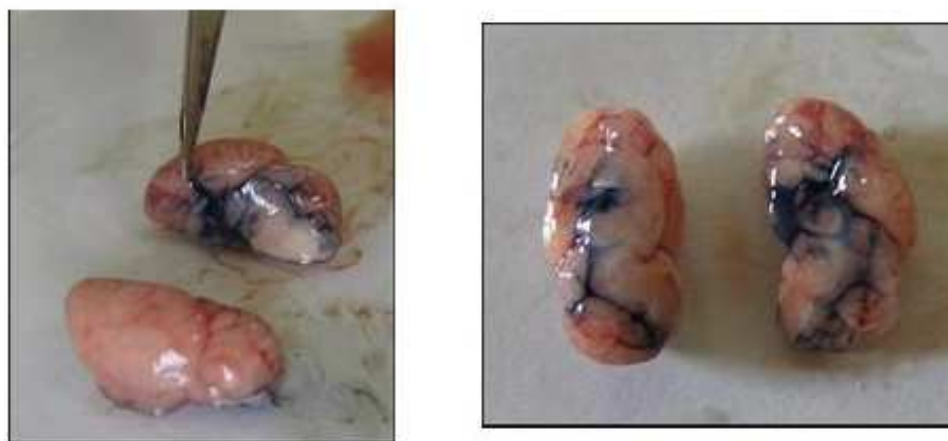


Figura 36: Confirmação do posicionamento da cânula em terceiro ventrículo. Corte sagital do cérebro após injeção de azul na cânula.

Para as injeções repetidas de siRNA, nós canulamos quatro camundongos em terceiro ventrículo e após quatro dias iniciamos as injeções. Foram cinco dias de experimento, sendo realizadas duas injeções por dia, às 8h30 e às 17h30, com 2 μ L de volume cada. Utilizamos dois animais para a injeção de si_Lgi1 (10 μ g) associado à

emulsão lipídica (1:1) e dois como controles: um para a injeção apenas do veículo (emulsão lipídica + PBS) e o outro sem injeção. As reações de PCR em tempo real não demonstraram silenciamento gênico nos animais tratados com si_Lgi1.

No segundo experimento de canulação, testamos outras duas moléculas além da si_Lgi1: si_Lgi1 *in vitro* e si_Stealth. O experimento foi desenhado para injetarmos cada uma das três moléculas em dois animais, durante três dias, sendo duas injeções por dia, às 9h30 e às 17h30. Optamos por fazer a canulação em hipocampo (Tabela 5) a fim de restringirmos a área a ser coletada após as injeções. A massa de molécula obtida pela transcrição *in vitro* foi pequena, portanto, tivemos que testar uma quantidade pequena de todas as moléculas, aproximadamente 12ng/injeção (1pmol/inj) (siRNA + emulsão lipídica, 1:2), em 2µL de injeção. Nós canulamos seis camundongos, porém utilizando apenas cinco, pois um animal estava com a cânula solta, sendo usado como controle sem injeção. No segundo dia de experimento, tivemos que sacrificar um dos animais do grupo do si_Stealth, pois o capacete (armação de resina que sustenta a cânula) havia caído. Desta forma, finalizamos o experimento apenas com quatro camundongos: 1 si_Lgi1, 2 si_Lgi1 *in vitro* e 1 si_Stealth. Após a última injeção dos siRNAs, sacrificamos os animais e antes da remoção do hipocampo, injetamos 0,5µL de corante na cânula para nos certificar que a cânula estava no local de interesse. As amostras de RNA provenientes dos hemisférios esquerdos de um dos animais si_Lgi1 *in vitro* e de um si_Stealth apareceram degradadas ao final da extração (Figura 37). Apesar disso, utilizamos todas as amostras para a reação de PCR em tempo real, que resultou na redução da expressão de *Lgi1* nas amostras com RNA degradado (Figura 38). O outro animal tratado com si_Lgi1 *in vitro* não apresentou silenciamento, indicando que a diminuição de expressão encontrada é, muito provavelmente, artefato devido à degradação da amostra (Figura 38).

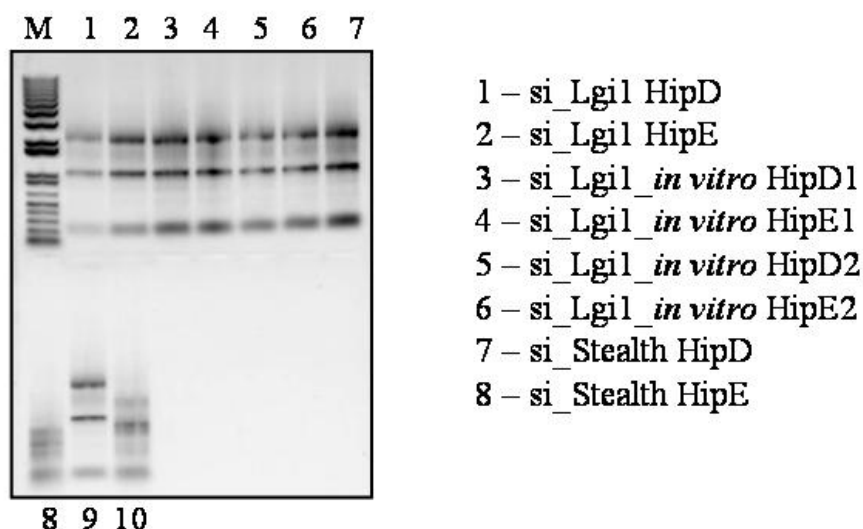


Figura 37: Verificação da qualidade da extração de RNA em gel de agarose 1%. Foi aplicado 1µL de RNA. Notar que amostras 8 e 10 estão degradadas. M: marcador de peso molecular de 1Kb; HipD: hipocampo direito; HipE: hipocampo esquerdo.

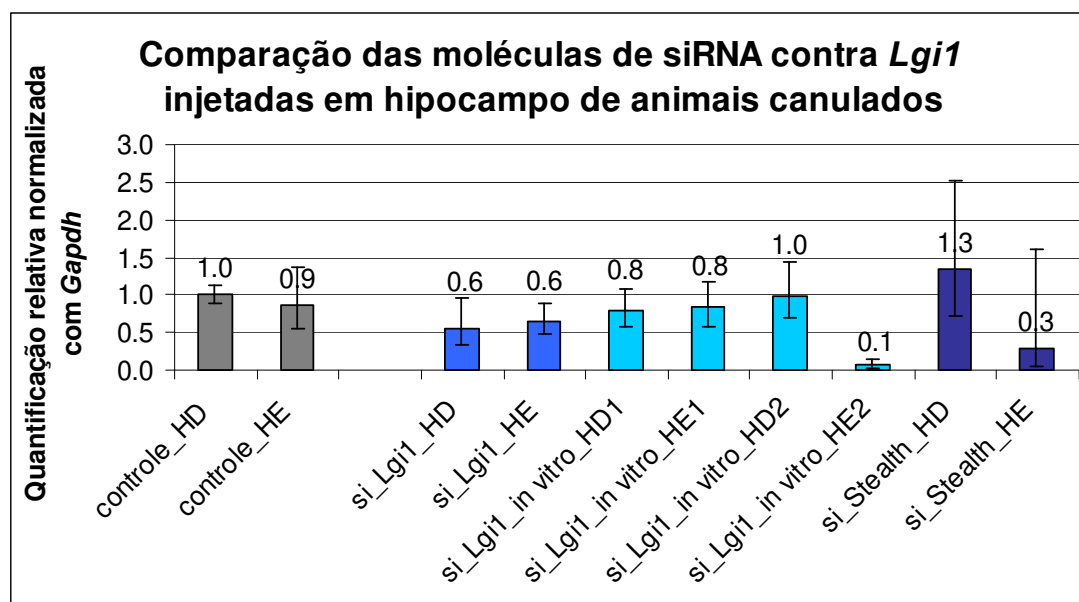


Figura 38: Quantificação relativa da expressão do gene *Lgi1* em hipocampo dos camundongos tratados com as três moléculas de siRNA. Notar que as amostras “*in vitro*_HE2” e “Stealth_HE” que estão diminuídas, partiram de um RNA degradado, não sendo confiáveis. Barras verticais indicam RQmin e RQmax. HD: hipocampo direito; HE: hipocampo esquerdo.

Eletroporação local

Para testarmos a técnica de eletroporação local, injetamos 5µl/6min de si_Stealth no hipocampo esquerdo de seis camundongos com 10 semanas de idade e após 30 minutos procedemos a eletroporação utilizando os eletrodos-agulha. A eletroporação consistiu de dois pulsos, como descrito por Akaneya et al. (2005), um pulso de alta voltagem e curta duração (100V e 1ms) para a abertura de poros na membrana celular, seguido de um pulso de baixa voltagem e longa duração (5V e 2s) para a entrada das moléculas. Segundo o trabalho original onde a técnica é apresentada, é descrito um intervalo de 10ms entre os dois pulsos, porém nosso eletroporador não tem a opção de salvar dois pulsos diferentes em um mesmo programa, desta forma, trocávamos de programa para alterar o pulso, o que levava aproximadamente 10s. Em dois animais, injetamos aproximadamente 100ng (7,5pmol) de siRNA, retirando os hipocampus com 8 e 27 horas após a injeção, e em quatro animais injetamos cerca de 1µg (75pmol), retirando os hipocampus com 1 e 24 horas após a injeção (hpi). A análise de quantificação relativa mostrou uma redução da expressão gênica no hipocampo esquerdo de aproximadamente 50%, quando comparado ao direito do mesmo animal (HipE4), tratado com 1µg de siRNA e cujo hipocampo foi removido após 24 horas (Figura 39). As outras amostras não apresentaram nenhuma diminuição significativa (Figura 39).

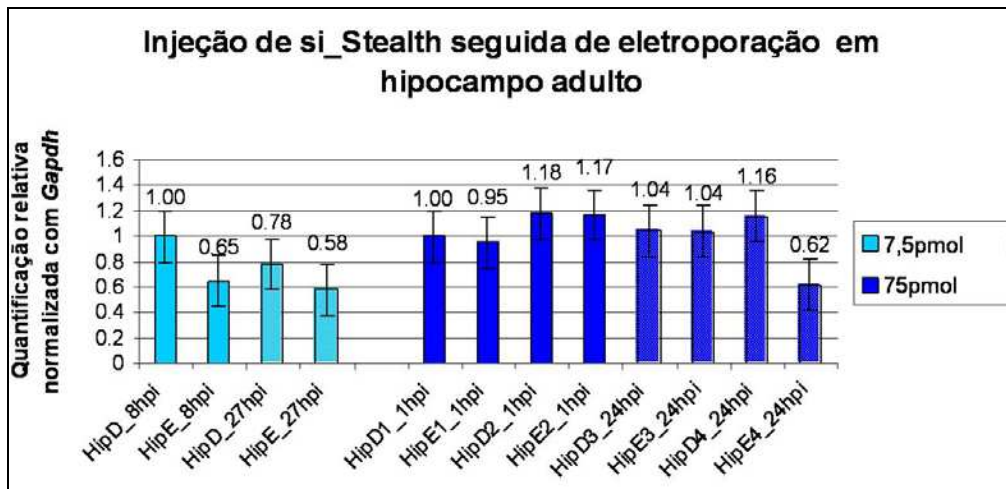


Figura 39: Expressão do gene *Lgi1* em animais que receberam injeção de 100ng (7,5pmol) ou 1µg (75pmol) de si_Stealth, seguida de eletroporação local, com diferentes tempos de retirada do hipocampo. Barras verticais indicam RQmin e RQmax. HipD: hipocampo direito; HipE: hipocampo esquerdo; hpi: horas pós-injeção.

Para confirmar esse resultado positivo de silenciamento, repetimos o experimento com 1µg (75pmol) de siRNA em 10 animais com oito semanas de idade, sendo dois desses animais utilizados como controle (injeção de siRNA irrelevante). Empregamos os mesmos parâmetros do primeiro experimento: coordenadas, volume e taxa de injeção, voltagem e duração dos pulsos. No entanto, a fim de diminuir o intervalo entre os pulsos, utilizamos dois eletroporadores para oito camundongos (Figura 40), porém esse outro equipamento, apesar de ser parecido com o nosso (mesma marca e modelo), não alcançava uma duração de 1ms, por isso o primeiro pulso foi de 100V e 600µs (tempo máximo permitido), desta forma conseguimos reduzir o intervalo entre os pulsos de dez para dois segundos. Para garantir uma injeção constante e também uniforme entre os animais, utilizamos uma bomba de infusão (Insight®) programada para uma taxa de injeção de 0,85µL/min, o que resultou em aproximadamente seis minutos de injeção (mesmo tempo do primeiro experimento). Retiramos os hipocampus 24 e 48 horas após a injeção conforme detalhado na Figura 40.

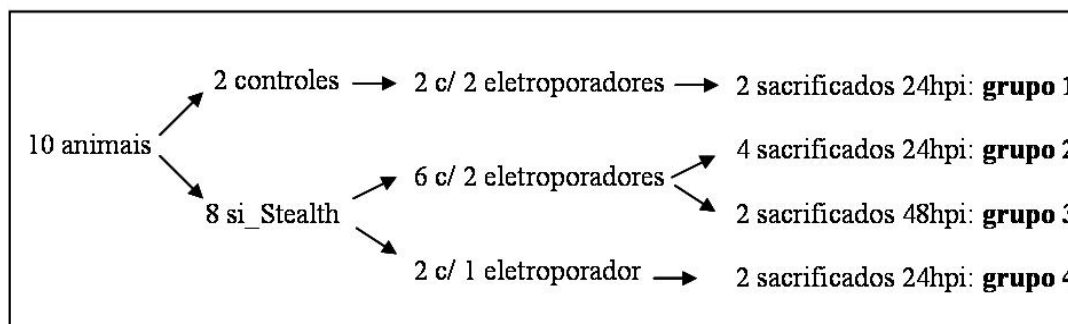


Figura 40: Esquema dos grupos de animais utilizados para o segundo experimento de injeção de si_Stealth seguido de eletroporação.

As análises de PCR em tempo real confirmaram o silenciamento do gene *Lgi1* em três camundongos do grupo 2: animais 3, 4 e 9 apresentando redução da expressão gênica do hipocampo esquerdo em aproximadamente 30%, 25% e 45%, respectivamente, quando comparado ao hipocampo direito do mesmo animal (Figura 41). Além disso, foi observado silenciamento de quase 50% em uma das amostras analisadas 48 horas após a injeção (Figura 41). Porém, ao mesmo tempo observamos uma redução de *Lgi1* em um dos controles e um aumento de 25% em uma das amostras tratadas com siRNA do grupo 3 (Figura 41). Não foi observado nenhum silenciamento nos animais eletroporados com um equipamento.

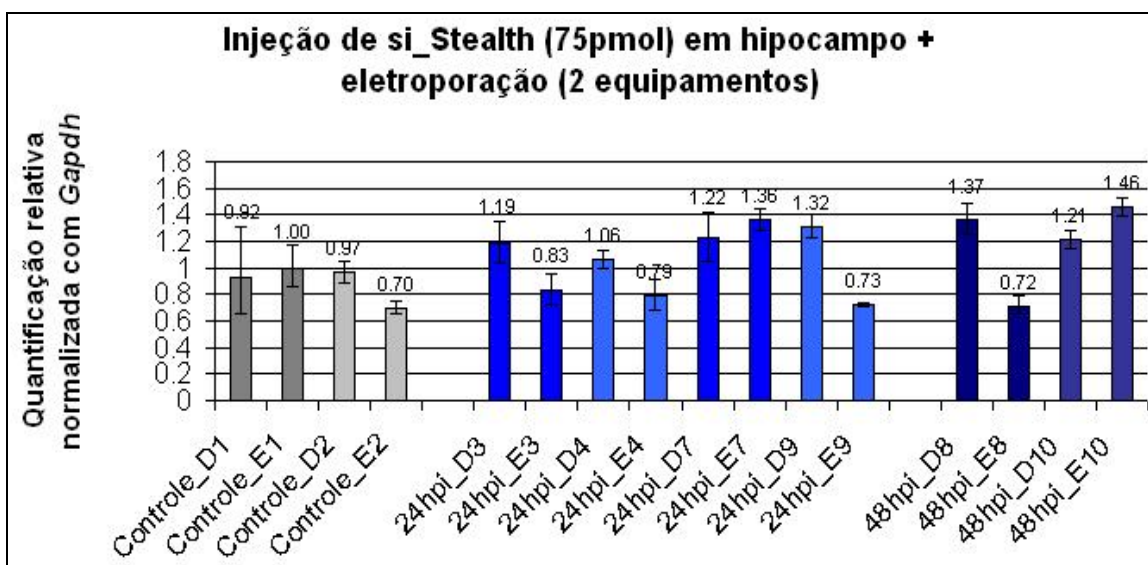


Figura 41: Expressão do gene *Lgi1* em hipocampus tratados com 1µg de si_Stealth, seguidos de eletroporação local, utilizando dois eletroporadores. Barras verticais indicam RQmin e RQmax. D: hipocampo direito; E: hipocampo esquerdo.

Adicionalmente, nós testamos a injeção do oligo si_ *Lgi1* em três camundongos, com retirada do encéfalo 24 hpi e encontramos redução de 20% da expressão do gene *Lgi1* em apenas um animal, quando comparado o hipocampo esquerdo que recebeu a injeção e o contralateral do mesmo animal (Figura 42). Como controle negativo, injetamos si_irrelevante em três animais e um animal não fizemos injeção, apenas aplicamos a eletroporação. Não encontramos diferença de expressão entre os hipocampus do camundongo apenas eletroporado e obtivemos uma diminuição de *Lgi1* no hipocampo esquerdo de um dos animais com si_irrelevante (Figura 42).

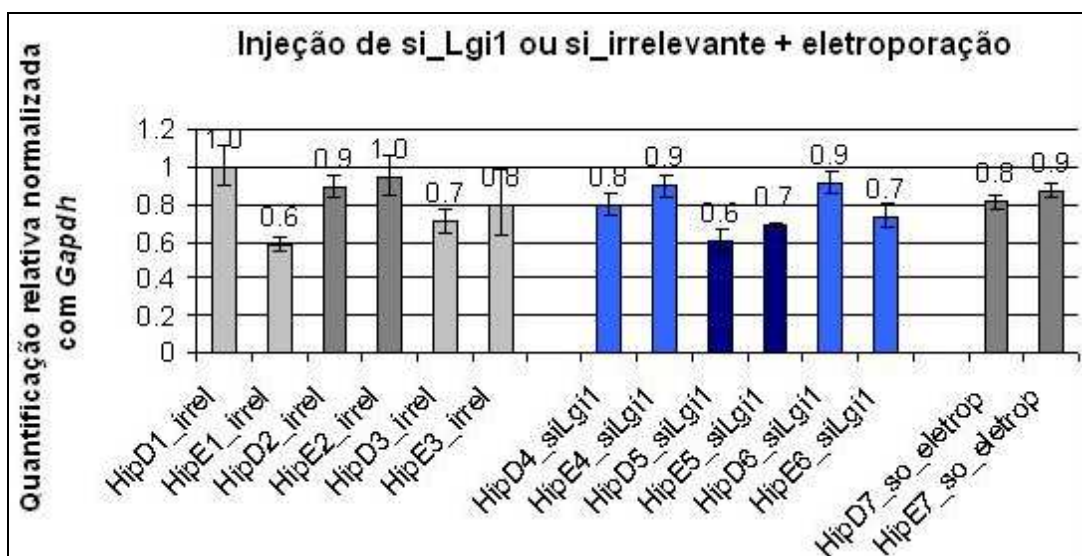


Figura 42: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em hipocampus de animais que receberam 1µg (75pmol) de si_*Lgi1* ou si_irrelevante (irrel), seguido de eletroporação local, e de um animal que apenas recebeu a eletroporação (so_eletrop). Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Finalmente, nós fizemos uma curva de tempo de silenciamento, utilizando um número maior de animais por grupo, com a molécula si_Stealth acompanhada de eletroporação, já que esta havia se mostrado a mais eficiente na redução da expressão do gene *Lgi1* nos experimentos até este momento. Nós injetamos 1µg em hipocampo de vinte e cinco camundongos com nove semanas de idade e coletamos os encéfalos nos seguintes períodos após a injeção: 12 e 24 horas, 3, 5 e 7 dias. Doze horas após a injeção do si_Stealth, obtivemos silenciamento de 67% e 54% do gene *Lgi1* nos dois primeiros animais operados, porém esses animais receberam um massa maior de siRNA, aproximadamente 4 e 2µg (250 e 128pmol), respectivamente. Os outros três animais não apresentaram diferença de expressão entre os hipocampus. Nos animais que foram sacrificados após 24 horas, encontramos redução de 30% na expressão de *Lgi1* em um animal, aumento de expressão em dois animais de 39 e 91% e nenhuma diferença nos outros dois (Figura 43).

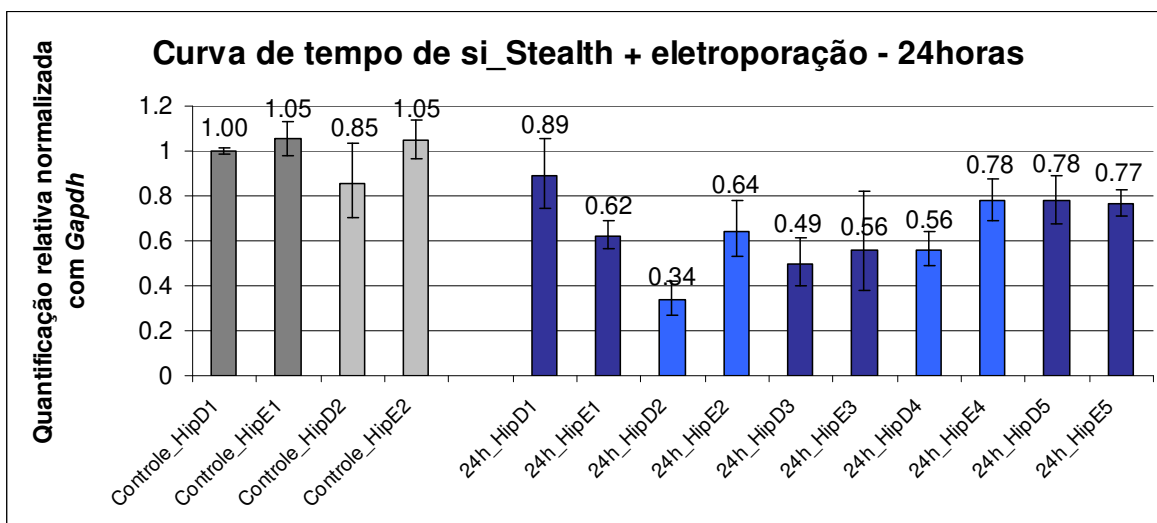


Figura 43: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em hipocampus de animais que receberam 1µg (75pmol) de si_Stealth seguido de eletroporação local e foram sacrificados 24 horas após a injeção. Animais com a mesma idade dos experimentais porém sem injeção estão indicados como controles. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Além disso, quatro dos cinco camundongos sacrificados três dias após a injeção apresentaram silenciamento de 23 até 65% no hipocampo esquerdo quando comparado ao direito (Figura 44).

