

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FÁBIO FRANGIOTTI CONTE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DO
TRANSCRITO DO GENE *EFHC1* NO CÉREBRO DE
ROEDORES DURANTE O DESENVOLVIMENTO E NO
ANIMAL ADULTO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FÁBIO FRANGIOTTI CONTE
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C767a

Conte, Fábio Frangiotti

Análise da expressão e localização do transcrito do gene *Efhc1* no cérebro de roedores durante o desenvolvimento e no animal adulto / Fábio Frangiotti Conte. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Iscia Lopes-Cendes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epilepsia mioclônica juvenil. 2. Expressão gênica.
3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Hibridização *in situ*. 5. Interferência de RNA. I. Lopes-Cendes, Iscia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Analysis of the expression profile and distribution of *Efhc1* gene transcript during rodent brain development and in the adult animal.

Palavras-chave em inglês: Juvenile myoclonic epilepsy; Gene expression; Polymerase chain reaction; In situ hybridization; RNA interference.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Iscia Lopes-Cendes, Fábio Papes, Maria de Fátima Sonatti, Ângela Cristina do Valle, Débora Amado Scerni.

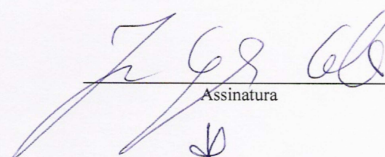
Data da defesa: 25/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 25 de Março de 2009

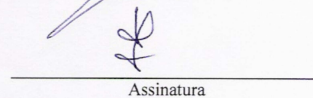
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Fábio Papes



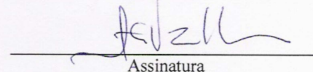
Assinatura

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonatti



Assinatura

Profa. Dra. Ângela Cristina Valle



Assinatura

Profa. Dra. Déboda Amado Scerni

Assinatura

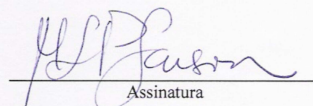
Profa. Dra. Mônica Mello

Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson



Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me agraciado com saúde, força e perseverança, e por ter me dado a oportunidade de realizar esta tese de doutorado.

A Ana Luiza, por ter me dado a honra de amá-la e de viver ao lado dela.

A Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes, por ter me recebido em seu laboratório e pela oportunidade de desenvolver esta tese.

Aos meus pais que, mesmo distantes, estiveram sempre presentes na minha vida. Obrigado por todos esses anos de dedicação, amor, carinho, respeito e, principalmente, confiança.

A minha irmã, Ana Lúcia, que me enche de orgulho por ter se tornado a pessoa que é.

Aos os meus amigos, em especial ao Rafael (Oni), Alexandra, Mário, Tatiana, Tininha, Jair, Miriam, Luis Antônio, Mariana e Daniel. São pessoas maravilhosas que me brindaram com suas presenças na minha vida.

Ao pessoal do laboratório (Camila, Danyella, Mariana, Patrícia, Rafael, Vinícius), pela convivência harmoniosa e pelo carinho com que sempre me trataram. Devo muito desta tese a vocês.

Ao pessoal do DNA, em especial ao Fábio Rossi, Daniela Aguiar e Luciana Bonadia, pela companhia no bandeirão (e fora dele também) e pela amizade.

Às agências financiadoras CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado e por financiarem este projeto.

RESUMO

A epilepsia é uma condição bastante freqüente que atinge aproximadamente 1,5% da população geral, sendo mundialmente considerada um problema de saúde pública. O termo epilepsia engloba um grupo de distúrbios neurológicos crônicos com diferentes etiologias, manifestações e prognósticos, mas que possuem como característica comum as crises convulsivas recorrentes. A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) é caracterizada por abalos mioclônicos principalmente ao despertar. A EMJ tem sido uma das formas de epilepsia mais amplamente estudadas do ponto de vista molecular.

Recentemente, um dos genes causadores da EMJ foi clonado. Este gene, chamado de *EFHC1*, codifica uma proteína que possui 640 aminoácidos e que possui três domínios estruturais DM10, de função desconhecida, e um motivo de ligação a cálcio, chamado de EF-hand. A proteína EFHC1 associa-se a microtúbulos e, dessa forma, participa ativamente do processo de divisão celular. Além disso, esta proteína induz apoptose em neurônios através da sua associação com um canal de cálcio voltagem-dependente ($Ca_v2.3$). Foram identificadas cinco mutações no gene *EFHC1* que co-segregam com o quadro epiléptico em pacientes acometidos por EMJ. As proteínas mutadas codificadas por estas variantes têm a capacidade pró-apoptótica reduzida.

Os genes ortólogos de camundongo e rato, chamados de *Efhc1*, também foram isolados. O gene murino codifica uma proteína de aproximadamente 75KDa, homóloga à proteína Rib72 de *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteína Efhc1 é abundante em tecidos e órgãos que possuem flagelos ou cílios móveis, como, por exemplo, os testículos, os ovidutos e, no sistema nervoso central (SNC), as células endoteliais. No epêndima, a proteína Efhc1 é essencial para a manutenção da freqüência de batimento ciliar destas células.

Os principais objetivos desta tese foram a determinação do perfil de expressão do gene *Efhc1* e a avaliação da viabilidade de estudos funcionais pela modulação de sua expressão no cérebro de roedores em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os experimentos de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real revelaram que não há diferença na expressão do transcrito do gene *Efhc1* entre os hemisférios cerebrais nas duas espécies. Os ensaios de *Western blot* corroboraram este achado. Além disso, os maiores níveis do transcrito destes genes são observados nos estágios intra-uterinos nos camundongos e nos animais adultos em ratos. Em comum, há um decréscimo progressivo na expressão dos genes a partir de neonatos de 1 dia de vida (P1) até P14. Os estudos de hibridização *in situ* mostraram que o transcrito dos genes *Efhc1* destas espécies é expresso nas células endoteliais, as quais revestem as paredes dos ventrículos cerebrais.

Estes resultados sugerem que a expressão do gene *Efhc1* é mais importante durante as fases iniciais do desenvolvimento do cérebro e que, neste estágio, a proteína Efhc1 pode estar envolvida no surgimento dos mecanismos epileptogênicos subjacentes a EMJ.

A técnica de interferência por RNA (RNAi) promove o silenciamento gênico potente e específico e foi utilizada neste projeto com o intuito de estudar a função do gene *Efhc1* em células de mamíferos em cultura e no cérebro de camundongos em desenvolvimento. Esta abordagem tem sido amplamente utilizada para esta finalidade.

Tanto para os experimentos com cultura celular quanto para os experimentos *in vivo*, a confirmação do silenciamento gênico ocorreu via Real Time PCR e *Western blot*. Além disso, foram utilizados controles negativos (injeção apenas com tampão e siRNA irrelevantes).

Inicialmente, foram desenhadas e sintetizadas duas moléculas de siRNA, as efetoras da RNAi, que promovem um silenciamento gênico temporário, e uma molécula de shRNA (*short hairpin* RNA), cujo efeito é duradouro.

Nos experimentos com cultura de células, foram utilizados diferentes tipos celulares, desde cardiomiócitos de rato até células de camundongos derivadas de neuroblastoma (Neuro2A). Já para o silenciamento do gene no cérebro de camundongos em desenvolvimento, foram utilizadas diferentes metodologias de inoculação da molécula, como, por exemplo, cirurgia intra-uterina, transfecção hidrodinâmica, injeção na veia jugular e associação do siRNA com um peptídeo derivado de uma glicoproteína do vírus da raiva.

Como resultado, obteve-se silenciamento duradouro e consistente do gene *Efhc1* em cultura de células Neuro2A. A maior porcentagem de silenciamento gênico (60%) foi obtida após 48h de incubação do siRNA com as células e o gene permaneceu silenciado por até 6 dias. Além disso, o silenciamento do gene *Efhc1* no Sistema Nervoso Central de roedores (redução da expressão em até 45%) foi alcançado pela complexação do siRNA com um peptídeo derivado do vírus da raiva, o *RVG-9R*.

Espera-se que os resultados deste estudo sejam capazes de fortalecer a associação do gene *EFHC1* e o fenótipo de EMJ, além de fornecer maiores subsídios para identificar os possíveis mecanismos biológicos envolvidos na fisiopatologia da EMJ, os quais permanecem ainda muito controversos.

ABSTRACT

Epilepsy is a frequent condition that affects around 1.5% of general population and is considered worldwide as a public health problem. The term epilepsy refers to a group of chronic neurological disorders with different etiologies and prognostics. However, a common characteristic of all epilepsies is the recurrence of seizures. Juvenile myoclonic epilepsy (JME), one of the most common forms of epilepsy, is characterized by myoclonic seizures mainly at awakening. JME has been intensively studied at the molecular level.

Recently, one of the putative causative genes for JME was cloned. This gene, called *EFHC1*, encodes a protein with 640 amino acids that has three DM10 domains, with unknown function, and a calcium binding motif, called Ef-Hand. EFHC1 protein associates with microtubules and, therefore, it actively participates in the cellular division process. In addition, it has been demonstrated that this protein induces apoptosis in cultured neurons through the association with an R-type voltage-dependent calcium channel (Cav2.3). To date, five different EFHC1 missense mutations identified in patients with JME were shown to decrease this pro-apoptotic function in cell models.

The ortholog genes in mouse and rat, both named *Efhc1*, were also isolated. The murine gene encodes a protein with around 75KDa, homolog to *Chlamydomonas reinhardtii* Rib72 protein. Efhc1 protein presents its highest expression levels in tissues and organs that have mobile cilia and flagella, like testis, oviduct and, in the central nervous system, the ependymal cells.

The aim of this study was to determine the distribution and expression profile of *Efhc1* genes and evaluate the viability of functional studies by the modulation of its expression during the development of the brain of mice and rats.

Real time polymerase chain reaction (Real Time PCR) revealed that there is no difference in the expression of *Efhc1* transcript between right and left hemispheres in both species. Western blot experiments corroborated this finding. In addition, the highest levels of *Efhc1* mRNA were found at intra-uterine stages in mouse and in adulthood in rat. In common, there was a progressive decrease in *Efhc1* expression from 1-day-old neonates to 14-days-old animals in both species. In situ hybridization studies showed that rat and mouse *Efhc1* mRNAs are expressed in ependymal cells of ventricle walls.

Our findings suggest that *Efhc1* expression is more important during initial phases of brain development and that at this stage it could be involved in key developmental mechanisms underlying JME.

The technique of RNA interference (RNAi) promotes a potent and specific gene silence and it was employed in this project to study the function of *Efhc1* gene in cultured mammal cells and in the brain of mice in different developmental stages. This approach has been widely used to achieve this aim.

Both for cultured cells assays as for *in vivo* experiments, the percentage of gene silence was evaluated with Real Time PCR and Western blot. In addition, negative controls (injection only with buffer and the use of an irrelevant siRNA) were used in the experiments.

Initially, we used two siRNAs, the effectors of RNAi. The siRNA molecules promote a temporary gene silence, whereas the short hairpin RNA (shRNA), another type of molecule, promotes long-term gene silence.

In the experiments with mammal cells in culture, we used different cellular types, from rat cardiomyocytes to mouse neuroblastoma cells. For the *in vivo* experiments, different

methodologies were used, such as intra-uterine surgery, hydrodynamic transfection, and association of the siRNA with a peptide derived from a rabies virus glycoprotein.

A long-term *Efhc1* gene silencing was obtained in Neuro2A cells. The greatest silencing percentage (60%) was observed after 48h of incubation with the siRNA and the gene remained silenced for up to 6 days. Besides, *Efhc1* gene silencing in rodent Central Nervous System (decrease in gene expression of 45%) was achieved by the inoculation of the siRNA-RVG-9R complex.

We believe that our results point to an association between putative *EFHC1* gene function during brain development and the physiopathology of JME.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

An	Animal
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> : análise de variância
ATP	Adenosina trifosfatada
B	Base
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato
BrdU	Bromodeoxiuridina
BRD2	<i>Bromodomain-containing protein 2</i>
°C	Graus celcius
CACNB4	Subunidade $\beta 4$ de canal de cálcio voltagem-dependente
Ca _v 2.3	Canal de cálcio voltagem-dependente do tipo R
cDNA	DNA complementar
CDS	<i>Coding sequence</i> : sequência codificante
CEMIB	Centro de Estudos Multidisciplinares de Investigação Biológica
CHRNA7	<i>Acetylcholine Receptor, Neuronal Nicotinic, Alpha-7 Subunit</i>
CLNC2	<i>Chloride channel-2</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> : fluido cérebro-espinhal
Ct	<i>Threshold Cycle</i> : Ciclo do limiar de detecção
CTCG	Crises clônico-tônico-clônicas generalizadas
C Terminal	Extremidade carboxi das proteínas
Cx36	Conexina 36
Da	Dalton
DAE	Drogas anti-epilépticas
DCX	<i>Doublecortin</i>
ΔG	Diferença de Energia Livre de Gibbs
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DM10	Domínio estrutural da proteína EFHC1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> : RNA dupla-fita
DTT	1,4-Ditiotreitol

E	Embrião
EAJ	Epilepsia de Ausência Juvenil
ECTCG	Epilepsia com crises tônico-clônicas generalizadas
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EEG	Eletroencefalograma
EF-Hand	Domínio de ligação a cálcio da proteína EFHC1
EFHC1	<i>Ef-hand domain (C terminal) containing 1</i>
EIG	Epilepsias idiopáticas generalizadas
EJM	<i>Epilepsy, Juvenile Myoclonic</i>
EMJ	Epilepsia Mioclônica Juvenil
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
g	Grama
GABA _A	Ácido γ -aminobutírico subtipo A
GABRA1	Subunidade $\alpha 1$ do receptor do GABA _A
GABRD	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor delta</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	Guanina e Citosina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Hora
HD	Hemisfério direito
HE	Hemisfério esquerdo
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ig	Imunoglobulina
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IOD	<i>Integrated Optic Density</i> : Densidade Óptica Integrada
Kb	Quilobase
KCNQ3	Canal de potássio voltagem-dependente 3
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LIS1	<i>Lissencephaly 1</i>
μ	Micro

MDC	Malformações do desenvolvimento cortical
ME2	Enzima Málica 2
mRNA	RNA mensageiro
NAA	N-acetil aspartato
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
N Terminal	Extremidade amino das proteínas
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	Braço curto dos cromossomos
P	Neonato
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Placa Cortical
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKR	Proteína kinase dependente de dsRNA
PP	Pré-placa
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
q	Braço longo dos cromossomos
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i> : Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAa	Ativação por RNA
RNAi	Interferência por RNA
RQ	Quantificação relativa
RT	Transcrição reversa
RVG-9R	<i>Rabies vírus glycoprotein-9 arginines</i>
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecilsulfato de sódio
Sem	Semanas
SFB	Soro fetal bovino
saRNA	<i>Small activating RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sub-placa
SPF	Livre de patógenos específicos
SuP	Superfície pial
SVZ	<i>Subventricular zone</i> : Zona Subventricular
TBS	Tampão salino Tris-HCl
TCG	Crises tônico-clônicas generalizadas
Tm	<i>Melting temperatures</i> : temperaturas de fusão
UTR	<i>Untranslated region</i> : região não-traduzida
VPA	Valproato de sódio
ZI	Zona Intermediária
ZM	Zona Marginal
ZV	Zona Ventricular

ÍNDICE

	página
CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica e Expressão do gene <i>Efhc1</i> no cérebro de roedores	01
1.1. A Epilepsia	02
1.2. A Epilepsia Mioclônica Juvenil	03
1.3. Genética da Epilepsia Mioclônica Juvenil	05
1.4. O Gene <i>EFHC1</i>	14
1.5. Distúrbios de Desenvolvimento do Córtex Cerebral e a EMJ	18
Bibliografia	24
OBJETIVOS	33
Expression profile and distribution of <i>Efhc1</i> gene transcript during rodent brain development	34
CAPÍTULO 2: Silenciamento do gene <i>Efhc1</i> em cultura de células e no cérebro de roedores	44
2.1. Introdução	45
2.2. Material e Métodos	53
2.3. Resultados	68
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES GERAIS	101
BIBLIOGRAFIA	102
ANEXO	109

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica e Expressão do gene *Efhc1* no Cérebro de Roedores

1.1. A EPILEPSIA

As epilepsias formam um grupo de síndromes neurológicas crônicas, decorrentes de alterações das funções cerebrais, associadas ou não a outras condições patológicas. Possuem grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, graus variados de morbidade e prognóstico. No entanto, a característica comum a todas as síndromes epiléticas é a ocorrência de crises. Crises epiléticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo ou de área mais extensa envolvendo simultaneamente os dois hemisférios cerebrais (Guereiro *et al.*, 2000). A crise epilética é causada por descargas elétricas neuronais anormais, excessivas e transitórias (Zielinski, 1988).

Segundo classificação da *International League Against Epilepsy* (ILAE), em relação ao tipo de crise epilética, as epilepsias são classificadas em parciais ou generalizadas. As crises parciais são aquelas nas quais, em geral, as primeiras manifestações clínicas e eletrencefalográficas indicam ativação de um sistema neuronal limitado à parte de um hemisfério cerebral. O que distingue a crise parcial simples da complexa é o comprometimento da consciência nesta última. Quando a descarga epilética envolve a totalidade do córtex cerebral em ambos os hemisférios, é denominada de generalizada (ILAE, 1989). Em relação à etiologia, a classificação das epilepsias e síndromes epiléticas é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, história familiar, achados eletrencefalográficos e prognóstico (Guereiro *et al.*, 2000). Dessa forma, as epilepsias podem ser divididas em três categorias: idiopáticas, que são aquelas transmitidas geneticamente, sintomáticas, as quais possuem etiologias conhecidas, e criptogênicas, que são as epilepsias de presumível base orgânica, sem etiologia definida (ILAE, 1989).

O tratamento medicamentoso das epilepsias é, em última análise, aceito como tratamento sintomático, isto é, visa o controle das crises epiléticas. A seleção das drogas antiepiléticas é

baseada, primariamente, em sua eficácia para tipos específicos de crises e epilepsias. Os riscos que são potencialmente minimizados pelo uso de medicamentos são: morte, lesão física decorrente da crise, dano cerebral e consequências psicossociais (Guerreiro *et al.*, 2000).

A epilepsia não possui barreiras sócio-econômicas, étnicas, geográficas ou etárias e é o transtorno neurológico grave mais comum. Os problemas sociais e econômicos decorrentes desta condição transformam-na em um problema de saúde pública mundial (Gomes, 1994; Gomes, 1997). Uma das características que contribui para a gravidade da epilepsia é a refratariedade, ou seja, a resistência ao controle das crises, mesmo quando o paciente é tratado com drogas antiepilépticas (DAE).

1.2. A EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL

O grupo das epilepsias idiopáticas corresponde a aproximadamente 40% do total das epilepsias humanas (Zielinski, 1988). Neste tipo de epilepsia, a predisposição genética se apresenta de maneira marcante. Dentre as epilepsias idiopáticas generalizadas (EIG), encontra-se a Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) (OMIM 606904) (Lund *et al.*, 1976), segundo classificação da ILAE (1989). A EMJ representa 5% a 10% das epilepsias e tem início entre os 9 e 27 anos de vida, sendo que 85% dos casos iniciam-se entre os 13 e 20 anos, acometendo igualmente ambos os sexos (Janz, 1969; Tsuboi, 1977; Janz, 1989).

A EMJ é caracterizada por abalos mioclônicos geralmente bilaterais, mas nem sempre simétricos, únicos ou repetitivos, rápidos e de amplitude variável (Wolf, 1992). As mioclonias, no início da doença, geralmente manifestam-se após eventos associados à desorganização da vida do paciente, tais como privação de sono, ingestão excessiva de álcool e despertar prematuro (Janz, 1989). Os abalos mioclônicos são sempre mais pronunciados e frequentemente restritos aos membros superiores, mas podem acometer os membros inferiores (ocasionando queda), a

musculatura cervical e, excepcionalmente, a face (Delgado-Escueta & Enrile-Bacsal, 1984). A consciência é usualmente preservada, podendo haver certa obnubilação quando muito intensas (Janz, 1969). Algumas vezes, as mioclonias são muito discretas, percebidas apenas pelos pacientes, que as descrevem como sensação de choques elétricos; outras vezes, são intensas, provocando movimentos violentos com arremesso de objetos, geralmente os utilizados na higiene pessoal ou no desjejum (Yacubian, 2000). O padrão eletrencefalográfico registrado durante as mioclonias é representado por descargas de complexos de multispícula-onda, generalizados, bilaterais e simétricos (Janz, 1957). Privação de sono, fotoestimulação intermitente e oclusão palpebral podem ativar as anormalidades eletrencefalográficas (Janz & Christian, 1957; Wolf, 1992).

Além dos abalos mioclônicos, a EMJ é caracterizada pela presença de crises dos tipos tônico-clônicas generalizadas (TCG) e/ou clônico-tônico-clônicas generalizadas (CTCG) (em 90% a 95% dos pacientes) e crises de ausência (em até 39,5% dos casos) (Delgado-Escueta & Enrile-Bacsal, 1984). As crises TCG frequentemente são precedidas por uma série de abalos mioclônicos que se sucedem rapidamente; após as crises, há um período de quiescência das mioclonias durante dias ou semanas. As crises TCG, como os abalos mioclônicos, ocorrem quase exclusivamente ao despertar (Janz, 1969). As crises de ausência costumam ser do tipo ausência simples, raras, de curta duração, manifestando-se durante algumas horas ou dias, com intervalos de dias ou semanas. O comprometimento da consciência nas crises de ausência da EMJ é discreto, e estas crises são referidas pelos pacientes como falta de concentração momentânea ou como pequenos lapsos (Panayiotopoulos, 1994).

Como privação do sono e o despertar súbito são fatores precipitantes de crises na EMJ, o tratamento visa à regularização do ciclo vigília-sono. O controle da ingestão de álcool e da exposição à estimulação luminosa também são medidas importantes na terapêutica da EMJ

(Yacubian, 2000). Quanto ao tratamento medicamentoso, a droga de escolha é o valproato de sódio (VPA) que possibilita o controle completo das crises em 90% a 95% dos pacientes (Janz, 1989; Yacubian, 2000). Entretanto, como a terapêutica com VPA, em alguns pacientes, pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis, como ganho excessivo de peso e, em mulheres, irregularidade menstrual, ovários policísticos e potencial teratogênico, outras opções terapêuticas são consideradas, como, por exemplo, lamotrigina, primidona, fenobarbital, clonazepam e acetazolamida (Obeid & Panayiotopoulos, 1989; Isojärvi *et al.*, 1998). A instituição precoce do tratamento parece favorecer o controle das crises; entretanto, a recorrência é referida em 75% a 100% dos pacientes mesmo após vários anos de controle total, se a medicação é descontinuada. Desse modo, em pacientes sem crise durante dois anos, a suspensão do VPA provocou o seu reaparecimento entre 91% e 100% dos casos (Yacubian, 2000). Assim, a EMJ é um tipo de epilepsia no qual não é possível a suspensão da medicação, mesmo após vários anos de controle das crises.

1.3. GENÉTICA DA EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL

Nas epilepsias idiopáticas, da qual a EMJ faz parte, a predisposição genética se apresenta de maneira muito marcante, perfazendo 39 – 59% de todas as epilepsias (ILAE, 1989; Hauser & Hesdorffer, 1990). Aproximadamente 40% dos indivíduos diagnosticados com EMJ relatam histórico familiar de crises e epilepsias (Liu *et al.*, 1996). Esta porcentagem é maior do que a relatada para outros tipos de epilepsia e, devido a isso, a EMJ tem sido uma das formas de epilepsia mais amplamente estudadas do ponto de vista genético-molecular (Welty, 2006). Com a finalidade de se identificar genes causadores deste tipo de epilepsia, diferentes abordagens foram utilizadas, desde análise de ligação e associação em famílias que segregam a doença até *screening* de genes candidatos. Até o momento, 15 regiões candidatas foram identificadas como

associadas à causa da EMJ. Os genes mutados mais comumente encontrados nos pacientes com EMJ são: *BRD2* no cromossomo 6p21.3, *CACNB4* em 2q22-23, *GABRA1* em 5q34, *CLNC2* em 3q27, *Cx36* em 15q14, *ME2* em 18q21 e *EFHC1* em 6p12-p11 (Medina *et al.*, 2008).