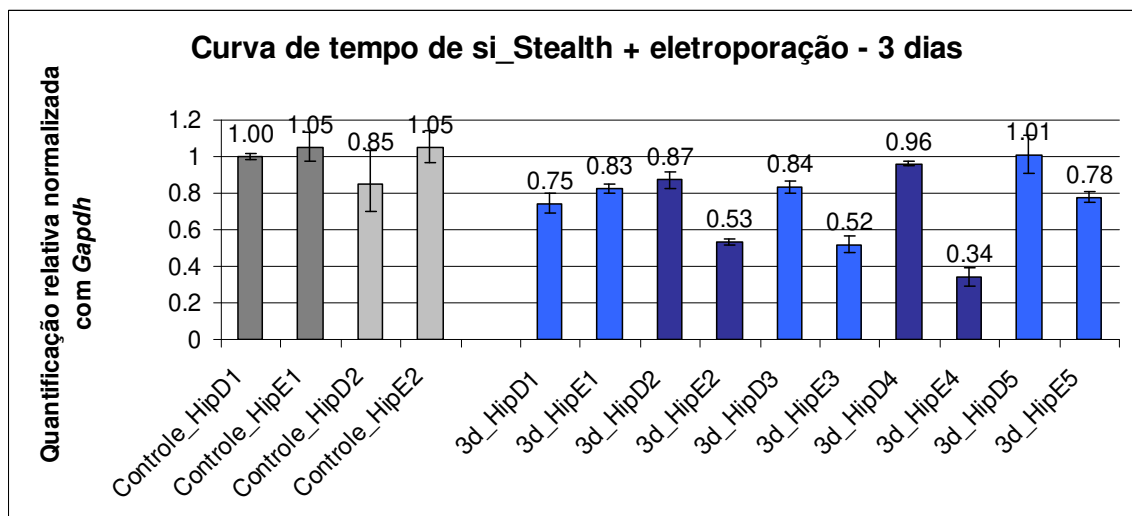


Figura 44: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em hipocampus de animais que receberam 1µg (75pmol) de si_Stealth seguido de eletroporação local e foram sacrificados 3 dias após a injeção. Dois animais com a idade do grupo experimental, porém sem injeção foram usados como controles. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Três amostras coletadas cinco dias após a injeção apresentaram redução de 7%, 19% e 41% de *Lgi1* e uma amostra encontrou-se aumentada 35%. Sete dias após a injeção resultou em dois animais que apresentaram silenciamento no hipocampo esquerdo (17% e 30%) e dois com aumento de expressão (30% e 41%). A amostra referente ao hipocampo esquerdo do animal 2 resultou em pouco RNA, em consequência a reação de PCR em tempo real não resultou em boa amplificação, sendo excluída das análises.

Os testes de Wilcoxon, aplicados para cada tempo estudado, não resultaram em diferença de expressão estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os hipocampus direito e esquerdo, em todos os cinco grupos, incluindo o tempo de três dias ($p = 0,0796$).

Analisando os dados de expressão relativa de RNA, nos cinco tempos estudados, utilizando a média da expressão dos hipocampus esquerdos, temos um aumento da expressão de *Lgi1* após 24 horas, seguido de uma redução de 30% observada no terceiro dia após o tratamento, tendendo a um aumento de expressão nos dias seguintes (Figura 45).

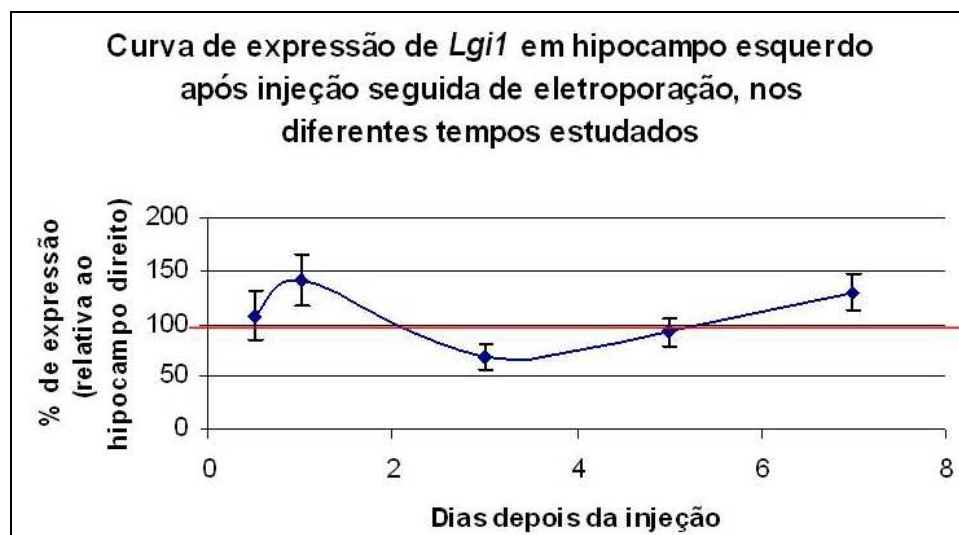


Figura 45: Gráfico de dispersão das médias da expressão relativa dos hipocampus esquerdos nos diferentes tempos estudados (12h $n = 3$; 24h, 3 e 5 dias $n = 5$; 7 dias $n = 4$). Linha vermelha destaca valor referente ao calibrador (hipocampus direitos dos animais). Barras verticais indicam erro padrão.

Quando analisamos as linhas de tendências referentes aos dados dos hipocampus direito e esquerdo, dos 22 animais em conjunto, como dois grupos, observamos uma ligeira diminuição da expressão dos hipocampus esquerdos (Figura 46), porém estatisticamente

não significativa (ANOVA pareada, $p = 0.3198$). Excluímos das análises os dois animais do grupo de 12 horas que receberam uma massa maior de siRNA e também foi excluído o animal 2 do grupo de sete dias, cuja extração de RNA não resultou em bom material.

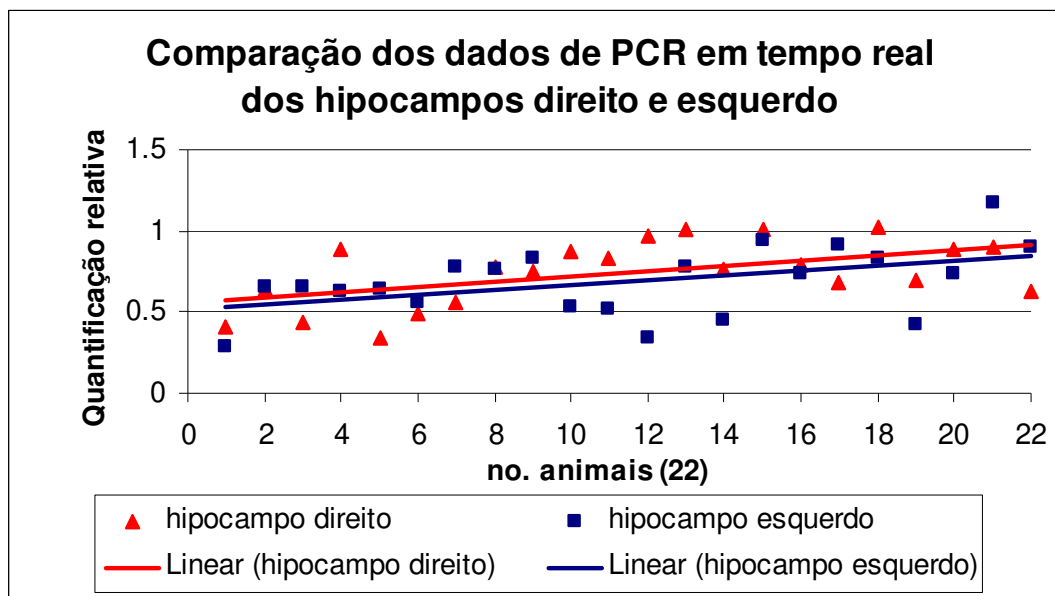


Figura 46: Diagrama de dispersão dos valores de expressão, por PCR em tempo real, dos hipocampus tratados (esquerdos) e não tratados (direitos) em conjunto. O calibrador utilizado para essa análise foi o hemisfério direito de um animal sem tratamento. n°

Para verificação da proteína Lgi1, foram realizados experimentos de western blot (Figura 47) com amostras dos hipocampus direito e esquerdo de 20 dos 25 animais que receberam si_Stealth seguido de eletroporação local, como descrito da Tabela abaixo (Tabela 11).

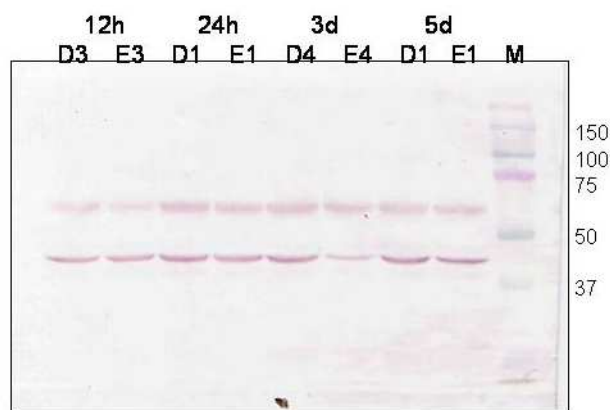


Figura 47: Western blot mostrando a expressão da proteína Lgi1 (~60KDa) em algumas amostras da curva de tempo para o método de eletroporação local. Foram aplicados 30µg de extrato protéico em gel SDS-PAGE 10%. A β -actina (41,7KDa) foi utilizada como controle interno. D: hipocampo direito; E: hipocampo esquerdo; M: Marcador Kaleidoscope (Bio-Rad).

Tabela 11: Amostras testadas por western blot para verificação de redução da proteína Lgi1, nos experimentos de silenciamento por eletroporação local.

12h	24h	3 dias	5 dias	7dias
12h_1	24h_1	3d_1	5d_1	7d_1
12h_2	24h_2	3d_2	5d_2	7d_2
12h_3	24h_3	3d_3	5d_3	7d_3
12h_4		3d_4	5d_4	7d_5
12h_5				

Os resultados de western blot corroboram a quantificação por PCR em tempo real na maioria das amostras (Figura 48), porém, em algumas, a quantificação do RNA demonstrou silenciamento de *Lgi1* e a proteína apareceu aumentada ou não apresentou diferença entre os hipocampus (24h_1, 3d_2, 3d_4, 5d_1, 7d_3), outras a PCR em tempo real não apresentou diferenças entre os hipocampus e o western blot mostrou uma diminuição de Lgi1 (24h_3).

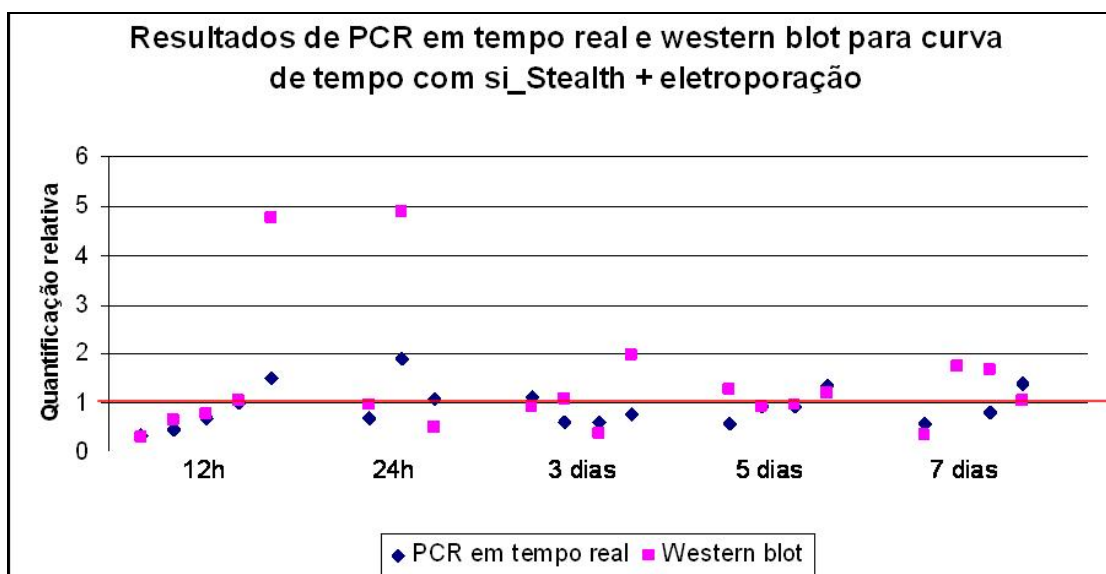


Figura 48: Comparação entre as quantificações relativas por PCR em tempo real e os resultados semi-quantitativos de western blot de hipocampus tratados com 1µg (75pmol) de si_Stealth (exceto animais 1 e 2 de 12h), seguidos de eletroporação local, nos vários tempos analisados. Os valores aqui representados são referentes aos hipocampus esquerdos, levando em consideração os direitos como calibradores (valor 1) na comparação. Portanto, amostras abaixo de 1 (linha vermelha) são hipocampus com *Lgi1* silenciados.

Minibombas osmóticas

Oito camundongos entre seis e sete semanas de idade receberam a minibomba osmótica e outros dois animais com o mesmo tempo de vida que os experimentais, porém sem cirurgia, foram usados como controles (Tabela 12).

Tabela 12: Detalhamento dos experimentos com o uso de minibombas osmóticas.

Nº do experimento	Bomba	Nº Total	Nº /trat	Molécula	Massa	Coleta do encéfalo (dias após cirurgia)
1	7 dias	1 fêmea	1	si_Stealth	24µg	8
2	7 dias	4 fêmeas	1	si_Stealth	24µg	8
			1	si_irrelevante		
3	14 dias	3 fêmeas	2	si_Stealth	18µg	11
			1	não operado	24µg	14
4	14 dias	2 fêmeas	1	si_Lgi1	840µg	14
			1	não operado		

Os experimentos realizados com si_Stealth e bombas de uma ou duas semanas não resultaram em diminuição da expressão do gene *Lgi1*. Um animal com a minibomba de uma semana apresentou uma menor expressão no hemisfério esquerdo, quando comparado com seu hemisfério direito, porém como fizemos a injeção em 3º ventrículo, o silenciamento deveria ser global, em relação aos animais controles (Figura 49).

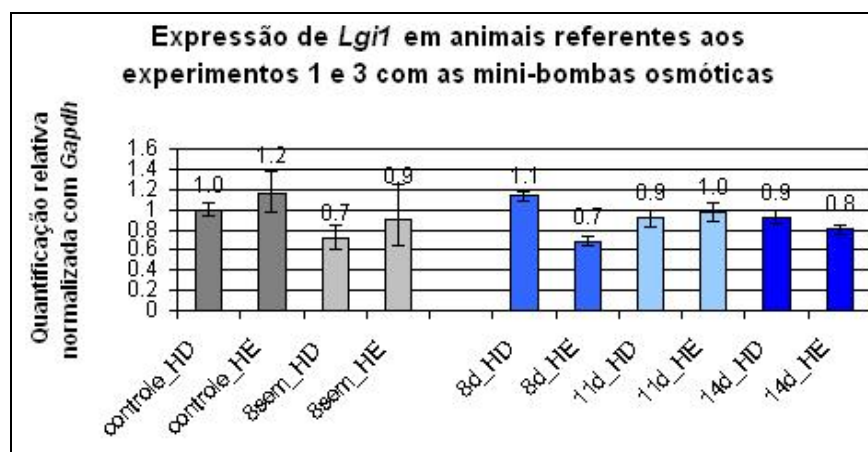


Figura 49: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em animais que receberam si_Stealth continuamente por 8, 11 ou 14 dias. Um animal com a idade do grupo experimental, porém sem injeção, e também os animais utilizados para a curva de expressão em idade semelhante (aqui analisados em conjunto - 8sem) foram usados como controles. Barras verticais indicam RQmin e RQmax. HD: hemisfério direito; HE: hemisfério esquerdo.

A molécula de si_*Lgi1* inoculada por duas semanas em um camundongo também não resultou em silenciamento gênico.

Injeção veia caudal

Para os experimentos utilizando a via periférica através de injeções pela veia caudal, as moléculas interferentes foram complexadas ao peptídeo RVG na proporção molar de 10:1 (RVG:siRNA). Além disso, introduzimos um controle adicional, um controle positivo utilizando uma molécula já validada que comprovadamente silencia em cultura celular o gene endógeno *Gapdh* de camundongo. Para comprovar essa complexação, nós testamos três proporções diferentes, como demonstrado na Figura 50.

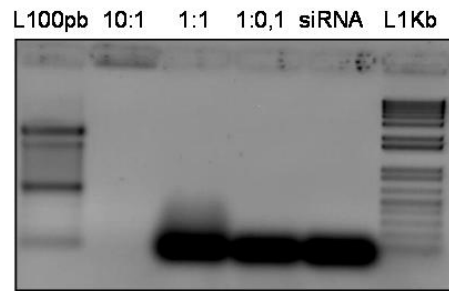


Figura 50: Teste de complexação do peptídeo com 100pmol de si_Stealth, utilizando três proporções de RVG:siRNA. Notar que na proporção 10:1, amostra ficou estagnada no pocinho, comprovando complexo RVG:si_Stealth. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

Nós realizamos quatro experimentos utilizando 50µg (4nmol) de diferentes moléculas de siRNA e aproximadamente 5µg (0,4nmol) de esiRNA associadas ao peptídeo, em camundongos adultos (Tabela 13).

Tabela 13: Detalhamento dos experimentos em camundongos com o peptídeo RVG. Utilizamos 50µg dos diferentes siRNAs e 5µg de esiRNA.

Nº do experimento	Nº de animais	Idade	Tratamento	Nº de injeções de 8h/8h	Coleta do encéfalo (após 1ª injeção)
1	9 fêmeas	6 sem	3 PBS	3 injeções	72 horas
			3 si_Gapdh		
			3 si_Stealth		
2	10 fêmeas	6 sem	2 glicose	3 injeções	72 horas
			2 si_Gapdh		
			3 si_Lgi1		
			3 si_Lgildna		
3	10 fêmeas	6 sem	3 glicose	3 injeções	72 horas
			3 si_Amb		
			2 si_Lgi1_b		
			2 esiRNA		
4	14 fêmeas	8 sem	5 glicose	2 injeções	24 horas
			3 si_Amb		
			2 si_Lgi1		
			2 si_Stealth		
			2 esiRNA		

No experimento número 1, a primeira injeção de si_Gapdh (usado como controle positivo) foi incompleta nos animais 1 e 2, pois o acesso venoso não foi fácil e, portanto, só conseguimos injetar 100µL (dos 200µL). O mesmo aconteceu com a terceira injeção de PBS nos controles e com o animal 1 injetado com si_Gapdh; os outros dois animais de si_Gapdh e o animal 1 de si_Stealth (molécula experimental) receberam todo o volume da injeção fora da veia, pela via subcutânea. O animal 3 do grupo de si_Stealth foi encontrado morto quando fomos aplicar a terceira dose, provavelmente por embolia, pois vimos uma bolha de ar ser injetada durante a segunda dose. Desta forma, aplicamos a dose que já estava pronta de RVG:siRNA via intraperitoneal em um camundongo, mas não obtivemos alteração na expressão de *Lgi1*. Também não encontramos silenciamento nos outros animais tratados com Si_Stealth, quando comparados aos que receberam apenas PBS (Figura 51). Já o tratamento com si_Gapdh resultou em um animal com aproximadamente 50% de redução do gene *Gapdh* (Figuras 52 e 55). O controle PBS 3 não foi incluído nessa análise por falta de cDNA desta amostra.

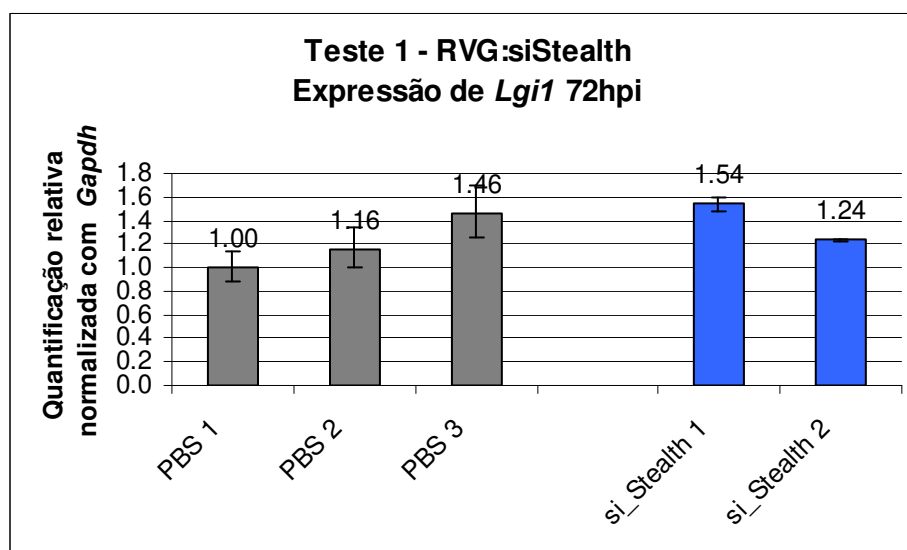


Figura 51: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em encéfalo de animais que receberam três doses de 50µg (4nmol) de si_Stealth complexado ao RVG ou PBS, de 8 em 8 horas, e foram sacrificados 3 dias após a injeção. Animal 3 tratado morreu durante o procedimento. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

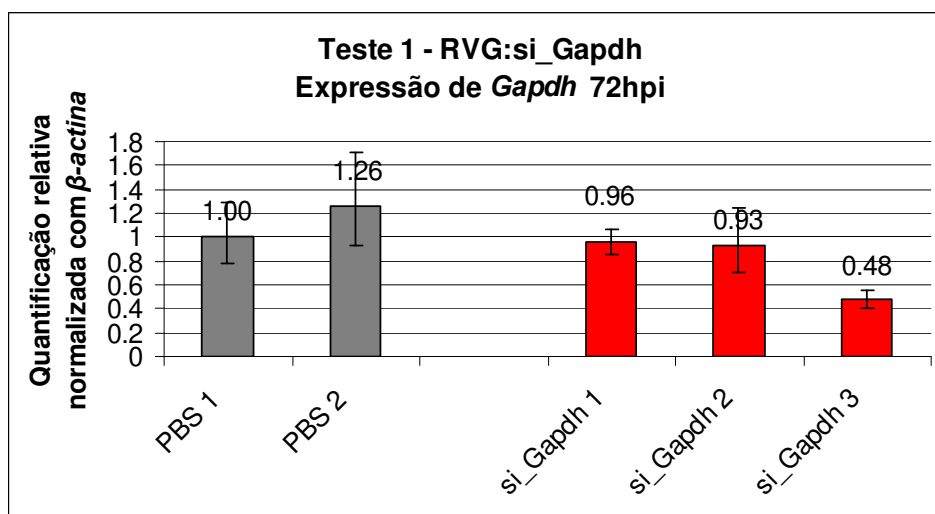


Figura 52: Quantificação relativa do gene *Gapdh* em encéfalo de animais que receberam três doses de 50 μ g (4nmol) de si_Gapdh complexado ao RVG ou PBS, de 8 em 8 horas, e foram sacrificados 72 horas após a injeção. O controle 3 não foi incluído nessa análise por falta de amostra. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Repetimos o experimento testando outras duas moléculas contra *Lgi1* e tivemos problemas com o acesso venoso durante a primeira injeção apenas com o animal 1 do grupo de si_Lgi1, que recebeu 160 μ L do siRNA. Na segunda dose, receberam 150 μ L os animais número 2 dos grupos de si_Gapdh e de si_Lgi1. Na última injeção, foi injetado novamente menor volume, 180 μ L, de si_Gapdh no animal 2. O animal 3 do grupo si_Lgi1_dna recebeu 160 μ L de injeção intravenosa.

A quantificação relativa do gene *Lgi1* não demonstrou silenciamento dos animais tratados, quando comparados aos dois animais que receberam apenas glicose 5% (Figura 53). Entretanto, os experimentos com si_Gapdh resultaram na redução do gene *Gapdh* em um dos animais (Figura 54 e 55).

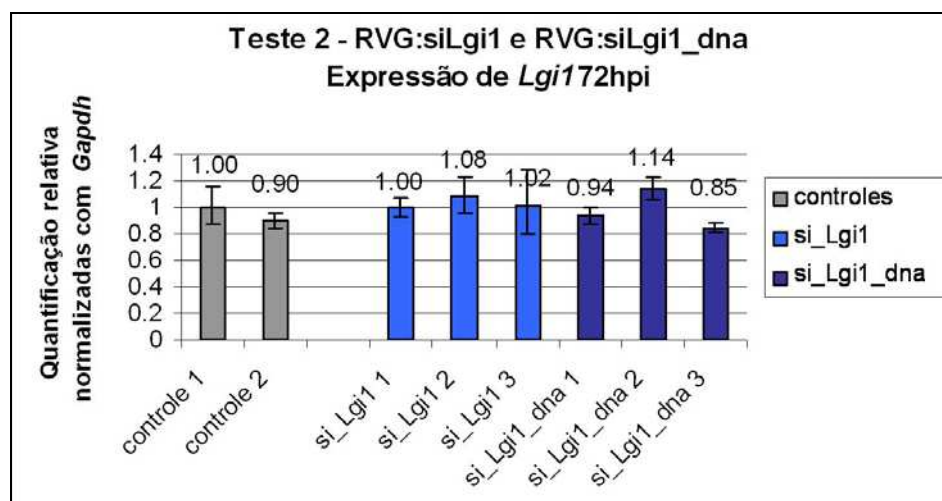


Figura 53: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em animais que receberam, de 8 em 8 horas, três doses de 50µg (4nmol) de si_Lgi1 ou si_Lgi1_dna complexado ao RVG e foram sacrificados 72 horas após a injeção. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Resumindo os dados dos testes 1 e 2 com si_Gapdh e utilizando todos os controles em conjunto, como uma única amostra, vemos uma tendência de silenciamento em todos os animais tratados, tendo dois deles uma redução significativa do gene *Gapdh* (controle positivo), sem a interposição dos desvios (valores de RQ máximo e mínimo) (Figura 55). O teste Mann-Whitney, analisando os quatro controles separadamente, encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados e não tratados ($p = 0,0275$).

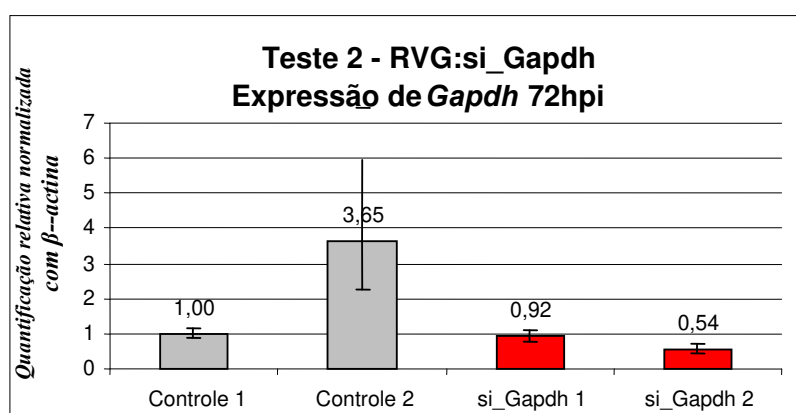


Figura 54: Quantificação relativa do gene *Gapdh* de quatro animais: dois tratados com 50µg (4nmol) de si_Gapdh complexado ao RVG (3 injeções de 8/8h) e dois não tratados. Análise realizada 72 horas após a injeção. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

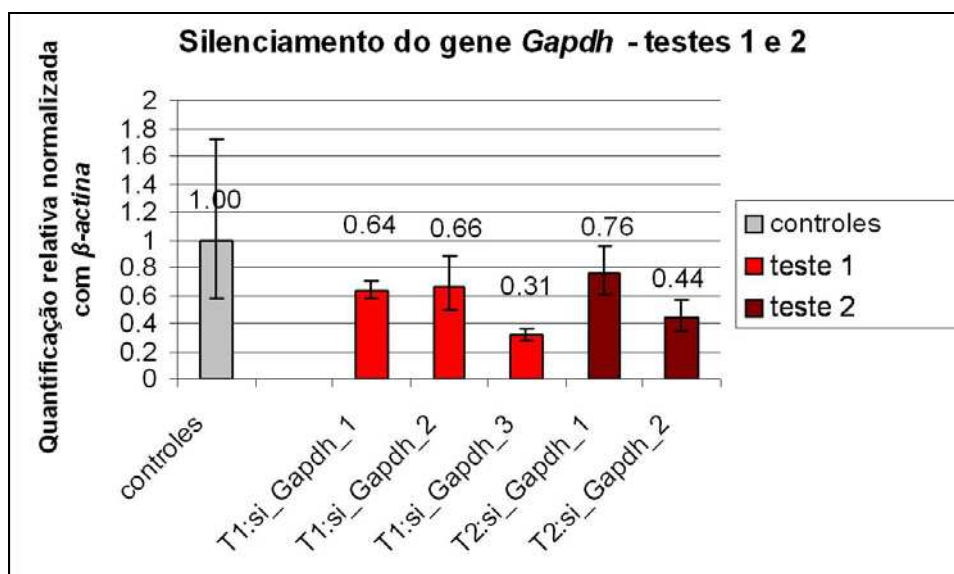


Figura 55: Comparação da expressão do gene *Gapdh* entre os dois testes realizados com RVG:si_Gapdh. Os controles estão todos agrupados. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

No terceiro experimento com o peptídeo, além de testarmos duas moléculas de siRNA, testamos também o esiRNA contra *Lgi1*. Na Tabela 14 estão descritos os volumes de fato injetados durante o procedimento. Os volumes injetados nos animais 1 e 2 do grupo de si_Amb estão indeterminados porque, apesar da injeção ter ocorrido bem, durante o procedimento houve desconexão do cateter que liga a agulha gengival à seringa, perdendo umas gotículas da mistura que não foi possível quantificar (Tabela 14).

Tabela 14: Teste 3 - Descrição dos volumes aplicados nas três injeções do terceiro teste de RVG:siRNA.

Tratamento	Animal	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção
Glicose	1	OK	180 μ L	OK
	2	OK	180 μ L sc*	OK
	3	OK	OK	OK
si_Amb	1	<200 μ L	190 μ L	190 μ L
	2	<200 μ L	190 μ L	OK
	3	OK	OK	OK
si_Lgi1_b	1	190 μ L	110 μ L	180 μ L
	2	OK	OK	OK
esiRNA	1	160 μ L	170 μ L	100 μ L
	2	150 μ L	OK	100 μ L

*sc: subcutânea

A quantificação por PCR em tempo real não mostrou silenciamento nos animais tratados com si_Amb e si_Lgi1_b, porém um dos animais tratados com esiRNA apresentou uma redução de 32%, quando comparado apenas ao controle 3. Como houve uma grande variação entre os controles, o silenciamento não foi significativo (Figura 56).

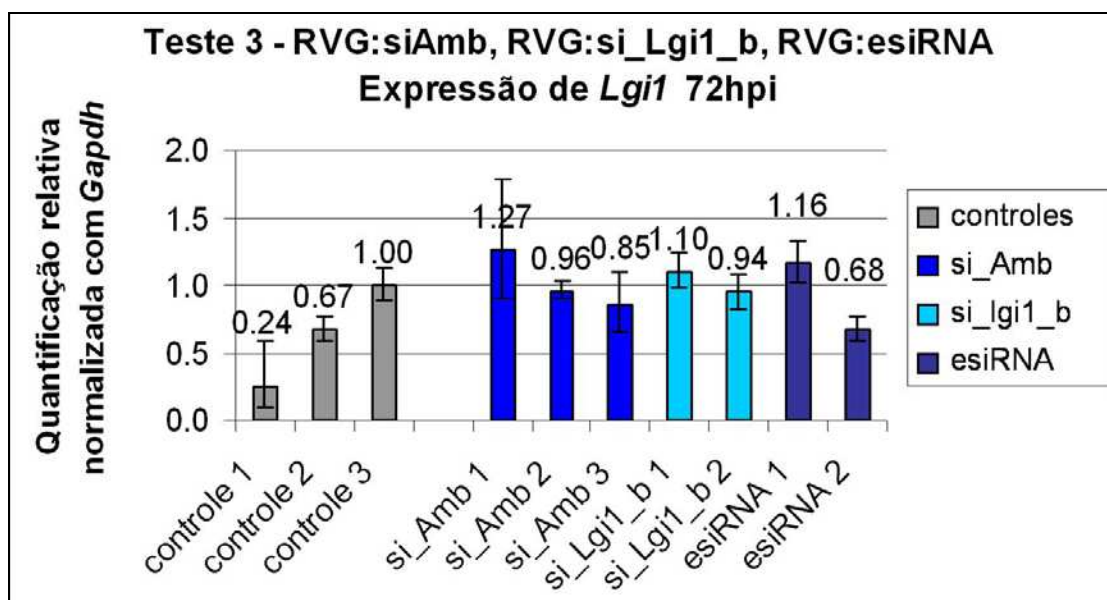


Figura 56: Quantificação relativa de *Lgi1*, após 72 horas da primeira injeção, dos animais referentes ao terceiro teste com RVG. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

O último experimento com RVG em camundongos foi realizado com duas doses e com muitas intercorrências na segunda injeção. Apenas os animais si_Amb 3, si_Lgi1 1 e si_Stealth 2 receberam duas injeções de 200µL. Não foi observado silenciamento de *Lgi1* em nenhum dos quatro tratamentos utilizados, quando comparados à expressão nos cinco controles, após 24 horas da primeira injeção (Figura 57).

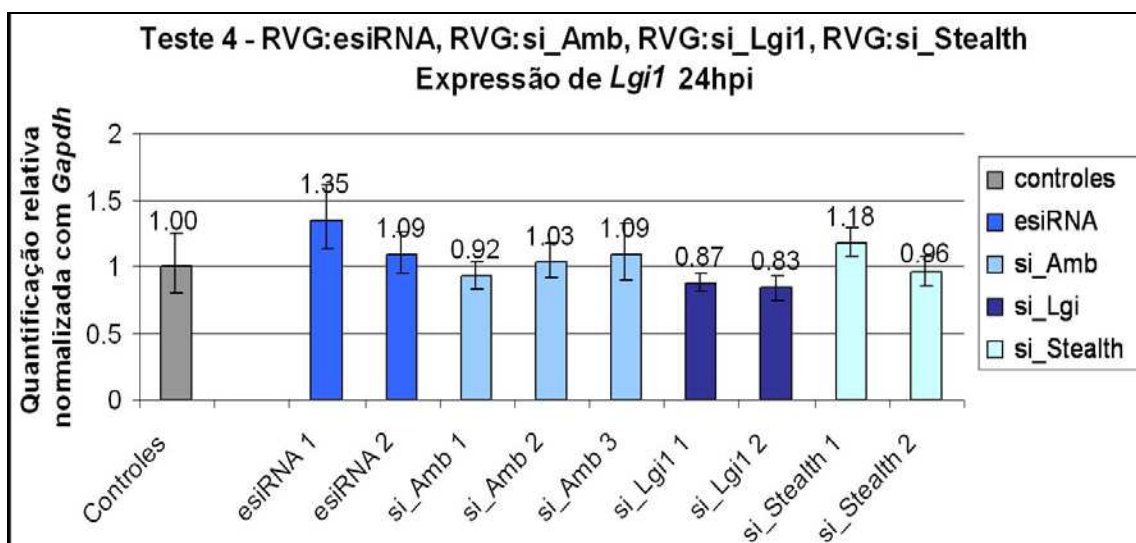


Figura 57: Quantificação relativa de *Lgi1*, após 24horas, em animais tratados com duas injeções apenas de glicose ou de esiRNA, si_Amb, si_Lgi1, si_Stealth. Os cinco controles testados estão analisados em conjunto. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

O experimento de injeção veia caudal em ratos foi realizado com duas injeções de oito em oito horas, utilizando 25µg (2nmol) de si_Amb por injeção, em dois animais. Não houve qualquer dificuldade técnica para as injeções. Após 48 horas da primeira injeção, a expressão de *Lgi1* se mostrou reduzida no animal 2 do grupo dos tratados, porém, além do seu desvio máximo se interpor ao mínimo dos quatro controles analisados (Figura 58), o teste T resultou em valor de $p > 0,05$.

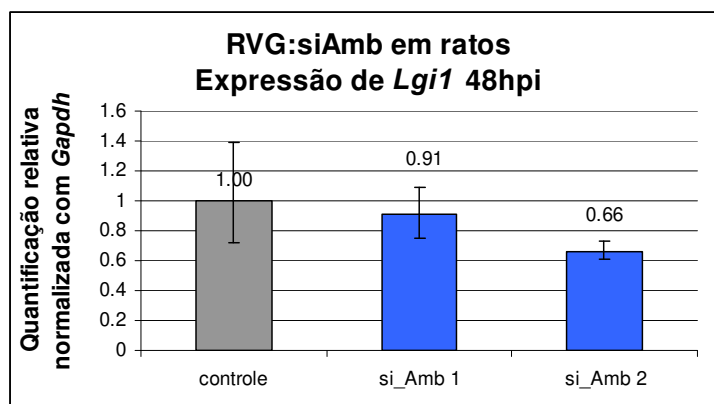


Figura 58: Quantificação relativa do gene *Lgi1*, após 48 horas, em ratos tratados com duas injeções de 25µg (2nmol) de RVG:si_Amb. Os quatro animais controles testados estão analisados em conjunto. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Cirurgia estereotáxica em animais neonatos

Padronização da cirurgia

Para a utilização do aparelho estereotáxico com neonatos foi preciso adaptar uma base mais alta, já que esses animais possuíam cerca de 3,5cm e 3g, e o aparelho foi projetado para animais adultos (Figura 59A). Além disso, utilizamos uma garrafa para cultura de células, preenchida com gelo, para manter o animal anestesiado durante o procedimento (Figura 59A). Também foi necessário improvisar um “apoio de cabeça” (borracha com 3mm de espessura) para manter a área operada sem inclinação (Figura 59B), já que não se consegue usar os apoios de orelha e de dentes que são usados no estereotáxico em adultos.

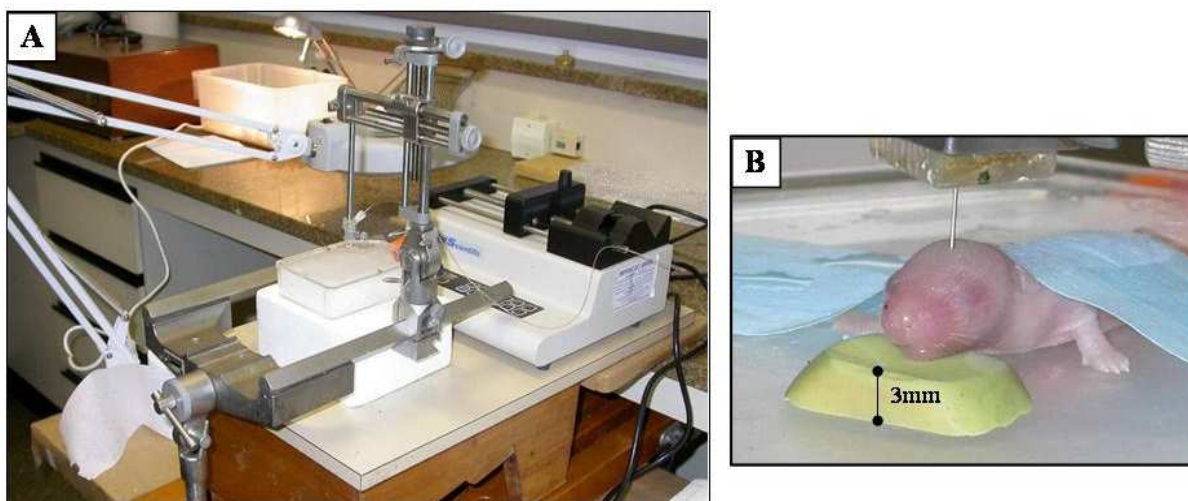


Figura 59: Adaptações para a cirurgia extereotáxica em camundongos neonatos. **A.** Imagem do estereotáxico mostrando base com gelo e suporte de isopor para possibilitar cirurgia em animais pequenos; **B.** Imagem de um neonato posicionado durante a injeção.

Para iniciar a padronização da injeção em animais em desenvolvimento, optamos por operar animais com 4 dias (P4), pois nesta idade os animais ainda não possuem pêlo, o que permite a visualização do bregma, sem a necessidade de uma incisão na pele. E, também, porque a calota craniana de animais P4 é facilmente perfurada por uma agulha, não necessitando da utilização de broca de trepanação como em animais adultos, sendo, desta forma, uma cirurgia mais simples.

Com as primeiras coordenadas usadas (AP: 3mm; L: 0,5mm para esquerda; DV: 2,5mm) obtivemos um bom resultado do alcance do corante no terceiro ventrículo, injetando 0,5µL ou 1µL (Figura 60A). Porém com a injeção de 1µL, observamos um pouco de corante sob a pele do animal (Figura 60B).

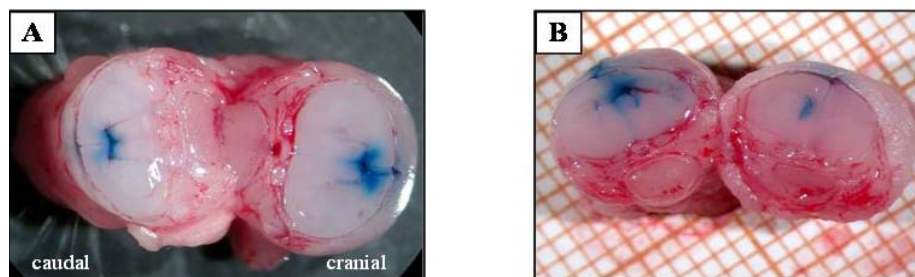


Figura 60: Corte coronal de encéfalos de neonatos P4, utilizando as coordenadas: AP: - 3mm, L: +0,5mm (para esquerda) e DV: -2,5mm, mostrando que o corante atingiu o terceiro ventrículo e estava se difundindo no córtex. A. Volume injetado: 0,5µL; B. Volume injetado: 1µL, mostrando corante também sob a pele.

Com isso, aumentamos a profundidade (DV: 3,0mm) para permitir a injeção de 1µL sem extravasamento. Também percebemos que próximo à linha sagital média da cabeça passa um seio venoso, o qual em alguns animais está um pouco afastado da linha média, existindo a possibilidade de ser perfurado durante o procedimento, levando o animal a óbito. Desta forma, decidimos nos afastar 1,5mm da linha média sagital. Além disso, alteramos também as coordenadas para fazer a injeção em uma porção mais posterior, em uma região mais plana da cabeça do animal, nos afastando da região próxima ao olho. Portanto, padronizamos a cirurgia com as coordenadas: AP: -3,5; L: 1,5 e DV: 3,0, mantendo o alcance do córtex cerebral pelo corante injetado.

Injeção de siRNA

O primeiro teste de silenciamento gênico via estereotaxia em neonatos foi realizado utilizando um siRNA que já vinha sendo usado em nosso laboratório para silenciamento de vísceras de camundongos, via injeção veia caudal. Esta molécula era contra o gene *Mecp2*, que também está envolvido em processos no SNC. Injetamos 50ng de siRNA em Lipofetamine 2000 (Invitrogen), na proporção 1:19 (siRNA:lipo). Fizemos a injeção em

cinco animais: três com siRNA contra *Mecp2*, um controle com injeção de PBS e um com si_GFP (controle irrelevante). O que observamos foi um silenciamento do gene *Mecp2* de aproximadamente 50% e 60% em dois dos animais tratados (animais 4 e 5, respectivamente) (Figura 61).

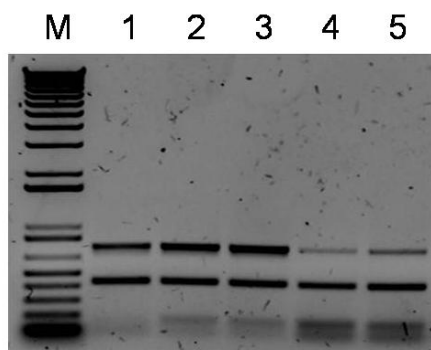


Figura 61: RT-PCR de *Mecp2* (753pb) e do controle endógeno, *α-tubulina* (430pb), confirmando o silenciamento do gene *Mecp2* utilizando a técnica de RNAi associada a estereotaxia em neonatos P4. Gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular de 1Kb Plus (Invitrogen); **1.** PBS; **2.** GFP; **3-5.** siRNA contra *Mecp2*.

Iniciamos os experimentos de RNAi contra *Lgi1* em neonatos utilizando dois animais P3 para cada um dos três tratamentos testados: 5 e 10μg (1 e 2μL) de si_*Lgi1* diluído em PBS e 10μg associado à emulsão lipídica (1:1), coletando os hemisférios cerebrais, de três animais, um por tratamento, 4 horas após a injeção e dos outros três, 22 horas depois. A quantificação relativa por PCR em tempo real das amostras não revelou diminuição da expressão do gene *Lgi1* em nenhum dos hemisférios esquerdos injetados.

Repetimos a injeção de si_*Lgi1* exatamente como havíamos feito quando obtivemos silenciamento do gene *Mecp2*: injetamos apenas 50ng (1μL em 3 minutos) da molécula complexada à emulsão lipídica (1:19), em dois animais P4 e utilizamos dois animais injetados apenas com a emulsão como controle. Os hemisférios cerebrais foram retirados 24 horas após a injeção e não observamos silenciamento do gene *Lgi1*. Refizemos este experimento de 50ng de si_*Lgi1* em cinco animais, porém retiramos o cérebro com 0, 30 e 60 minutos após a injeção e também não observamos diminuição da expressão do gene alvo, na verdade o que observamos foi uma tendência a um aumento do gene no hemisfério esquerdo (Figura 62).