Em 1988, Greenberg e colaboradores conseguiram mapear o primeiro *locus*, localizado no cromossomo 6p21.3, associado à EMJ, denominando-o de EJM1 (OMIM 254770). Esses autores sugeriram que o *locus* EJM1 localizava-se próximo da região HLA. Weissbecker *et al.* (1991) e Durner *et al.* (1991) corroboraram estes resultados e ainda concluíram que *loci* gênicos relacionados a diversos tipos de epilepsias idiopáticas generalizadas estariam localizados no braço curto do cromossomo 6. Surpreendentemente, Sander *et al.* (1997) encontraram evidências da ligação da EMJ com o *locus* HLA somente em famílias de origem européia, afirmando que esta ligação é característica e exclusiva de pacientes deste continente.

Em 2003, Pal *et al.* (2003) apresentaram evidências de que o gene *BRD2* (*bromodomain-containing protein 2*) (OMIM 601540), também localizado no cromossomo 6p21.3, poderia estar relacionado com a EMJ. Este gene é um putativo regulador da transcrição e membro de uma família gênica expressa durante o desenvolvimento. A proteína BRD2 contém dois domínios de ligação a lisinas acetiladas presentes na cauda das histonas e, dessa forma, está envolvida na remodelação da cromatina (Kanno *et al.*, 2004). Foram identificados dois SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) no promotor deste gene em pacientes com EMJ, mas ainda não se conhece a relevância desses polimorfismos. Esses autores sugeriram que a EMJ ligada ao *locus* 6p21.3 é causada, na verdade, por mutações no gene *BRD2*. Recentemente, Lorenz *et al.* (2006) demonstraram a associação de polimorfismos na região codificadora deste gene com resposta fotoparoxismal (fotossensibilidade). A fotossensibilidade é uma característica frequente nas EIGs, sendo observada em 13% a 18% das epilepsias idiopáticas de ausência e em 30% a 35% dos pacientes com EMJ (Guerrini & Genton, 2004). Lorenz *et al.* (2006) sugerem que a variação

genética no gene *BRD2* confere susceptibilidade à fotossensibilidade observada em algumas epilepsias e que esta característica compartilha com a EMJ algumas vias epileptogênicas, para as quais o gene *BRD2* pode ser o gene de susceptibilidade subjacente. O locus para a EMJ ligada ao HLA foi originalmente chamado de EJM1 (Sander *et al.*, 1995), mas, desde então, o locus EJM1 passou a se referir à EMJ causada por mutações no gene *EFHC1*, localizado no cromossomo 6p12-p11 (Suzuki *et al.*, 2004). O locus da região 6p21 passou a ser denominado EJM3 (OMIM 608816).

No fim da década de 1990, Elmslie *et al.* (1997) investigaram se havia ligação entre EMJ e regiões cromossômicas que contivessem genes codificadores de subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina (*nicotinic acetylcholine receptors*, nAChRs), pois sabia-se que mutações no gene codificador da subunidade $\alpha 4$ destes receptores (*Acetylcholine Receptor, Neuronal Nicotinic, Alpha-4 Subunit, CHRNA4*) foram identificadas em uma forma rara de epilepsia, a epilepsia de lobo frontal noturna autossômica dominante (Steinlein *et al.*, 1995). Esses autores encontraram uma forte evidência de ligação da EMJ com *loci* polimórficos que compreendiam a região que continha o gene codificador da subunidade $\alpha 7$ do nAChR (gene *CHRNA7*), o qual se localiza no cromossomo 15q14. Elmslie *et al.* (1997) sugeriram que este locus, denominado posteriormente de EJM2 (OMIM 604827), contribui para a susceptibilidade genética à EMJ na maioria das famílias estudadas. Curiosamente, Sharp *et al.* (2008) descreveram a associação recorrente entre uma microdeleção na região 15q13.3 e uma síndrome na qual os pacientes apresentam retardo mental e crises epiléticas. Esta microdeleção contém 6 genes, inclusive o gene *CHRNA7*, para o qual é atribuída a ocorrência das crises observadas nesta síndrome (Sharp *et al.*, 2008).

Outro gene localizado no locus EJM2 é o *CX36* (Mas *et al.*, 2004). Em 2004, Mas e colaboradores identificaram um *SNP* (588 C>T) cuja frequência é significativamente maior nos

pacientes com EMJ do que nos controles. Este resultado foi corroborado por Hempelmann *et al.* (2006) e sugere que *CX36* é um potencial gene de susceptibilidade a EMJ no locus EJM2 (Mas *et al.*, 2004). O gene *CX36* codifica uma conexina presente nos neurônios (Condorelli *et al.*, 1998). As conexinas são proteínas integrais da membrana e constituintes dos canais das junções intercelulares do tipo *gap* (*gap junctions*; Willecke *et al.*, 2002). Essas junções permitem a passagem de íons, mensageiros secundários e metabólitos de uma célula a outra e, no sistema nervoso central, constituem a base estrutural das sinapses elétricas (Zoidl & Dermietzel, 2002). A deleção do gene *Cx36* resulta em perda das sinapses elétricas em camundongos e em oscilações de frequência γ alteradas nos interneurônios tanto do hipocampo quanto do neocórtex (Deans *et al.*, 2001; Buhl *et al.*, 2003). Além disso, Welsh *et al.* (1998) demonstraram que a geração de crises mioclônicas está intimamente associada com uma sincronização anormal dos neurônios, particularmente na oliva inferior, onde o gene *CX36* é altamente expresso. A expressão deste gene também é reduzida no hipocampo de modelos animais de epilepsia do lobo temporal humana (Sohl *et al.*, 2000). Portanto, a redução da expressão do gene *CX36* pode estar envolvida na geração de crises epiléticas em pacientes com EMJ (Mas *et al.*, 2004).

Em 1997, Burgess e colaboradores demonstraram que a inativação da subunidade $\beta 4$ de um canal de cálcio voltagem-dependente (codificada pelo gene *CACNB4*, localizado no cromossomo 2q22-23) em camundongos *lethargic* resultava em uma desordem neurológica complexa que incluía crises de ausência e ataxia. Essas crises espontâneas possuíam as mesmas características eletrencefalográficas e farmacológicas que as crises de ausência em pacientes (Hosford *et al.*, 1999). Escayg *et al.* (2000) identificaram a mutação R482X (arginina para códon de terminação) no gene *CACNB4* em um paciente com EMJ, resultando na síntese de uma proteína truncada (não contém o domínio de interação da subunidade $\beta 4$ com a subunidade $\alpha 1$). Ensaio funcionais em oócitos de *Xenopus laevis* mostraram alterações na cinética de inativação

do canal de cálcio voltagem-dependente quando essas células eram transfectadas com a subunidade mutada (Escayg *et al.*, 2000). Estudos adicionais são necessários para avaliar a relação desta mutação com a causa da EMJ. O *locus* do gene *CACNB4* foi denominado de EJM5 (OMIM 601949).

Em 2002, Cossette e colaboradores identificaram uma mutação (Ala322Asp) no exon 9 do gene *GABRA1* nos indivíduos afetados de uma família franco-canadense segregando uma forma autossômica dominante de EMJ. Este gene está localizado na região 5q34 e codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor do GABA_A (ácido γ -aminobutírico subtipo A), principal transmissor inibitório do sistema nervoso central. Esses autores demonstraram que os receptores GABA_A que continham a subunidade mutada apresentavam diminuição da amplitude de correntes ativadas por GABA em cultura de células HEK 293, indicando que as crises poderiam estar sendo causadas por perda de função desses receptores (Cossette *et al.*, 2002). O efluxo reduzido de íons cloreto nos neurônios pode ocasionar uma diminuição da inibição da atividade neuronal mediada por GABA, resultando em hiperexcitabilidade celular, presumivelmente a causa da epilepsia nos pacientes (Wallace, 2002). Além disso, a proteína GABRA1 é fosforilada e funcionalmente mantida pela enzima glicolítica GAPDH, o que sugere uma associação funcional entre o metabolismo regional de glicose no cérebro e as correntes GABAérgicas, uma vez que este mecanismo depende da produção local (regional) de ATP e da atividade de GAPDH (Laschet *et al.*, 2004). Curiosamente, Laschet *et al.* (2007) observaram que tecidos corticais isolados de pacientes epiléticos, principalmente com epilepsia do lobo temporal, apresentaram diminuição da fosforilação da subunidade GABRA1 em comparação ao tecido dos indivíduos normais. Apesar de não haver diferenças na composição das subunidades entre os pacientes e os controles (o que sugere uma deficiência na fosforilação da subunidade nos pacientes com epilepsia), esta é mais

uma evidência de que distúrbios na função deste gene estão relacionados à patofisiologia das epilepsias.

Haug *et al.* (2003) identificaram uma inserção de 1 par de bases (pb) (597G) no gene *CLCN2* (*chloride channel-2 gene*; OMIM 600570), localizado no cromossomo 3q26, em indivíduos acometidos por EMJ. Esta inserção produzia um códon de terminação prematuro e, consequentemente, uma proteína truncada cujos domínios essenciais para a formação do poro estavam ausentes. Em 2000, Sik e colaboradores haviam mostrado que os canais *CLCN2* localizam-se na membrana plasmática de dendritos, axônios e corpos celulares de neurônios. Além disso, funcionalmente, estes canais situam-se dentro ou adjacente a zonas ativas de sinapses GABAérgicas (Sik *et al.*, 2000). Os estudos funcionais mostraram que os canais mutados (inserção 597G) não apresentavam correntes de íons cloreto detectáveis, revelando que não havia efluxo destes íons. Os autores sugeriram que o acúmulo dos íons cloreto no interior dos neurônios reduz a resposta inibitória mediada por GABA, resultando em hiperexcitabilidade neuronal e, presumivelmente, em crises epiléticas (Haug *et al.*, 2003).

Vijai *et al.* (2003) resolveram investigar se havia associação entre o gene *KCNQ3* e a EMJ, uma vez que este gene estava implicado com a causa de um tipo raro de epilepsia, as convulsões neonatais familiares benignas (Charlier *et al.*, 1998). O gene *KCNQ3* é um membro da família dos canais de potássio voltagem-dependente e está localizado no cromossomo 8q24. Estes canais participam diretamente da geração de potenciais de ação e, consequentemente, da ativação neuronal, além de, juntamente com a proteína G, também estarem envolvidos no controle dos potenciais pós-sinápticos inibitórios no cérebro e na regulação dos potenciais de ação de fase de repolarização rápida. Dessa forma, a redução da atividade desses canais nas fibras nervosas atrasa a repolarização neuronal e diminui o limiar de excitabilidade para a produção de novos potenciais de ação (Vijai *et al.*, 2003). Dessa forma, Vijai *et al.* (2003) concluíram que há associação entre o

gene *KCNQ3* e a EMJ após estudarem famílias residentes no sul da Índia. Recentemente, Kapoor *et al.* (2007) identificaram uma família indiana na qual 8 indivíduos tinham EMJ com padrão de herança autossômico dominante. Esses autores identificaram um *locus* candidato, denominado de EJM4 (OMIM 611364), no cromossomo 5q12-q14, e, apesar de nesta região estarem presentes genes relacionados ao metabolismo de cálcio (*S100Z*), transmissão sináptica (*HOMER1*) e neurogênese (*THBS4* e *CSPG2*, entre outros), nenhum deles foi apontado como o responsável pela doença.

Greenberg *et al.* (2005) identificaram um *locus* no cromossomo 18q21 que parece ser comum às EIGs de início na adolescência, a saber: EMJ, a epilepsia de ausência juvenil (EAJ) e a epilepsia com crises tônico-clônicas generalizadas (ECTCG). Além disso, esses autores demonstraram que um *SNP* no gene codificador da enzima málica 2 (*ME2*; OMIM 154270), presente neste *locus*, aumenta em 6 vezes o risco de desenvolver estas síndromes. A ME2 é uma enzima mitocondrial codificada pelo genoma nuclear que converte malato a piruvato e está envolvida na síntese de GABA nos neurônios (Hassel, 2001). A atividade da ME2 é alta em mitocôndrias localizadas nos terminais sinápticos do córtex em comparação com mitocôndrias de neurônios corticais em cultura e do cerebelo (McKenna *et al.*, 2000). Greenberg *et al.* (2005) argumentaram que a demonstração de que uma enzima relacionada à síntese de GABA está fortemente associada às EIGs sugere que alterações nas funções deste neurotransmissor podem modificar o limiar de excitabilidade dos neurônios corticais e que as crises epiléticas são desencadeadas quando mutações em outros genes estão presentes. Portanto, o gene *ME2* pode ser considerado um gene de susceptibilidade às EIGs (genes de susceptibilidade são aqueles que apresentam mutações - ou perda de função - que isoladamente não causariam uma determinada doença, mas que quando associados a outros genes mutados, desencadeiam a patologia).

Por fim, é importante destacar que a presença de genes de susceptibilidade é um fenômeno comumente observado em doenças complexas e geneticamente heterogêneas, como é o caso da EMJ. Por exemplo, Dibbens *et al.* (2004) identificaram um polimorfismo no gene *GABRD*, que codifica a subunidade δ do receptor do GABA_A e se localiza no cromossomo 1p36, em pacientes com EIGs e em 1 indivíduo com EMJ. Entretanto, essa mutação também foi encontrada em indivíduos controle e, dessa forma, não parece ser um fator comum na EMJ. Porém, como o alelo mutante pode aumentar a excitabilidade neuronal, o mesmo pode ser considerado um alelo de susceptibilidade quando associado com outros genes relacionados à causa da EMJ (Dibbens *et al.*, 2004).

A tabela 1 mostra a localização cromossômica e a natureza da proteína codificada pelos genes causadores e de susceptibilidade a EMJ identificados até o momento.

Tabela 1. Genes relacionados com a causa da EMJ. Tabela modificada de Welty (2006).

GENE	LOCALIZAÇÃO	PROTEÍNA	REFERÊNCIA
<i>BRD2</i>	6p21.3	Regulador da Transcrição	Pal <i>et al.</i> , 2003
<i>CHRNA7</i>	15q14	Subunidade $\alpha 7$ do nAChR	Elmslie <i>et al.</i> , 1997
<i>CX36</i>	15q14	Conexina	Mas <i>et al.</i> , 2004
<i>CACNB4</i>	2q22-23	Subunidade $\beta 4$ de canal de cálcio voltagem-dependente	Escayg <i>et al.</i> , 2000
<i>GABRA1</i>	5q34	Subunidade $\alpha 1$ do receptor do GABA _A	Cossette <i>et al.</i> , 2002
<i>CLCN2</i>	3q26	Subunidade de canal de íons cloreto	Haug <i>et al.</i> , 2003
<i>KCNQ3</i>	8q24	Subunidade de canal de potássio voltagem-dependente	Vijai <i>et al.</i> , 2003
<i>EJM4</i>	5q12-q14	???	Kapoor <i>et al.</i> , 2007
<i>ME2</i>	18q21	Enzima málica 2	Greenberg <i>et al.</i> , 2005
<i>GABRD</i>	1p36	Subunidade δ do receptor de GABA _A	Dibbens <i>et al.</i> , 2004
<i>EFHC1</i>	6p12-p11	Regulador da apoptose e do movimento de cílios	Suzuki <i>et al.</i> , 2004

A maior parte dos genes cujas mutações aumentam a susceptibilidade ou causam EMJ codifica subunidades de canais iônicos ou proteínas que interagem com estes. Do ponto de vista patofisiológico, isto é interessante, uma vez que os canais iônicos constituem a base tanto para a excitabilidade eletrofisiológica das membranas plasmáticas neuronais quanto para a comunicação entre os neurônios. O mecanismo epileptogênico proposto nestes casos baseia-se na premissa de que a redução nas correntes iônicas dificulta a inibição da atividade neuronal mediada por GABA, o que resulta, em última instância, em aumento da excitabilidade neuronal e em crises epiléticas. Entretanto, um gene que não é um canal iônico e que não desempenha funções

exclusivamente relacionadas a estes, o gene *EFHC1*, também foi apontado como causador da doença (Suzuki *et al.*, 2004).

1.4. O GENE *EFHC1*

Entre meados da década passada e início desta, alguns autores identificaram um *locus* na região 6p12-p11 que estava em ligação com a EMJ em famílias de Belize, do México e da Holanda (Liu *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2004). Dos 18 genes localizados nesta região, 17 foram excluídos como candidatos e somente o gene *EFHC1* (*EF-hand domain (C terminal) containing 1*) (OMIM 608815) foi investigado mais profundamente (Suzuki *et al.*, 2004).

Em 2004, Suzuki e colaboradores descreveram cinco mutações no gene *EFHC1* que co-segregavam com o quadro epiléptico em membros acometidos por EMJ de seis famílias não relacionadas, estando ausentes em 382 indivíduos não afetados por esta doença. Estas mutações ocasionavam troca de aminoácidos (*missense mutations*) na proteína, sendo que quatro delas em resíduos conservados entre ortólogos de *EFHC1*. Em 2006, Stogmann e colaboradores descreveram mais três novas mutações e uma variante na região 3' não traduzida (3' UTR; 2014t>c). Curiosamente, a mutação 2014t>c está localizada em uma região que é um putativo sítio de ligação do micro RNA hasmiR-499. Esta troca de nucleotídeos (t>c) prediz uma ligação mais forte deste micro RNA à sua sequência alvo, o que pode alterar a eficiência da tradução do RNA mensageiro (mRNA) do gene *EFHC1*.

No ano seguinte, mais uma nova mutação foi descrita em pacientes italianos portadores de EMJ (Annesi *et al.*, 2007). Este resultado foi interessante na medida em que estendeu a distribuição das mutações no gene *EFHC1* para a população européia, uma vez que nos trabalhos anteriores os pacientes eram do México e América Central. Em 2008, Medina e colaboradores

encontraram mais duas novas mutações com troca de aminoácidos e uma deleção de 3 nucleotídeos no promotor do gene em famílias do México e Japão. Esses autores verificaram que aproximadamente 9% dos pacientes de EMJ em clínicas de Honduras e México e 3% no Japão possuem mutações no gene *EFHC1*.

A Fig. 1 resume as mutações mais frequentemente encontradas no gene *EFHC1* em pacientes com EMJ.

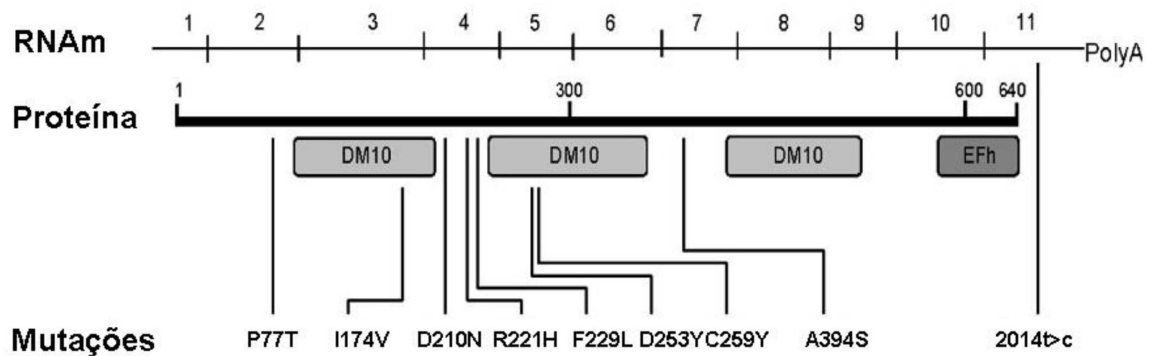


Figura 1. Mutações identificadas no gene *EFHC1* em pacientes com EMJ. Na parte superior, está a representação esquemática do RNAm de *EFHC1* (11 exons). Logo abaixo, há um esquema mostrando os motivos e domínios estruturais da proteína EFHC1 (3 domínios DM10 e 1 motivo EF-hand). Por fim, as mutações conhecidas da região codificadora e na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *EFHC1* e suas respectivas posições estão representadas. Figura retirada de Stogmann *et al.* (2006).

O gene *EFHC1* possui aproximadamente 72 kb e codifica uma proteína de 640 aminoácidos (isoforma A, 74kDa) e uma variante truncada no terminal carboxi (C) resultante de *splicing* alternativo no exon 4 (isoforma B). A isoforma A da proteína EFHC1 contém três domínios estruturais DM10 repetidos em *tandem*, de função desconhecida, e um motivo de ligação a cálcio, chamado de *EF-hand*, presente na região carboxi terminal (C terminal; Suzuki *et al.*, 2004). A isoforma B só possui um domínio DM10 e o motivo *Ef-hand* está ausente (Suzuki *et al.*, 2004).

Com a finalidade de se investigar a função do gene *EFHC1*, neurônios de hipocampo de camundongo mantidos em cultura foram transfectados com um cassete de expressão deste gene. Observou-se que, 48h após a transfecção, as células mostravam sinais de neurodegeneração e morte celular. Os ensaios de TUNEL mostraram que EFHC1 estava induzindo apoptose nestes neurônios (Suzuki *et al.*, 2004). Análises de interação da proteína EFHC1 com canais de cálcio voltagem-dependente, cujas anormalidades foram descritas em epilepsias humanas e murinas (Fletcher *et al.*, 1996; Jouvenceau *et al.*, 2001), revelaram que a taxa de sobrevivência dos neurônios transfectados com *EFHC1* foi especificamente aumentada quando estas células foram tratadas com um antagonista (SNX-482) de um canal de cálcio voltagem-dependente do tipo R (Ca_v2.3). Dessa forma, os autores concluíram que a proteína EFHC1 se associa com este canal e aumenta o influxo de cálcio pelo mesmo, acarretando a morte celular programada (Suzuki *et al.*, 2004). Apesar das proteínas EFHC1 mutantes identificadas por Suzuki *et al.* (2004) se associarem ao canal Ca_v2.3, todas apresentavam queda significativa na indução de apoptose. Esses resultados sugerem que as mutações no gene *EFHC1* causam EMJ porque comprometem a atividade apoptótica da proteína selvagem, evitando a eliminação, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, de neurônios em que a homeostase do cálcio está alterada, e promovendo aumento da densidade neuronal (Suzuki *et al.*, 2004).

Suzuki *et al.* (2004) também isolaram o gene ortólogo de camundongo, chamado de *Efhc1*. No ano seguinte, Ikeda e colaboradores relataram que a proteína Efhc1 é homóloga (35% de homologia) à proteína Rib72 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Dessa forma, esses autores denominaram o gene de camundongo que codifica esta proteína de *mRib72-1/Efhc1*. A proteína Rib72 foi identificada como sendo um componente de axonemas de cílios e flagelos (Patel-King *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Os homólogos desta proteína foram encontrados em diversos organismos, como o homem, camundongo e *Drosophila*, demonstrando que Rib72 é

evolutivamente conservada (Ikeda *et al.*, 2005). Ikeda *et al.* (2005) verificaram que os maiores níveis de expressão de *mRib72-1/Efhc1* são observados nos cílios e flagelos de células de testículos e ovidutos de camundongos adultos. Esses autores propuseram que o funcionamento inadequado dos cílios, resultante de mutações no gene *mRib72-1/Efhc1*, seja a causa da EMJ. A proteína Efhc1 (648 aminoácidos e 75kDa), assim como a proteína humana, contém três domínios estruturais DM10 repetidos em *tandem*, mas possui dois motivos EF-hand (Ikeda *et al.*, 2005). A Fig. 2 mostra os domínios estruturais da proteína EFHC1 humana e da murina.