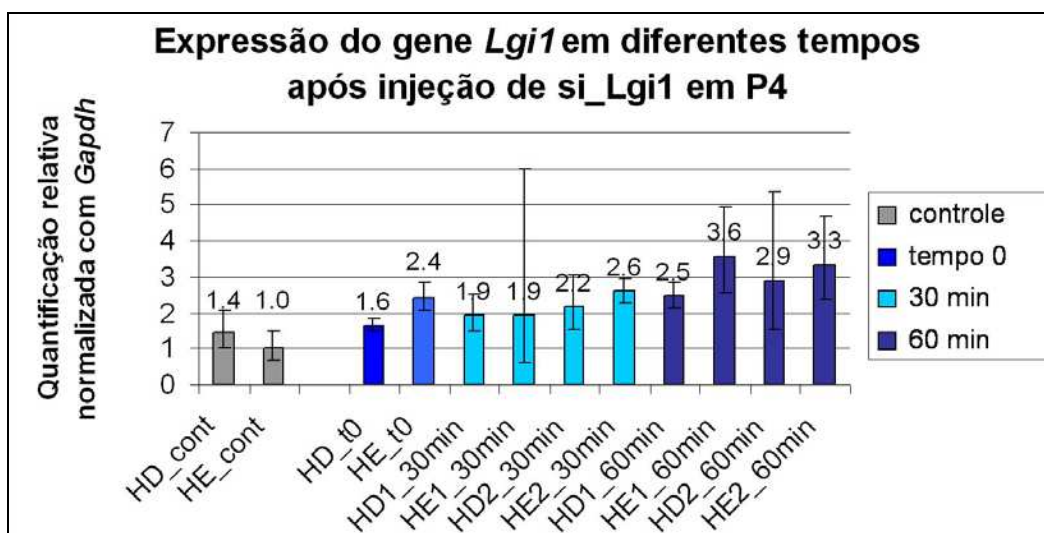


Figura 62: Quantificação relativa do gene *Lgi1* em hemisférios cerebrais de neonatos retirados em diferentes tempos após a injeção de 50ng de si_*Lgi1* no hemisfério esquerdo, utilizando como calibrador o hemisfério esquerdo de um animal sem injeção. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Com o objetivo de testarmos a eficiência da molécula si_*Stealth*, injetamos 10pmol (5µL/5min) deste oligo complexado à emulsão lipídica (1:19) em córtex de três neonatos P4 e injetamos apenas emulsão lipídica em dois animais para controle, retirando os hemisférios cerebrais três horas após a injeção, porém nenhum silenciamento foi observado.

Com a injeção de 1µl (4pmol) de um siRNA fluorescente associado à emulsão lipídica (1:99), pudemos observar, após uma hora e meia, a molécula marcada apenas no local da injeção (Figura 63).

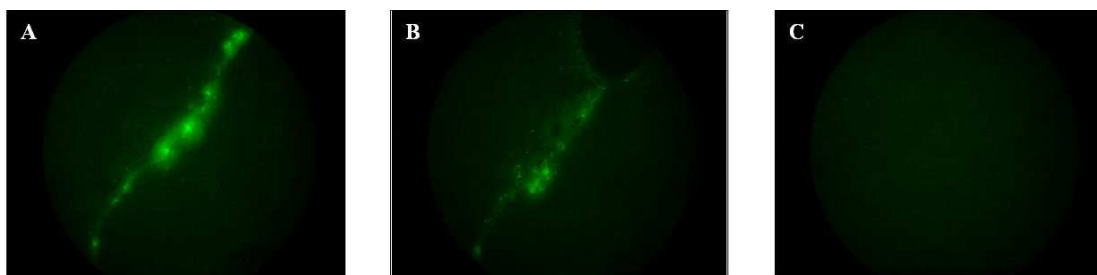


Figura 63: Verificação da transfecção utilizando um siRNA marcado com fluorescência complexado à emulsão lipídica. **A e B:** corte passando pelo local da injeção; **C:** região adjacente a injeção, sem qualquer marcação fluorescente.

Silenciamento do gene *LGII/Lgi1* por RNAi *in vitro*

A expressão de *LGII/Lgi1*, testada em sete culturas celulares (L929, cardiomiócito de camundongo, U87MG, U138MG, T98G e A172), foi observada apenas nas linhagens U138MG (Figura 64A) e Neuro2a. As outras apresentaram expressão do controle endógeno, *Gapdh* para culturas murinas e *18S* para humanas, demonstrando que o cDNA testado estava funcionando (Figura 64B).

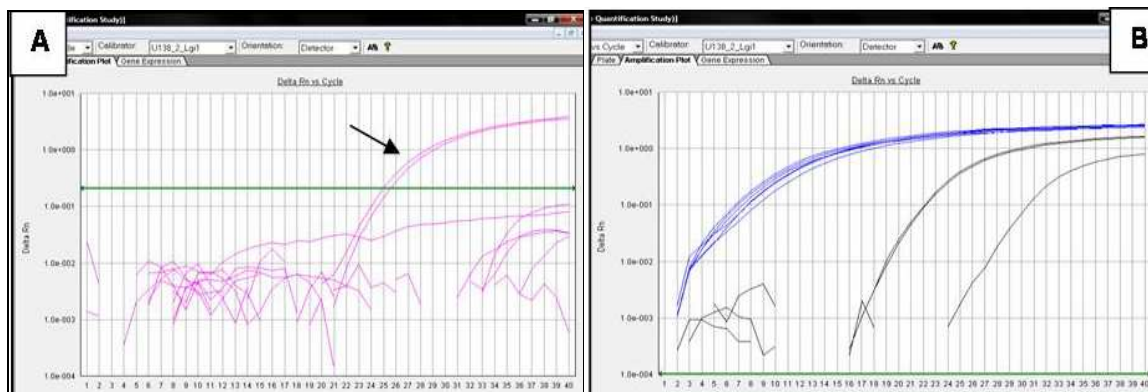


Figura 64: Teste de expressão de *LGII/Lgi1*, *Gapdh* e *18S* em seis culturas celulares. **A.** Ensaio para *Lgi1*, mostrando que apenas as duas amostras providas de U138MG apresentaram expressão (seta); **B.** Expressão de *Gapdh*, em preto, para as culturas L929 (duas amostras) e para cardiomiócito; em azul está representada a expressão de *18S* nas demais culturas de origem humana testadas.

Com isso, partimos para o primeiro experimento de silenciamento *in vitro* utilizando a linhagem humana U138MG e 200nM dos siRNAs: si_Amb, si_Gapdh e mock; coletando as células 24, 48 e 72 horas após a transfecção. A quantificação relativa resultou em uma redução significativa, de até 99%, da expressão de *LGII* nas células transfectadas com si_Amb, e do gene *GAPDH*, nas células transfectadas com si_Gapdh, quando comparadas ao grupo controle *mock*, em todos os tempos analisados (Figura 65 e 66). A quantificação foi realizada utilizando dois endógenos, *GAPDH* e *18S*, na mesma corrida, possibilitando assim a utilização do programa GeNorm, que usa os dados dos dois controles endógenos em conjunto para a análise da expressão do gene alvo.

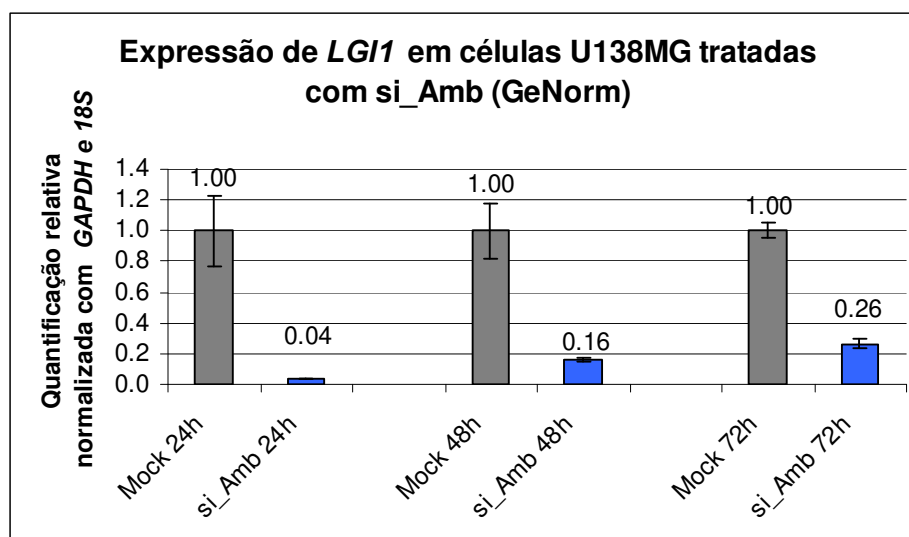


Figura 65: Quantificação relativa de *LGI1* em U138MG, utilizando *GAPDH* e *18S* como controles endógenos da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Amb. Como controle negativo, utilizamos os grupos *mock*. Análise de quantificação realizada pelo programa GeNorm. Barras verticais indicam desvio padrão.

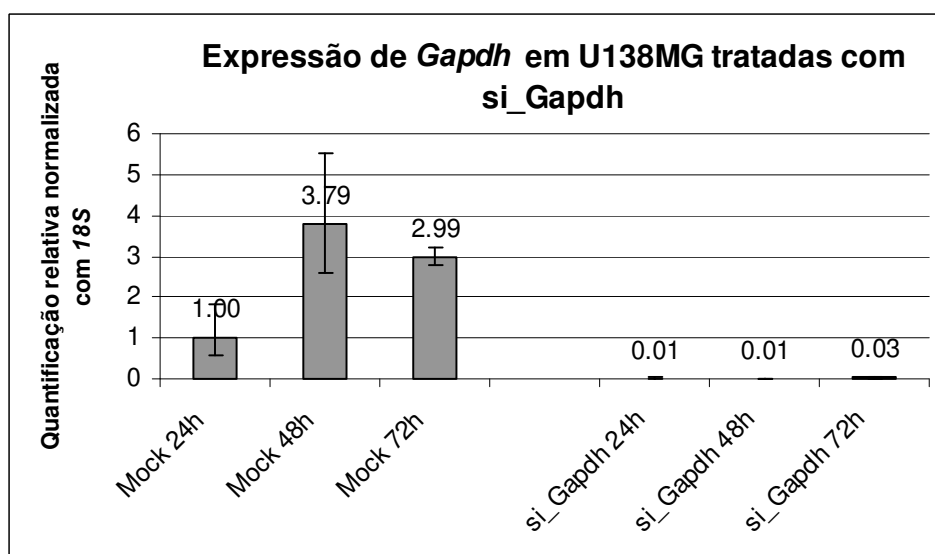


Figura 66: Quantificação relativa de *GAPDH* em U138MG, utilizando *18S* como controle endógeno da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Gapdh. Como calibrador utilizamos a amostra mock_24h. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Quantificamos ainda a expressão de *LGII* nas células tratadas com si_Gapdh, testando este siRNA como um controle negativo e encontramos uma redução de *LGII* nestas células, porém estatisticamente não significativa (Figura 67).

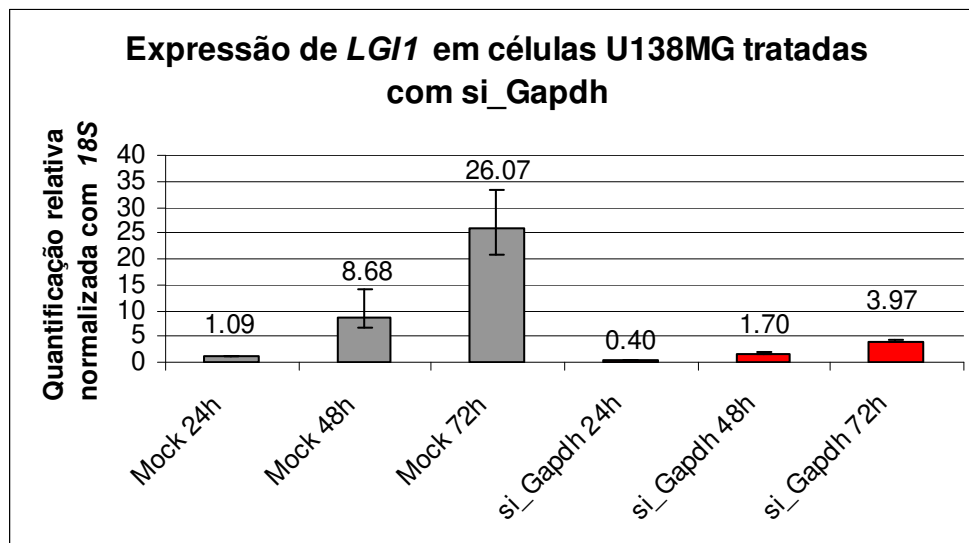


Figura 67: Quantificação relativa de *LGII* em U138MG, utilizando *18S* como controle endógeno da reação, 24, 48 e 72 horas após a transfecção das células com si_Gapdh. Como calibrador utilizamos a mock_24h. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

Repetimos o experimento com a U138MG, utilizando os mesmos tratamentos do experimento anterior, si_Amb, si_Gapdh e o grupo *mock*, e também dois novos grupos controle: um com a molécula irrelevante si_GFP e outro com as células sem tratamento nenhum. Nesta experimentação testamos as moléculas de siRNA a 200nM e também a 50nM e a coleta foi realizada 48 horas após a transfecção. Este experimento foi feito em duplicata. Os dados de PCR em tempo real analisados pelo GeNorm, resultaram em redução aparente de *LGII* de aproximadamente 50%, utilizando a média, no tratamento com si_GFP e um silenciamento de mais de 80% com si_Amb (Figura 68). Entretanto, o teste de Kruskal-Wallis apontou apenas como significativa a diferença entre o grupo controle (*mock* e células) e as células tratadas com si_Amb ($p = 0,0125$) (Figura 69). O teste T não encontrou diferença significativa entre os tratamentos de 50nM e 200nM, nos dois grupos analisados, si_GFP e si_Amb, e também não encontrou diferença entre os controles com e sem emulsão lipídica.

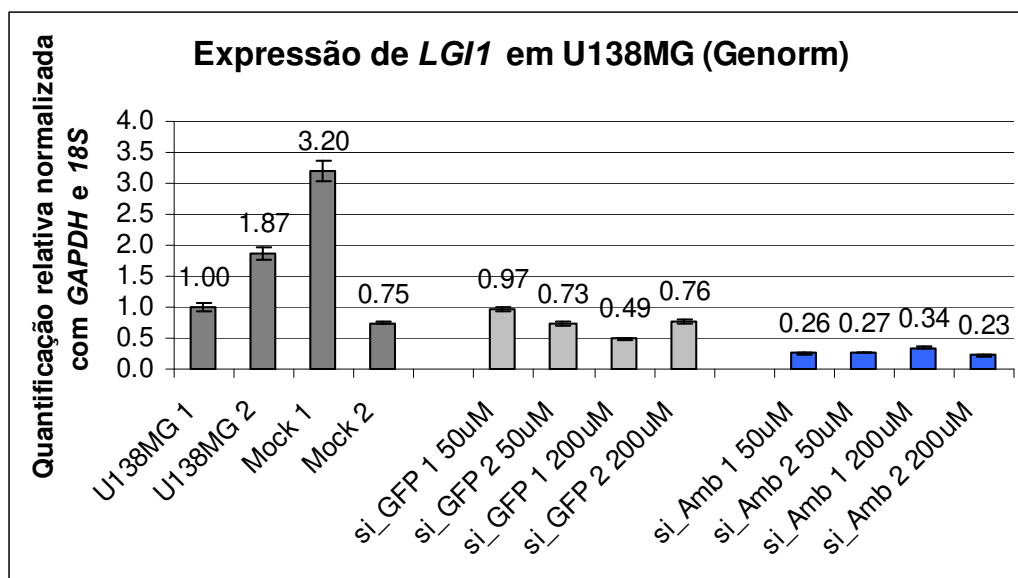


Figura 68: Quantificação relativa de *LGII* em células não tratadas (apenas células e *mock*) e tratadas com 50nM e 200nM de si_GFP e si_Amb, após 48 horas. Análise de quantificação realizada pelo programa GeNorm, levando em consideração os dois controles endógenos *GAPDH* e *18S*. Barras verticais indicam erro padrão.

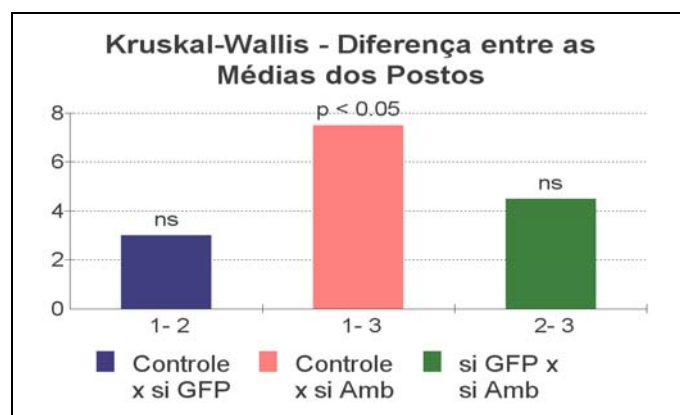


Figura 69: Comparação dos dados gerados pelo GeNorm para os três grupos estudados, analisando os tratamentos (50nM e 200nM) em conjunto, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis. Gráfico gerado pelo programa BioStat 3,0 (Ayres et al., 2003).

A quantificação relativa de *LGII* foi realizada com os dois controles endógenos, *GAPDH* e *18S*, porém, as células que foram tratadas com si_Gapdh não puderam ser analisadas com o ensaio para *GAPDH*, uma vez que este gene estava silenciado. No entanto, analisando essas amostras apenas com o endógeno *18S*, notamos que *LGII* também

apresenta redução em algumas amostras neste tratamento (si_Gapdh), porém estatisticamente não significativa (Figuras 70 e 71).

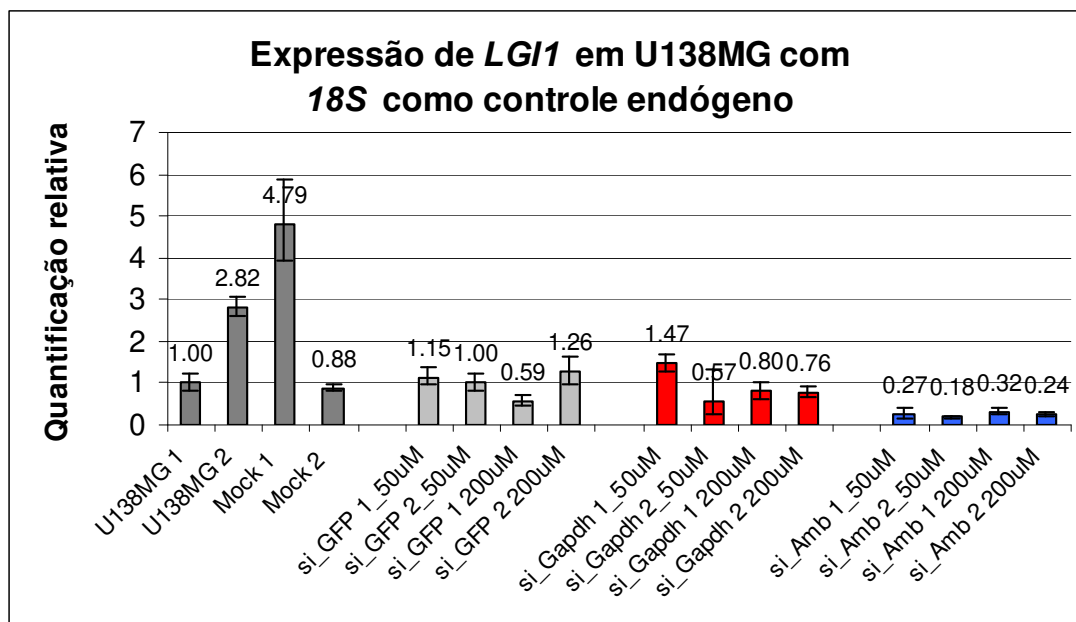


Figura 70: Quantificação relativa de *LGI1* em células não tratadas (apenas células e *mock*) e tratadas com 50nM e 200nM de si_GFP, si_Gapdh e si_Amb, após 48 horas, utilizando *18S* como controle endógeno, podendo assim quantificar as amostras tratadas com si_Gapdh. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

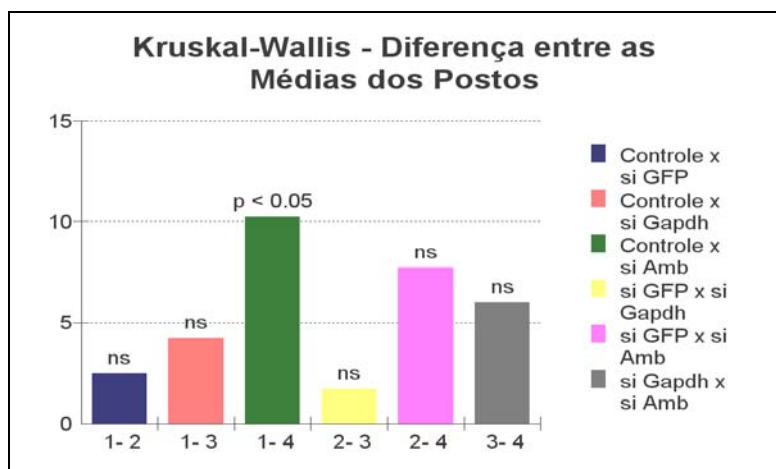


Figura 71: Comparação dos dados gerados pela análise de *LGI1* com *18S* para os quatro grupos estudados, analisando os tratamentos (50nM e 200nM) em conjunto, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis. Gráfico gerado pelo programa BioStat 3,0 (Ayres et al., 2003).

Ao analisarmos a expressão do gene *GAPDH* nas células tratadas com os diferentes siRNAs e dos grupos controle, percebemos que a redução de expressão ocorreu apenas nas amostras tratadas com si_Gapdh (Figura 72).

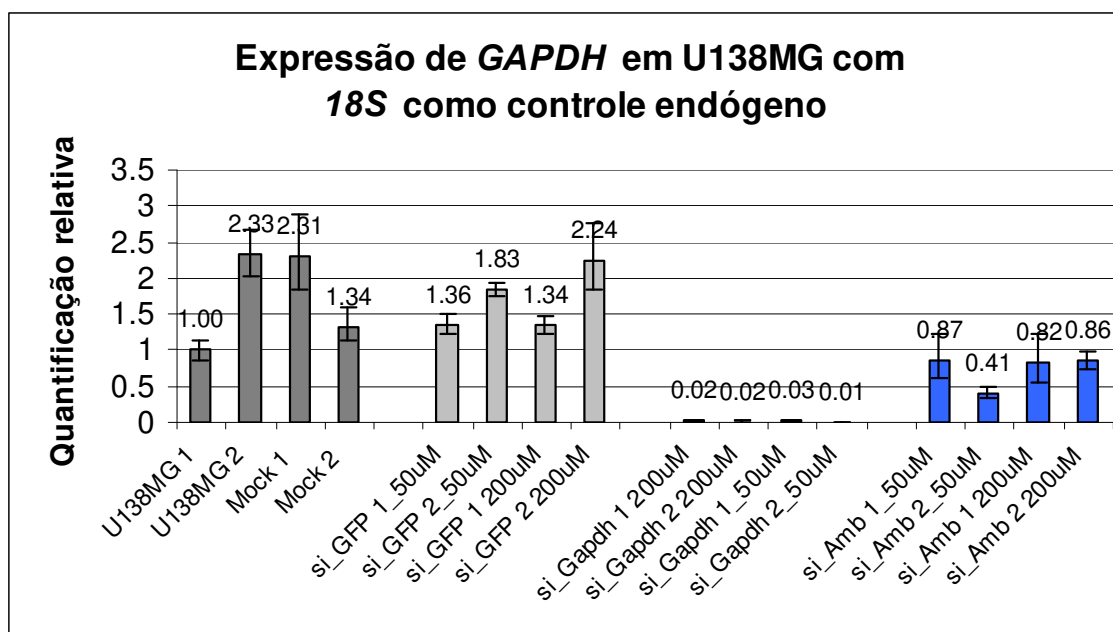


Figura 72: Quantificação relativa do gene *GAPDH* em células U138MG, após 48 horas da transfecção, utilizando o ensaio para *18S* como controle endógeno. As células foram transfectadas com 50nM ou 200nM de si_GFP, si_Amb ou si_Gapdh e como controles negativos utilizamos um grupo sem tratamento e outro *mock*. Barras verticais indicam RQmin e RQmax.