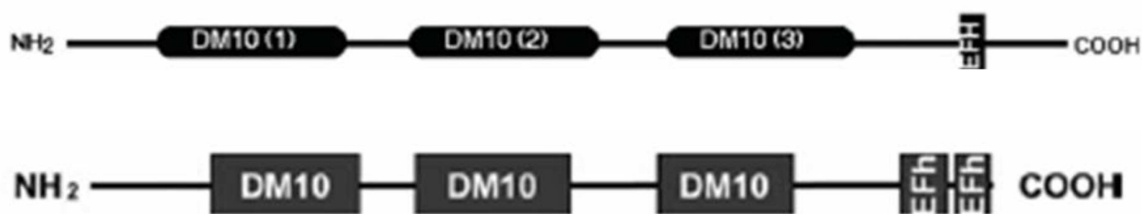


Figura 2. Domínios estruturais da proteína EFHC1 humana e murina. Ilustrações retiradas de Suzuki *et al.* (2004) e Ikeda *et al.* (2005).

Em 2006, de Nijs e colaboradores demonstraram que, em células interfásicas, a proteína EFHC1 estava presente no citoplasma e no núcleo, com uma acumulação forte e específica no centróssomo. Durante a mitose, a proteína colocalizou-se com o fuso mitótico, estando presente nos pólos do fuso durante a citocinese. A concentração de EFHC1 no centróssomo e nos pólos do fuso, onde estão localizados os centríolos, sugere que a proteína é um componente estrutural do centróssomo e que participa ativamente no funcionamento e/ou organização do fuso mitótico. Componentes moleculares comuns ao centróssomo e ao fuso mitótico foram previamente descritos (Cassimeris & Morabito, 2004; Patzke *et al.*, 2005). Além disso, esses autores verificaram que EFHC1 colocaliza-se com α -tubulina no fuso mitótico, sugerindo uma possível interação da proteína com microtúbulos. De fato, uma vez que o fuso mitótico e o axonema de cílios e flagelos são estruturas constituídas de microtúbulos, essa interação parece bastante

plausível (Ikeda *et al.*, 2005; de Nijs *et al.*, 2006). Ensaios com versões truncadas de EFHC1 revelaram que o terminal amino (N terminal) da proteína é crucial para a associação com o fuso mitótico. De maneira geral, estes resultados sugerem que a proteína EFHC1 está diretamente envolvida na divisão celular e, em particular, na organização do fuso mitótico.

Recentemente, Suzuki *et al.* (2008) resolveram investigar a distribuição da proteína Efhc1 no cérebro de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento. Os experimentos de imunohistoquímica revelaram que a proteína Efhc1 aparece primeiramente no teto do rombencéfalo em embriões de 10 dias (E10) e, posteriormente, passa a se localizar no plexo coróide, em E14. Em E18, a proteína localiza-se nas paredes dos ventrículos cerebrais (laterais, terceiro e quarto) e desaparece do plexo coróide. Nos neonatos, Efhc1 concentra-se nos cílios das células endoteliais que revestem as paredes ventriculares e nos adultos, além desta região, a proteína é observada nos cílios do epitélio da traquéia e pulmões e nos flagelos dos espermatozoides. Esses autores sugeriram que a base patológica da EMJ causada por mutações no gene *EFHC1* seja decorrente de alterações nas funções dos cílios ou do plexo coróide.

1.5. DISTÚRBIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX CEREBRAL E A EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL

A participação das células endoteliais na formação do córtex cerebral já é conhecida há algum tempo (Sarnat, 1992; Sarnat *et al.*, 1993). Estas células, através da secreção de substâncias difusíveis no meio extracelular, como as proteínas da família S100, auxiliam nos processos de direcionamento dos cones de crescimento axonais, proliferação e manutenção das células gliais radiais, interrupção da neurogênese no neuroepitélio primitivo e migração neuronal (Sarnat *et al.*, 1993). Como a proteína EFHC1 é expressa nas células endoteliais e no plexo coróide, é

necessário conhecer como ocorre a formação cortical, a fim de que seja possível inferir quais funções a proteína EFHC1 desempenha neste processo.

A formação do córtex cerebral pode ser dividida em três grandes estágios de desenvolvimento: proliferação, migração e diferenciação. Os precursores neuronais proliferam na zona ventricular e em seguida os neurônios pós-mitóticos migram para formar as estruturas que se tornarão o córtex cerebral maduro (Allen & Walsh, 1999). As primeiras células que migram formarão uma estrutura acima da zona ventricular denominada de pré-placa. As demais ondas migratórias de neurônios irão então formar a placa cortical que dividirá a pré-placa em uma camada mais externa denominada de zona marginal (futura camada I do córtex maduro) e uma camada mais interna chamada de sub-placa. Ao chegarem à placa cortical, os neurônios organizam-se em camadas que irão se desenvolver no córtex adulto. Este processo mostrou-se surpreendentemente complexo, havendo um padrão *inside-out* de deposição dos neurônios (Angevine *et al.*, 1961). Em outras palavras, os neurônios recém chegados à placa cortical ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais (Sidman *et al.*, 1973).

A migração dos neurônios ocorre em sua maioria ao longo das células radiais gliais; no entanto, interneurônios GABAminérgicos seguem um padrão de migração tangencial, paralelo à superfície pial ou lateralmente dentro dos ventrículos (O'Rourke *et al.*, 1995; van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Uma vez que os neurônios imaturos chegam às suas localizações definitivas, os mesmos estabelecem uma série específica de conexões pela extensão de seus axônios e dendritos. Estes fenômenos são característicos da fase de organização do córtex. A Fig. 3 esquematiza simplificada o processo de formação do córtex cerebral em camundongos.

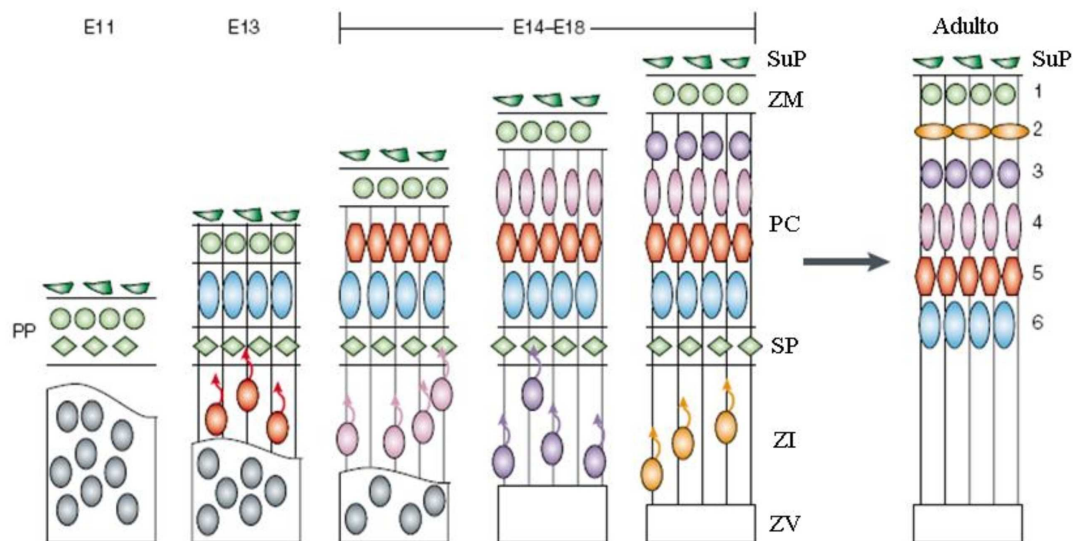


Figura 3. Desenvolvimento e organização do córtex cerebral de camundongos. Em E11, a pré-placa (PP) é formada pela primeira onda migratória de neurônios originados da zona ventricular (ZV) que se dirigem em direção à superfície pial (SuP). Em E13, a segunda onda migratória de neurônios atravessa a zona intermediária (ZI) e divide a PP em zona marginal (ZM) e sub-placa (SP), criando a placa cortical (PC). De E14 a E18, a deposição de neurônios, que ocorre no padrão *inside-out*, expande a PC. No adulto, a SP degenera-se, originando o córtex com seis camadas. As barras verticais representam as células radiais da glia. Esquema retirado de Gupta *et al.* (2002).

Dessa forma, as malformações do desenvolvimento cortical (MDCs) surgem quando um ou mais dos estágios de desenvolvimento do córtex (proliferação, migração e organização) são alterados. Existem pelo menos três mecanismos principais pelos quais os MDCs podem se desenvolver: anormalidades da proliferação e diferenciação de neurônios e da glia, anormalidades na migração neuronal e anormalidades na organização cortical (Barkovich *et al.*, 2001). Até pouco tempo atrás, a ocorrência de MDCs era relacionada principalmente a insultos pré-natais (Wyllie *et al.*, 1996). No entanto, a elucidação dos mecanismos básicos de formação do córtex tem demonstrado que as MDCs também podem ser devido a fatores genéticos. As MDCs incluem, em seu contexto mais abrangente, desde grandes anormalidades estruturais até malformações de natureza sutil (Koepp & Duncan, 2004). Dessa forma, variações da espessura

cortical, da distribuição e profundidade dos sulcos e giros corticais e dos limites entre as substâncias cinzenta e branca caracterizam diferentes MDCs.

As MDCs também têm sido freqüentemente apontadas como causa de epilepsia (Kuzniecky *et al.*, 1993). A maior disponibilidade de exames baseados em ressonância magnética tem aumentado a identificação de pequenas alterações estruturais em indivíduos com epilepsia. Estudos mostram que aproximadamente 8% dos pacientes com epilepsia que buscam atendimento em centros especializados são portadores de algum tipo de MDC e que 40% das epilepsias refratárias são causadas por MDCs (Semah *et al.*, 1998; Guerrini *et al.*, 2003). Há inúmeros exemplos de MDCs que resultam em epilepsias de diferentes graus de severidade. Pacientes com displasia cortical focal (presença de giros cerebrais simplificados e espessamento do córtex) apresentam epilepsias de início precoce e são refratários a DAEs. A remoção cirúrgica da área displásica resulta em remissão das crises em até 90% dos pacientes. A esclerose tuberosa resulta em alta taxa de pacientes com epilepsia (60%) e a maioria dos indivíduos com esquizencefalia (fendas no cérebro originadas por perda de tecido cerebral) ou heterotopia nodular periventricular bilateral (presença de nódulos de substância cinzenta ao longo dos ventrículos laterais) possui epilepsias parciais. Já pacientes com lisencefalia, que é caracterizada pela diminuição de profundidade dos giros cerebrais, apresentam epilepsia severa (Guerrini *et al.*, 2003).

Desde a década de 1950, há relatos de que indivíduos com EMJ apresentam características de personalidade como instabilidade emocional, impulsividade, inconstância, imaturidade, dificuldade em aceitar regras sociais, indiferença à doença e falta de persistência (Janz & Christian, 1957; Araújo Filho *et al.*, 2007). Os pacientes com EMJ apresentam significativamente mais desordens psiquiátricas e problemas psicossociais do que indivíduos saudáveis. As

desordens de ansiedade e humor são as mais freqüentes, seguidas pelas de personalidade (Araújo Filho *et al.*, 2007).

Estes traços de comportamento indicam que há alterações estruturais e/ou funcionais do lobo frontal em pacientes com EMJ, o que é suportado também por testes cognitivos e estudos de neuroimagem (Swartz *et al.*, 1994; Woermann *et al.*, 1998 e 1999; Betting *et al.*, 2007). Em 1994, Swartz e colaboradores verificaram que pacientes com EMJ apresentaram desempenho quase tão deficitário em testes de memória de trabalho quanto indivíduos que possuem epilepsia de lobo frontal com ou sem lesões estruturais aparentes nesta região. Devinsky e colaboradores (1997) investigaram as habilidades cognitivas de pacientes com EMJ, com o foco voltado para as atividades que envolviam o lobo frontal. O desempenho desses indivíduos foi variável, com alguns pacientes apresentando comprometimento da capacidade cognitiva e outros não. As maiores taxas de disfunção foram observadas nos testes de formação de conceitos abstratos, velocidade cognitiva e planejamento e organização. Os autores concluíram que as deficiências no lobo frontal podem influenciar tanto o comportamento como a personalidade de pacientes com EMJ. Nos trabalhos de 1998 e 1999, Woermann e colaboradores verificaram que alguns pacientes com EMJ apresentam aumento de volume de substância cinzenta no córtex frontal em relação aos controles. Mais recentemente, Betting e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes com EMJ também apresentam maior concentração de substância cinzenta na região frontobasal do que os controles. Além disso, autópsias revelaram a presença de neurônios distópicos (e outras pequenas anormalidades, denominadas de microdisgenesias) na substância cinzenta e aumento na densidade neuronal no córtex frontal de pacientes com EMJ (Meencke, 1985).

Dados bioquímicos e fisiológicos também reforçam a hipótese de focalização frontal na EMJ. Neste sentido, foi observada uma redução nos níveis de N-acetil aspartato (NAA) no lobo frontal de pacientes com EMJ (Savic *et al.*, 2000). Estes resultados podem indicar um aumento na

excitabilidade neuronal, disfunções mitocondriais ou lesão neuronal, o que acarretaria liberação de NAA aminohidrolase, responsável pela degradação de NAA (Savic *et al.*, 2000). Curiosamente, uma condição que pode relacionar todas as possibilidades é a ocorrência de displasia cortical (uma MDC), pois foi demonstrado que tecidos displásicos podem apresentar disfunções metabólicas (Savic *et al.*, 2000). Em 2004, este mesmo grupo confirmou os resultados obtidos previamente e mostrou que estas características são exclusivas de pacientes com EMJ, uma vez que não foi observada redução nos níveis de NAA em indivíduos com outras EIGs (Savic *et al.*, 2004). Curiosamente, foi demonstrado neste estudo que os pacientes com EMJ que possuíam níveis mais baixos de NAA apresentaram pior desempenho nos testes neuropsicológicos de funções executivas do que os indivíduos que tinham níveis normais de NAA (Savic *et al.*, 2004). Esta distribuição bimodal dos pacientes com EMJ nos testes psicológicos corrobora os resultados apresentados nos trabalhos de Devinsky *et al.* (1997) e Woermann *et al.* (1999), que encontraram anormalidades no lobo frontal em uma porcentagem de indivíduos com a doença (Savic *et al.*, 2004).

Portanto, tanto as características neurofisiológicas quanto as psicológicas e os recentes dados de neuroimagem apontam no sentido de disfunções no lobo frontal em pacientes com EMJ. Dessa forma, pode-se especular que a EMJ seja consequência de uma MDC cujos efeitos levem à disfunção no lobo frontal e à geração de crises epiléticas.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, K.M., Walsh, A.C. (1999). Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. *Epilepsy Research*, **36**: 143-156.
- Angevine, J.B., Sidman, R.L. (1961). Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature*, **192**: 766-768.
- Annesi, F., Gambardella, A., Michelucci, R., Bianchi, A., Marini, C., Canevini, M.P., Capovilla, G., Elia, M., Buti, D., Chifari, R., Striano, P., Rocca, F.E., Castellotti, B., Cali, F., Labate, A., Lepiane, E., Besana, D., Sofia, et al. (2007). Mutational analysis of *EFHC1* gene in italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, **48**(9):1686-1690.
- Araújo Filho, G.M., Pascalicchio, T.F., Sousa, P.S., Lin, K., Guilhoto, L.M.F.F., Yacubian, E.M.T. (2007). Psychiatric disorders in juvenile myoclonic epilepsy: A controlled study of 100 patients. *Epilepsy & Behavior*, **10**: 437-441.
- Bai, D., Alonso, M.E., Medina, M.T., Bailey, J.N., Morita, R., Cordova, S., Rasmussen, A., Ramos-Peek, J., Ochoa, A., Jara, A., Donnadieu, F.R., Cadena, G., Yamakawa, K., Delgado-Escueta, A.V. (2002). Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. *American Journal of Medical Genetics*, **113**: 268-274.
- Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., Guerrini, R., Dobyns, W.B. (2001). Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology*, **57**: 2168-2178.
- Betting, L.E., Mory, S.B., Li, L.M., Lopes-Cendes, I., Guerreiro, M.M., Guerreiro, C.A.M., Cendes, F. (2007). Voxel-based morphometry in patients with idiopathic generalized epilepsies. *NeuroImage*, **32**: 498-502.
- Buhl, D.L., Harris, K.D., Hormuzdi, S.G., Monyer, H., Buzsaki, G. (2003). Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse *in vivo*. *Journal of Neuroscience*, **23**(3):1013-1018.
- Cassimeris, L., Morabito, J. (2004). TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly. *Molecular Biology of the Cell*, **15**: 1580-1590.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature Genetics*, **18**: 53-55.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989). Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, **30**: 389-399.

- Condorelli, D.F., Parenti, R., Spinella, F., Trovato Salinaro, A., Belluardo, N., Cardile, V., Cicirata, F. (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *European Journal of Neuroscience*, **10**(3):1202-1208.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., Wang, Y.T., Rpuleau, G.A. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, **31**(2): 184-189.
- Deans, M.R., Gibson, J.R., Sellitto, C., Connors, B.W., Paul, D.L. (2001). Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron*, **31**(3): 477-485.
- Delgado-Escueta, A.V., Enrile-Bacsal, F. (1984). Juvenile myoclonic epilepsy of Janz. *Neurology*, **34**: 285-294.
- de Nijs, L., Lakaye, B., Coumans, B., Léon, C., Ikeda, T., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., Chanas, G. (2006). EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Experimental Cell Research*, **312**(15): 2872-2879.
- Devinsky, O., Gershengorn, J., Brown, E., Perrine, K., Vazquez, B., Luciano, D. (1997). Frontal functions in juvenile myoclonic epilepsy. *Neuropsychiatry, Neuropsychology and Behavioral Neurology*, **10**(4): 243-246.
- Dibbens, L.M., Feng, H.-J., Richards, M.C., Harkin, L.A., Hodgson, B.L., Scott, D., Jenkins, M., Petrou, S., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Macdonald, R.L., Mulley, J.C. (2004). GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABA-A receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Human Molecular Genetics*, **13**: 1315-1319.
- Durner, M., Sander, T., Greenberg, D.A., Johnson, K., Beck-Mannagetta, G., Janz, D. (1991). Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. *Neurology*, **41** (10): 1651-1655.
- Elmslie, F., Williamson, M.P., Rees, M., Kerr, M., Kjeldsen, M.J., Pang, K.A., Sundqvist, A., Friis, M.L., Chadwick, D., Richens, A., Curtis, D., Whitehouse, W.P., Gardiner, R.M. (1997). Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Medizinische Genetik*, **9**: 15.
- Escayg, A., de Waard, M., Lee, D.D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T., Meisler, M.H. (2000). Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene *CACNB4* in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *American Journal of Human Genetics*, **66**: 1531-1539.
- Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D.Jr., Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1996). Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell*, **87**(4): 607-617.

- Gomes, M.M. (1994). Epilepsias: uma prioridade nacional em cuidados de saúde. *Revista Brasileira de Neurologia*, **30**(5): 141-147.
- Gomes, M.M. (1997). Frequência populacional da epilepsia. *Revista Brasileira Neurologia*, **33**(1): 3-7.
- Greenberg, D.A., Delgado-Escueta, A.V., Widelitz, H., Sparkes, R.S., Treiman, L., Maldonado, H.M., Park, M.S., Terasaki, P.I. (1988). Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA *loci* on human chromosome 6. *American Journal of Medical Genetics*, **31**: 185-192.
- Greenberg, D.A., Cayanis, E., Strug, L., Marathe, S., Durner, M., Pal, D.K., Alvin, G.B., Klotz, I., Dicker, E., Shinnar, S., Bromfield, E.B., Resor, S., Cohen, J., Moshe, S.L., Harden, C., Kang, H. (2005). Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy. *American Journal of Human Genetics*, **76**: 139-146.
- Guereiro, C.A.M., Guereiro, M.M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. (2000). Considerações Gerais. In: *Epilepsia*. Lemos, São Paulo: 1-10.
- Guerrini, R., Sicca, F., Parmeggiani, L. (2003). Epilepsy and malformations of the cerebral córtex. *Epileptic Disorders*, **5**(Supl. 2): S9-S26.
- Guerrini, R., Genton, P. (2004). Epileptic syndromes and visually induced seizures, *Epilepsia*, **45** (Supl. 1): 14–18.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortex development. *Nature Reviews Genetics*, **3**: 342-357.
- Hamani, C., Mello, L.E. (2002). Spontaneous recurrent seizures and neuropathology in the chronic phase of the pilocarpine and picrotoxin model of epilepsy. *Neurological Research*, **24**: 199-209.
- Hassel, B. (2001). Pyruvate carboxylation in neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **66**: 755-762.
- Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A.K., Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., et al. (2003). Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nature Genetics*, **33**: 527-532.
- Hauser, W.A., Hesdorffer, D.C. (1990). In: *Epilepsy: Frequency, Causes and Consequences*. Demos, New York.
- Hempelmann, A., Heils, A., Sander, T. (2006). Confirmatory evidence for an association of the *connexin-36* gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Research*, **71**: 223-228.

- Hosford, D.A., Lin, F.H., Wang, Y., Caddick, S.J., Rees, M., Parkinson, N.J., Barclay, J., Barclay, J., Cox, R.D., Gardiner, R.M., Hosford, D.A., Denton, P., Wang, Y., Seldin, M.F., Chen, B. (1999). Studies of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures: regulatory mechanisms and identification of the lh gene. *Advances in Neurology*, **79**: 239-252.
- Ikeda, K., Brown, J.A., Yagi, T., Norrander, J.M., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R., Linck, R.W. (2003). Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(9): 7725-7734.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M.K., Hirono, M., Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Letters*, **579**: 819-822.
- Isojärvi, J.I.T., Rättyä, J., Myllylä, V.V., Knip, M., Koivunen, R., Pakarinen, A.J., Tekay, A., Tapanainen, J.S. (1998). Valproate, lamotrigine, and insulin-mediated risks in women with epilepsy. *Annals of Neurology*, **43**: 446-451.
- Janz, D., Christian, W. (1957). Impulsiv-Petit mal. *Dtsch. Z.*, **176**: 348-386.
- Janz, D. (1969). Epilepsie mit impulsive-petit mal. In: *Die Epilepsien*. Georg Thieme, Stuttgart, 135-163.
- Janz, D. (1989). Juvenile myoclonic epilepsy. *Cleve Clinical Journal of Medicine*, **56** (suppl): 23-33.
- Jouveneau, A., Eunson, L.H., Spauschus, A., Ramesh, V., Zuberi, S.M., Kullmann, D.M., Hanna, M.G. (2001). Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet*, **358**: 801-807.
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R.M., Jang, M.K., Lenardo, M.J., Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular Cell*, **13**: 33-43.
- Kapoor, A., Ratnapriya, R., Kuruttukulam, G., Anand, A. (2007). A novel genetic locus for juvenile myoclonic epilepsy at chromosome 5q12-q14. *Human Genetics*, **121**: 655-662.
- Koepp, M.J., Duncan, J.S. (2004). Epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, **17**: 467-474.
- Kuzniecky, R., Murro, A., King, D., Morawetz, R., Smith, J., Powers, R., et al. (1993). Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology*, **43**: 681-687.
- Laschet, J.J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M.H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., Pumain, R. (2004). Glyceraldehyde-3-

- phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *The Journal of Neuroscience*, **24** (35): 7614-7622.
- Laschet, J.J., Kurcewicz, I., Minier, F., Trottier, S., Khallou-Laschet, J., Louvel, J., Gigout, S., Turak, B., Biraben, A., Scarabin, J.-M., Devaux, B., Chauvel, P., Pumain, R. (2007). Dysfunction of GABA-A receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **104**: 3472-3477.
- Liu, A.W., Delgado-Escueta, A.V., Serratosa, J.M., Alonso, M.E., Medina, M.T., Gee, M.N., Cordova, S., Zhao, H.Z., Spellman, J.M., Peek, J.R.R., Donnadieu, F.R., Sparkes, R.S. (1995). Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *American Journal of Human Genetics*, **57**(2): 368-381.
- Liu, A.W., Delgado-Escueta, A.V., Gee, M.N., Serratosa, J.M., Zhang, Q.W., Alonso, M.E., Medina, M.T., Cordova, S., Zhao, H.Z., Spellman, J.M., Donnadieu, F.R., Peek, J.R., Treiman, L.J., Sparkes, R.S. (1996). Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. *American Journal of Medical Genetics*, **63** (3): 438-446.
- Lorenz, S., Taylor, K.P., Gehrmanna, A., Becker, T., Muhled, H., Gresch, M., Tauer, U., Sander, T., Stephani, U. (2006). Association of *BRD2* polymorphisms with photoparoxysmal response. *Neuroscience Letters*, **400**: 135-139.
- Lund, M., Reintoft, H., Simonsen, N. (1976). Eine kontrollierte soziologischer und psychologische Untersuchung von Patienten mit juveniler myoklonischer Epilepsie. *Nervenarzt*, **47**: 708-712.
- Mas, C., Taske, N., Deutsch, S., Guipponi, M., Thomas, P., Covanis, A., Friis, M., Kjeldsen, M.J., Pizzolato, J.P., Villemure, J.-G., Buresi, C., Rees, M., Malafosse, A., Gardiner, M., Antonarakis, S.E., Meda, P. (2004). Association of the *connexin36* gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Medical Genetics*, **41**: 1-7.
- McKenna, M.C., Stevenson, J.H., Huang, X., Tildon, J.T., Zielke, C.L., Hopkins, I.B. (2000). Mitochondrial malic enzyme activity is much higher in mitochondria from cortical synaptic terminals compared with mitochondria from primary cultures of cortical neurons or cerebellar granule cells. *Neurochemistry International*, **36**: 451-459.
- Medina, M.T., Suzuki, T., Alonso, M.E., Duron, R.M., Martinez-Juarez, I.E., Bailey, J.N., Bai, D., Inoue, Y., Yoshimura, I., Kaneko, S., Montoya, N.C., Ochoa, A., et al. (2008). Novel mutations in *Myoclonin1/EFHC1* in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology*, **70**: 2137-2144.
- Meencke, H.J. (1985). Neuron density in the molecular layer of the frontal cortex in primary generalized epilepsy. *Epilepsia*, **26**(5): 450-454.

- Meschaks, A., Lindstrom, P., Halldin, C., Farde, L., Savic, I. (2005). Regional reductions in serotonin 1A receptor binding in juvenile myoclonic epilepsy. *Archives of Neurology*, **62**(6): 946-950.
- Obeid, T., Panayiotopoulos, C.P. (1989). Clonazepam in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, **30**: 603-606.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database no National Center for Biotechnology Information, National Institute of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>.
- O'Rourke, N.A., Sullivan, D.P., Kaznowski, C.E., Jacobs, A.A., McConnell, S.K. (1995). Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development*, **121**: 2165-2176.
- Pal, D.K., Evgrafov, O.V., Tabares, P., Zhang, F., Durner, M., Greenberg, D.A. (2003). BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common Juvenile Myoclonic Epilepsy. *American Journal of Human Genetics*, **73**: 261-270.
- Panayiotopoulos, C.P. (1994). Juvenile myoclonic epilepsy: an underdiagnosed syndrome. In: Wolf, P., ed. *Epileptic seizures and syndromes*. John Libbey, London: 221-230.
- Patel-King, R.S., Benashski, S.E., King, S.M. (2002). A bipartite Ca²⁺-regulated nucleoside-diphosphate kinase system within the *Chlamydomonas* flagellum: the regulatory subunit p72. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(37): 34271-34279.
- Patzke, S., Hauge, H., Sioud, M., Finne, E.F., Sivertsen, E.A., Delabie, J., Stokke, T., Aasheim, H.C. (2005). Identification of a novel centrosome/microtubule-associated coiled-coil protein involved in cell-cycle progression and spindle organization. *Oncogene*, **24**: 1159-1173.
- Pinto, D., de Haan, G.J., Janssen, G.A., Boezeman, E.H., van Erp, M.G., Westland, B., Witte, J., Bader, A., Halley, D.J., Kasteleijn-Nolst Trenité, D.G., Lindhout, D., Koeleman, B.P. (2004). Evidence for linkage between juvenile myoclonic epilepsy-related idiopathic generalized epilepsy and 6p11-12 in Dutch families. *Epilepsia*, **45**(3): 211-217.
- Sander, T., Bockenkamp, B., Hildmann, T., Blasczyk, R., Kretz, R., Wienker, T.F., Volz, A., Schmitz, B., Beck-Mannagetta, G., Riess, O., Epplen, J.T., Janz, D., Ziegler, A. (1997). Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. *Neurology*, **49**: 842-847.
- Savic, I., Lekvall, A., Greitz, D., Helms, G. (2000). MR spectroscopy shows reduced frontal lobe concentrations of N-acetyl aspartate in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy*, **41**(3): 290-296.
- Savic, I., Osterman, Y., Helms, G. (2004). MRS shows syndrome differentiated metabolite changes in human-generalized epilepsies. *NeuroImage*, **21**(1): 163-172.

- Semah, F., Picot, M.C., Adam, M.D., Broglin, D., Arzimanoglou, A., Bazin, B., et al. (1998). Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*, **51**: 1256-1262.
- Sharp, A.J., Mefford, H.C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., Stevenson, R.E., Schroer, R.J., Novara, F., De Gregori, M., Ciccone, R., Broomer, A., Casuga, I., et al. (2008). A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nature Genetics*, **40**: 322-328.
- Sidman, R.L., Rakic, P. (1973). Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research*, **62**: 1-35.
- Sik, A., Smith, R.L., Freund, T.F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience*, **101**: 51-65.
- Sohl, G., Guldenagel, M., Beck, H., Teubner, B., Traub, O., Gutierrez, R., Heinemann, U., Willecke, K. (2000). Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Molecular Brain Research*, **83**: 44-51.
- Steinlein, O.K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Phillips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (1995). A missense mutation in the neuronal receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics*, **11**: 201-203.
- Stogmann, E., Lichtner, P., Baumgartner, C., Bonelli, S., Assem-Hilger, E., Leutmezer, F., Schmied, M., Hotzy, C., Strom, T.M., Meitinger, T., Zimprich, F., Zimprich, A. (2006). Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different *EFHC1* mutations. *Neurology*, **67**: 2029-2031.
- Suzuki, T., Delgado-Escueta, A.V., Aguan, K., Alonso, M.E., Shi, J., Hara, Y., Nishida, M., Numata, T., Medina, M.T., Takeuchi, T., Morita, R., Bai, D., Ganesh, S., Sugimoto, Y., Inazawa, J., Bailey, J.N., Ochoa, A., Jara-Prado, A., Rasmussen, A., Ramos-Peek, J., Cordova, S., Rubio-Donnadieu, F., Inoue, Y., Osawa, M., Kaneko, S., Oguni, H., Mori, Y., Yamakawa, K. (2004). Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, **36**(8): 842-849.
- Suzuki, T., Inoue, I., Yamagata, T., Morita, N., Furuichi, T., Yamakawa, K. (2008). Sequential expression of *Efhc1/myoclonin1* in choroid plexus and ependymal cell cilia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **367**(1): 226-233.
- Swartz, B.E., Halgren, E., Simpkins, F., Syndulko, K. (1994). Primary memory in patients with frontal and primary generalized epilepsy. *Journal of Epilepsy*, **7**: 232-241.
- Tsuboi, T. (1977). Primary generalized epilepsy with sporadic myoclonias of myoclonic petit mal type. Georg Thieme, Stuttgart: 1-115.

- van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., van den Ouweland, A., et al. (1998). Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Human Molecular Genetics*, **7**: 1053-1057.
- Vijai, J., Kapoor, A., Ravishankar, H.M., Cherian, P.J., Girija, A.S., Rajendran, B., Rangan, G., Jayalakshmi, S., Mohandas, S., Radhakrishnan, K., Anand, A. (2003). Genetic association analysis of KCNQ3 and juvenile myoclonic epilepsy in a South Indian population. *Human Genetics*, **113**: 461-463.
- Wallace, R., (2002). Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *The Lancet Neurology*, **1**: 212.
- Welsh, J.P., Chang, B., Menaker, M.E., Aicher, S.A. (1998). Removal of the inferior olive abolishes myoclonic seizures associated with a loss of olivary serotonin. *Neuroscience*, **82**(3): 879-897.
- Welty, T.E. (2006). Juvenile myoclonic epilepsy: epidemiology, pathophysiology and management. *Pediatric Drugs*, **8** (5): 303-310.
- Weissbecker, K.A., Durner, M., Janz, D., Scaramelli, A., Sparkes, R.S., Spence, M.A. (1991). Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *American Journal of Medical Genetics*, **38**: 32-36.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., Sohl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*, **383**(5): 725-737.
- Woermann, F.G., Sisodiya, S.M., Free, S.L., Duncan, J.S. (1998). Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy: evidence of widespread cerebral structural changes. *Brain*, **121**: 1661-1667.
- Woermann, F.G., Free, S.L., Koepp, M.J., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S. (1999). Abnormal cerebral structure in juvenile myoclonic epilepsy demonstrated with voxel-based analyses of MRI. *Brain*, **122**: 2101-2108.
- Wolf, P. (1992). Juvenile myoclonic epilepsy. In: Roger, J., Bureau, M., Dravet, C., Dreifuss, F.E., Perret, A., Wolf, P., eds. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. John Libbey, London: 313-327.
- Wyllie, E., Comair, Y., Ruggieri, P., Raja, S., Prayson, R. (1996). Epilepsy surgery in the setting of periventricular leukomalacia and focal cortical dysplasia. *Neurology*, **46**: 839-841.
- Yacubian, E.M.T. (2000). Epilepsia mioclônica juvenil. In: Guereiro, C.A.M., Guereiro, M.M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., eds. *Epilepsia*. Lemos, São Paulo: 215-222.
- Zielinski, J.J. (1988). Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw, J., Richens, A., Oxley, J. (eds) *A Textbook of Epilepsy*, Third edition, Churchill Livingstone, New York: 21-48.

Zoidl, G., Dermietzel, R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future.
Cell Tissue Research, **310**(2):137-142.

OBJETIVOS

Os principais objetivos desta tese foram a determinação do perfil de expressão do gene *Efhc1* e a avaliação da viabilidade de estudos funcionais pela modulação de sua expressão no cérebro de roedores em diferentes estágios de desenvolvimento.

Para atingir tais propósitos, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Determinação da expressão do transcrito e da abundância da proteína codificada pelo gene *Efhc1* ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso central de roedores;
2. Verificação da distribuição do transcrito do gene *Efhc1* no cérebro de roedores durante o desenvolvimento e no animal adulto;
3. Silenciamento do gene *Efhc1* *in vitro* e *in vivo* pela utilização da técnica de interferência por RNA.

***Expression profile and distribution of
Efhc1 gene transcript during rodent brain
development***

**Artigo publicado no
*Journal of Molecular Neuroscience***

Expression Profile and Distribution of *Efhc1* Gene Transcript During Rodent Brain Development

Fábio F. Conte · Patrícia A. O. Ribeiro ·
Rafael B. Marchesini · Vinícius D. B. Pascoal ·
Joelcimar M. Silva · Amanda R. Oliveira ·
Rovilson Gilioli · Lourenço Sbragia ·
Jackson C. Bittencourt · Iscia Lopes-Cendes

Received: 9 December 2008 / Accepted: 19 January 2009
© Humana Press 2009

Abstract One of the putative causative genes for juvenile myoclonic epilepsy (JME) is *EFHC1*. We report here the expression profile and distribution of *Efhc1* messenger RNA (mRNA) during mouse and rat brain development. Real-time polymerase chain reaction revealed that there is no difference in the expression of *Efhc1* mRNA between right and left hemispheres in both species. In addition, the highest levels of *Efhc1* mRNA were found at intra-uterine stages in mouse and in adulthood in rat. In common, there was a progressive decrease in *Efhc1* expression from 1-day-old neonates to 14-day-old animals in both species. In situ hybridization studies showed that rat and mouse *Efhc1* mRNAs are expressed in ependymal cells of ventricle walls. Our findings suggest that *Efhc1* expression is more important during initial phases of brain development and

that at this stage it could be involved in key developmental mechanisms underlying JME.

Keywords Juvenile myoclonic epilepsy · Gene expression · Real-time PCR · *In situ* hybridization

Introduction

Juvenile myoclonic epilepsy (JME), one of the most common forms of epilepsy, has been intensively studied at the molecular level (Greenberg et al. 1988; Cossette et al. 2002; Pal et al. 2003). One of the putative causative genes for JME is *EFHC1*, which encodes the Myoclonin1 protein. It has been demonstrated that EFHC1 protein induces apoptosis in cultured neurons through the association with an R-type voltage-dependent calcium channel (Cav2.3; Suzuki et al. 2004). In addition, five different *EFHC1* missense mutations identified in patients with JME were shown to decrease this pro-apoptotic function in cell models (Suzuki et al. 2004).

The ortholog gene in mouse, named *mRib72-1/Efhc1* (from now on called *Efhc1* only), presents its highest expression levels in cilia and flagella of testis and oviduct of adult mice (Suzuki et al. 2004; Ikeda et al. 2005). In addition, Efhc1 protein is present at choroid plexus and ventricle walls in embryonic mouse brain and at cilia of ependymal cells from neonates to adult stages (Suzuki et al. 2008). The ortholog gene in rat (also named *Efhc1*) has been identified (Florea et al. 2005); however, there are no data about the distribution and expression profile of rat *Efhc1* messenger RNA (mRNA) and protein during brain development. Because EFHC1 could play a role in cell division, since it colocalizes with the mitotic spindle and

F. F. Conte · P. A. O. Ribeiro · R. B. Marchesini ·
V. D. B. Pascoal · I. Lopes-Cendes (✉)
Department of Medical Genetics,
University of Campinas—UNICAMP,
Tessália Vieira de Camargo, 126,
Campinas, São Paulo, Brazil 13084-971
e-mail: icendes@unicamp.br

J. M. Silva · A. R. Oliveira · J. C. Bittencourt
Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences,
University of São Paulo—USP,
São Paulo, São Paulo, Brazil

R. Gilioli
Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB),
University of Campinas—UNICAMP,
Campinas, São Paulo, Brazil

L. Sbragia
Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences,
University of Campinas—UNICAMP,
Campinas, São Paulo, Brazil

Published online: 04 February 2009

 Humana Press

with midbody during mitosis cytokinesis (de Nijs et al. 2006), it is reasonable to predict a putative function during brain development. Indeed, some clinical data support this role since an increased concentration of gray matter was found in the frontobasal regions in patients with JME (Betting et al. 2006).

The aim of our study was to determine and compare the expression profile of *Efhc1* gene during brain development and quantitatively access *Efhc1* mRNA distribution in two rodent models, mice and rats.

Materials and Methods

Animals

We used the isogenic lineages BALB/cAnUnib mice (*Mus musculus*) and Lewis/Unib rats (*Rattus norvegicus*) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (University of Campinas). Programmed matings were carried out using 8-week-old mice in order to obtain embryos of different ages. Animals were treated according to the guidelines for animal care issued by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at the University of Campinas and the research protocol was approved by the same committee.

Real-Time PCR Analysis

Brains of three animals at each age were removed and separated into left and right hemispheres. Mouse *Efhc1* gene expression was analyzed in embryos of 15, 17, and 18-days-old (E15, E17, and E18), neonates of 1, 7, 14, 21-days-old (P1, P7, P14, and P21), and adults of 4, 6, 8, and 24-week-old. Rat *Efhc1* gene expression was analyzed in the same ages, with the exceptions of embryos and the older adult. After total RNA extraction (TRIzol reagent—Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis using SuperScript III Reverse Transcriptase (50 U) and random primers (250 ng; both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the relative expression of mouse and rat *Efhc1* genes was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR; Applied Biosystems 7500 real-time PCR system, Foster City, CA, USA) using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The *Efhc1* probe was located in exon 5 (5'-CCCCTTCCCCTCCTC-3') of the mouse *Efhc1* mRNA (GenBank accession number: XM_907335). In order to verify the sequence similarity between mouse and rat *Efhc1* coding sequences (CDS), we performed a BLAST 2 sequences analysis, since the probe used to determine rat *Efhc1* mRNA expression by real-time PCR was produced based on mouse *Efhc1* CDS. The GenBank

accession numbers are: NM_001122947 (rat) and XM_907335 (mouse). BLAST 2 sequences analysis showed that rat and mouse *Efhc1* CDS have 91% identity (data not shown). Mouse and rat *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* genes were used as endogenous controls (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were carried out using 50 ng of cDNA. Cycle conditions were: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All relative quantification experiments were performed in duplicates or triplicates. The relative expression of mouse and rat *Efhc1* genes was calculated by the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen 2001).

Western Blot Analysis

Right and left hemispheres from E15, E17, E18, P1, P7, P14, 8-, and 24-week-old mice were submitted to total protein extraction according to Deshane et al. (2004) with small modifications. Briefly, brain tissue was homogenized in the lysis buffer using a Politron (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). After centrifugation at 14,000 rpm for 15 min, the supernatant was collected. Sample concentrations were determined using Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Thirty micrograms of protein samples were fractionated by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose Hybond C filters (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) using a horizontal semi-dry electroblot apparatus (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The filters were incubated for 2 h at 25°C in blocking solution (5% non-fat dry milk powder in 25 mM Tris-buffered saline, pH 7.4) and for 16 h at 4°C with polyclonal anti-Efhc1 and β -actin antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluted 1:350 and 1:4,000, respectively. Immunoreacted bands were detected using an alkaline phosphatase-conjugated and affinity-purified goat anti-rabbit IgG antibody diluted 1:20,000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium substrates (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Kaleidoscope protein standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to estimate the molecular weight of the bands. Polyclonal anti-Efhc1 antibody was kindly provided by Dr. Ritsu Kamiya (University of Tokyo). This antibody was produced from an antigen peptide corresponding to amino acid residues 554–639 fused to GST. Anti-Efhc1 antibody was purified from the serum by a blot-purification method using the peptide antigen (Ikeda et al. 2005). The relative quantification of Efhc1 protein was performed by measuring the intensity of the bands in relation to β -actin using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

In Situ Hybridization

In order to verify mouse and rat *Efhc1* transcripts distribution, the *in situ* hybridization method was used. The first-strand cDNA was synthesized as described previously. The mouse sense and antisense *Efhc1* probes were generated from a 691-bp fragment ranging from the end of exon 2 to the end of exon 5 (GenBank accession no. *XM_907335*). The 691-bp fragment was amplified using the primers *Efhc1* 211F (5'-ATCTTAACCTACGGGC CACTC-3') and *Efhc1* 902R (5'-AAACTTTGGGCA TACGCTGTC-3') and Taq DNA Polymerase (1 U; Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). This fragment was gel-purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) and ligated into the pGEM-T Easy plasmid vector for 16 h at 4°C using T4 Ligase (1 U; both from Promega, Madison, WI, USA). After transformation in DH5 α -competent cells, the colonies were grown in LB medium added to 100 mg/mL ampicillin. Plasmid DNAs containing the cloned insert were isolated using a Wizard Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, USA). Cloned insert identity and orientation were confirmed by automatic sequencing in MEGABACE (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). For generation of ³⁵S-labeled cRNA *Efhc1* probes, the plasmid was linearized by digestion with *Pst*I (antisense) or *Nco*I (sense) restriction enzymes and subjected to *in vitro* transcription with ³⁵S-UTP (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and the appropriate RNA polymerases (T7 for antisense and SP6 for sense probe) according to the manufacturer protocol (Riboprobe Combination System—Promega, Madison, WI, USA). The mixture was digested with DNAase (Promega, Madison, WI, USA); non-incorporated nucleotides were removed and the labeled probes were collected using Sephadex G-50 spin columns (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

The animals were deeply anesthetized with 35% chloral hydrate (35 mg/kg, ip) and perfused transcardially with 200 mL of 0.9% saline, followed by 1 L of cold 4% formaldehyde in 0.1 M sodium tetraborate fixative (pH 9.5). Immediately after perfusion, whole heads were placed in fixative solution for 1 day. Brains were then removed and postfixed for 1 day in 20% sucrose in fixative solution. For cryoprotection, brains were first placed in a solution of 20% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS: 10 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl, and 137 mM NaCl, pH 7.4) for 1 day at 4°C and then in a solution of 30% sucrose in PBS at 4°C for 1 day. In a freezing microtome, the brains were cut at the frontal plane to a thickness of 30 μ m, collected in antifreeze solution, and stored at -30°C. Prior to hybridization, sections were mounted onto Super-Frost plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and pretreated with 0.5 μ g/ml proteinase K (37°C for 30 min)

and triethanolamine/acetic anhydride. The probes were diluted at concentrations of about 10⁶ cpm/mL in hybridization solution. This solution consisted of 10% dextran sulfate, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; pH 8.0), 0.01% sheared salmon sperm DNA, 0.05% yeast transfer RNA, 1 $\times$ Denhardt's solution, 50% formamide, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM dithiothreitol, and 0.1% sodium thiosulfate. The hybridization solution (100 μ L) and a coverslip were applied to each slide and sections were incubated overnight at 56°C. On the following day, the coverslips were removed and the slides were rinsed in 2 $\times$ sodium chloride/sodium citrate buffer (SSC). Sections were treated in a solution of 20 μ g/ml of RNase A (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany), 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 1 mM EDTA (pH 8.0) for 30 min at 37°C. Sections were then rinsed in decreasing concentrations of SSC at 55–60°C, dehydrated, and placed in X-ray film cassettes with BMR-2 film (Kodak, Rochester, NY, USA) for 2 days. Subsequently, slides were dipped in NTB-2 photographic emulsion (Kodak, Rochester, NY, USA), air-dried, and stored with desiccant in foil-wrapped slide boxes at 4°C for 4 weeks. Sections were developed with D-19 (Kodak, Rochester, NY, USA) for 3 min at 14°C, rinsed briefly in distilled water, fixed with Polymax fixer (Kodak, Rochester, NY, USA) for 3 min at 14°C, and rinsed for 20 min again under running distilled water. Finally, sections were counterstained with Nissl staining (thionin, 0.025%), dehydrated, cleared in xylene, and coverslipped with DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Brains sections of P7, P14, 4, and 8-week-old animals (three animals per age) were used in these experiments.

Imaging Processing and Data Analysis

Images were captured using a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a SPOT RT digital camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) adapted to the microscope, together with a Dell 4400 Dimension computer, under bright- and dark-field illumination. Adobe Photoshop 4.0 (Adobe, San Jose, CA, USA) image-editing software was used to combine photomicrographs into plates. Only sharpness, contrast, and brightness were adjusted. Labeled slides were characterized quantitatively via digital image analysis using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The labels were counted using a $\times 5$ objective, with a constant area (100 $\times$ 150 μ m, 1.5 $\times$ 10⁻² mm²) and scale grid position. The position of the counting grid was delineated encompassing the entire third ventricle area. The measurement parameter was the integrated optical density (IOD), a parameter representing the label intensity. The average value of IOD of three animals per age was

calculated. The data were exported to Excel (Microsoft Corporation).