O experimento com a cultura celular murina Neuro2a, no qual utilizamos 50nM do oligo si_Stealth e coletamos o material 24h após transfecção, resultou em silenciamento significativo (~90%) da expressão de *Lgi1*, quando comparado ao tratamento com si_irrelevante, utilizando ambos ensaios *Gapdh* e β -actina como controles endógenos (Figura 73).

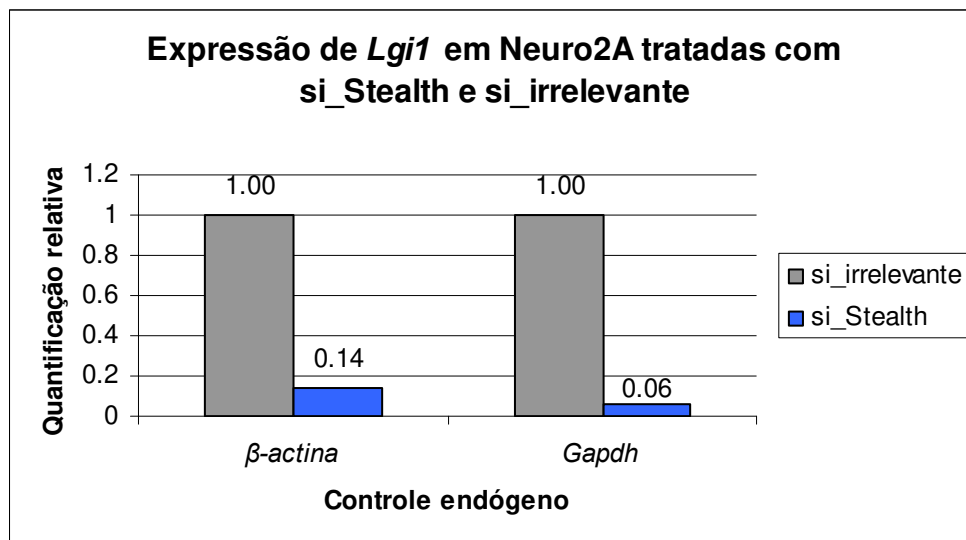


Figura 73: Quantificação relativa de *Lgi1* em células Neuro2a, após 24horas da transfecção, tratadas com si_Stealth, utilizando como calibrador o tratamento si_irrelevante, para os dois controles endógenos, *Gapdh* e β -actina.

As células tratadas com si_Gapdh também apresentaram redução expressiva do gene *Gapdh* quando comparado com os tratamentos de si_irrelevante e si_Stealth (Figura 74).

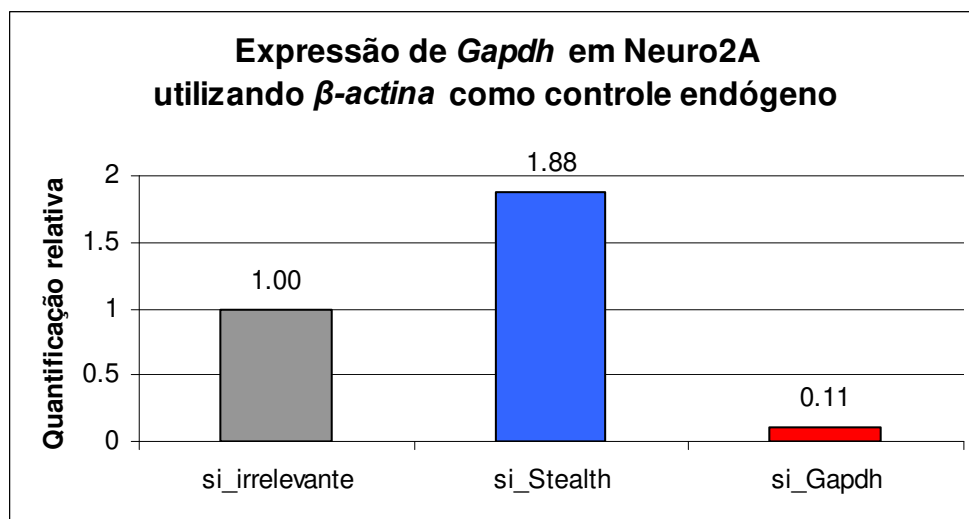


Figura 74: Quantificação relativa do gene *Gapdh* em células Neuro2a, utilizando como controle endógeno a β -actina e como calibrador o tratamento si_irrelevante.

4.5- DISCUSSÃO

No capítulo 1 nós estabelecemos o perfil de expressão do gene *Lgi1* em cérebro de camundongos e descrevemos que o seu período de maior expressão se encontra em idade adulta. Desta forma, com o intuito de silenciar o gene *Lgi1* em seu pico de expressão, padronizamos os experimentos de silenciamento gênico em adultos. Para isso foram realizadas diversas tentativas em que variamos os siRNAs utilizados e suas concentrações, o local e o número de injeções e também testamos diferentes métodos de introdução das moléculas no SNC (Anexo 3).

Inicialmente os experimentos foram realizados na tentativa de um silenciamento global de todo o cérebro ou pelo menos de um hemisfério cerebral, através de injeções de siRNA diretamente no sistema intracerebroventricular. Nessa tentativa, utilizamos inclusive moléculas mais estáveis com substituição de nucleotídeos de DNA nas extremidades (para aumentar a estabilidade no líquido) e também soluções emulsionantes (para aumentar a biodisponibilidade tecidual); porém não observamos diminuição da expressão gênica de *Lgi1*. Nossos resultados foram semelhantes às dificuldades relatadas por outros pesquisadores na área (Senn et al., 2005; Salahpour et al., 2007) e que sugeriram a injeção local como uma possível solução (Makimura et al., 2002; Salahpour et al., 2007). Partimos então para a tentativa de silenciamento em uma porção limitada do neocórtex utilizando injeções locais. Em nossos experimentos tomamos o cuidado de investigar também outras variáveis, além de diferentes moléculas sintetizadas por diferentes métodos e fabricantes, tais como o agente diluente que foi substituído por PBS, ao invés de emulsão lipídica, já que esta poderia influenciar em nossos resultados, visto que Fedorov et al. (2005) demonstraram por *microarray* que a utilização de Lipofectamine (Invitrogen) em cultura de células altera a expressão de 65 genes. Não obtivemos êxito com o local da injeção, pois pelo teste da injeção de azul, percebemos que grande parte do corante espalhava-se em áreas não coletadas para a análise e se fizéssemos a injeção mais superficialmente, teríamos problemas com extravasamento das moléculas.

Como havíamos encontrado previamente um silenciamento significativo do gene *Mecp2* em cérebro de camundongos neonatos, decidimos tentar essa estratégia para o gene *Lgi1*. Infelizmente, a literatura de cirurgia estereotáxica em neonatos é muito escassa e não

existe um atlas com coordenadas para essa faixa etária. Desta forma, para alcançar uma grande distribuição do siRNA em todo córtex cerebral, tivemos que padronizar todo o procedimento, desde o posicionamento do animal no estereotáxico até as coordenadas e volume injetado. Neste experimento com injeção de 50ng de moléculas contra *Mecp2*, nós obtivemos silenciamento por volta de 50% em dois animais. Para apenas um dos animais tratados não obtivemos silenciamento, o que provavelmente ocorreu devido a um mau posicionamento da agulha durante o procedimento (tal fato foi notado durante o procedimento), pois a cabeça do animal se inclinou um pouco para a esquerda no momento da entrada da agulha. Hong et al. (2005) descreveram que altas doses (injetamos 10µg) de siRNA podem reduzir a eficiência do silenciamento gênico, assim diminuimos a massa de siRNA injetada para 50ng, a mesma quantidade utilizada no experimento em que obtivemos silenciamento. Infelizmente, não observamos redução de expressão do gene *Lgi1* em 0, 30, 60 minutos ou 24 horas após a injeção. Então, nos questionamos se o problema não poderia estar na transfecção do siRNA e, para responder a este questionamento, injetamos moléculas marcadas com fluorescência e observamos que após uma hora e meia a marcação estava presente dentro de poucas células, apenas ao redor da inserção da agulha. Como as moléculas não pareciam estar sendo difundidas no córtex do animal, decidimos aumentar o número de injeções de siRNA contra *Lgi1*, canulando animais adultos. Não podemos descartar aqui a possibilidade de que se aumentássemos a quantidade de siRNA fluorescente ou, ainda, que se fizéssemos a observação do cérebro em outros períodos mais tardiamente, poderíamos melhorar a marcação e talvez observar a molécula mais difundida.

Thakker et al. (2004) descreveram uma ampla distribuição das moléculas de siRNA e silenciamento gênico em cérebro de camundongos, utilizando uma minibomba osmótica que permite a liberação de siRNA constantemente. Nós testamos dois siRNAs contra *Lgi1* (si_Stealth e si_Lgi1), com minibombas de 7 e 14 dias, utilizando as mesmas coordenadas estereotáxicas utilizadas por Thakker e colaboradores (2004), porém nenhum tratamento resultou em diminuição da expressão gênica de *Lgi1*.

Akaneya et al., em 2005, descreveram silenciamento gênico de mais de 70% em algumas regiões de cérebro de ratos, introduzindo siRNA por eletroporação local, ou seja, introduzindo os eletrodos próximos ao local de injeção, dentro do cérebro. Com a chegada em nosso laboratório do eletrodo-agulha, que foi encomendado sob medida, testamos a

injeção seguida de eletroporação local. O grupo que descreveu essa técnica aplicou a eletroporação uma hora após a injeção. Nós preferimos diminuir esse intervalo para 30 minutos, pois padronizamos os anestésicos para trinta minutos de cirurgia, com uma margem de segurança, mas que não garantiria mais uma hora de anestesia. As análises de quantificação relativa resultaram no silenciamento do hipocampo esquerdo de um dos animais tratados com 75pmol de si_Stealth, após 24 horas, porém no outro animal com o mesmo tratamento não houve alteração. Uma possível explicação para tal acontecimento foi o fato do animal acordar minutos antes da eletroporação, sendo necessárias mais duas doses de anestésico (quase 85% da dose inicial), adiando a eletroporação para uma hora após a injeção. O fato de termos aumentado o intervalo entre injeção e eletroporação para uma hora, não explicaria o não silenciamento, já que o grupo descreveu o experimento com este intervalo, porém, o estresse que o animal passou até ser anestesiado novamente pode ter influenciado nos resultados. Nesse experimento, também testamos 100ng (7,5pmol) de siRNA em dois animais, que resultou em uma diminuição de aproximadamente 20% da expressão do gene *Lgil*, quando comparados os hemisférios, porém a variação dos pontos máximo e mínimo das amostras, mesmos depois de repetirmos as reações de PCR em tempo real, provou que essas reduções não eram significativas.

Confirmamos o silenciamento por eletroporação local, repetindo o experimento anterior com um número de animais maior. Ao repetirmos o procedimento utilizando apenas um eletroporador, em dois camundongos, não obtivemos silenciamento, o que pode ser explicado pelo fato de um dos animais também ter acordado minutos antes da eletroporação e, na injeção do outro animal, ter ocorrido extravasamento. Já os experimentos utilizando dois eletroporadores resultaram em silenciamento de quatro, dos seis animais tratados com siRNA. Em um dos animais dos quais coletamos os hipocampus 48 horas após a injeção, houve um aumento na expressão de 20%, sendo que a única intercorrência durante a cirurgia foi que tivemos que alterar 0,5mm na coordenada ântero-posterior, pois a perfuração foi feita em um local mais anterior que o desejado (ao invés de -1,9, “andamos” -1,4), porém isso já poderia acarretar uma injeção fora do hipocampo. Com o outro animal que não apresentou silenciamento gênico, não houve nenhum problema durante o experimento, não havendo uma explicação para tal resultado. Surpreendentemente, observamos uma diminuição de expressão do gene *Lgil* em um dos

controles negativos (injeção de molécula irrelevante). Nossa única explicação para tal fato seria uma variação na expressão basal do gene *Lgil* nesse animal ou um efeito inespecífico da molécula irrelevante dupla fita ou da própria eletroporação na expressão do gene *Lgil*. É importante salientar que nós utilizamos uma agulha e um tubo de polietileno individuais para cada tratamento, para evitar contaminação cruzada dos siRNAs e também iniciamos os experimentos com a injeção das moléculas irrelevantes, não havendo contato com siRNA contra *Lgil* antes da injeção. Efeitos inespecíficos de moléculas dupla fita irrelevantes têm sido descritos, principalmente em concentrações elevadas (Sledz et al., 2003; Persengiev et al., 2004; Tschuch et al., 2008).

Para a confirmação dos nossos resultados ampliamos o número de animais testados com a eletroporação local e injeção com a molécula si_Stealth. Realizamos uma curva de tempo, analisando as amostras em diferentes períodos após a injeção de si_Stealth e eletroporação, com o objetivo de identificar em que tempo alcançaríamos a maior taxa de silenciamento. Doze horas após o tratamento, a PCR em tempo real demonstrou silenciamento apenas em dois animais (54 e 67%), os quais receberam uma massa maior de siRNA, 1 e 3µg a mais de moléculas. Analisando as amostras de 24 horas, percebemos um silenciamento variável, de cinco animais, um tem a expressão de *Lgil* reduzida, dois têm a expressão aumentada e os outros dois não apresentam alteração de expressão. Já com as amostras testadas três dias após a injeção, obtivemos silenciamento em 80% dos animais, porém o teste estatístico não apontou uma diferença significativa entre os hipocampus tratados e não tratados. E ainda, a análise da proteína por western blot não evidenciou diminuição de expressão significativa. Em alguns animais houve diminuição do RNAm de *Lgil* detectado pelo PCR em tempo real, o que, no entanto, não atingiu significância estatística, se combinarmos todos os animais experimentais, e o western blot não identificou diminuição significativa da proteína. Sendo assim, podemos concluir que a eletroporação local, com as moléculas testadas, foi eficiente para silenciar o gene *Lgil* em alguns animais, mas não em todo o grupo de animais testados, provavelmente por variações nas concentrações de moléculas que conseguiram penetrar nas células durante a eletroporação. A variação de eficácia no silenciamento gênico por esse procedimento não nos permitiu identificar uma diminuição significativa da proteína *Lgil* nas amostras, porém, também não podemos descartar a reduzida sensibilidade do método

semiquantitativo de western blot em identificar pequenas variações quantitativas. No entanto, como a diminuição do transcrito foi pequena é provável que o efeito fisiológico/patológico nos animais, se existente, seria discreto e provavelmente de difícil detecção fenotípica.

Como uma última tentativa de melhorar os resultados do silenciamento de *Lgil* *in vivo* utilizamos a técnica descrita por Kumar et al. (2007), na qual, através de injeções intravasculares de moléculas de siRNA complexadas com um peptídeo do vírus da raiva modificado (RVG), foi possível entregar com sucesso moléculas no SNC. Por ser proveniente de um vírus neurotrófico, esse peptídeo atravessa a barreira hematoencefálica, facilitando a entrega das moléculas interferentes no cérebro dos animais. Obtivemos o peptídeo por síntese química com a adição de nove resíduos de arginina à porção C-terminal a fim de carregá-lo positivamente, permitindo sua complexação com as moléculas de siRNA por interação de cargas. Além disso, foi solicitado que os resíduos de arginina fossem destrógeros (D-arginina), o que facilitaria a entrada das moléculas nas células (Wender et al. 2000; Kumar et al., 2007). Os experimentos com RVG foram realizados com cinco moléculas de siRNA contra o gene *Lgil*, com as mesmas condições descritas por Kumar et al. (2007), e nenhum deles resultou em diminuição da expressão deste gene. Apesar das intercorrências durante as injeções, vários camundongos, tratados com diferentes siRNAs, receberam as três injeções completas, sem problemas de acesso venoso, e mesmo assim não apresentaram silenciamento de *Lgil*. Vale ressaltar que demonstramos silenciamento eficiente de um gene endógeno, utilizado como controle positivo da técnica (gene *Gapdh*). Como o acesso à veia caudal em camundongos é tecnicamente difícil, principalmente quando o animal já recebeu uma ou mais injeções no mesmo dia, testamos a injeção do peptídeo complexado ao si_Amb em ratos, visto que estes possuem um acesso venoso mais fácil. Nesses experimentos também foi silenciado um gene endógeno (*Gapdh*) com sucesso e outros dois genes de interesse do laboratório (dados não mostrados). Mesmo com todas as condições técnicas ideais, não observamos um silenciamento significativo do gene *Lgil* em cérebro de ratos. Um dos ratos tratados apresentou uma redução de *Lgil*, porém seu desvio máximo se interpôs ao mínimo dos controles negativos. Apesar de toda a cautela no desenho das moléculas, decidimos utilizar ainda 5µg de esiRNA (Hong et al., 2006; Xuan et al., 2006; Tan et al., 2007) associado ao RVG em injeções em camundongos.

Dentro desse *pool* de siRNAs contra *Lgil*, alguns deveriam obrigatoriamente funcionar. Porém mais uma vez não encontramos redução de *Lgil*, excluindo definitivamente qualquer dúvida em relação a um problema de desenho da molécula.

Para complementar nossos experimentos e testar a viabilidade do silenciamento do gene *LGII/Lgil* *in vitro*, procuramos por uma linhagem celular, dentre as culturas já utilizadas em nossa instituição, que expressasse o gene *LGII/Lgil* e encontramos sua expressão em uma linhagem proveniente de glioblastoma humano, a U138MG. Para utilizar esta linhagem celular foi necessário procurar quais siRNAs tinham 100% de identidade com a sequência de *LGII* humano, resultando em duas moléculas, si_Amb e si_Lgil_b, das quatro sequências possíveis, porém somente uma delas em quantidade suficiente para os experimentos *in vitro*, a si_Amb. Já no primeiro teste de transfecção, que foi realizado com 200nM de moléculas, obtivemos silenciamento de *LGII* para o tratamento com si_Amb e redução do gene *GAPDH* para o tratamento com si_Gapdh, nos três tempos analisados, no entanto, também encontramos uma aparente redução de *LGII* nas células tratadas com si_Gapdh, sugerindo um silenciamento inespecífico. Para investigar essa hipótese, repetimos o experimento com todos os tratamentos anteriores e também com a utilização de um siRNA irrelevante (si_GFP) e células sem tratamento algum. Além disso, utilizamos também uma concentração menor de siRNA para testarmos se a concentração de 200nM não poderia estar sendo citotóxica. Esse experimento foi realizado em duplicata. Os dados de PCR quantitativa revelaram um silenciamento de *LGII* estatisticamente significativo apenas do grupo tratado com siRNA contra este mesmo gene, comprovando a funcionalidade da molécula si_Amb e não encontramos diferenças entre as duas concentrações de moléculas transfectadas (50 e 200nM). Uma tendência de redução da expressão de *LGII*, que, no entanto, não foi estatisticamente significativa, foi observada também nos grupos tratados com siRNAs contra *GFP* e *GAPDH*, apontando para uma possível inespecificidade da técnica para o nosso gene de interesse. Vários trabalhos já relataram que siRNAs irrelevantes em cultura de célula possam levar a alterações de expressão inespecíficas (Sledz et al., 2003; Persengiev et al., 2004; Tschuch et al., 2008), o que, no entanto, não invalida nossos achados de silenciamento significativo com moléculas específicas. Com o objetivo de testar a eficiência da molécula si_Stealth, buscamos uma linhagem celular que fosse proveniente de camundongo e encontramos a Neuro2a, que

resultou em silenciamento expressivo de *Lgil*. Desse modo, os experimentos *in vitro* demonstram que as moléculas testadas foram eficientes no silenciamento do gene *LGI1/Lgil* em um sistema mais simples e restrito, que é a cultura celular.

Nós tivemos grande dificuldade no silenciamento do gene *Lgil* *in vivo*, no qual conseguimos apenas com o uso de métodos bastante invasivos, com a injeção local de moléculas no SNC seguida de eletroporação, entretanto, em um sistema simples de cultura de células, derivadas de glioblastoma humano ou de neuroblastoma murino, o silenciamento gênico foi eficiente. Uma das possibilidades para as dificuldades encontradas com a técnica de silenciamento *in vivo* é a presença de muitas proteínas associadas ao RNAm do gene alvo, dificultando o acesso dos siRNAs. Alguns autores descreveram que a proteína LGI1 é secretada (Furlan et al., 2006, Sirerol-Piquer et al., 2006), deste modo, a interação do seu RNAm com as estruturas membranosas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, poderia de alguma forma dificultar o acesso das moléculas e da maquinaria de RNAi para efetivar o silenciamento. Essa hipótese pode ser apoiada pelo fato de termos observado alguma redução de *Lgil* quando empregamos a eletroporação, método que sabidamente desestabiliza membranas. Uma outra possível explicação seria a de que *Lgil* seja um gene essencial e logo após a detecção da diminuição do seu RNAm é ativado um mecanismo compensatório que imediatamente aumentaria sua expressão.

5- CONCLUSÕES FINAIS

O estudo da expressão gênica durante o desenvolvimento do SNC foi possível devido a obtenção de animais com diferentes idades intra-uterinas e neonatais, através de acasalamentos programados.

Foi encontrado um padrão crescente de expressão e posterior estagnação em idade adulta do gene *Lgil*, que poderia ser explicado por uma possível função inibitória deste gene nos processos de desenvolvimento do SNC.

Não foram encontradas diferenças na expressão de *Lgil* entre os hemisférios cerebrais que pudessem explicar a predominância de alterações no hemisfério esquerdo de pacientes com EPADSA.

Observou-se uma expressão de *Lgil* mais elevada em hipocampo, quando comparada ao neocórtex e ao cerebelo, que não foi estatisticamente significativa.

Diferentes siRNAs contra o gene *Lgil* foram desenhados, observando importantes características que garantissem a funcionalidade destas moléculas, como o valor positivo da energia livre, a ausência de estruturas secundárias nas moléculas e nas regiões escolhidas do RNAm alvo.

O silenciamento do gene *Lgil* em SNC de camundongos foi alcançado utilizando a técnica de RNAi com injeções locais e eletroporação, no entanto, este silenciamento só foi eficiente em alguns animais.

Também foi alcançado o silenciamento do gene *LGII* *in vitro*, em culturas de célula humana e murina.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International. 2004; 11(7):36-42.

Akaneya Y, Jiang B, Tsumoto T. RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. J Neurophysiol. 2005; 93(1):594-602.

Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. J Clin Invest. 2007; 117(12):3623-32.

Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. Comparative Medicine. 2001; 51(5):443-56.

Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Dos Santos AS. BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá, 2003. 291pp.

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat Neurosci. 2003; 6(12):1277-83.

Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, Phillips HA, et al. LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. Neurology. 2004; 64:1115-19.