Statistical Analysis

Two-factor analysis of variance (ANOVA) test was used to access differences in *Efhc1* gene expression between right and left brain hemispheres and ages. When a significant variation was found, Tukey test was used as a *post hoc* comparison test to adjust *p* values. For Western blot and *in situ* hybridization quantifications, we used one-factor ANOVA. Statistical significance was considered at α of 5%. Statistical analyses were carried out with BioEstat 3.0 program (Ayres et al. 2003).

Results

Efhc1 Expression During Mouse Brain Development

We found no significant differences in mouse *Efhc1* mRNA expression between right and left brain hemispheres in any of the ages studied ($p=0.5203$, Fig. 1a). However, we found a significant difference in *Efhc1* expression among the ages studied ($p<0.0001$). *Efhc1* mRNA expression was high during intra-uterine and early postnatal stages (from E15 to P7), decreasing from E18 to 4-week-old animals and stabilizing at lower levels in older animals (from 4 to 24-week-old; Fig. 1b). Embryos of 15 days (E15) presented a 4.5-fold increased expression than 4-

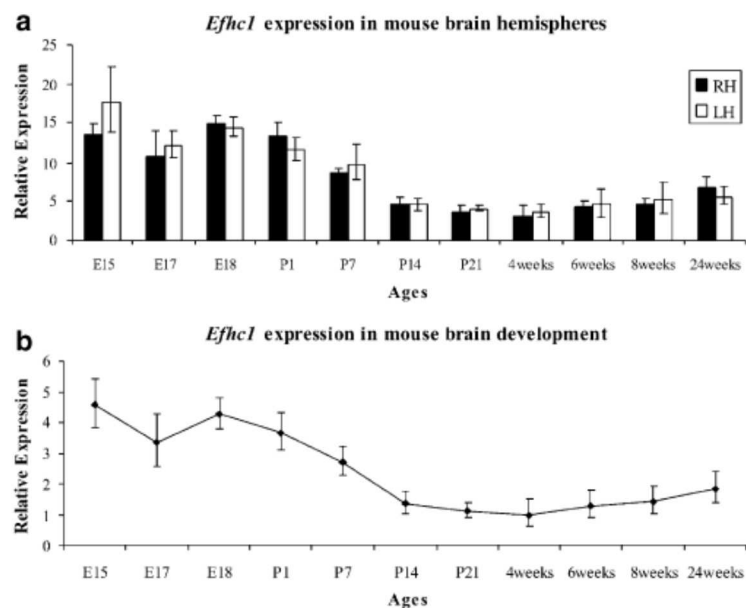
week-old animals (Fig. 1b). Indeed, E15, E17, and E18 mRNA relative expression levels were significantly higher than in late postnatal stages and adulthood expression levels ($p<0.05$).

Mouse *Efhc1* protein was equally distributed in right and left brain hemispheres in animals of the same age ($p=0.8454$, Fig. 2a, b). In addition, we observed that *Efhc1* protein is more abundant from E15 to E18, decreasing from this age to P1, and stabilizing until adulthood (Fig. 2b). Therefore, both *Efhc1* mRNA and protein are more abundant in younger animals than in older ones (Fig. 3). Furthermore, we also found a good correspondence between mRNA and protein levels, so that, in general, a decrease in mRNA expression was accompanied by a decrease in the abundance of *Efhc1* protein (Fig. 3).

Efhc1 Expression During Rat Brain Development

We found no significant differences in rat *Efhc1* mRNA expression between left and right brain hemispheres in all ages studied ($p=0.2756$, Fig. 4a). However, we found a significant difference in *Efhc1* mRNA relative expression when animals of different ages were compared ($p=0.03865$, Fig. 4b). Group comparison showed that P14 expression level was significantly lower than 6-week-old expression levels ($p=0.04797$, Fig. 4b). In addition, we observed that the relative expression levels of 6-week-old animals were almost threefold higher than that of P14 and are even greater than in P1 (Fig. 4b).

Figure 1 Expression profile of mouse *Efhc1* transcript during brain development. **a** *Efhc1* mRNA expression in mouse brain hemispheres during development. Columns represent gene expression average values obtained from three animals of each age, RH: right hemisphere and LH: left hemisphere. **b** *Efhc1* transcript expression during mouse brain development. In **a** and **b**, vertical bars indicate minimum and maximum relative expression values. E: embryonic day, P: postnatal day



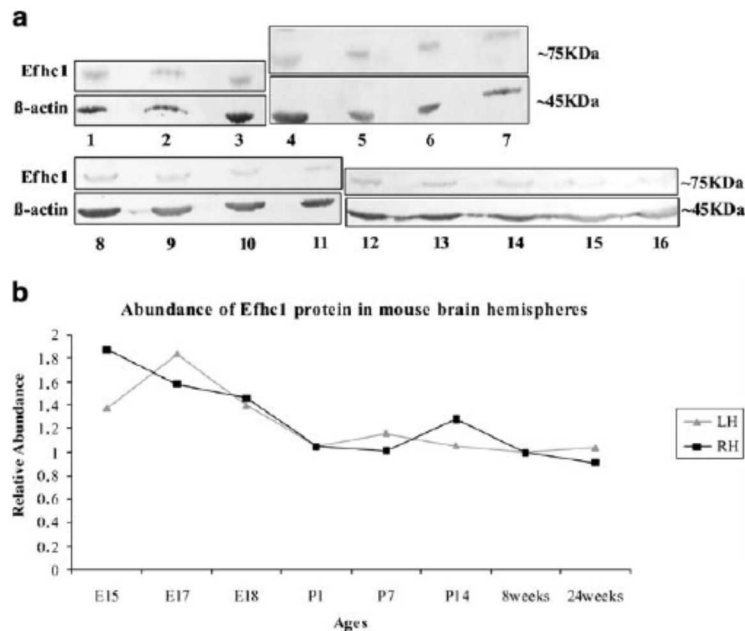


Figure 2 Analysis of the abundance of mouse Efhc1 protein during brain development. **a** Western blot analysis of Efhc1 protein using a polyclonal anti-Efhc1 antibody (Ikeda et al. 2005). All reactions were performed using 30 µg of total protein extracts. Lanes 1 to 7 and 16 correspond to right hemisphere samples of animals at the following ages, respectively: E15, E17, E18, P1, P7, P14, and adults of 8 and 24-week-old. Lanes 9 to

15 correspond to left hemisphere samples of animals with the same ages as above. Efhc1 protein was detected at the expected size (~75 kDa; upper panels). The anti-β-actin antibody was used as a control (lower panels). **b** Relative abundance of Efhc1 protein during mouse brain development obtained by densitometric analysis. LH: left hemisphere, RH: right hemisphere, E: embryonic day, P: postnatal day

A comparison between mouse and rat *Efhc1* mRNA relative expressions from P1 to 8-week-old animals (Fig. 5) revealed that, while there was still a decrease in the expression levels from P1 to P14 in rat, the highest relative expressions levels were observed in animals of 4 and 6-week-old. It is important to note that we can only compare the expression profile of mouse and rat *Efhc1* mRNA and not the relative values of expression since we used different endogenous controls (mouse and rat *Gapdh*) to determine the expression profiles.

Distribution and Quantification of Mouse and Rat Efhc1 mRNA by In Situ Hybridization

There was a high correlation in the distribution of mouse and rat *Efhc1* mRNAs. In both species, cells at the subventricular zone (SVZ) and ependymal cells surrounding the walls of the laterals, third and fourth ventricles, cerebral aqueduct, and choroid plexus were strongly labeled in all ages studied (Fig. 6 A–O). We could detect strong signals even in older animals (4 and 8-week-old). Hybridization with the sense probe produced no labeling above background level (data not shown). Quantitative analysis by densitometry showed that P7 mice presented the highest IOD and P14 showed the lowest values. This was

different than the one we found by real-time PCR mRNA quantification in which the lowest relative expression levels were found in 4-week-old animals (Fig. 7). IODs at 4- and 8-week-old mice were very similar and lower than P1. Overall, densitometric quantification of *in situ* hybridization did not show significant differences in *Efhc1* mRNA expression in mice at different developmental stages ($p=0.9108$). In rats, the highest IOD value was observed at P7 with a slight but progressive decrease until 8-week-old

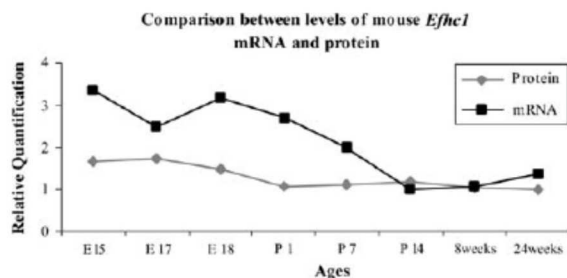


Figure 3 Comparison between levels of mouse *Efhc1* mRNA and protein during brain development. *Efhc1* mRNA and protein show higher levels at embryonic stages. P14 and 24-week-old samples were used as calibrators for *Efhc1* mRNA and protein curves, respectively. E: embryonic day, P: postnatal day

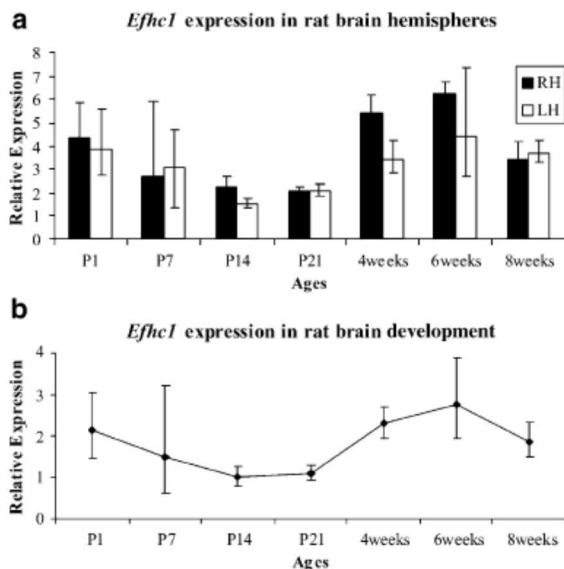


Figure 4 Expression profile of rat *Ephc1* transcript during brain development. **a** *Ephc1* mRNA expression in rat brain hemispheres during development. Columns represent gene expression average values obtained from three animals of each age. RH: right hemisphere, LH: left hemisphere **b** *Ephc1* transcript expression during rat brain development. In **a** and **b**, vertical bars indicate minimum and maximum relative expression values. E: embryonic day, P: postnatal day

animals (Fig. 7). This profile is similar (but not identical) to that obtained in the real-time PCR quantification, in which 4-week-old animals showed higher expression than the other ages (Fig. 4b). However, average IODs were not significantly different among animals of distinct developmental stages ($p=0.7533$).

Discussion

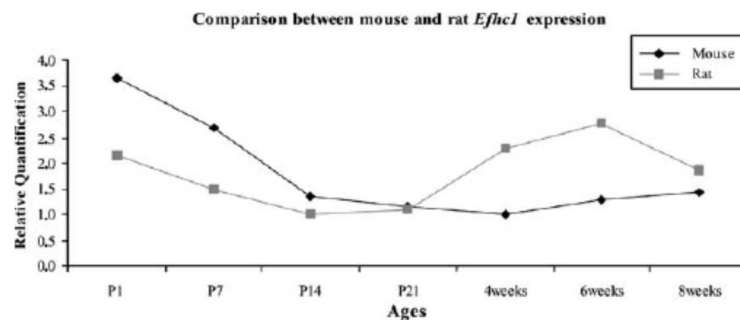
In this study, we determined *Ephc1* mRNA expression profile and its tissue distribution during mouse and rat brain development. We showed that mouse and rat *Ephc1*

expression is not significantly different in right and left brain hemispheres. However, we found differences in *Ephc1* expression among animals of different ages.

In mice, *Ephc1* mRNA expression is higher in embryos than in subsequent developmental stages. There are two previous studies addressing this issue with contradictory results. In the first, the authors built a small expression profile of mouse *Ephc1* during development (only five ages were analyzed), showing that mouse *Ephc1* expression is higher in early development decreasing progressively until P10 and subsequently stabilizing in adulthood (Grisar et al. 2006). In contrast, a more recent report (Suzuki et al. 2008) showed that the expression of mouse *Ephc1* was largely constant from embryonic to adult stages. It is interesting to note that our *Ephc1* mRNA densitometric quantification (IOD) also showed a somewhat constant distribution of *Ephc1* transcripts from embryonic to adult stages. However, the results of our real-time PCR experiments greatly contrast with these findings, showing undoubtedly that *Ephc1* mRNA expression varies during brain development in mice. These results can be explained by the fact that real-time PCR is by far more sensitive to variations in the numbers of mRNA molecules than are densitometric analysis. In addition, consistent with our real-time PCR results, the Western blot experiments demonstrated that mouse *Ephc1* protein levels are higher in embryos than in the subsequent developmental stages. The highest expression of the *Ephc1* gene in brain of mouse embryos in comparison to older animals suggests that any of the putative EFHC1 functions, e.g., ciliary activity (Ikeda et al. 2005), participation in cellular division (de Nijs et al. 2006), and cerebrospinal fluid (CSF) movement and secretion (Ibanez-Tallon et al. 2004; Suzuki et al. 2008), could be necessary to the correct central nervous system organization during its initial developmental stages.

In rats, although *Ephc1* expression mainly at P1 is still high, the highest levels were seen in adulthood (4- and 6-week-old animals). Unfortunately, we did not generate data on the embryonic expression of rat *Ephc1*. Therefore, we do not know if *Ephc1* expression profile of mice and rats

Figure 5 Comparison between mouse and rat *Ephc1* mRNA expression during brain development. The expression profile is very similar from P1 to P14, where *Ephc1* expression levels progressively decrease. However, after P21, rat *Ephc1* expression levels become high while mouse *Ephc1* levels stay low. P: postnatal day



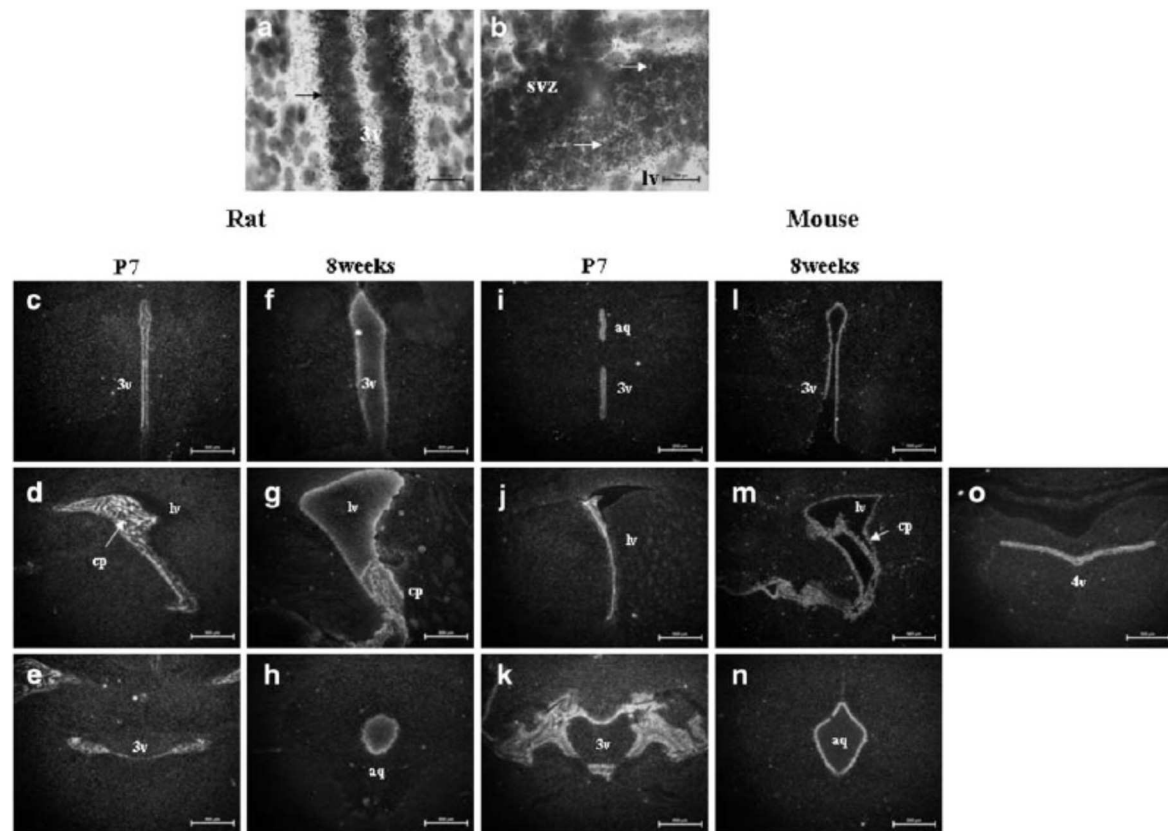


Figure 6 Distribution of *Ephc1* mRNA in mouse and rat brain during development. (a and b) Bright-field photomicrographs showing rat third ventricle (a) and mouse choroid plexus (b) in reference (thionin-stained) sections. Arrows point to cells labeled with *Ephc1* probe. (c–h) Dark-field photomicrographs showing the distribution of rat *Ephc1* mRNA in P7 (c–e) and 8-week-old animals (f–h). (i–o) Dark-field

photomicrographs showing the distribution of mouse *Ephc1* mRNA in P7 (i–k) and 8-week-old animals (l–n). (o) Dark-field photomicrograph showing the distribution of mouse *Ephc1* mRNA in the fourth ventricle of a 4-week-old animal. svz: subventricular zone; 3v: third ventricle; 4v: fourth ventricle; lv: lateral ventricle; cp: choroid plexus; aq: cerebral aqueduct. Scale bar 500 μ m

is similar at this developmental stage. However, at this point, it is unclear if the difference between mouse and rat *Ephc1* expression profile is cause or consequence of species variation in developmental or physiological pro-

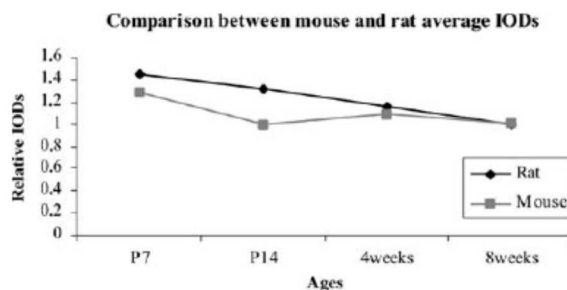


Figure 7 Comparison between mouse and rat *Ephc1* average IODs during brain development. For both species, P7 showed the highest IOD value. IOD: integrated optical density; P: postnatal day

cesses in the brain. Indeed, Kichula and Huntley (2008) demonstrated that there are anatomical differences between mice and rats in the development and organization of posterior medial nucleus inputs to barrel cortex. These differences have implications in the speed of whisker movements in these species (they are faster in mice than in rats). Also, there are significant differences in the intensity of the unidirectional K^+ fluxes in astrocytes between rat and mouse cell culture (Walz and Kimelberg 1985; Peng et al. 1998).

In addition, *Ephc1* may play stage-specific roles, which could vary in importance in different species. In this context, during embryonic stages of brain development, *Ephc1* may preferentially associate with mitotic spindle and with midbody during mitosis, contributing to growth of the central nervous system. In adult brains, besides participation in cell division, *Ephc1* could preferentially associate with R-type voltage-dependent calcium channels (Suzuki et

al. 2004) and, therefore, play an important role in neuronal excitability process. Recent reports also indicated a possible dual role for another gene related to familial epilepsy, *LGII*, a gene implicated in the etiology of autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features (Schulte et al. 2006; Fukata et al. 2006; Ribeiro et al. 2008).

The in situ hybridization experiments showed that cells at the SVZ and ependymal cells lining the ventricular zone were strongly labeled. In both species, we were able to detect *Efhc1* mRNA expression in all ages studied. Our results confirm previous observations related to the distribution of mouse *Efhc1* mRNA, including the absence of signal in neuronal cells (Suzuki et al. 2008), but generate new data on rat *Efhc1* gene transcript distribution.

EFHC1 is homolog to *Chlamydomonas* axonemal protein Rib72 and it is found only in axonemes of motile cilia and flagella (Ikeda et al. 2005). So, it is possible that EFHC1 participates in ciliary function. In addition, there is a growing body of evidences suggesting that EFHC1 plays this role by the interaction with microtubules (Ikeda et al. 2005; de Nijs et al. 2006). The importance of microtubules in neuronal migration was the subject of many studies (Hafezparast et al. 2003; Tanaka et al. 2004) and it has been emphasized by the demonstration that mutations in α -tubulin cause abnormalities in this process (Keays et al. 2007). Lissencephaly, a disorder of neuronal migration, is caused by mutations in genes that play key roles in the stabilization and function of microtubules, such as *DCX* and *LIS1* (Francis et al. 1999; Gleeson et al. 1999; Smith et al. 2000). In fact, *DCX* is highly expressed in migrating and differentiating neurons during cortex formation and mutations in this gene, causing lissencephaly, are located in the tubulin-binding domains of the protein (Taylor et al. 2000). Furthermore, *Dcx* knockout mice exhibit defects in neuronal migration from the SVZ to the olfactory bulbs via the rostral migratory stream (Koizumi et al. 2006). Another gene implicated in the cause of lissencephaly is *LIS1* (Dobyns et al. 1993). The protein encoded by this gene localized to the Cajal-Retzius cells (the early pioneering neurons of the cortex molecular layer) and periventricular neuroepithelium (including tanycytes, the precursors of the ependymal cells) in the developing human brain and at ependyma at later gestational stages (Clark et al. 1997).

The dynamic role of the ependyma in the development of the nervous system including its participation in neural induction, arrest of mitotic activity in the neuroepithelium, guidance of axonal growth cones, and active secretory function, as well as its involvement in genetic diseases with abnormal neuroblast migration (e.g., lissencephaly and pachygyria) is well documented (Sarnat 1992; Sarnat et al. 1993). For example, an abnormal ependyma in lissencephaly may be a primary factor in the pathogenesis since it may contribute to disturbances in neurogenesis, guidance of

axonal projections, and neuroblast migrations (Sarnat et al. 1993). In addition, it has been demonstrated that the orientation of neuroblast migration (derived from the SVZ) correlates with the flow of CSF, which is dependent on ciliary activity of ependymal cells (Sawamoto et al. 2006).

Therefore, in a similar way to that of *DCX* and *LIS1*, we can hypothesize that an abnormal expression of *EFHC1* (caused by a loss-of-function mutation) at embryonic developmental stage could disrupt EFHC1–microtubules interaction, which could alter ependymal cells activities leading to abnormalities in the neuroblast migratory dynamics, which, in turn, may result in structural abnormalities in the developing brain, thus contributing to the etiology of JME. Indeed, Betting et al. (2006) demonstrated that there is an increase in gray matter concentration in the frontobasal regions of patients with JME when compared to controls, suggesting that brain structural abnormalities could indeed be involved in the pathophysiology of JME.

In conclusion, we have determined the expression profile and distribution of mouse and rat *Efhc1* mRNA during brain development. Our findings suggest that *Efhc1* expression is important during the initial phases of brain development. Although many biologic functions have been proposed for *EFHC1*, its exact relationship with epileptogenesis is still unclear.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Ritsu Kamiya (University of Tokyo) for kindly providing the polyclonal anti-Efhc1 antibody used in this study. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP—São Paulo, Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq—Brazil. F.F.C. is recipient of a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES—Brazil. I.L.-C. and J.C.B. are investigators of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq—Brazil.

References

- Ayres, M., Ayres, M., Jr, Ayres, D. L., & Santos, A.S. (2003). BioEstat 3.0. Mamirauá Civil Society, Mamirauá.
- Betting, L. E., Mory, S. B., Li, M. L., et al. (2006). Voxel-based morphometry in patients with idiopathic generalized epilepsies. *NeuroImage*, 32, 498–502. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.04.174.
- Clark, G. D., Mizuguchi, M., Antalffy, B., Barnes, J., & Armstrong, D. (1997). Predominant localization of the *LIS* family of gene products to Cajal-Retzius cells and ventricular neuroepithelium in the developing human cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(9), 1044–1052. doi:10.1097/00005072-199709000-00009.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., et al. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 31, 184–189. doi:10.1038/ng885.
- de Nijs, L., Lakaye, B., Coumans, B., et al. (2006). EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the

- mitotic spindle through its N-terminus. *Experimental Cell Research*, 312, 2872–2879. doi:10.1016/j.yexcr.2006.05.011.
- 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, 7872–7883. doi:10.1021/jf040407d.
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., & Ledbetter, D. H. (1993). Lissencephaly: A human brain malformation associated with deletion of the *LIS1* gene located at chromosome 17p13. *Journal of the American Medical Association*, 270, 2838–2842. doi:10.1001/jama.270.23.2838.
- Florea, L., Di Francesco, V., Miller, J., et al. (2005). Gene and alternative splicing annotation with AIR. *Genome Research*, 15, 54–66. doi:10.1101/gr.2889405.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23 (2), 247–256. doi:10.1016/S0896-6273(00)80777-1.
- Fukata, Y., Adesnik, 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, 1792–1795. doi:10.1126/science.1129947.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., & Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. doi:10.1016/S0896-6273(00)80778-3.
- Greenberg, D. A., Delgado-Escueta, A. V., Widelitz, H., et al. (1988). Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *American Journal of Medical Genetics*, 31, 185–192. doi:10.1002/ajmg.1320310125.
- Grisar, T., de Nijs, L., Chanas, G., et al. (2006). Some genetic and biochemical aspects of myoclonus. *Neurophysiologie Clinique*, 36, 271–279. doi:10.1016/j.neucli.2006.11.002.
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., et al. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 300(5620), 808–812. doi:10.1126/science.1083129.
- Ibanez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., et al. (2004). Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Human Molecular Genetics*, 13, 2133–2141. doi:10.1093/hmg/ddh219.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M. K., Hirono, M., & Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is a axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Letters*, 579, 819–822. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.070.
- Keays, D. A., Tian, G., Poirier, K., et al. (2007). Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, 128(1), 45–57. doi:10.1016/j.cell.2006.12.017.
- Kichula, E. A., & Huntley, G. W. (2008). Developmental and comparative aspects of posterior medial thalamocortical innervation of the barrel cortex in mice and rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 509, 239–258. doi:10.1002/cne.21690.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., et al. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 9(6), 779–786. doi:10.1038/nn1704.
- 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)). *Methods*, 25(4), 402–408.
- Pal, D. K., Evgrafov, O. V., Tabares, P., Zhang, F., Durner, M., & Greenberg, D. A. (2003). BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *American Journal of Human Genetics*, 73, 261–270. doi:10.1086/377006.
- Peng, L., Arystarkhova, E., & Sweadner, K. J. (1998). Plasticity of Na,K-ATPase isoform expression in cultures of flat astrocytes: species differences in gene expression. *Glia*, 24, 257–271. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199811)24:3<257::AID-GLIA1>3.0.CO;2-#.
- Ribeiro, P. A. O., Sbragia, L., Gilioli, R., Langone, F., Conte, F. F., & Lopes-Cendes, I. (2008). Expression profile of *Lgi1* gene in mouse brain during development. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35, 323–329. doi:10.1007/s12031-008-9096-0.
- Sarnat, H. B. (1992). Role of the human fetal ependyma. *Pediatric Neurology*, 8, 163–178. doi:10.1016/0887-8994(92)90063-5.
- Sarnat, H. B., Darwish, H. Z., Barth, P. G., et al. (1993). Ependymal abnormalities in Lissencephaly/Pachygyria. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 52(5), 525–541. doi:10.1097/00005072-199309000-00011.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., et al. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311, 629–632. doi:10.1126/science.1119133.
- Schulte, U., Thumfart, J. O., Klocker, N., et al. (2006). The epilepsy-linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron*, 49, 697–706. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.033.
- Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., et al. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behavior and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nature Cell Biology*, 2(11), 767–775. doi:10.1038/35041000.
- Suzuki, T., Delgado-Escueta, A. V., Aguan, K., et al. (2004). Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 36, 842–849. doi:10.1038/ng1393.
- Suzuki, T., Inoue, I., Yamagata, T., Morita, N., Furuichi, T., & Yamakawa, K. (2008). Sequential expression of *Efhc1/myoclonin1* in choroid plexus and ependymal cell cilia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 226–233. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.126.
- Tanaka, T., Semeo, F. F., Higgins, C., et al. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *The Journal of Cell Biology*, 165(5), 709–721. doi:10.1083/jcb.200309025.
- Taylor, K. R., Holzer, A. K., Bazan, J. F., Walsh, C. A., & Gleeson, J. G. (2000). Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34442–34450. doi:10.1074/jbc.M007078200.
- Walz, W., & Kimelberg, H. K. (1985). Differences in cation transport properties of primary astrocyte cultures from mouse and rat brain. *Brain Research*, 340, 333–340. doi:10.1016/0006-8993(85)90930-8.

CAPÍTULO 2

Silenciamento do gene *Efhc1* em cultura de células e no cérebro de roedores

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. A INTERFERÊNCIA POR RNA

A interferência por RNA (RNAi) é uma técnica que promove o silenciamento gênico potente e específico através da introdução de moléculas de RNA dupla-fita (*double stranded* RNA, dsRNA) (Fire *et al.*, 1998). A RNAi foi descoberta quando este grupo estudava a função de genes do nemátodo *Caenorhabditis elegans* utilizando a técnica de RNA anti-senso, que consiste na inoculação de moléculas longas de RNA simples-fita, complementares ao RNA alvo. 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 o oligo anti-senso (Fire *et al.*, 1998).

Em mamíferos, a técnica de RNAi é mediada por dsRNAs de 21 nucleotídeos, designados *small interfering* RNAs (siRNAs). Os siRNAs possuem um grupo fosfato nas extremidades 5' e dois nucleotídeos não pareados nas extremidades 3', características que definem sua assinatura molecular. A RNAi utiliza-se de uma via endógena presente nas células da maioria dos organismos, cuja função é a defesa celular. Esta via é ativada pela presença de dsRNAs, que são geradas na replicação viral ou mobilização de elementos transponíveis (Hannon, 2002; Duchaine *et al.*, 2006). Assim, dsRNAs longas ou siRNAs sinalizam perigo e iniciam um processo de reconhecimento e degradação de RNAs que são similares a estas moléculas estranhas de dsRNA, utilizando, para isso, o próprio siRNA ou a dsRNA como modelos para esta busca. Essa via natural de defesa é conhecida como PTGS, para a sigla em inglês de silenciamento gênico pós-transcricional (Hannon, 2002).

Dentro das células, as dsRNAs longas são clivadas em vários siRNAs por ação de uma enzima chamada Dicer (Elbashir *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2001). Em seguida, o siRNA é

capturado por R2D2, uma proteína com afinidade por duplexes de RNA e que fica acoplada a Dicer. R2D2 age como um sensor da estabilidade termodinâmica das extremidades do siRNA (Tomari *et al.*, 2004). Desta forma, esta proteína liga-se ao oligonucleotídeo do duplex cuja extremidade 5' é mais estável termodinamicamente (oligo passageiro). Posteriormente, uma proteína com atividade de RNA Helicase (Dicer ou alguma outra proteína específica; Dalmay *et al.*, 2001) abre o duplex e o outro oligonucleotídeo, com extremidade 5' menos estável (oligo guia), é preferencialmente transferido para a endonuclease Slicer (ou Argonauta 2), responsável pela clivagem do mRNA alvo, promovendo o silenciamento gênico (Hammond *et al.*, 2000). Esta proteína e muitas outras constituem o complexo enzimático designado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*; Hammond *et al.*, 2000). O oligo guia permanece intacto e associado ao complexo, permitindo sua utilização na clivagem de, no mínimo, mais outras nove moléculas de RNA (Hutvagner & Zamore, 2002). Os produtos gerados na clivagem são degradados por exonucleases presentes na célula (Glazov *et al.*, 2003). A Fig. 4 esquematiza a via de silenciamento gênico pós-transcricional mediada por siRNAs.

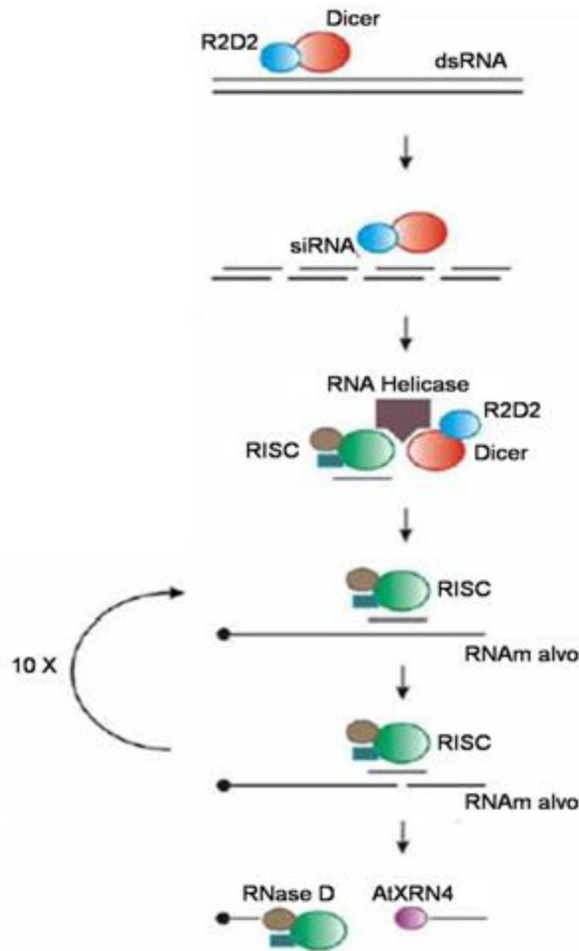


Figura 4. Esquema da via de silenciamento gênico pós-transcricional mediada por siRNAs (modificado de Pereira, 2008).

A técnica de RNAi tem sido amplamente aplicada devido às suas vantagens frente a outros sistemas de silenciamento gênico. Um bom exemplo é a maior eficiência da RNAi 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 de 1:1, ou seja, para cada oligo inoculado, apenas um RNA alvo não é traduzido. Além disso, por ser mais eficiente, torna-se mais econômica, pois a quantidade de oligos utilizada é menor. A utilização de siRNA também apresenta vantagens quando comparada à produção de um animal *knockout*. Primeiramente, a RNAi 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 & Constantine-Paton, 2004).

Desde sua descoberta, vários trabalhos foram realizados demonstrando silenciamento gênico através de RNAi em diferentes organismos, como protozoários, plantas, cnidários e invertebrados (Ngô *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999; Lohmann *et al.*, 1999; Hughes & Kaufman, 2000; Klink & Wolniak, 2000; Schoppmeier & Damen, 2001). Entretanto, quando esta técnica era aplicada em células de mamíferos, os resultados não eram os desejados (Caplen *et al.*, 2000; Ui-Tei *et al.*, 2000). Moléculas de dsRNAs maiores que 30pb, quando introduzidas em células de mamíferos, ativavam a via da proteína Kinase R dependente de dsRNA (PKR), levando a uma resposta mediada por interferon que, ao invés de resultar em silenciamento gênico, levava à morte celular (Elbashir *et al.*, 2001). Entretanto, em 2001, Elbashir e colaboradores demonstraram que era possível silenciar genes em células de mamíferos, sem a indução da resposta mediada por interferon, pela inoculação de oligos de dsRNA de 21 a 22 nucleotídeos, os quais possuíam as mesmas características moleculares do produto de clivagem de longas dsRNAs pela enzima Dicer, os siRNAs (Elbashir *et al.*, 2001). A partir deste trabalho, inúmeros outros foram realizados e publicados utilizando linhagens celulares de mamíferos e também aplicando RNAi *in vivo*.

Os primeiros artigos que demonstraram silenciamento de genes expressos no Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos adultos foram publicados em 2002 (Makimura *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2002). Ambos os trabalhos utilizaram cassetes de expressão que produziam dentro da célula moléculas de *short hairpin* RNA (shRNA). O shRNA é uma molécula de RNA simples-fita, na qual as seqüências alvo do silenciamento (direta e reversa) estão conectadas por

alguns nucleotídeos que formam um *loop*, resultando em uma estrutura de grampo (*hairpin*). O shRNA pode ser considerado uma forma sintética de um micro RNA. Essas moléculas são introduzidas em vetores de clonagem (plasmídeos ou vetores virais) e, após transfecção e transcrição por uma RNA polimerase celular, são reconhecidas pela enzima Dicer e clivadas em siRNAs funcionais (Federici & Boulis, 2007). Enquanto que o silenciamento gênico causado por um siRNA é transiente, os shRNAs podem promovê-lo de forma estável e duradoura (Wadhwa *et al.*, 2004).

Um ponto importante a ser mencionado é que, para que o silenciamento gênico seja eficiente e específico, o desenho de uma molécula de siRNA (e de shRNA) deve obedecer a uma série de parâmetros. A posição no mRNA para a qual o siRNA será complementar, a exclusão de regiões polimórficas do mRNA, a energia livre das extremidades da molécula de siRNA, a presença de estruturas secundárias, o conteúdo de GC do siRNA e a especificidade são alguns deles (Davidson & Boudreau, 2007).

A princípio, qualquer região do RNA mensageiro pode servir como alvo para o desenho de uma molécula de siRNA (seqüência completa, apenas 5' não traduzido (UTR), apenas 3' UTR ou somente a seqüência codificante). Entretanto, a utilização sistemática de siRNAs revelou que algumas moléculas direcionadas para diferentes alvos de um mesmo mRNA são mais eficientes que outras (Holen *et al.*, 2002). Devido a isso, utiliza-se apenas a seqüência codificante do gene que se quer silenciar, excluindo-se os cem primeiros nucleotídeos após o *start codon* e os cem últimos antes do *stop codon*. Dessa forma, as regiões 5' e 3' UTR também são excluídas da seqüência. Este passo é importante porque estas regiões, freqüentemente, são sítios de ligação de proteínas regulatórias que participam da tradução do gene. Sendo assim, a presença dessas proteínas dificulta o acesso do siRNA ao mRNA, diminuindo a eficiência do silenciamento.

A especificidade dos oligos de siRNA é um outro fator importante para o desenho de moléculas interferentes efetivas. Alguns autores consideram que há necessidade de total complementariedade entre o siRNA e o mRNA alvo para que ocorra silenciamento (Sijen *et al.*, 2001). Porém, outros trabalhos demonstraram que a presença de homologia entre apenas 11 nucleotídeos contíguos do siRNA em relação à molécula alvo já seria suficiente para a redução da expressão gênica (Jackson *et al.*, 2003; Haley & 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-targets*). Dessa forma, para garantir que haverá especificidade do siRNA em relação ao mRNA alvo, realiza-se a busca por identidade através do programa BLAST (NCBI; www.ncbi.nlm.gov/BLAST/), usando sempre o oligo antisenso do siRNA (que será a molécula funcional) contra o banco de seqüências expressas (*EST: Expressed Sequence Tags*) do organismo em questão.

Na RNAi, o que se deseja é que o oligo guia (fita do siRNA cuja seqüência é complementar ao mRNA) seja preferencialmente transferido do siRNA para o complexo RISC, o qual vai realizar a clivagem do mRNA. Recentes estudos levaram à descoberta de um parâmetro determinante da eficiência de um siRNA, que é a diferença de estabilidade termodinâmica de suas extremidades (diferença de energia livre de Gibbs - ΔG) (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Esta característica é definida pelos quatro primeiros pares de bases de cada extremidade. A proteína R2D2 liga-se à terminação do duplex mais estável (valores negativos de ΔG) e a RNA Helicase inicia o processo de abertura do siRNA pela extremidade oposta (valores positivos de ΔG). A fita cuja extremidade 5' está na terminação menos estável é preferencialmente transferida para RISC (oligo guia). Uma reduzida (ou nula) eficiência de silenciamento ocorrerá caso a fita senso (oligo passageiro) seja transferida. Assim, a caracterização da estabilidade

termodinâmica das extremidades é um procedimento indispensável no processo de desenho de um siRNA.

Em relação à presença de estruturas secundárias, deve-se evitar siRNAs que apresentem *hairpins* e *loops* internos cujas *melting temperatures* (T_m) sejam maiores que 0°C. Essa análise é conduzida no programa *Gene Runner*, subprograma *Oligo*. Nesse sentido, há preferência pela escolha de siRNAs que apresentem um conteúdo de GC entre 30% e 55%, pois a ocorrência de estruturas secundárias é reduzida (Reynolds *et al.*, 2004).

Além do correto desenho do siRNA, outro fator limitante para a utilização da RNAi é a transfecção das moléculas efetoras, uma vez que tanto os siRNAs quanto os shRNAs são moléculas altamente carregadas e que não atravessam as membranas celulares por difusão passiva (Akhtar & Benter, 2007; Pardridge, 2007). Quando se trabalha com silenciamento de genes expressos no SNC, existe mais um obstáculo, que é a barreira hematoencefálica, a qual apresenta seletividade para a entrada de moléculas no SNC. Desta forma, a injeção diretamente no cérebro tem sido usada para o silenciamento de genes envolvidos em processos do SNC (Bai *et al.*, 2003; Dorn *et al.*, 2004; Hassani *et al.*, 2005; Salahpour *et al.*, 2007). Entretanto, diferentes estratégias foram descritas para promover a entrada dos oligos ou dos vetores nos neurônios. Por exemplo, a associação dos siRNAs a emulsões lipídicas, as quais possuem afinidade de composição com as membranas celulares lipoprotéicas, facilitam a transfecção dos oligos (Makimura *et al.*, 2002; Salahpour *et al.*, 2007). Uma outra técnica utilizada é a cirurgia intra-uterina, acompanhada ou não por subsequente eletroporação, na qual se injeta o siRNA diretamente no cérebro dos embriões (Bai *et al.*, 2003).

Alguns pesquisadores criaram vetores não virais para promover o 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 conjugados a moléculas de polietilenoglicol e

peptídeos para encapsular as moléculas de shRNAs, protegendo-as de degradação no organismo. Esta construção facilitou a passagem do shRNA pela barreira hematoencefálica (Zhang *et al.*, 2003). Em um outro estudo, utilizando um sistema mais simples, os autores descrevem 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).

Estudar a função de um ou mais genes, como na genômica funcional (Fraser *et al.*, 2000; Gönczy *et al.*, 2000), não é a única aplicação da técnica de RNAi, que também tem sido utilizada na produção de modelos animais (Bai *et al.*, 2003; Kunath *et al.*, 2003; Fedoriw *et al.*, 2004) e no combate a patógenos, como o vírus da hepatite B (Uprichard *et al.*, 2005) e *Schistosoma mansoni* (Pereira *et al.*, 2008). Entretanto, a utilização desta metodologia no estudo da fisiopatologia da EMJ permanecia inédita, tanto na produção de animais *knock-down* como na tentativa de silenciar genes defeituosos. Nosso grupo tem sido pioneiro no Brasil nos estudos de RNAi, principalmente na tentativa de desenvolver modelos animais que mimetizem doenças genéticas e protocolos de combate a doenças infecciosas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Animais

Os camundongos (*Mus musculus*) das linhagens BALB/c e Swiss, assim como ratos Wistar, utilizados nos experimentos, foram produzidos e mantidos no Centro de Estudos Multidisciplinares de Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

2.2.2. Extração de RNA e PCR em tempo real

O RNA total das células foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen). 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 DNA complementar (cDNA) foi feita incubando-se 2µg de RNA com iniciadores randômicos (250ng) (Invitrogen), 50U da enzima SuperScriptIIITM Reverse Transcriptase (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 25°C por 5 min., 50°C por 1 h. e 70°C por 15 min.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (Applied Biosystems), que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com um fluoróforo. Os iniciadores utilizados para amplificação do gene *Efhc1* de camundongo estão localizados nas posições 838 e 893 (exon 5) da sequência codificante do gene (CDS: AK006489). A sonda, marcada com o fluoróforo FAM, está localizada na posição 858. O gene *Gapdh* (TaqManTM - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno das reações. A sonda *GAPDH* está marcada com o fluoróforo VIC.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, é necessário fazer a validação do sistema gene de interesse (*Efhc1*)/controle endógeno

(*Gapdh*), a fim de se verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação, tanto com os iniciadores do gene de interesse quanto do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluuições seriadas de 5 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, constrói-se uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção – *Threshold* - o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, são obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)}$.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, são utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obtém-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação da mesma. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados.

Para a quantificação relativa do gene *Efhc1*, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 0,625µL da solução de iniciadores e sonda, 1,125µL de água e 4,0µL de cDNA (50ng), sendo que no controle negativo, adicionou-se 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem 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. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems). Em todos os experimentos, a expressão gênica relativa era calibrada pelo valor de expressão mais baixo observado nas amostras controle.

2.2.3. Extração de proteínas e *Western blot*

Os cérebros dos animais foram removidos cirurgicamente, com o auxílio do Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP. Em seguida, os hemisférios cerebrais foram separados sagitalmente, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

A extração de proteínas foi realizada conforme descrito em Deshane *et al.* (2004), com pequenas modificações. Os hemisférios cerebrais foram homogeneizados em tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, [(3-colamidopropil) dimetilamônio,]-1-propanossulfonato (CHAPS) a 4%, ditioneitol (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.

Para a realização do *Western blot*, o anticorpo primário contra a proteína *Efhc1* foi gentilmente cedido pelo Dr. Ritsu Kamiya, do Departamento de Ciências Biológicas da

Universidade de Tóquio. O protocolo de produção deste anticorpo foi descrito em Ikeda *et al.*, 2005. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (GE Healthcares), previamente umedecida em tampão de transferência (39mM glicina, 48mM Tris base, 0,037% SDS e 20% de etanol), usando aparelho de *eletroblot* Multiphor II (GE Healthcares) a 3500V por 2h. O filtro foi incubado em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó magro por 2h a temperatura ambiente e lavado duas vezes com TBS 1X. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos primários contra a proteína *Efhc1* (diluído 1:350) e contra β -actina (diluído 1:4000), utilizada como controle, por 16h a temperatura ambiente, sendo lavada duas vezes com TBS 1X. Posteriormente, o filtro foi incubado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (diluído 1:20000) e conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich). As bandas foram detectadas pela incubação da membrana com tampão de revelação acrescido de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-fosfatase) e NBT (NitroBlue Tetrazólico) (Sigma-Aldrich).

2.2.4. Desenho dos siRNAs do gene *Efhc1*

A sequência codificante do gene *Efhc1* foi obtida a partir do banco de dados do NCBI (AK006489). A análise da estrutura secundária do mRNA do gene *Efhc1* foi realizada com o auxílio do programa *Mfold* (Zuker, 2003). O primeiro passo necessário para o desenho do siRNA foi gerar moléculas de RNA dupla-fitas candidatas de 21 nucleotídeos. Para isso, utilizou-se o programa *Strand Analysis* (Pereira *et al.*, 2007), o qual analisa, dentre outros parâmetros, a diferença da energia livre de Gibbs (ΔG) dos quatro primeiros nucleotídeos das extremidades 5' de pares de oligonucleotídeos de RNA complementares, obtidos a partir da sequência codificante do gene que se quer silenciar.