Bernstein, E, Caudy, AA, Hammond, SM and Hannon, GJ. Role for a bidentate 2001; ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363-366.

Besleaga R, Montesinos-Rongen M, Perez-Tur J, Siebert R, Deckert M. Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. Virchows Arch. 2003; 443(4):561-4.

Bisulli F, Tinuper P, Marini C, Avoni P, Carraro G, Nobile C. Partial epilepsy with prominent auditory symptoms not linked to chromosome 10q. Epileptic Disorders 2002; 4 (3): 183-8.

Borges MA, Min LL, Guerreiro CAM, Yacubian EMT, Cordeiro JA, Tognola WA, et al. Urban prevalence of epilepsy: populational study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2004; 62(2a):199-204.

Brodtkorb E, Gu W, Nakken KO, Fischer C, Steinlein OK. Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia.* 2002; 43(3):228-35.

Brodtkorb E, Steinlein OK, Sand T. Asymmetry of Long-latency Auditory evoked potentials in LGI1-related Autosomal Dominant Lateral Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia.* 2005; 6:1692-4.

Caplen NJ, Fleenor J, Fire A, Morgan RA. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene.* 2000; 252(1-2):95-105.

Cendes F, Kobayashi E, Lopes-Cendes I. Familial Temporal Lobe Epilepsy with Auditory Features. *Epilepsia.* 2005; 46(Suppl.10):59-60.

Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, et al. Absence of mutations in the LGI1 receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Research.* 2007a; 76:41-8.

Chabrol E, Popescu C, Gourfinkel-An I, Trouillard O, Depienne C, Senechal K, et al. Two novel epilepsy-linked mutations leading to a loss of function of LGI1. *Arch Neurol.* 2007b; 64(2):217-22.

Chernova OB, Somerville RP, Cowell, JK. A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene.* 1998; 17:2873-81.

Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH and Baulcombe DC. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 2001; 20:2069-78.

Davidson BL, Boudreau RL. RNA interference: a tool for querying nervous system function and an emerging therapy. *Neuron.* 2007; 53(6):781-8.

de Lanerolle NC, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior.* 2005; 7:190-203.

Deshane J, Chaves L, Sarikonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, Grubbs, et al. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(26):7872-83.

Diani E, Di Bonaventura C, Mecarelli O, Gambardella A, Elia M, Bovo G. et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: Absence of mutations in ADAM22 and Kv1 channel genes encoding LGI1-associated proteins. *Epilepsy Res*. 2008; 80(1):1-8.

Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ, et al. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(5):e49.

Duchaine TF, Wohlschlegel JA, Kennedy S, Bei Y, Conte D Jr, Pang K, et al. Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell*. 2006; 124(2):343-54.

Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411:494–8.

Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science*. 2004; 303(5655):238-40.

Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, et al. Different delivery methods – different expression profiles. *Nat Methods*. 2005; 2(4):241.

Fertig E, Lincoln A, Martinuzzi A, Mattson RH, Hisama FM. Novel LGI1 mutation in a family with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*. 2003; 60: 1687-90.

Fialka F, Gruber RM, Hitt R, Opitz L, Brunner E, Schliephake H, et al. CPA6, FMO2, LGI1, SIAT1 and TNC are differentially expressed in early- and late-stage oral squamous cell carcinoma - A pilot study. *Oral Oncol*. 2008 Jan 28. [Epub ahead of print]

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.

Flecknell PA. Anaesthesia of animals for biomedical research. *British Journal of Anaesthesia*. 1993; 71:885-94.

- Fountaine TM, Wood MJ, Wade-Martins R. Delivering RNA interference to the mammalian brain. *Curr Gene Ther*. 2005; 5(4):399-410.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000; 408(6810):325-30.
- Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*. 2006; 313:1792-5.
- Furlan S, Roncaroli F, Forner F, Vitiello L, Calabria E, Piquer-Sirerol S, et al. The LGI1/epitempin gene encodes two protein isoforms differentially expressed in human brain. *J Neurochem*. 2006; 98(3):985-91.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real – time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot*. 2004; 55:1445-54.
- Gardner DJ, Davis JA, Weina PJ, Theune B. Comparison of tribromoethanol, ketamine/acetylpromazine, Telazol™/xilasine, pentobarbital, and methoxyflurane anesthesia in HSD:ICR mice. *Laboratory Animal Science*. 1995; 45(2):199-204.
- Gönczy P, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, et al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*. 2000; 408(6810):331-6.
- Grosse G, Draguhn A, Höhne L, Tapp R, Veh RW, Ahnert-Hilger G. Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *The Journal of Neuroscience*. 2000; 20(5):1869-82.
- Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, Finocchiaro G, Steinlein OK. LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics*. 2005; 6:59-66.
- Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK. LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol*. 2002; 52:364-7.
- Guimarães MA, Mázaró R. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo. Universidade Federal do Estado de São Paulo, 2004.

- Hafez ESE. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970.
- Haley B, Zamore PD. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11(7):599-606.
- Hamilton A, Baulcombe D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 1999; 286:950–2.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000; 404:293-6.
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 2002; 418(6894):244-51. Review
- Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(16):5820-5.
- Hassani Z, Lemkine GF, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, et al. Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med.* 2005; 7(2):198-207.
- Hauser W, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1940-1980. *Epilepsia.* 1991; 32:429-45.
- Hauser W, Ortega R, Zarelli M. The prevalence of epilepsy in a rural Mexican Village. *Epilepsia.* 1990; 31:604.
- Head K, Gong S, Joseph S, Wang C, Burkhardt T, Rossi MR, et al. Defining the expression pattern of the LGI1 gene in BAC transgenic mice. *Mamm Genome.* 2007; 18(5):328-37.
- Hedera P, Abou-Khalil B, Crunk AE, Taylor KA, Haines JL, Sutcliffe JS. Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: two families with novel mutations in the LGI1 gene. *Epilepsia.* 2004; 45(3):218-22.
- Hong J, Qian Z, Shen S, Min T, Tan C, Xu J, et al. High doses of siRNAs induce eri-1 and adar-1 gene expression and reduce the efficiency of RNA interference in the mouse. *Biochem J.* 2005; 390(Pt 3):675-9.

- Hong J, Zhao Y, Huang W. Blocking c-myc and stat3 by E. coli expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348(2):600-5.
<http://medgen.ugent.be/genorm/>
- Hughes CL, Kaufman TC. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development.* 2000; 127(17):3683-94.
- Hutvagner G and Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002; 297:56-2060.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology.* 2003; 21(6):635-7.
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Baker-Cummings C, Boneshi FM, et al. Mutations in *LGII* cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet.* 2002; 30:335-41.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115(2):209-16.
- Kittler R, Heninger AK, Franke K, Habermann B, Buchholz F. Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells. *Nat Methods.* 2005; 2(10):779-84.
- Klink VP, Wolniak SM. The efficacy of RNAi in the study of the plant cytoskeleton. *J Plant Growth Regul.* 2000; 19(4):371-84. Review.
- Kobayashi E, Santos NF, Torres FR, Secolin R, Sardinha LAF, Lopes-Cendes I, et al. MRI abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol.* 2003; 60:1546-51.
- Krex D, Hauses M, Appelt H, Mohr B, Ehninger G, Schackert HK, et al. Physical and functional characterization of the human *LGII* gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathol.* 2002; 103(3):255-66.

- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007; 448(7149): 39-43.
- Kunapuli P, Chitta KS, Cowel JK. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene*. 2003; 22:3985-91.
- Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(5):559-61.
- Lee RC, Hammell CM, Ambros V. Interacting endogenous and exogenous RNAi pathways in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*. 2006; 12(4):589-97.
- Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor SIP2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res*. 2005; 65(9):3788-95.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120(1):15-20.
- Liao D, Zhang X, O'Brien R, Ehlers MD, Huganir R. Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neuroscience*. 1999; 2(1):37-43.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- Lohmann JU, Endl I, Bosch TC. Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol*. 1999; 214(1):211-4.
- Magalhães T, Brackney DE, Beier JC, Foy BD. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2008; 68(3):134-43.
- Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci*. 2002; 3:18.

- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62(4A):609-14.
- Messier C, Émond S, Ethier K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1999; 63(2):313-8.
- Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, de Feo MR, Binelli S, Bisulli F, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epileptin mutations and genetic heterogeneity in seven european families. *Epilepsia*. 2003; 44(10):1289-97.
- Mohammed A, Dasaradhi PV, Bhatnagar RK, Chauhan VS, Malhotra P. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 309(3):506-11.
- Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, et al. Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet*. 2002; 11:1119-27.
- Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:14687-92.
- Olafsson E, Hauser W, Ludvigsson P, Gudmundsson G. Incidence and prevalence of epilepsy in rural Iceland. *Epilepsia*. 1996; 37(10):951-5.
- Oliveira S, Storm G, Schiffelers RM. Targeted Delivery of siRNA. *J Biomed Biotechnol*. 2006; 2006(4):63675.
- Onojafe FI. Vaginal mucous plug and weight gain in mice. Tech talk -The Newsletter for Laboratory Animal Science Technicians. 2005; 10(6):4.
- Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genetics*. 1995; 10:56-60.
- Ottman R, Winawer MR, Kalachikov S, Baker-Cummings C, Gilliam TC, Pedley TA, et al. LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*. 2004; 62:1120-6.
- Pardridge WM. shRNA and siRNA delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59(2-3):141-52. Review.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.

Peng D, Sheta EA, Powell SM, Moskaluk CA, Washington K, Goldknopf IL, et al. Alterations in Barrett's-related adenocarcinomas: a proteomic approach. *Int J Cancer*. 2008; 122(6):1303-10.

Pereira TC, Bittencourt VAB, Secolin R, Rocha CS, Maia IG, Lopes-Cendes I. Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genetics and Molecular Biology*. 2007; 30(4):1206-8.

Pereira TC, Pascoal VD, Marchesini RB, Maia IG, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM, Lopes-Cendes I. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRase gene. *Exp Parasitol*. 2008; 118(4):619-23.

Pereira TC. Estudos de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Persengiev SP, ZhuX, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*. 2004; 10(1):12-8.

Piepoli T, Jakupoglu C, Gu W, Lualdi E, Suarez-Merino B, Poliani PL, et al. Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro Oncol*. 2006; 8(2):96-108.

Pisano T, Marini C, Brovedani P, Brizzolara D, Pruna D, Mei D, et al. Abnormal phonologic processing in familial lateral temporal lobe epilepsy due to a new LGI1 mutation. *Epilepsia*. 2005; 46(1):118-23.

Pizutti A, Flex E, Bonaventura CD, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, et al. Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol*. 2003; 53:396-9.

Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol*. 1999; 45:182-8.

- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(3):326-30.
- Richards MP, Poch SM. Quantitative analysis of gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection *Mol Biotechnol.* 2002; 21(1):19-37.
- Roth CM. Quantifying gene expression. *Current Issues in Molecular Biology.* 2002; 4:93-100.
- Rutz S, Scheffold A. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(2):78-85.
- Salahpour A, Medvedev IO, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Local knockdown of genes in the brain using small interfering RNA: a phenotypic comparison with knockout animals. *Biol Psychiatry.* 2007; 61(1):65-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol 3, p.18.52.
- SAS System for windows, The (Statistical Analysis System), v8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.
- Scheel H, Tomiuk S, Hofmann KA common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(15):1757-62.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270(5235):467-70.
- Schoppmeier M, Damen WG. Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation. *Dev Genes Evol.* 2001; 211(2):76-82.
- Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. The epilepsy linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron.* 2006; 49:697-706.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003; 115(2):199-208.

Senechal KR, Thaller C, Noebels JL. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics*. 2005; 14: 1613-20.

Senechal Y, Kelly PH, Cryan JF, Natt F, Dev KK. Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J Neurochem*. 2007; 102(6):1928-40.

Senn C, Hangartner C, Moes S, Guerini D, Hofbauer G. Central administration of small interfering RNAs in rats: a comparison with antisense oligonucleotides. *Eur J Pharmacol*. 2005; 522:30-7.

Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Pérez V, Favell K, Barker PA, et al. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Human Molecular Genetics*. 2006; 15:3436-45.

Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BRG. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology*. 2003; 5(9):834-9.

Somerville RP, Chernova O, Liu S, Shoshan Y, Cowell JK. Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1. *Mamm Genome*. 2000; 11(8):622-7.

Staub E, Pérez-Tur J, Siebert R, Nobile C, Moschonas NK, Deloukas P, et al. The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(9):441-4.

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*. 2001; 107(4):465-76.

Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*. 1990; 31:45-54.

Tan C, Xuan B, Hong J, Dai Z, Hao R, Li Z, et al. RNA interference against hepatitis B virus with endoribonuclease-prepared siRNA despite of the target sequence variations. *Virus Res*. 2007; 126(1-2):172-8.

Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S. Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J. Mol. Neurosci*. 2007; 32(1):38-46.

- Tessa C, Michelucci C, Nobile C, Giannelli M, Della Nave R, Testoni S, et al. Structural anomaly of left lateral temporal lobe in epilepsy due to mutated LGI1. *Neurology*. 2007; 69:1298-1300.
- Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, et al. Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(49):17270-5.
- Thakker DR, Natt F, Husken D, van der Putten H, Maier R, Hoyer D, et al. siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(8):782-9, 714.
- Tomari, Y, Matranga, C, Haley, B, Martinez, N, and Zamore, PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*. 2004; 306:1377-80.
- Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(23):8682-6.
- Torres FR. Distúrbios do Desenvolvimento Cortical e Epilepsia Autossômica Dominante Com Auras Auditivas: Estudos Genéticos e Moleculares. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- Tschuch C, Schulz A, Pscherer A, Werft W, Benner A, Hotz-Wagenblatt A, et al. Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol Biol*. 2008; 9(1):60.
- Ui-Tei K, Zenno S, Miyata Y, Saigo K. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett*. 2000; 479(3):79-82.
- Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(3):773-8.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7):RESEARCH0034.
- Vanguilder H, Vrana K, Freeman W. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008; 44(5):619-26.

Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(24):13003-8.

www.alzet.com/products/brainkits_howto.php

www.alzet.com/products/howdoesitwork.php

www.ambion.com

www.gensat.org

www.invitrogen.com

www.ncbi.nlm.gov/BLAST/

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 2002; 20(10):1006-10.

Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z. Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(3):578-86

Xuan B, Qian Z, Hong J, Huang W. esiRNAs inhibit Hepatitis B virus replication in mice model more efficiently than synthesized siRNAs. *Virus Res*. 2006; 118(1-2):150-5.

Yoshizawa T, Yoshida H, Shoji S. Differential susceptibility of cultured cell lines to aggregate formation and cell death produced by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Brain Res Bull*. 2001; 56:349–52.

Zeringue HC, Constantine-Paton M. Post-transcriptional gene silencing in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2004; 14(5):654-9.

Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *J Gene Med*. 2003; 5(12):1039-45.

Zielinski JJ. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw, J., Richens, A., Oxley, J. (eds) *A Textbook of Epilepsy*, Third edition. New York: Churchill Livingstone, 1988, 21-48.

Artigo 1

“Expression Profile of *Lgil* Gene in Mouse Brain During Development”

Journal of Molecular Neuroscience, 2008; 35(3):323-9

Expression Profile of *Lgil* Gene in Mouse Brain During Development

Patrícia A. O. Ribeiro · Lourenço Sbraglia ·
Rovilson Gilioli · Francesco Langone · Fábio F. Conte ·
Isela Lopes-Cendes

Received: 11 April 2008 / Accepted: 28 April 2008
© Humana Press 2008

Abstract Mutations in *LGII* were described in patients with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF), and recent clinical findings have implicated *LGII* in human brain development. However, the precise role of *LGII* in epileptogenesis remains largely unknown. The objective of this study was to determine the expression pattern of *Lgil* in mice brain during development and in adult animals. Real-time polymerase chain reaction (PCR) quantification and Western blot experiments showed a relative low expression during intrauterine stages, increasing until adulthood. In addition, we did not find significant differences between left and right hemispheres. The hippocampus presented higher levels of *Lgil* expres-

sion when compared to the neocortex and the cerebellum of adult animals; however, these results did not reach statistical significance. This study was the first to determine a specific profile of *Lgil* gene expression during central nervous system development, which suggests a possible inhibitory function in latter stages of development. In addition, we did not find differences in hemispheric expression that could explain the predominance of left-sided abnormalities in patients with ADPEAF.

Keywords Epilepsy · ADPEAF · Real-time PCR

Introduction

Mutations in the *LGII* (leucine-rich, glioma-inactivated 1) gene were described in patients with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF; Gu et al. 2002; Kalachikov et al. 2002; Morante-Redolat et al. 2002; Pizutti et al. 2003; Kobayashi et al. 2003; Michelucci et al. 2003; Pisano et al. 2005), a rare Mendelian partial epilepsy syndrome. ADPEAF is characterized by juvenile-adult onset of focal seizures often starting with auditory auras (Ottman et al. 1995; Poza et al. 1999; Brodtkorb et al. 2002; Cendes et al. 2005). Seizure manifestations as well as electroencephalogram (EEG) abnormalities and magnetic resonance imaging point to the temporal lobe as the area of dysfunction (Kobayashi et al. 2003; Ottman et al. 2004; Gu et al. 2005).

We have reported patients with ADPEAF and mutations in the *LGII* gene showing developmental abnormalities in the lateral cortex of the left temporal lobe (Kobayashi et al. 2003), suggesting that mutations in *LGII* could lead to cortical malformation. In addition, an intriguing finding of this study was that no abnormalities were identified on the right hemisphere of these patients (Kobayashi et al. 2003).

P. A. O. Ribeiro · F. F. Conte · I. Lopes-Cendes
Department of Medical Genetics,
University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

L. Sbraglia
Department of Surgery, University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

R. Gilioli
Laboratory of Animal Quality Control-Multidisciplinary Center
of Biological Investigation—(CEMIB),
University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

F. Langone
Department of Physiology and Biophysics,
University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

I. Lopes-Cendes (✉)
Department of Medical Genetics, FCM-UNICAMP,
Tessália Vieira de Camargo, 126,
Campinas, São Paulo 13084-971, Brazil
e-mail: icendes@unicamp.br

Additional studies have described a predominance of left-sided EEG abnormalities in ADPEAF patients (Gu et al. 2005), as well as a dysfunction in left auditory cortex processing (Brodförb et al. 2005). It is not yet clear why *LGII* mutations would lead to abnormalities predominantly in the left temporal side.

The objective of the present study was to determine the expression pattern of the *LgII* gene in mice brain during central nervous system (CNS) development and in adult animals. In addition, we aimed to compare expression patterns in both hemispheres to gain insights into a possible role of *LGII* in CNS development and ADPEAF pathophysiology.

Materials and Methods

Animals

Programmed matings were carried using specific pathogen-free BALB/c/UNI mice (*Mus musculus*) to obtain embryos at specific ages. The vaginal smear cytology was used for the determination of the estrous phase, the period that females accept the mating. Vaginal secretion was collected using a sterile tip filled with 10 μ l of sterilized distilled water. Unstained material was observed under a light microscope, using $\times 10$ and $\times 40$ objective lenses (Marcondes et al. 2002). The matings were carried out putting one to three females in estrous phase together with one male. To determine the precise pregnancy time, animals were separated in the following morning of the mating, and pregnancy was confirmed by periodically weighing the females and by abdominal palpation (Onofre 2005).

Tissue Preparation

For gene expression quantification, brains of three animals at the following ages were collected, separated into left and right hemispheres, and frozen into liquid nitrogen: embryonic days (E) E15, E17, and E18; postnatal days (P) P1, P7, and P14; and 4, 6, 8, and 24 weeks old. We used the whole heads of E13 animals due to their small sizes. In addition, we used three 5-week-old animals to study three CNS regions: neocortex, hippocampus, and cerebellum. The neocortex removed was a rectangular area: 3.0 mm from the lambda suture and 6.0 mm to the brain bottom. We dissected the right and left neocortex and hippocampi, whereas the cerebellum was used as one single piece.

For the Western blot experiments, we used eight samples with the following ages: E13, E15, E17, E18, P1, P7, P14, and 8 weeks old. These samples were from the right hemispheres only, except for the E13 from which we used whole heads.

Animals were treated according to the guidelines for animal care issued by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at the University of Campinas (UNICAMP—Campinas, Brazil), and this research protocol was approved by the same committee.

Real-Time PCR

Total RNA was isolated with Trizol™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to manufacturer instructions. The integrity of RNA was assessed by 1% agarose gel; RNA concentration and purity were determined by spectrophotometry (GeneQuant *pro*, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The complementary DNA (cDNA) was obtained using SuperScript III™ reverse transcriptase and random primers (both from Invitrogen, Carlsbad, USA). Gene expression assays were carried out using quantitative real-time PCR (Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system, Foster City, USA) with the TaqMan® system (Applied Biosystems). Primers and probe for the mouse *LgII* gene were obtained from the Assays-On-Demand choice of Applied Biosystems (Mm00522315_m1), the probe is localized in the junction of exons 2 and 3 (5' GCTGCAGCTCTTGTTATTACGTCG), avoiding DNA contaminations. The *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) and β -*actin* genes were used as endogenous controls (Applied Biosystems). Reactions were carried out using 6.25 μ l of TaqMan® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0.625 μ l of the primers and probe, 1.625 μ l of water, and 4 μ l of cDNA. Cycle conditions were 50°C for 2 min, then 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s (melting step), and 60°C for 1 min (annealing/extension step). All relative quantification experiments were performed in duplicates or triplicates.

The relative quantification (RQ) of the *LgII* expression was calculated by the comparative threshold cycle, which is determined using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen 2001). The average C_T is calculated for both target and endogenous control of each sample, and the ΔC_T is determined ($C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ endo}}$). Then, the $\Delta\Delta C_T$ is calculated subtracting ΔC_T of the calibrator from the ΔC_T of the target (Livak and Schmittgen 2001), where the calibrator is the sample used as the basis for comparative results. The $\Delta\Delta C_T$ of the calibrator always equals to zero; as $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ and 2^0 equals one, the fold change in gene expression relative to the calibrator equals one, by definition (Livak and Schmittgen 2001).

We initiate the quantitative real-time PCR experiments by validating the primers and probes, demonstrating that amplification efficiencies of the target and the endogenous controls were approximately equal. We used six different concentrations of a cDNA brain sample (1 and 0.7 log serial dilutions for *Gapdh* and β -*actin*, respectively) for the

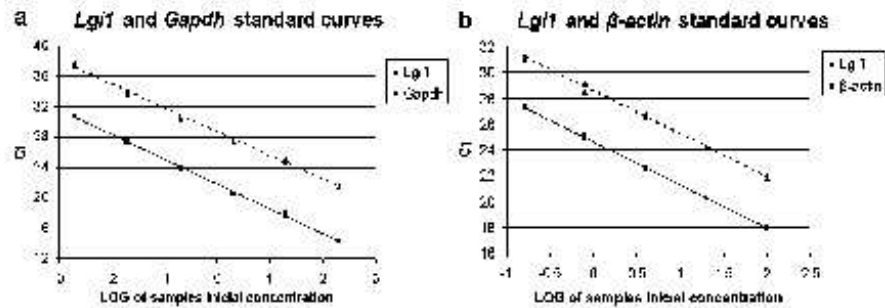


Figure 1 Primers and probes validation. **a** Standard curves of *Lg1* and *Gapdh*. **b** Standard curves of *Lg1* and β -actin. Note that the slope of the standard curves that are used to calculate the primers and

validation experiments. Amplification efficiencies are calculated based on the slope of the standard curve generated by the 7500 System (SDS Software v1.3; Applied Biosystems). Efficiency values should be 1 ± 0.1 ($\sim 100\%$). The result confidence is measured by the R^2 parameter given by the 7500 System (SDS Software v1.3; Applied Biosystems). These reactions were done in triplicates.