Para verificar se os oligonucleotídeos resultantes apresentavam similaridade apenas com o gene alvo, foi conduzido um BLAST *Search for Short, Nearly Exact Matches* (NCBI; www.ncbi.nlm.gov/BLAST/) no genoma de camundongo. Após este procedimento, os oligonucleotídeos de RNA complementares selecionados foram analisados quanto à presença de estruturas secundárias no subprograma *Oligo Analysis*, do programa *GeneRunner*. Dessa forma, foram desenhados dois siRNAs: os siRNAs Efhc1 350 e 1355. O primeiro possui energia livre de Gibbs de 7,20 kcal/mol e o seu alvo está localizado no exon 3 (posição 350 da sequência codificante) enquanto que o segundo possui ΔG de 7,30 kcal/mol e o seu alvo está no exon 8 (posição 1355). As sequências dos siRNAs de *Efhc1* e as estruturas secundárias dos locais nos quais os siRNAs pareiam com o mRNA estão mostrados na Fig. 5:

A

siRNA 350

Oligo Senso: 5' UCCGCCACGUGAACAUUUACU 3'

Oligo Antissenso: 3' UUAGGCGGUGCACUUGUAAAU 5'

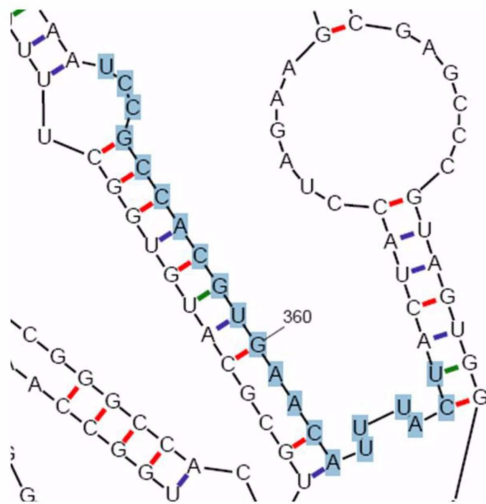
siRNA 1355

Oligo Senso: 5' GAGCCACCUGUUCGAAAUUCT 3'

Oligo Antissenso: 3' AAUUUCGAACAGGUGGCUCAA 5'

B

siRNA 350



siRNA 1355

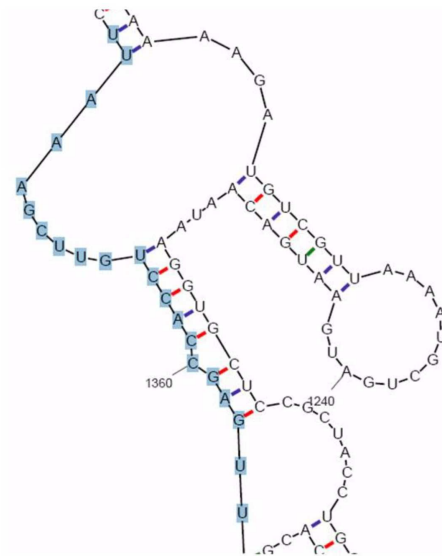


Figura 5. Sequências dos siRNAs do gene *Efhc1* e estruturas secundárias dos locais nos quais os siRNAs pareiam com o mRNA. Em (A), estão mostradas as sequências dos oligos senso e antissenso que compõem os siRNAs do gene *Efhc1*. Em (B), os locais de pareamento dos siRNAs com o mRNA do gene *Efhc1* (evidenciados em azul).

2.2.5. Síntese dos siRNAs do gene *Efhc1*

Os oligonucleotídeos de RNA complementares que compõem os siRNAs *Efhc1* 350 e 1355 foram sintetizados quimicamente (IDT). O siRNA (dupla fita) foi montado pela combinação equimolar dos RNAs complementares seguido de incubação a 95°C por 5 minutos e resfriamento a temperatura ambiente.

2.2.6. Produção do *short hairpin* RNA do gene *Efhc1*

Para a produção do shRNA de *Efhc1*, foram adquiridos dois oligonucleotídeos de DNA complementares. O oligo shEfhc350T possui as seqüências direta e reversa do shRNA dispostas de tal maneira que, quando ocorre sua transcrição, essas seqüências conseguem parear. Além disso, possui, na extremidade 5', um sítio de restrição para a enzima *BamH* I, o qual é utilizado para clonagem no vetor plasmidial. O oligo shEfhc350B é composto pelas seqüências complementares ao primeiro oligo e possui um sítio de restrição para a enzima *Hind* III. Esses oligos foram anelados (3,4µg de cada) a 90°C por 3 minutos e resfriados a 37°C por 1 hora. Em seguida, essa dupla-fita (8ng) foi clonada (ligação com 5U de T4 DNA Ligase a 16°C por 18 horas) no plasmídeo *pSilencerTM 4.1 CMV neo* (Ambion) (chamado de *pSilencer* a partir de agora), o qual já é adquirido linearizado pela dupla digestão enzimática com *BamH* I e *Hind* III. Em seguida, foram transformadas bactérias competentes DH5α. A fim de se confirmar a identidade dos insertos presentes nesses clones, o DNA plasmidial dessas colônias foi obtido e procedeu-se à amplificação do inserto para posterior sequenciamento. Esta PCR foi realizada com a utilização de 5 picomoles dos iniciadores pSilencer F (5'AGGCGATTAAGTTGGGTA3') e pSilencer R (5'CGGTAGGCGTGTACGGTG3') e o sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático (MEGA BACE – GE Healthcare).

2.2.7. Experimentos de inoculação dos siRNAs e do shRNA do gene *Efhc1*

A. Experimentos com cultura de células de mamíferos

1. Experimento de inoculação de siRNA 350 do gene *Efhc1* em cultura de cardiomiócitos de ratos Wistar

Inicialmente, realizou-se um teste com o PCR em tempo real para saber se tanto os iniciadores quanto a sonda fluorescente utilizados nesta técnica conseguiriam parear com o mRNA do gene *Efhc1* de rato. Em seguida, foi feita uma busca por homologia com a sequência nucleotídica codificante (*CDS: Coding Sequence*) do gene *Efhc1* de camundongo (AK006489) no banco de dados de sequências expressas de *Ratus norvegicus*. Esta tarefa foi realizada com o auxílio do programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A sequência que apresentou a maior similaridade com o *CDS* do gene *Efhc1* murino foi comparada com esta com o auxílio da ferramenta BLAST *Two Sequences* a fim de se determinar o grau de homologia entre as sequências destes genes.

Para a extração e estiramento de miócitos cardíacos ventriculares isolados, os corações foram retirados de ratos neonatos (1 a 2 dias), submetidos a digestão branda com colagenase tipo II (Worthington) e pancreatina (Sigma), segundo especificações dos fabricantes, e separados em gradiente de Percoll por centrifugação. Após a separação, as células foram plaqueadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex) para estiramento biaxial cíclico em Sistema Flexercell 3000T (Flexercell International, USA). Detalhes desta técnica podem ser obtidos em Torsoni *et al.* (2003). Para a transfecção do siRNA 350, os cardiomiócitos cultivados por 72 horas (sendo as últimas 24 horas de cultivo feitas em ausência de soros e antibiótico) foram tratados por 24 horas com o siRNA 350 ou com o siRNA do gene *GFP* (*Green*

Fluorescent Protein) complexados com lipofectina (Invitrogen). O siRNA do gene *GFP* foi utilizado como controle. Após este período, as células foram estiradas e extraídas. Os complexos de siRNA-lipofectina foram preparados da seguinte maneira: 18µL de lipofectina foram adicionados a 450µL de OPTI-MEM (Gibco BRL) e incubados por 45min a temperatura ambiente. Em um tubo separado, 0,3µL de siRNA (0,96µg/µL) foi misturado com 20µL de OPTI-MEM e foram incubados por 5 min. a temperatura ambiente. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 25 min. a temperatura ambiente para permitir a formação do complexo de transfecção (siRNA + lipofectina). O volume total do complexo de transfecção (~ 500µL) foi adicionado a cada poço da placa contendo células e meio de cultura (3ml de *Dulbecco's modified Eagle's* - DMEM - Gibco BRL). Vale ressaltar que este experimento foi realizado no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (área de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da FCM), cujo docente responsável é o Dr. Kleber Gomes Franchini, o qual tem amplo reconhecimento científico por seus trabalhos nesta área.

2. Experimento de inoculação do siRNA 350 e do shRNA de *Efhc1* em cultura de células L929

Para este experimento, foi utilizada cultura de células L929, a qual é mantida rotineiramente no CEMIB. Esta linhagem foi adquirida do *Zentral Institute fur Versuchstierzucht* (Hannover, Alemanha).

Como a linhagem celular L929 se adere à superfície da placa de cultura (não cresce em suspensão), foi necessário plaqueá-la um dia antes da transfecção do complexo siRNA-lipofectina (Invitrogen). Foram plaqueadas $2,0 \times 10^5$ células em 500µL de meio de cultura MEM (Gibco BRL) sem antibióticos acrescido de soro fetal bovino 5%. Para a preparação do complexo siRNA-lipofectina, 1µg de siRNA ou shRNA e 2µL de lipofectina foram diluídos em 50µL de

meio MEM sem soro fetal bovino, respectivamente (esta quantidade da preparação corresponde a cada amostra transfectada, ou seja, a cada poço que receberá o complexo). Em seguida, misturou-se o siRNA ou shRNA com a lipofectina (totalizando 100µL para cada poço). Para a completa formação do complexo, incubou-se a mistura por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se os 100µL do complexo siRNA- ou shRNA-lipofectina a cada poço contendo células e meio de cultura MEM completo (10% soro fetal bovino, 0,5% de antibiótico, 1% de glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais). Por fim, as células foram incubadas a 37°C em uma estufa com CO₂ por 48 horas. Para análise dos resultados de expressão gênica em PCR em tempo real, todos os poços que receberam o mesmo tratamento (controle, siRNA ou shRNA) foram unidos (tratados como se fossem um só, ou seja, foi feito um *pool*). Este experimento foi realizado nas dependências do CEMIB e sob a orientação do Dr. Rovilson Gilioli.

3. Experimento de inoculação do siRNA 1355 do gene *Efhc1* em cultura de células Neuro2A

Para estes experimentos, foi utilizada cultura de células originadas de neuroblastoma de camundongo (Neuro2A), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em ambiente umidificado controlado a 5% de CO₂ e 37°C e cultivadas em meio DMEM (Gibco, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 18 mM de Hepes e 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina. Ao atingir confluência, as células passavam pelo processo de tripsinização, que consiste em duas lavagens com *Hank's* seguida de uma incubação de 10 min. a 37°C com 2 mL de tripsina-EDTA para uma garrafa de 75 cm². Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultura completo e divididas em duas garrafas novas.

As células foram transfectadas com o siRNA utilizando lipofectina (Lipofectamine 2000; Invitrogen). Anteriormente à transfecção, as placas foram tratadas com poli-D-lisina para aumentar a adesão das células à placa. Toda a extensão da placa foi coberta pela solução de poli-D-lisina, 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) e colocada na estufa à 37°C por 2 h. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril.

As células Neuro2A foram distribuídas em placas de 60 mm de diâmetro (Corning) na concentração de 4×10^5 células em 3 ml de meio de cultura completo. No dia seguinte ao plaqueamento, 10 µl de lipofectina (1mg/ml) foram misturados a 490 µl de OPTI-MEM (Invitrogen) e esta mistura foi incubada por 5 min. a temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se uma solução de 500 µl do siRNA diluído em OptiMEM na concentração de 100 nM, e procedeu-se com nova incubação por 20 min a temperatura ambiente. O meio de cultura das placas foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS 1X. A mistura completa de lipofectina, siRNA e OptiMEM foi gotejada na placa e acrescentou-se mais 1 mL de OPTI-MEM. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e após 5h foram adicionados 2 mL de meio de cultura completo com 20% de soro fetal bovino. A troca do meio de cultura foi realizada no terceiro dia.

B. Experimentos com animais

1. Experimentos de inoculação do siRNA Efhc1 350 no cérebro de embriões

Para a realização dos experimentos, foram obtidos camundongos da linhagem BALB/c junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB). Esses animais foram cruzados a fim de que, dezessete ou dezoito dias depois, houvesse embriões com esta idade em cujos cérebros foi inoculado o siRNA.

A cirurgia e a manipulação dos embriões foram realizadas como descrito em Nakajima *et al.*, (1997) e Saito & Nakatsuji, (2001). As fêmeas prenhes foram anestesiadas com uma solução mista de Ketamina (Ketalar - Pfizer) (100mg/kg do animal) e Xilasina (Rompum - Bayer) (20mg/kg) (intraperitonal) e tiveram as trompas uterinas expostas. Para visualização da superfície dorsal do telencéfalo através da parede uterina, foi utilizada uma fonte de luz acoplada a uma fibra óptica. O siRNA 350 (50ng ou 3 µg) ou o tampão PBS (1µL) foram inoculados no ventrículo lateral dos embriões com uma micropipeta de vidro e uma agulha de anestesia gengival. Em um experimento, realizou-se eletroporação em um *ElectroSquarePorator* T830 (BTX, San Diego, CA) no cérebro dos embriões, a fim de facilitar a entrada do siRNA nas células (Saito & Nakatsuji, 2001). Pulsos elétricos de 40V e 50 milissegundos foram disparados cinco vezes em intervalos de 1 segundo. Em outro experimento, não foi utilizado o passo de eletroporação e, alternativamente, o siRNA foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente após ser misturado com lipofectina (Invitrogen) na proporção 1:2 (volume:volume), sendo injetado no cérebro após este período. As trompas uterinas foram recolocadas na cavidade abdominal e as fêmeas foram suturadas para que os embriões continuassem a se desenvolver. Em todos os experimentos, os cérebros foram removidos somente após o nascimento dos animais (o parto ocorre no décimo nono dia de gestação).

2. Experimentos de inoculação do siRNA 350 e do shRNA do gene *Efhc1* utilizando a técnica de transfecção hidrodinâmica

A técnica de transfecção hidrodinâmica foi originalmente descrita por McCaffrey *et al.* (2002). Para a realização desta técnica, o siRNA (ou o plasmídeo contendo o shRNA) foi incubado com a lipofectina na proporção 1:2 (volume:volume) e esta mistura foi dissolvida em um volume de PBS 0,1M correspondente a uma volemia de sangue do animal (10% do peso do animal em gramas - por exemplo, se o animal pesa 25 g, o volume de PBS é 2,5 mL). Todo este líquido foi injetado nos animais (6 meses de vida) através da veia caudal. No dia seguinte, os animais foram sacrificados e tanto o fígado como o cérebro (este separado em hemisférios) foram coletados no dia seguinte. Foram injetados 1µg ou 3µg de siRNA. O procedimento experimental para a realização do experimento com shRNA foi idêntico, à exceção de que os animais foram sacrificados 48 horas depois da inoculação do shRNA (50µg). Em todos os casos, os animais controles foram inoculados somente com PBS 0,1M.

3. Experimentos de inoculação do siRNA 350 do gene *Efhc1* na veia jugular direita de camundongos adultos

Para a realização do experimento, foram obtidos três machos de camundongos da linhagem Swiss de 6 semanas de idade junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB).

O siRNA diluído em PBS 0,1M (20µg) foi injetado em camundongos através da veia jugular. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de Ketamina (Ketalar - Pfizer) (100mg/kg do animal) e Xilasina (Rompum - Bayer) (20mg/kg). Em seguida, a região do pescoço foi aberta, a jugular direita dissecada e introduziu-se uma cânula de

polietileno (PE-10 estirada) por onde 300µL de solução de siRNA foram infundidas lentamente (40µL, intervalo de 5 segundos, mais 40µL e assim por diante) no animal. Uma segunda injeção foi feita com 80µL de PBS 0,1M para lavagem da cânula. Ao final da injeção, a cânula foi retirada, a jugular ligada e a região da ferida cirúrgica fechada. Após a recuperação anestésica, os camundongos foram acomodados em gaiolas individuais. Animais controles foram injetados somente com 400µL de PBS 0,1M. Os cérebros dos animais foram removidos 24h após a inoculação do siRNA. Este experimento também foi realizado no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, sob coordenação do Dr. Kléber Franchini.

4. Experimentos de inoculação dos siRNAs *Efhc1* 350 e 1355 no cérebro de neonatos

Os neonatos de camundongo e rato foram adquiridos junto ao CEMIB com a idade desejada (um ou três dias de vida - P1 ou P3). Foram realizados três experimentos com neonatos de camundongos ou ratos. Em todos os experimentos, o siRNA (375 picomoles = 5µg) foi misturado com um peptídeo derivado de uma glicoproteína do vírus da raiva adicionado de nove resíduos de D-arginina (*RVG-9R: rabies vírus glycoprotein-9 arginines*) a uma proporção molar de 1:10 (portanto, utilizou-se 3750 picomoles de peptídeo) por 15 minutos a temperatura ambiente. O volume total da mistura foi de 1,71µL, quantidade esta para cada animal. Os neonatos foram posicionados em um aparelho de cirurgia estereotáxica para facilitar a inoculação, a qual se deu no bregma (local de junção das suturas coronal e sagital do crânio), a 2 milímetros de profundidade. O complexo siRNA-peptídeo foi injetado com o auxílio de uma bomba de micro-infusão (Insight) a um fluxo de 0,85µL por minuto. Os animais do grupo controle foram injetados apenas com PBS 0,1M.

No primeiro experimento, o siRNA 350 foi injetado em neonatos P1 de camundongo e dois dias após as injeções, os animais foram sacrificados e os cérebros foram removidos. No segundo, o siRNA 1355 foi injetado em neonatos P3 de camundongo e os encéfalos removidos no dia seguinte. Na última tentativa, o siRNA 1355 foi inoculado em neonatos P3 de rato e os cérebros retirados dois dias depois. A sequência do *RVG-9R* e informações mais detalhadas podem ser obtidas em Kumar *et al.* (2007).

2.2.8. Análises Estatísticas

Para testar possíveis diferenças na expressão do gene *Efhc1* entre os diferentes grupos experimentais, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Quando os valores de expressão gênica variavam significativamente, era aplicado o teste *post-hoc* de Tukey, a fim de que fossem ajustados os valores de p. Os testes estatísticos foram realizados no programa BioEstat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Validação do sistema *Efhc1*/*Gapdh* utilizado na técnica de PCR em tempo real

Como mencionado anteriormente, antes de se realizar um experimento de expressão gênica utilizando PCR em tempo real, deve-se fazer a validação do sistema gene de interesse/controlado endógeno. A validação do sistema *Efhc1* e *Gapdh* foi realizada utilizando-se sete concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 5 vezes) de um animal com duas semanas de vida pós-natal (P14). Com os dados da cinética de amplificação das amostras e utilizando-se o programa *7500 System SDS Software*, construiu-se uma curva padrão para cada gene. Os valores das inclinações (*slope*) das curvas e as eficiências foram -3,323 e 99% para *Efhc1* e -3,256 e 100% para *Gapdh*. A confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R² foi de 99,1% para *Efhc1* e de 99,9% para o controle endógeno. A Fig. 6 mostra as curvas obtidas para os genes *Efhc1* e *Gapdh*.

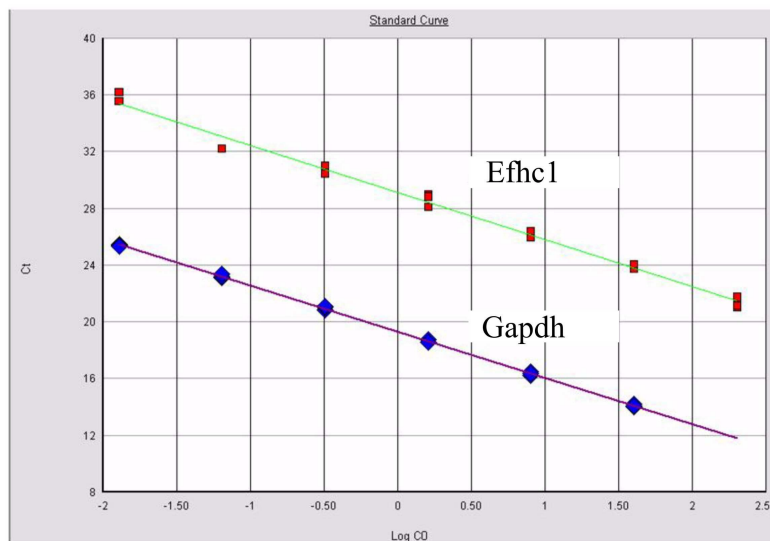


Figura 6. Gráfico gerado pelo programa *7500 System SDS Software* mostrando a curva padrão obtida para o gene *Efhc1* (em verde) e a curva obtida para o controle endógeno *Gapdh* (em roxo). Os pontos sobre as curvas representam as réplicas.

Para se determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, construiu-se um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos Cts do controle endógeno e do gene de interesse obtidas para cada concentração (eixo Y). Com isso, obteve-se uma reta com inclinação igual a -0,0246, mostrando que os ΔC_t s das amostras não estão variando entre as diferentes concentrações testadas. Na Fig. 7, estão mostradas a curva de eficiência para o sistema *Efhc1-Gapdh* e a equação da reta correspondente à linha de tendência.

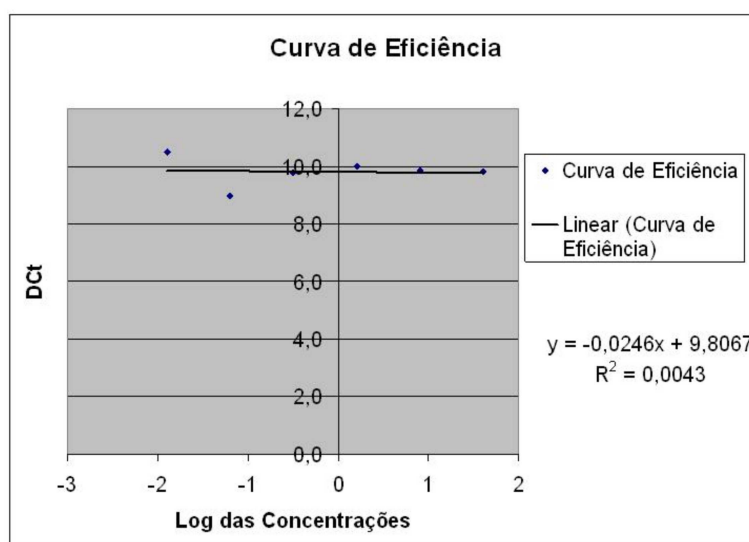


Figura 7. Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Após a validação, a porcentagem de silenciamento gênico pôde ser medida pela utilização da técnica de PCR em tempo real.

2.3.2. Produção do shRNA do gene *Efhc1*

Com a finalidade de se obter um silenciamento gênico duradouro, procedeu-se com a produção do shRNA do gene *Efhc1*.

Foram obtidas 25 colônias brancas após a transformação de bactérias competentes com o plasmídeo *pSilencer*. Os insertos dos plasmídeos foram amplificados e visualizados em gel a fim de se verificar se continham o tamanho esperado após a clonagem do oligo de DNA molde para a produção do shRNA. Das 25 colônias, 14 apresentaram um produto de amplificação cujo tamanho é compatível com o esperado. Somando-se a região no plasmídeo nas quais os iniciadores ancoram-se com o tamanho do DNA molde clonado, o *amplicon* resultante deveria ter aproximadamente 250 pb, o que pode ser observado na Fig. 8.

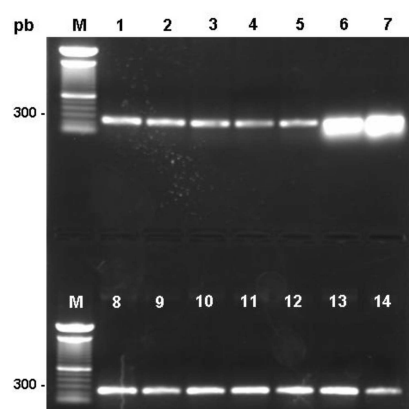


Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando os produtos de amplificação de aproximadamente 250pb provenientes da clonagem dos oligos de DNA molde em plasmídeos *pSilencer* para a produção do shRNA do gene *Efhc1*. As letras M indicam o marcador de peso molecular e os números de 1 a 14 indicam os produtos de amplificação obtidos a partir dos plasmídeos contidos em cada uma das 14 colônias brancas.