Western Blot

Protein samples were obtained according to Deshane et al. (2004) with small modifications. Brain tissue was homogenized in a lysis buffer using a polytron (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). After centrifugation at 14,000 rpm for 15 min, the supernatant was collected and processed for protein concentration determination using the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, USA). Thirty micrograms of protein per sample were run on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel, transferred to a nitrocellulose Hybond C (GE Healthcare), and blocked with

probe efficiencies are similar between the endogenous and the target assays

5% low fat milk for 2 h. Membranes were incubated overnight with the primary antibodies sc-9583 (Santa Cruz Biotechnology®, Inc., Santa Cruz, USA) for *Lg1* and β -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diluted 1:200 and 1:1,000, respectively. Membranes were subsequently incubated with a bridge antibody anti-goat IgG produced in rabbit (Sigma-Aldrich) diluted 1:5,000 for 2 h. Antigen-antibody complexes were visualized with anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich) diluted 1:20,000. After incubations, membranes were washed with Tris-buffered saline $1 \times$ twice. Kaleidoscope protein standard (Bio-Rad) was used to estimate the molecular weight of protein bands. We used the ImageJ program (Abramoff et al. 2004) to quantify *Lg1* protein normalized with β -actin.

Statistical Analyses

Analysis of variance (ANOVA) test was used to assess differences in gene expression between ages and also between hemispheres. When a significant variation was

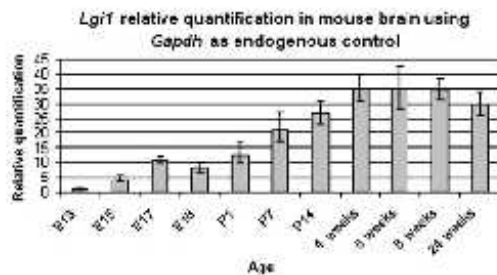


Figure 2 *Lg1* gene expression profile normalized with *Gapdh* in different ages of mice brain, using E13 sample as the calibrator. Each age is represented by both hemispheres of a pool of three animals. E embryonic day, P postnatal day. Vertical bars indicate minimum and maximum relative quantification (RQ), which is given by the SDS Software v1.3 (Applied Biosystems)

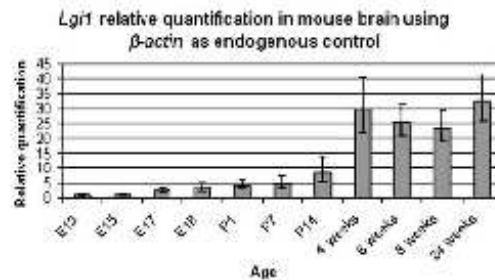


Figure 3 *Lg1* gene expression profile normalized with β -actin in different ages of mice brain, using E13 sample as the calibrator. Each age is represented by both hemispheres of a pool of three animals. E embryonic day, P postnatal day. Vertical bars indicate minimum and maximum relative quantification (RQ), which is given by the SDS Software v1.3 (Applied Biosystems)

Table 1 Relative quantification results for the *Lgil* gene expression for both endogenous controls during different ages, using E13 sample as the calibrator

Age	Gapdh			β -actin		
	RQ	RQ min	RQ max	RQ	RQ min	RQ max
E13	1.00	0.76	1.32	1.00	0.63	1.59
E15	4.48	3.47	5.77	1.18	0.87	1.59
E17	10.90	9.69	12.27	2.39	1.84	3.10
E18	8.17	6.97	9.57	3.46	2.30	5.22
P1	12.77	9.74	16.74	4.44	3.17	6.22
P7	21.40	16.97	27.00	4.95	3.33	7.37
P14	26.81	23.18	31.01	8.67	5.41	13.90
4 weeks	35.05	31.11	39.50	29.85	22.08	40.37
6 weeks	34.80	28.62	42.32	25.41	20.55	31.42
8 weeks	34.68	31.29	38.43	23.72	19.08	29.49
24 weeks	29.75	26.02	34.01	32.60	25.66	41.41

RQ values correspond to the right and left hemispheres of three animals together. The minimum and maximum relative quantification (RQ min; RQ max) values are given by the SDS Software v1.3 (Applied Biosystems).

E embryonic day, P postnatal day

found, we used Tukey's test to investigate differences between specific groups. Friedman test was used to assess differences among brain regions, and Wilcoxon test was used to test for differences between the right and left side. Significance level was set at 5%. Statistical analyses were carried out with the SAS System for Windows (SAS Institute Inc. 1999–2001) and the BioEstat 3.0 Program (Ayres et al. 2003).

Results

Initially, we carried out the validation of the real-time PCR primers and probes to demonstrate that amplification efficiencies of the target, and the endogenous controls were approximately equal, and therefore, they could be used together. Validation of *Lgil* and *Gapdh* primers and probes resulted in 1.071 and 1.002 amplification efficiencies with a confidence of 99.6% and 99.7%, respectively (Fig. 1a). The amplification efficiency of *Lgil* and β -actin was 0.994, for both, with a confidence of 99.7% and 99.9%, respectively (Fig. 1b).

Lgil gene expression was notably low during intrauterine stages, increasing until adult ages (Figs. 2 and 3; Table 1). When analyzing the results obtained from the three animals, we observed that samples from both hemispheres together at ages 4, 6, 8, and 24 (weeks) presented a 34-fold increase in *Lgil* expression as compared to E13 samples using *Gapdh* as endogenous control (Fig. 2). In the same comparison but using β -actin as the endogenous control, we observed a 28-fold increase in *Lgil* expression (Fig. 3).

We found no significant differences in the *Lgil* gene expression profile between the right and left hemispheres in

all ages studied using both endogenous controls ($p=0.7969$ for *Gapdh* and $p=0.8329$ for β -actin). However, the ANOVA test revealed a significant *Lgil* expression difference among the ages studied when normalized with *Gapdh* ($p=0.0001$) and with β -actin ($p<0.0001$). The Tukey's test indicated the presence of four different groups according to expression profile. These four groups were slightly different according to the endogenous control used for normalization (Table 2). E13 samples were not included in the statistic analyses because we did not have the right and left hemispheres values.

Similar to the quantitative real-time PCR results, Western blot analyses also showed an increased expression of the *Lgil* protein in the last developmental stages studied (P14 and 8-week-old animals; Figs. 4 and 5).

The analyses of the three regions studied by quantitative real-time PCR resulted in higher *Lgil* expression levels in the hippocampus when compared to the neocortex and the cerebellum of adult animals for both endogenous controls (Fig. 6). However, these values did not reach statistical significance ($p=0.097$).

Table 2 Four groups pointed out by the Tukey's test as statistically different for both endogenous controls

Group	Gapdh	β actin
1	E15, E17, E18	E15, E17
2	E17, E18, P1	E17, E18, P1, P7
3	P7, P14, 24 weeks	E18, P1, P7, P14
4	P14, 4, 6, 8, 24 weeks	4, 6, 8, 24 weeks

As we did not separate E13 samples' hemispheres, they could not be included in the statistical analyses.

E embryonic day, P postnatal day



Figure 4 Western blot of *Lgil* protein in the different ages studied. Each lane represents the right hemisphere of one animal with the following ages: E13, E15, E17, E18 (E embryonic day), P1, P7, P14

(P postnatal day), and 8-week-old (w). S standard protein marker. The filled arrow indicates *Lgil* (~65 kDa), and the head arrow indicates β -actin (42 kDa)

Discussion

Real-time PCR has been extensively used in gene expression studies, although several parameters need to be controlled to obtain reliable quantitative expression data; these are initial sample quantification, RNA integrity, and most importantly, data normalization (Tanic et al. 2007). To normalize the reaction, it is mandatory to use a gene (an endogenous control) whose expression is not influenced by the experimental variants. In our study, these variants were animal age and brain hemispheres. Therefore, we carefully selected two endogenous control genes, *Gapdh* and β -actin, which are believed to be the most suitable genes for quantification studies under variable age in rat cortex (Tanic et al. 2007). In addition, another important point of concern is probe specificity. To confirm this, we did a blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) and found that our probe solely matches *Lgil* sequence (data not shown).

LGII was first described as a tumor suppressor gene involved in malignant progression of glial tumors (Chernova et al. 1998). However, mutations in this gene or differential methylation status were not found in malignant gliomas (Somerville et al. 2000; Krex et al. 2002), and there are no indications of brain tumors or other malignancies in patients with ADPEAF (Brodtkorb et al. 2005; Gu et al. 2005). In contrast, a recent study using transgenic mice demonstrated that *LGII* is presented in neurons and glial cells, and also in

different organs as prostate, kidney, endometrium, ovary, and testis (Head et al. 2007). The fact that *LGII* contains a leucine-rich repeat (LRR) domain, which is present in proteins involved in development and differentiation of the neural system, such as slit, toll, and tartan (Chernova et al. 1998) pointed to a possible role in CNS development. In addition, there is a number of recent clinical evidence suggesting a role of *LGII* in developmental abnormalities in the temporal lobes, especially on the left hemisphere (Kobayashi et al. 2003; Brodtkorb et al. 2005; Gu et al. 2005; Pisano et al. 2005).

A number of studies have determined *Lgil* expression in adult mouse using immunohistochemistry or in situ hybridization (Kalachikov et al. 2002; Morante-Redolat et al. 2002; Senechal et al. 2005; Piepoli et al. 2006; <http://www.gensat.org>). Although they precisely localize *LGII* in specific cellular compartments, they do not generate an expression profile. Therefore, our study was the first to accurately quantify *Lgil* expression during CNS development and compare it with expression levels found in adult animals. Our results clearly showed an increase of *Lgil* expression during development till the highest expression levels found in adult animals (Figs. 2, 3, and 5 and Table 1).

Recent reports indicated a possible double role for *LGII*: acting presynaptically modulating the inactivation rate of Kv1.1 channels (Schulte et al. 2006) and postsynaptically, as a secreted protein, regulating surface expression of AMPA receptors (Fukata et al. 2006). As AMPA receptors and Kv1.1 subunits increase with animal aging (Liao et al.

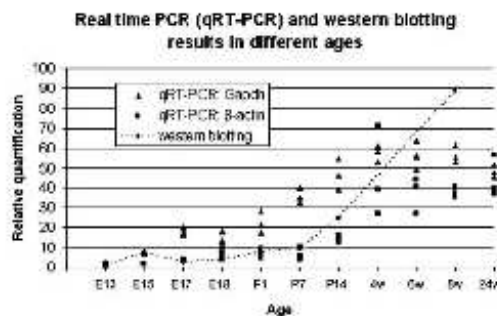


Figure 5 *Lgil* gene expression dispersion diagram for real-time PCR and Western blot data, both using E13 sample as the calibrator. Real-time PCR data comprise results from the right and left hemispheres (together) of three animals studied for both endogenous controls. E embryonic day, P postnatal day, w weeks

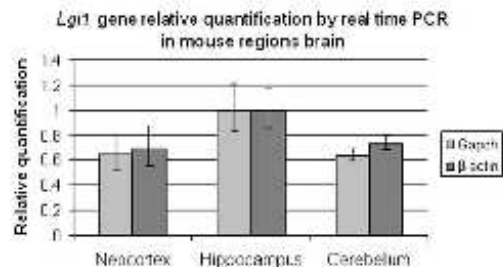


Figure 6 *Lgil* gene expression in different regions of the mouse brain for both endogenous controls, using the hippocampus sample as the calibrator. Vertical bars indicate minimum and maximum relative quantification (RQ), which is given by the SDS Software v1.3 (Applied Biosystems)

1999; Grosse et al. 2000) due to increase in neuronal circuitry activation, it is possible that the gradual increase in *Lgll* expression during CNS development is solely reflecting the maturation of neuronal circuits, as the adult animals have new experiences and increase in sensorial stimuli. Alternatively, we propose that the observed pattern of *Lgll* expression could be explained by an inhibitory function on neuronal proliferation. Thus, in more advanced ages, when neurons are already differentiated, its inhibitory function might be crucial. Kunapuli et al. (2003) demonstrated that forced expression of *LGII* in glioma cell lines significantly reduced the proliferation and migration ability of these cells. Therefore, one might speculate that the enlargement of the lateral temporal lobe found in patients with ADPEAF (Kobayashi et al. 2003) could be related to *LGII* loss of function due to mutations.

The Western blot experiments corroborated the *Lgll* messenger RNA (mRNA) quantification, showing an increased expression of this protein in the last developmental stages studied (P14 and 8-week-old animals). Previous study using this same technique also identified a progressively increase of *LGII* protein during animal maturation (Fukata et al. 2006). There are several limitations with the Western blot experiments: First, it is a semi-quantitative method; in addition, there are reports of cross-reactivity between commercial *LGII* antibody and other *LGII* proteins (Senechal et al. 2005; Head et al. 2007), which makes mRNA quantification methods more reliable.

Furthermore, we observed a higher *Lgll* expression in the hippocampus when compared to the neocortex and the cerebellum in adult mice; however, these differences were not statistically significant. Previous studies using immunohistochemistry (Morante-Redolat et al. 2002; Schulte et al. 2006) or in situ hybridization (Kalachikov et al. 2002; Senechal et al. 2005; Fukata et al. 2006) also showed a higher expression of *Lgll* in the hippocampus, but both techniques are not quantitative and are sensitive to a bias effect caused by higher density of cell bodies present in the hippocampus. This effect is not present in quantitative real-time PCR as used in our study.

Understanding patterns of gene expression in brain research is expected to provide insights into complex neurobiological mechanisms involved in epileptogenesis and other neurological syndromes. This study is the first to determine a specific profile of *Lgll* gene expression during CNS development, which suggests a possible inhibitory function. In addition, we did not find differences in hemispheric expression that could explain the predominance of left-sided abnormalities in patients with ADPEAF.

Acknowledgment We thank Tiago Campos Pereira for the helpful review of this manuscript. This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil. P.A.O.

R. received a studentship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. F.F.G. received a studentship from the Brazilian Education Ministry—CAPES, São Paulo, Brazil.

References

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with image. *Journal in Biophotonics International*, 11 (7), 36–42.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., & Dos Santos, A. S. (2003). *BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade civil Mamirauá, Brasília.
- Brodtkorb, E., Gu, W., Nakken, K. O., Fischer, C., & Steinlein, O. K. (2002). Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia*, 43(3), 228–235.
- Brodtkorb, E., Steinlein, O. K., & Sand, T. (2005). Asymmetry of long-latency auditory evoked potentials in *LGII*-related autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 46(10), 1692–1694.
- Cendes, F., Kobayashi, E., & Lopes-Cendes, I. (2005). Familial temporal lobe epilepsy with auditory features. *Epilepsia*, 46 (Suppl. 10), 59–60.
- Chernova, O. B., Somerville, R. P. T., & Cowell, J. K. (1998). A novel gene, *LGII*, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene*, 17, 2873–2881.
- Deshane, J., Chaves, L., Sarikonda, K. V., et al. (2004). Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7872–7883.
- Fukata, Y., Adenik, H., Iwanaga, T., Brecht, D. S., Nicoll, R. A., & Fukata, M. (2006). Epilepsy-related ligand/receptor complex *LGII* and *ADAM22* regulate synaptic transmission. *Science*, 313(5794), 1792–1795.
- Grosse, G., Duguhn, A., Höhne, L., Tapp, R., Veh, R. W., & Ahmert-Hilger, G. (2000). Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: Development and activity-dependent regulation. *The Journal of Neuroscience*, 20(5), 1869–1882.
- Gu, W., Brodtkorb, E., Piepoli, T., Finocchiaro, G., & Steinlein, O. K. (2005). *LGII*: A gene involved in epileptogenesis and glioma progression. *Neurogenetics*, 6(2), 59–66.
- Gu, W., Brodtkorb, E., & Steinlein, O. K. (2002). *LGII* is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Annals of Neurology*, 52, 364–367.
- Head, K., Gong, S., Joseph, S., et al. (2007). Defining the expression pattern of the *LGII* gene in BAC transgenic mice. *Mamm. Genome*, 18(5), 328–337.
- Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., et al. (2002). Mutations in *LGII* cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nature Genetics*, 30, 335–341.
- Kobayashi, E., Santos, N. F., Torres, F. R., et al. (2003). Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Archives of Neurology*, 60, 1546–1551.
- Krex, D., Haues, M., Appelt, H., et al. (2002). Physical and functional characterization of the human *LGII* gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathologica*, 103(3), 255–266.
- Kunapuli, P., Chitta, K. S., & Cowell, J. K. (2003). Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the *LGII* gene. *Oncogene*, 22(26), 3985–3991.
- Liao, D., Zhang, X., O'Brien, R., Ehlers, M. D., & Huganir, R. (1999). Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, 2(1), 37–43.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25(4), 402–408.

- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 609–614.
- Michelucci, R., Pozz, J. J., Sofia, V., et al. (2003). Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: Clinical spectrum, new epileptin mutations and genetic heterogeneity in seven European families. *Epilepsia*, 44(10), 1289–1297.
- Morante-Redolat, J. M., Gorostidi-Pagola, A., Piquer-Sinerol, S., et al. (2002). Mutations in the LGI1/Epileptin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Human Molecular Genetics*, 11, 1119–1127.
- Onofre, F. I. (2005). Vaginal mucous plug and weight gain in mice. *Tech talk—The newsletter for laboratory animal science technicians*, 10(6), 4.
- Ottman, R., Risch, N., Hauser, W. A., et al. (1995). Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.*, 10(1), 56–60.
- Ottman, R., Winawer, M. R., Kalachikov, S., et al. (2004). LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*, 62, 1120–1126.
- Piepoli, T., Jakupoglu, C., Gu, W., et al. (2006). Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro Oncology*, 8(2), 96–108.
- Pisano, T., Marini, C., Brovedani, P., et al. (2005). Abnormal phonologic processing in familial lateral temporal lobe epilepsy due to a new LGI1 mutation. *Epilepsia*, 46(1), 118–123.
- Pizzati, A., Flex, E., Di Bonaventura, C., et al. (2003). Epilepsy with auditory features: A LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Annals of Neurology*, 53, 396–399.
- Pozz, J. J., Saez, A., Martínez-Gil, A., et al. (1999). Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: Clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Annals of Neurology*, 45(2), 182–188.
- Schulte, U., Thumfart, J. O., Klockner, N., et al. (2006). The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron*, 49(5), 697–706.
- Senechal, K. R., Thaller, C., & Noebels, J. L. (2005). ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics*, 14(12), 1613–1620.
- Somerville, R. P., Chernova, O., Liu, S., Shoshan, Y., & Cowell, J. K. (2000). Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1. *Mammalian Genome*, 11(8), 622–627.
- Tanic, N., Perovic, M., Mladenovic, A., Ruzdijic, S., & Kanazir, S. (2007). Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus—Evaluation by real time RT-PCR. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32(1), 38–46.
- SAS Institute Inc. (1999–2001). The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), v8.02. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.

Artigo 2

MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System
Development”.

Journal of Molecular Neuroscience, 2008; 35(3):331-7

MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development

Danyella B. Dogini · Patrícia A. O. Ribeiro ·
Cristiane Rocha · Tiago C. Pereira · Iscia Lopes-Cendes

Received: 20 February 2008 / Accepted: 13 March 2008
© Humana Press 2008

Abstract MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression in a post-transcriptional sequence-specific manner. In order to better understand the possible roles of miRNAs in central nervous system (CNS) development, we examined the expression profile of 104 miRNAs during murine brain development. We obtained brain samples from animals at embryonic days (E) E15, E17, and postnatal days (P) P1 and P7. Total RNA was isolated from tissue and used to obtain mature miRNAs by reverse transcription. Our results indicate that there is a group of 12 miRNAs that show a distinct expression profile, with the highest expression during embryonic stages and decreasing significantly during development. This profile suggests key roles in processes occurring during early CNS development.

Keywords miRNA · Quantitative RT-PCR · Mouse · Brain development

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small endogenous noncoding RNAs that negatively regulate gene expression in a post-transcriptional sequence-specific manner (Bartel 2004). In *Drosophila*, miRNAs associate with argonaute

proteins in complexes that repress protein synthesis by a double interaction with target messenger RNA (Peters and Meister 2007). MiRNAs are predicted to regulate expression of at least one-third of all human genes and are known to be of great importance in a wide variety of biological processes, including cell cycle regulation, apoptosis, cell differentiation, maintenance of stemness, and imprinting (Ketting et al. 2001; Ambros 2004; Bartel 2004; Wienholds and Plasterk 2005; Wienholds et al. 2005; Lee et al. 2004).

Generation of cellular diversity during development requires coordination of gene expression mediated by both positive and negative (post-) transcriptional regulation (Wienholds and Plasterk 2005; Kloosterman and Plasterk 2006). Therefore, it is reasonable to predict that miRNAs characteristic temporal- and spatial-restricted expression pattern probably plays a role in brain morphogenesis and neuronal fate, which are key biological processes in central nervous system (CNS) development (Mansfield et al. 2004; Nelson et al. 2004; Vo et al. 2005; Krichevsky et al. 2003, 2006; Conaco et al. 2006; Wulczyn et al. 2007).

In order to investigate the possible roles of miRNAs in murine CNS development, we examined the expression profile of 104 miRNAs during this process.

Materials and Methods

Programmed matings were carried out using specific pathogen free BALB/c/UNI mice (*Mus musculus*) in order to obtain embryos at specific developmental stages. Brains of three animals at the following ages were collected and frozen in liquid nitrogen: embryonic day (E) E15, E17, postnatal day (P) P1, and P7. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the University of Campinas (Campinas, Brazil).

This paper was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP).

D. B. Dogini · P. A. O. Ribeiro · C. Rocha · T. C. Pereira ·
I. Lopes-Cendes (✉)
Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences,
University of Campinas—UNICAMP,
Tessália Vieira de Camargo, 126,
Campinas, 13084-971 São Paulo, Brazil
e-mail: icendes@unicamp.br

Total RNA was isolated from tissue using Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) and pools of three samples were used for each age studied. We obtained mature miRNAs by stem-loop reverse transcription as previously described (Chen et al. 2005) using the Human Panel Early Access™ kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), which contains 104 of the 489 miRNAs listed in the Sanger miRBase database (<http://microrna.sanger.ac.uk>). This kit uses stem-loop primers to produce cDNAs from each expressed miRNA, by annealing to their specific 7-nucleotide seed regions. The *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) gene was used as an endogenous control and all experiments were performed in duplicates. An overview of the methodology is illustrated in Fig. 1.

The relative quantification (RQ) of miRNAs expression was calculated by the comparative threshold cycle, which is determined using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). The values of relative gene expression were dispersed in a Gauss curve and the ANOVA test was used to access differences in gene expression among different developmental stages. Statistical analysis was carried out using the BioEstat 3.0 software (Ayres et al. 2003).

Bioinformatics studies were performed using two cluster analysis tools: the self-organizing map (SOM) and the hierarchical cluster, both using R—The R Project for Statistical Computing (R Development Core Team 2007). The SOM represents the result of a vector quantization algorithm that places a number of reference vectors into a high-dimensional input data space to approximate to its data sets in an ordered fashion and it is used to visualize metric ordering relations of input samples (Kohonen 1997). In hierarchical clustering, the data are not partitioned into a particular cluster in a single step, but instead a series of partitions takes place, which may run from a single cluster containing all objects to n clusters each containing a single object (Herrero and Dopazo 2002).

Prediction of potential mammalian miRNAs targets was carried out using three different programs simultaneously (TargetScans, miRanda and PicTar, in <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>, Sethupathy et al. 2006). Only targets identified in the three programs used were recorded.

Results

We determined the expression profile of 104 miRNAs during four stages of murine CNS development (Table 1). Values are presented as the fold change in gene expression normalized to the endogenous control and relative to the calibrator (Livak and Schmittgen 2001), which was chosen

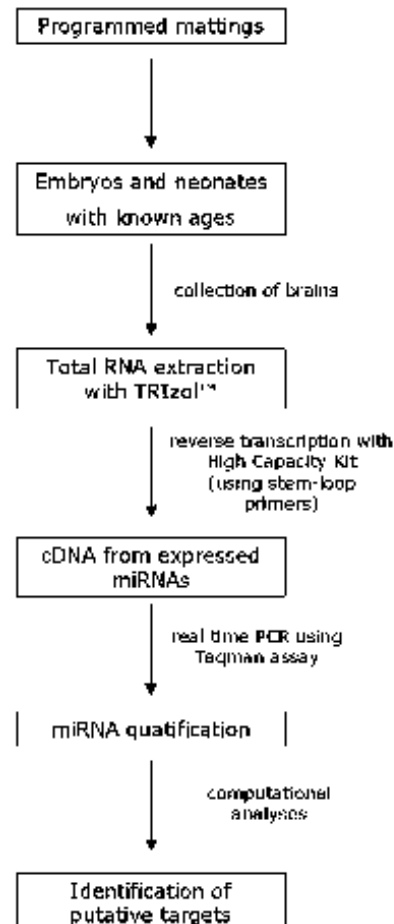


Figure 1 Overview of the methodology used for microRNA quantification. Each stem loop RT primer amplifies a specific miRNA using a 7-nucleotide complementary sequence. Generated cDNAs are quantified through real time PCR

arbitrarily in our study as the expression of let7a sample in E15 stage.

Subsequently, we used the raw data obtained in the quantitative RT-PCR experiments to sort miRNAs according to their expression profile by hierarchical cluster programs. They classified them into three distinct groups depicted in Fig. 2. At the bottom section of Fig. 2, five miRNAs with the highest expression during embryonic stages can be found: miR214, miR130a, miR125a, miR9, and miR125b. In the mid-portion of Fig. 2, miRNAs with low expression in all developmental stages are depicted; the top section comprises miRNAs whose relative expression are

Table 1 Putative biological functions to target genes for microRNAs in cluster C1, according to three different programs (TargetScans, miRanda and PicTar—<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>)

miRNA	Possible target gene	Targeted gene functions	Expression profile
miR-124a	NEUROD1 (Neurogenic differentiation factor 1)	Cell differentiation; neurogenesis	During cortical development (Przybowski et al. 2000); in humans, peak expression occurs in gestational week 19 (Franklin et al. 2001)
miR-125a	MYT1 (Myelin transcription factor 1)	Transcription factor activity; neurogenesis	Restricted to the developing nervous system—marker of primary neurogenesis (Bellefroid et al. 1996)
miR-125b	BAI1 (Brain-specific angiogenesis inhib. 1)	Inhibition of angiogenesis and neuronal differentiation; neurogenesis	Peak level in postnatal day 10, expressed in most neurons of cerebral cortex and hippocampus (Koh et al. 2001)
miR-130	GAP43 (Axonal membrane protein GAP-43)	Regulation of cell growth; neurogenesis	High expression in developing and regenerating nerve cells (Margolis et al. 1991)
miR-140	JAG1 (Jagged-1 precursor)	Regulation of cell migration; neurogenesis; control of cell specification and differentiation; DNA binding protein	In granule/geminate layer of neonatal mice (Gazit et al. 2004)
miR-205	NCAM1 (Neural cell adhesion molecule 1)	Cell-cell signaling; cell adhesion; neurogenesis	In neuronal precursor cells (Shanley and Sullivan 2007)
miR-9	CNTFR (Ciliary neurotrophic factor rec. alpha)	Enhances adult CNS neurogenesis; signal transduction; cytokine receptor; neurogenesis	Throughout the adult nervous system (Emsley and Hagg 2003)
miR-181a	SEMA4G (Semaphorin-4G precursor)	Cell differentiation; receptor activity; neurogenesis	During developing central and peripheral nervous systems as well as in several somatic tissues (Li et al. 1999)
miR-199a	ATXN7 (Spinocerebellar ataxia type 7 protein)	Nuclear organization; histone acetylation; neurogenesis	In adult mouse tissues, high expression level in brain (Strom et al. 2002)
miR-301	SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25)	Neurotransmitter uptake and secretion; neurogenesis	Highly expressed in adult brain (Zhao et al. 1994)

Only targets identified in the three programs used were recorded.

not as high as the group represented at the bottom, but are higher than those represented in the middle section: miR301, miR200a, miR205, miR199a, miR17–5p, miR181a, miR140, and miR124a.

The SOM analysis identified four distinct clusters of miRNAs according to their expression profile (C1, C2, C3, and C4; Fig. 3). However, only cluster C1 showed a significant difference ($p < 0.01$) in relative expression among the different ages examined. Cluster C1, which has 12 miRNAs (miR-9; miR-17–5p; miR-124a; miR-125a; miR-125b; miR-130a; miR-140; miR-181a; miR-199a; miR-205; miR-214; miR-301), has a very specific expression profile, showing high expression during embryonic stages (E15), decreasing progressively as the animals reach more mature postnatal stages (P7). The predicted mammalian targets for the 12 miRNAs in cluster 1 as well as data on their expression during development are summarized in Table 1.

Discussion

Post-transcriptional mechanisms such as alternative mRNA splicing, mRNA trafficking, and translational control are

believed to play important roles in the regulation of neural gene expression (Tiedge et al. 1999; Musumuru and Darnell 2001; Maniatis and Tasic 2002; Steward and Schuman 2003). It is becoming clearer that miRNAs are an important part of a novel regulatory pathway which needs further exploration.

The nervous system is a rich source of miRNAs that are involved in regulation of biological processes (Krichevsky et al. 2006; Miska et al. 2004). There is little evidence that miRNAs are involved in the early stages of neural induction (Zhang et al. 2006). Nevertheless, the specific expression of certain miRNAs in stem cells, where they might have a role in differentiation by negatively regulating the expression of key genes, suggests that neural induction might be a rich development point for more studies (Kosik 2006; Kosik and Krichevsky 2005). Following neural induction, the evidence for a role of miRNAs in CNS development is rather strong (Zhang et al. 2006; Kosik 2006).

We reported here the expression profile of 104 miRNAs, which are distributed according to specific temporal expression patterns during murine brain development. We want to draw special attention to the 12 miRNAs identified

Figure 2 Results of hierarchical cluster analysis with dendrogram. Each column represents an age: E15 (embryonic day 15); E17 (embryonic day 17); P1 (postnatal day 1); and P7 (postnatal day 7). MiRNAs with the highest relative expression at E15 are at the bottom section. MiRNAs with low relative expression in all developmental stages are represented in the *middle portion* and miRNAs whose expressions are not as high as the *bottom group*, but higher than those represented in the middle section, are on the *top section*

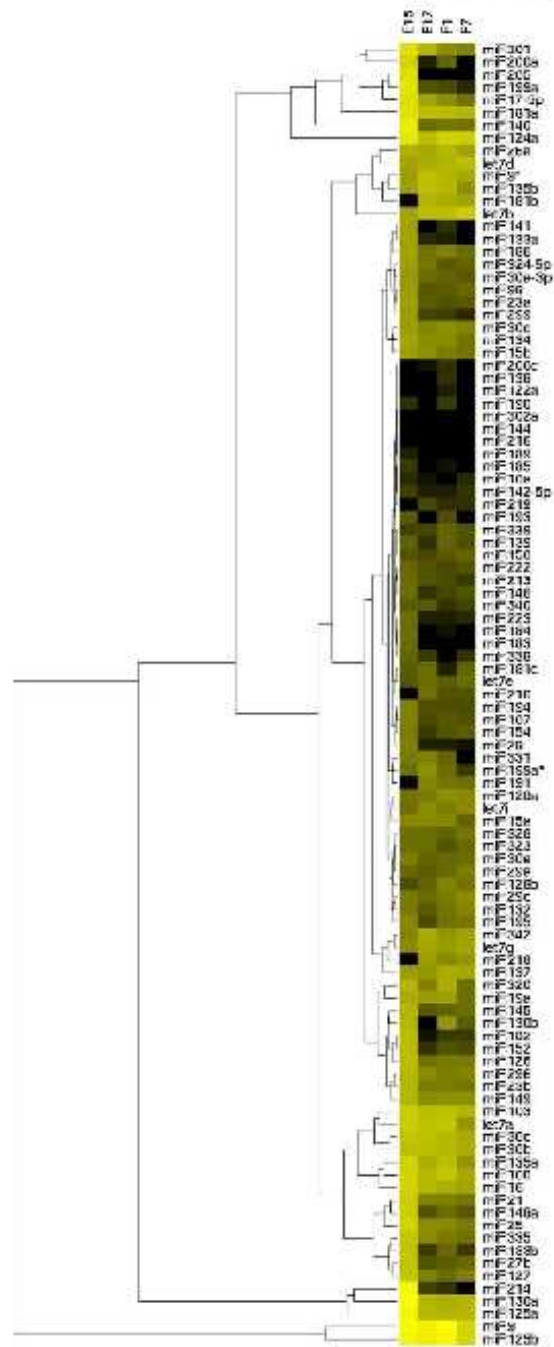
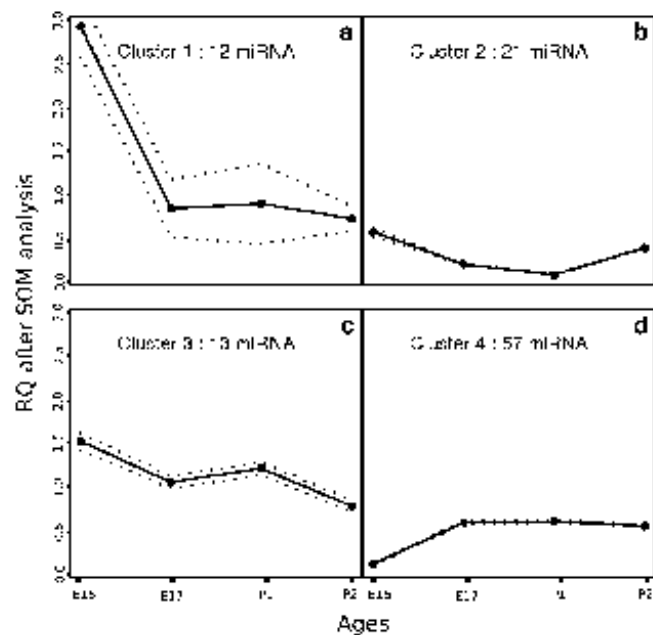


Figure 3 Results of self organization map (SOM) which generated four different clusters of miRNA expression: A cluster 1 (12 miRNAs); B cluster 2 (21 miRNAs); C cluster 3 (13 miRNAs); D cluster 4 (57 miRNAs). The standard deviation (SD) curve is represented as a dotted line (1SD)



in cluster 1, due to their distinct expression pattern: high expression during embryonic stage and decreasing as the brain develops. This profile is indicative of possible key roles in processes occurring during early CNS development. Many of these miRNAs, such as miR-124a and miR-125a, have already been reported to be up-regulated during neuronal maturation. Smirnova et al. (2005) verified in embryonic stem cells significant differences in the temporal expression pattern of a panel of highly expressed neural miRNAs. They have shown that neuron-specific miRNAs (miR-124a, miR-125a, and miR-128) gradually accumulated in parallel to neuronal maturation.

During oogenesis, the egg is loaded with several mRNAs which are needed for early development of the embryo. MiR-430 is the only abundant miRNA in the first 4–8 h after fertilization, promoting the down-regulation of maternal transcripts and allowing the zygotic genome expression. Lack of this miRNA causes a mix between the two sets of transcripts (maternal and zygotic), leading to the generation of embryos with subtle defects in gastrulation and brain morphogenesis (Cohen and Brennecke 2006). This abundant and early expression of miR-430 is conserved among vertebrates and indicate that miR-430 function in the maternal-zygotic transition may be a feature of vertebrate embryogenesis.

Strauss et al. (2006) show for the first time that cells express a miRNA signature characteristic of their develop-

mental stage. Using RNA from mouse embryonic stem cells (ES), embryoid bodies (EBs), day 11 mouse embryos, and mature somatic tissues (heart, brain, kidney, liver, and lung), they showed that both ES/EB present a less complex miRNA expression signature than do cells that are developmentally advanced and highly restricted. They observed that the brain expressed the most complex miRNA signature and liver the least one. Since the miRNA expression signature is correlated to a particular stage of differentiation, it seems that specific miRNA expression signatures reflect commitment to particular developmental lineages.

Computational analysis for target identification revealed that 10 of the 12 miRNAs present in cluster 1 have been reported to be involved in related processes, such as cell differentiation and cell adhesion. However, neurogenesis is a major biological process which was identified in our target search and is directly related to CNS development. According to Table 1, 10 of the 12 miRNAs in cluster 1 are predicted to regulate genes whose functions could be related to different pathways involved in neurogenesis. It is interesting to note that the decrease in expression of the 12 miRNAs in cluster C1 in the latter stages of development correlate with the increase in expression of the target genes listed in Table 1.

Nevertheless, it is important to point out that although the evidence exists, no clear functional role for miRNAs in

mammalian neurogenesis has been proved at the experimental level. In 2006, Krichevsky et al. demonstrated simultaneous high expression of miR-9 and miR-124a in the transition from neural precursor (NP) to neural differentiation (ND) cell stage transition. Since miR-124a is preferentially expressed in embryonic neurons, whereas miR-9 is expressed in both neurons and glia, these results suggest that early overexpression of miR-124a in NPs prevents gliogenesis, whereas miR-9 expression contributes to neurogenesis. In addition, an inhibition of miR-9 alone or in combination with miR-124a caused a reduction of neuronal differentiation from precursor cells. These observations are indications that indeed miRNAs could be important in gene regulation at this early neuronal differentiation stage.

It is also important to consider that miRNAs that are induced during CNS development could have multiple targets and interconnected combinatorial effects. In addition, several miRNAs may cooperatively target mRNAs with similar functions, and these events may imply unlimited number of regulatory combinations created by a network of co-expressed miRNAs that contribute to a highly complex cell response. By contrast, it is also conceivable that some of these miRNAs could have the same target gene (Kim 2005).

In conclusion, we identified a cluster of 12 miRNAs with a specific expression profile in CNS during mouse development. Further studies should be carried out addressing the specific role of these miRNAs in gene regulation of biological processes involved in CNS development.

References

- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350–355.
- Ayres, M., Ayres, M., Jr., Ayres, D. L., & Dos Santos, A. S. (2003). *BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade civil Mamirauá, Brasília.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and functions. *Cell*, 119, 281–297.
- Bellefroid, E. J., Bouguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D. J., Kintner, C., et al. (1996). X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell*, 87(7), 1191–1202.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179.
- Cohen, S. M., & Brennecke, J. (2006). Developmental biology: Mixed messages in early development. *Science*, 312(5770), 65–66.
- Conaco, C., Otto, S., Han, J. J., & Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2422–2427.
- Emsley, J. G., & Hagg, T. (2003). Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Experimental Neurology*, 183(2), 298–310.
- Franklin, A., Kao, A., Tapscott, S., & Unis, A. (2001). NeuroD homologue expression during cortical development in the human brain. *Journal of Child Neurology*, 16(11), 849–853.
- Gazit, R., Krizhanovsky, V., & Ben-Arie, N. (2004). Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development*, 131(4), 903–913.
- Herero, J., & Dopazo, J. (2002). Combining hierarchical clustering and self-organizing maps for exploratory analysis of gene expression pattern. *Journal of Proteome Research*, 1, 467–470.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Benstein, E., Sijen, T., Hammond, G. J., & Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in development timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, 15(20), 2654–2659.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385.
- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental Cell*, 11(4), 441–450.
- Koh, J. T., Lee, Z. H., Ahn, K. Y., Kim, J. K., Bae, C. S., Kim, H. H., et al. (2001). Characterization of mouse brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) and phytanoyl-CoA α -hydroxylase-associated protein 1, a novel BAI1-binding protein. *Molecular Brain Research*, 87(2), 223–237.
- Kohonen, T. (1997). *Self-organizing maps*. New York, NY: Springer.
- Kosik, K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(12), 911–920.
- Kosik, K. S., & Krichevsky, A. M. (2005). The elegance of microRNAs: A neuronal perspective. *Neuron*, 47(6), 779–782.
- Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khmapko, K., & Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*, 9(10), 1274–1281.
- Krichevsky, A. M., Scemttag, K. C., Isaacson, O., & Kosik, K. S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, 24(4), 857–864.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69–81.
- Li, H., Wu, D. K., & Sullivan, S. L. (1999). Characterization and expression of sema4g, a novel member of the semaphorin gene family. *Mechanisms of Development*, 87(1–2), 169–173.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Maniatis, T., & Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418(6894), 236–243.
- Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nature Genetics*, 36(10), 1079–1083.
- Margolis, F. L., Verhaagen, J., Biffo, S., Huang, F. L., & Grillo, M. (1991). Regulation of gene expression in the olfactory neuroepithelium: A neurogenic matrix. *Progress in Brain Research*, 89, 97–122.
- Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., et al. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biology*, 5(9), R68.

- Misumaru, K., & Darnell, R. B. (2001). Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 239–262.
- Nelson, P. T., Hatzigeorgiou, A. G., & Mourelatos, Z. (2004). miRNP: mRNA association in polyribosome in a human neuronal cell line. *RNA*, 10(3), 387–394.
- Peters, L., & Meister, G. (2007). Argonaute proteins: Mediators of RNA silencing. *Molecular Cell*, 26(5), 611–623.
- Przyboriski, S. A., Morton, I. E., Wood, A., & Andrews, P. W. (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3521–3528.
- R Development Core Team (2007). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<http://www.R-project.org/en/>).
- Sethupathy, P., Megraw, M., & Hatzigeorgiou, A. G. (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nature Methods*, 3, 881–886.
- Shanley, D. K., & Sullivan, A. M. (2007). Expression of the cell surface markers mAb 2F7 and PSA-NCAM in the embryonic rat brain. *Neuroscience Letters*, 424(3), 165–169.
- Smirnova, L., Gmfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., & Wulczyn, F. G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1469–1477.
- Steward, O., & Schuman, E. M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, 40(2), 347–359.
- Strauss, W. M., Chen, C., Lee, C. T., & Ridzon, D. (2006). Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mammalian Genome*, 17(8), 833–840.
- Ström, A.-L., Jonasson, J., Hart, P., Brannstrom, T., Fongren, L., & Holmberg, M. (2002). Cloning and expression analysis of the murine homolog of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) gene. *Gene*, 285, 91–99.
- Tiedge, H., Bloom, F. E., & Richter, D. (1999). RNA, whither goest thou? *Science*, 283(5399), 186–187.
- Vo, N., Klein, M. E., Varlamova, O., Keller, D. M., Yamamoto, T., Goodman, R. H., et al. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16426–16431.
- Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., et al. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309(5732), 310–311.
- Wienholds, E., & Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS*, 597(26), 5911–5922.
- Wulczyn, F. G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwizdzinski, E., Nimmemann, O., et al. (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB Journal*, 21(2), 415–426.
- Zhang, B., Pan, X., & Anderson, T. A. (2006). MicroRNA: A new player in stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 209(2), 266–269.
- Zhao, N., Hashida, H., Takahashi, N., & Sakaki, Y. (1994). Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA. *Gene*, 145(2), 313–314.

**Resumo das cirurgias para RNAi realizadas em camundongos e
ratos**

ADULTOS

nº de animais	tratamento	molécula	injeção				retirada do cérebro
			volume	massa	nº	local	
4	Lipofectamina (1:1)	si_Lgi1	1,5µL	7,5µg	1	ventrículo lateral	24 e 48 hpi
4	PBS (1:1)	si_Lgi1	1 e 2µL	5 e 10µg	1	neocórtex	24 e 28 hpi
4	canulação + Lipo (1:1)	si_Lgi1	2µL	10µg/inj.	10 (2/dia)	3º ventrículo	após última injeção
6	canulação + Lipo (1:2 lipo)	si_Stealth	2µL	1pmol/inj	6 (2/dia)	hipocampo	após última injeção
2	eletroporação (30´pi)	si_Stealth	5µL	100ng	1	hipocampo	7 e 27 hpi
4	eletroporação (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	1 e 24 hpi
10	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	24 e 48 hpi
7	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Lgi1 e si_irrelevante	5µL	1µg	1	hipocampo	24 hpi
5	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	12 hpi
5	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	24 hpi
5	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	3 dias pi
5	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	5 dias pi
5	eletroporação c/ 2 BTX (30´pi)	si_Stealth	5µL	1µg	1	hipocampo	7 dias pi
1	minibomba de 7 dias	si_Stealth	84µL	24µg	contínua	3º ventrículo	8 dias após cirurgia
2	minibomba de 7 dias	si_Stealth e si_irrelevante	84µL	24µg	contínua	3º ventrículo	8 dias após cirurgia
3	minibomba de 14 dias	si_Stealth	84 e 66µL	24 e 18 µg	contínua	3º ventrículo	11 e 14 dias após cirg.
4	minibomba de 14 dias	si_Lgi1	84µL	840ug	contínua	3º ventrículo	14 dias após cirurgia
9	RVG / veia caudal	si_Stealth e si_Gapdh	200µL	50µg/inj	3	veia caudal	72 hpi (1a)
10	RVG / veia caudal	si_Lgi, si_Lgi1_dna e si_Gapdh	200µL	50µg/inj	3	veia caudal	72 hpi (1a)
10	RVG / veia caudal	si_Amb, si_Lgi1_b e esiRNA	200µL	50 ou 5µg/inj	3	veia caudal	72 hpi (1a)
14	RVG / veia caudal	si_Amb, si_Lgi1, si_Stealth e esiRNA	200µL	50 ou 5µg/inj	2	veia caudal	24 hpi (1a)
6	RVG / veia caudal (rato)	si_Amb	500µL	25µg/inj	2	veia caudal	48 hpi (1a)

NEONATOS

nº de animais	tratamento	molécula	injeção				retirada do cérebro
			volume	massa	nº	local	
5	Lipofectamina (1:19 lipo)	si_Mecp2	1µL	50ng	1	córtex	26 hpi
6	PBS ou Lipo (1:1)	si_Lgi1	1 e 2µL	5 e 10µg	1	córtex	4 e 22 hpi
4	Lipofectamina (1:19 lipo)	si_Lgi1	1µL	50ng	1	córtex	24 hpi
5	Lipofectamina (1:19 lipo)	si_Lgi1	1µL	50ng	1	córtex	0, 30min e 1h pi
5	Lipofectamina (1:9 lipo)	si_Stealth	5µL	140ng	1	córtex	3 hpi