O sequenciamento desses produtos de amplificação revelou que dos 14 *amplicons* seqüenciados, 10 apresentaram identidade (dados não mostrados) com a seqüência dos oligos de DNA molde dupla-fita utilizados na produção do shRNA, a saber: clones 6, 10, 12, 16, 17, 18, 20, 21, 23 e 25. Vale ressaltar que a clonagem direcional foi bem sucedida (insertos estavam na orientação esperada).

2.3.3. Experimentos de inoculação dos siRNAs e do shRNA do gene *Efhc1*

A. Experimentos com cultura de células

1. Experimento de inoculação de siRNA 350 do gene *Efhc1* em cultura de cardiomiócitos de ratos Wistar

Um pressuposto *a priori* para a realização deste experimento seria o de que as sequências nucleotídicas dos mRNAs dos genes *Efhc1* de camundongo e rato eram muito parecidas ou idênticas, pois somente assim os níveis do mRNA de *Efhc1* de rato poderiam ser medidos. Para isso, antes da realização do experimento, foi necessário testar se tanto os iniciadores quanto a sonda fluorescente utilizados na técnica de PCR em tempo real conseguiriam parear com o mRNA do gene *Efhc1* de rato. O resultado deste teste foi positivo (dados não mostrados).

A busca por homologia com a sequência do siRNA do gene *Efhc1* murino contra o banco de sequências *ESTs* de *Ratus norvegicus* resultou em três sequências que apresentavam similaridade com a sequência codificante do gene *Efhc1* de camundongo (*E Value* = 0.0) (dados não mostrados). Uma dessas sequências homólogas de rato foi denominada de gene *Efhc1* (gb|DY315878.1) e foi submetida a uma comparação mais detalhada com a sequência do gene *Efhc1* murino pela utilização do programa BLAST *Two Sequences*, a fim de se verificar se a região de ligação do siRNA era total ou parcialmente complementar a este no gene homólogo de rato. A Fig. 9 mostra o resultado desta comparação.

```

M.m 330 AATGGAGGAGCATTACCGAATTCCGCCACGTGAACATTTACTACTACCTAGAAGATGACAG
      |||||
R.n 60 AATGGAGGAGCATTACCGAATTCCGCCGGGTGAACATTTACTACTACCTAGAGGATGACAG

```

Figura 9. Comparação entre parte das seqüências codificantes do gene *Efhc1* murino (AK006489) e seu homólogo em rato (gb|DY315878.1). Em negrito, está a região de ligação do siRNA.

A análise da Fig. 9 mostra que há dois nucleotídeos diferentes na região de ligação do siRNA entre camundongo e rato nas posições 7 e 8 (AC em camundongo e GG em rato). Apesar de alguns autores considerarem que há a necessidade de total complementariedade entre o siRNA e o mRNA alvo (Sijen *et al.*, 2001), outros demonstraram que se houver similaridade de seqüência em até 11 nucleotídeos contíguos entre o siRNA para um determinado gene e um alvo inespecífico, este último pode ter sua expressão reduzida (Jackson *et al.*, 2003).

Dessa forma, resolveu-se prosseguir com o experimento. O RNA total dos cardiomiócitos em cultura foi extraído e as amostras foram submetidas ao PCR em tempo real. O resultado está mostrado na Fig. 10.

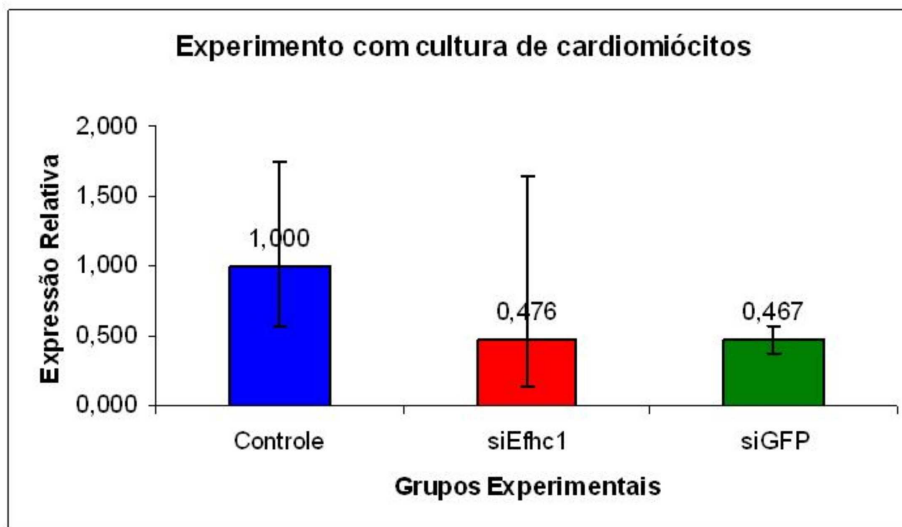


Figura 10. Gráfico mostrando a comparação entre os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* em cultura de cardiomiócitos de rato transfectados com o siRNA *Efhc1* 350. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa, sendo que “Controle” (coluna azul) representa as células que não receberam o siRNA, “siEfhc1” (coluna vermelha) refere-se àquelas que foram transfectadas com o siRNA 350 e “siGFP” (coluna verde) refere-se àquelas que receberam o siRNA GFP. A amostra “Controle” foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 10 permite verificar que tanto as células que receberam o siRNA (expressão relativa de 0,48) de *Efhc1* quanto aquelas que foram transfectadas com o siRNA de *GFP* (expressão de 0,47) apresentaram menor expressão do gene *Efhc1* (a expressão no controle foi de 1,0). Apesar de inesperado, estes resultados mostraram que as células foram, de fato, transfectadas.

2. Experimento de inoculação do siRNA 350 e do shRNA de *Efhc1* em cultura de células L929

A linhagem celular L929, de morfologia fibroblastóide, é proveniente de tecido adiposo e areolar de um camundongo C3H/An adulto (Coimbra *et al.*, 2007). Estas células foram utilizadas porque são rotineiramente mantidas no CEMIB.

Após a adição ao meio de cultura do siRNA e do shRNA e das 48 horas de incubação em estufa com CO₂, extraiu-se o RNA total dessas células. Para verificar se houve silenciamento do gene, estas amostras foram submetidas ao PCR em tempo real. O resultado está mostrado na Fig. 11.

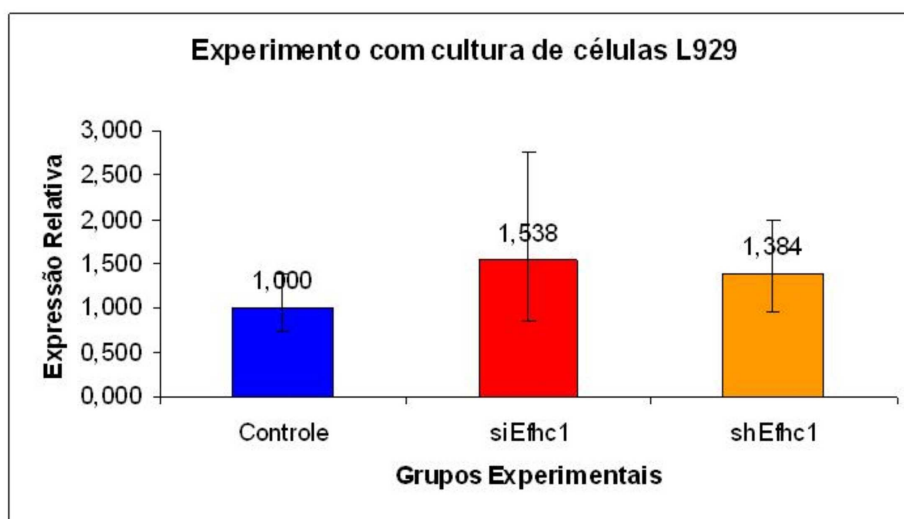


Figura 11. Gráfico mostrando a comparação entre os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* em cultura de células L929 transfectadas com siRNA 350 ou shRNA. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa, sendo que “Controle” representa as células que não receberam nenhuma molécula, “siEfhc1” (coluna vermelha) refere-se àquelas que foram transfectadas com o siRNA e “shRNA” (coluna laranja) refere-se àquelas que receberam o shRNA. A amostra “Controle” foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 11 permite observar que, curiosamente, houve aumento na expressão do gene *Efhc1* após transfecção das células tanto com o siRNA quanto com o shRNA. Nas amostras tratadas com siRNA, o aumento foi da ordem de 54% (1,00 no controle e 1,54 no siRNA), enquanto que naquelas tratadas com shRNA, foi de 38% (1,00 no controle e 1,38 no shRNA).

3. Experimento de inoculação do siRNA 1355 do gene *Efhc1* em cultura de células Neuro2A

Como demonstrado por Suzuki e colaboradores (2008) e pelo nosso grupo (Conte *et al.*, 2009), o gene *Efhc1* é expresso nos cílios das células ependimárias e sua expressão não é observada em neurônios. Como as células Neuro2A são derivadas de um neuroblastoma e seu tipo celular predominante é o neuroblasto, era esperado que não houvesse expressão do gene *Efhc1* nesta cultura celular. Entretanto, com a utilização da técnica de PCR em tempo real, verificou-se que estes neuroblastos expressam *Efhc1* (dados não mostrados). Uma possível explicação para este fato é a demonstração de que as células Neuro2A produzem grandes quantidades de proteínas formadoras de microtúbulos (Olmstead *et al.*, 1970), uma vez que de Nijls *et al.* (2006) demonstraram que a proteína EFHC1 associa-se aos microtúbulos durante a divisão celular e ao centrôssomo na intérfase. Dessa forma, é possível que a expressão de *Efhc1* ocorra de fato em neuroblastos e, possivelmente, até em neurônios, mas as quantidades de mRNA sejam tão pequenas que só são detectadas por técnicas tão sensíveis quanto o PCR em tempo real. A avaliação da expressão do gene *Efhc1* nas células Neuro2A após a inoculação do siRNA e incubação por diferentes intervalos de tempo está mostrada na Fig. 12.

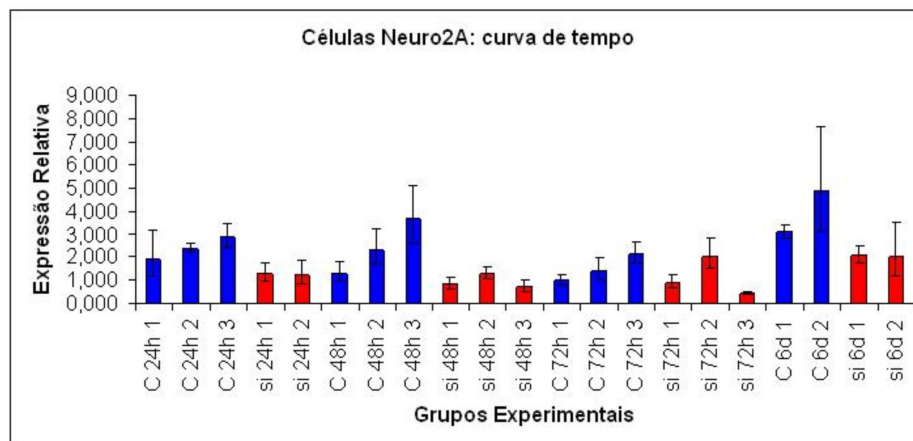


Figura 12. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* em cultura de células Neuro2A transfetadas com siRNA 1355 por diferentes períodos de tempo. As colunas azuis representam os valores de expressão gênica relativa obtidas para os controles (C), que são as células que não receberam o siRNA, e as colunas vermelhas referem-se àquelas que foram transfetadas com o siRNA (si). A amostra “C72 1” foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 12 permite concluir que houve silenciamento do gene *Efhc1* em todos os períodos de tempo analisados ($p=0,009$). Com a finalidade de saber qual foi a porcentagem de silenciamento obtido em cada intervalo de tempo, obteve-se a média das triplicatas de cada amostra e esses valores foram divididos pela média dos valores de expressão relativa dos controles correspondentes. A Fig. 13 mostra as porcentagens aproximadas de silenciamento do gene *Efhc1* obtidas para cada período.

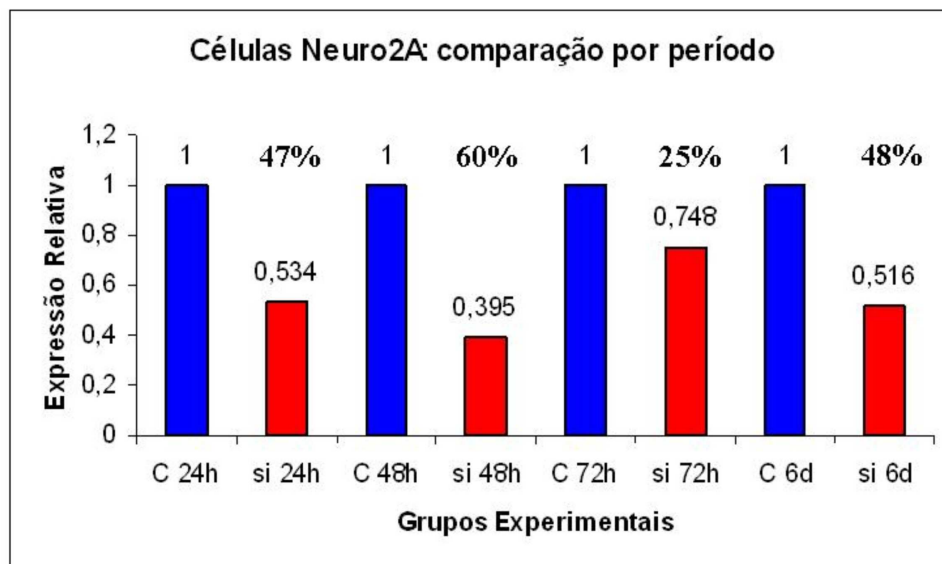


Figura 13. Gráfico mostrando a comparação entre os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* em cultura de células Neuro2A transfetadas com siRNA 1355. As colunas azuis representam os valores de expressão gênica relativa obtidas para os controles (C) e as colunas vermelhas referem-se àquelas que foram transfetadas com o siRNA (si). Notar que em todos os períodos de tempo analisados, as células transfetadas com o siRNA apresentam redução na expressão do gene *Efhc1* em relação ao respectivo controle.

A maior porcentagem de silenciamento foi obtida após 48h de incubação com o siRNA, enquanto que a menor foi obtida após 72h. O silenciamento gênico obtido foi tão eficiente que, mesmo após 6 dias de cultura e com a troca do meio no terceiro dia, a expressão do gene *Efhc1* nas células que receberam o siRNA era aproximadamente a metade das células controle. Após a repetição do experimento para confirmação dos resultados, os próximos passos seriam, a princípio, a avaliação das taxas de morte e divisão celular por citometria de fluxo e a verificação da taxa de síntese de DNA (medida indireta da taxa de divisão celular) pela marcação com BrdU. Infelizmente, esses procedimentos não são rotineiramente executados do nosso laboratório e, dessa forma, não houve tempo hábil para padronizá-los.

B. Experimentos com animais

1. Experimentos de inoculação do siRNA *Efhc1* 350 no cérebro de embriões

As técnicas de PCR em tempo real e *Western blot* foram empregadas com o intuito de se estabelecer o perfil de expressão do gene *Efhc1* em cérebros de camundongos em diferentes estágios de desenvolvimento. Isso permitiu verificar que há diferenças nos níveis de expressão deste gene em função da idade do animal. O estágio de desenvolvimento em que houvesse a maior expressão do gene *Efhc1* seria escolhido para a inoculação do siRNA, pois, acredita-se, é neste momento em que a expressão do gene é mais importante e no qual sua ausência, portanto, resultará nas alterações fenotípicas mais marcantes. A análise dos resultados permitiu verificar que não há diferença significativa na expressão do gene *Efhc1* entre embriões de diferentes idades. Dessa forma, resolveu-se inocular a molécula de siRNA em animais E17 ou E18, pois a expressão do gene é relativamente alta nestas idades e as fêmeas teriam tempo de se recuperarem da cirurgia antes do parto, que ocorre com dezenove dias. A Fig. 14 mostra o momento em que a molécula de siRNA é inoculada no ventrículo lateral dos cérebros dos embriões.



Figura 14. Cirurgia intra-uterina para a inoculação da molécula de siRNA do gene *Efhc1* no cérebro de embriões de camundongos. As fotos ilustram o momento em que a molécula de siRNA foi introduzida no ventrículo lateral dos cérebros dos embriões e a subsequente eletroporação.

Neste experimento, o que se observou foi que todos os embriões, sem exceção, nasceram mortos. Isso inviabilizou a análise da expressão do gene *Efhc1* nestes animais.

Como a tentativa anterior (com eletroporação após injeção do siRNA) não resultou em silenciamento gênico, resolveu-se variar o procedimento (não eletroporar) e a quantidade de siRNA injetada, bem como o tempo de espera até o sacrifício dos animais e posterior remoção do cérebro. Neste experimento, o siRNA (50ng) foi misturado com lipofectina na proporção 1:2 (volume:volume) e injetado nos cérebros dos embriões. Infelizmente, a fêmea utilizada como controle não resistiu à cirurgia e faleceu, o que inviabilizou a verificação da ocorrência do silenciamento gênico, pois não haveria dados para comparação.

No experimento seguinte, foram injetados 3µg de siRNA misturado com lipofectina. No dia seguinte, os animais foram sacrificados e o cérebro dos embriões removidos (E18). O resultado da avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real está mostrado na Fig. 15.

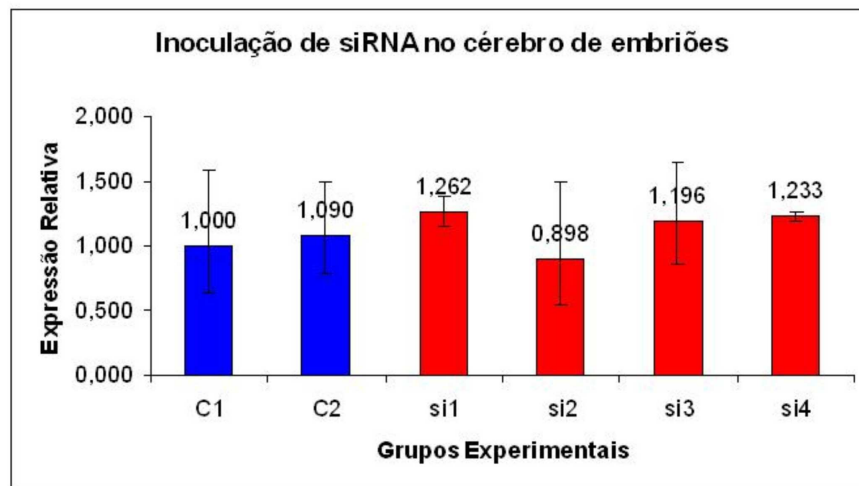


Figura 15. Gráfico mostrando a comparação entre os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de embriões injetados com siRNA misturado à lipofectina. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa, sendo que C1 e C2 representam dois animais controle (colunas azuis) e si1, 2, 3 e 4 representam animais injetados com siRNA (colunas vermelhas). A amostra C1 foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 15 permite observar que não houve diferença ($p=0,5733$) na expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro dos embriões controle em relação aos injetados (inclusive, há animais em que a expressão gênica relativa é até um pouco maior do que a dos controles – casos de si1, si3 e si4).

2. Experimentos de inoculação do siRNA 350 e do shRNA do gene *Efhc1* utilizando a técnica de transfecção hidrodinâmica

Como nas tentativas anteriores não se obteve silenciamento do gene *Efhc1*, resolveu-se adotar uma estratégia radicalmente diferente. Dessa forma, utilizou-se a técnica de transfecção hidrodinâmica (McCaffrey *et al.*, 2002). Neste procedimento, o princípio é o de que a pressão hidrodinâmica gerada pelo aumento de volume sanguíneo “força” a entrada da molécula de siRNA. Os órgãos mais susceptíveis à entrada da molécula, por este método, são o fígado e os rins, que estão envolvidos na filtração do sangue. A princípio, o siRNA não conseguiria entrar no cérebro, devido à presença da barreira hematoencefálica. Apesar desta dificuldade *a priori*, como não há relatos na literatura da utilização da transfecção hidrodinâmica para o silenciamento de genes no sistema nervoso central, resolveu-se testar esta técnica para esta finalidade. Dessa forma, após a realização do experimento, os animais foram sacrificados e o fígado e o cérebro removidos. Em seguida, o procedimento ocorreu como nos demais experimentos. Os resultados estão mostrados na Fig. 16.

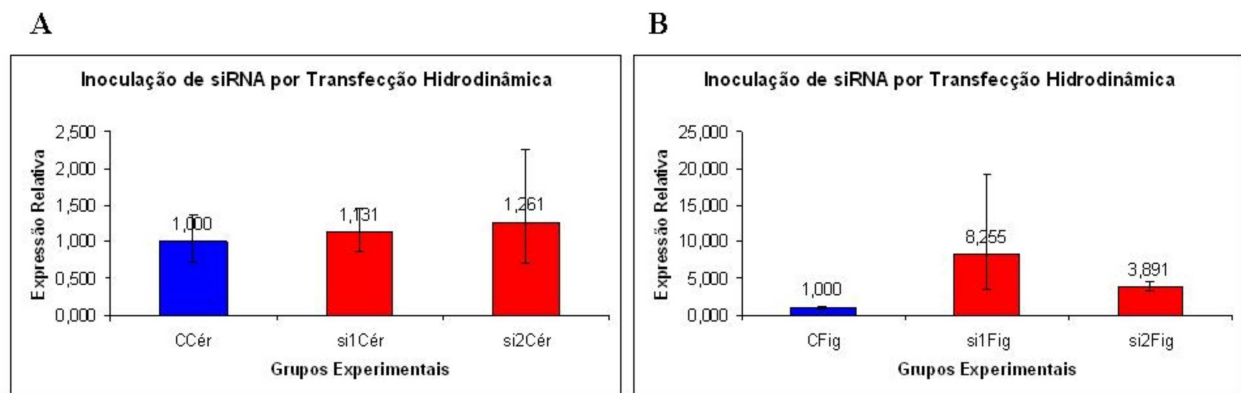


Figura 16. Gráficos mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro e no fígado de camundongos injetados com siRNA e nos animais controle, respectivamente. Em (A), estão mostrados os resultados da avaliação da expressão gênica no cérebro e em (B), os resultados do fígado. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa, sendo que a coluna azul (C) representa o animal controle e as colunas vermelhas (si1 e si2) representam os animais que foram injetados com 1µg ou 3µg de siRNA, respectivamente. A amostra C foi usada como calibrador tanto em (A) quanto em (B). As barras verticais representam o desvio padrão.

Pela análise da Fig. 16 é possível observar que não há diferença na expressão do gene *Efhc1* no cérebro dos animais analisados (CCér – 1,07; si1Cér – 1,15; si2Cér – 1,30). De certa forma, isso era esperado, uma vez que havia o risco inicial do siRNA não conseguir ultrapassar a barreira hematoencefálica, o que, provavelmente, aconteceu.

Entretanto, quando se analisa os resultados obtidos para o fígado, pode-se observar que há um aumento na expressão do gene quando foi injetado siRNA (si1Fig – 8,48 e si2Fig – 4,79), em comparação ao controle (CFig – 1,00). Isso é exatamente o oposto do que se espera quando se realiza a técnica de interferência por RNA, pois esta se utiliza de um mecanismo endógeno das células para o silenciamento, e não ativação, de genes.

Para saber se o shRNA produzido era funcional e, dessa foram, conseguir um silenciamento gênico mais duradouro, tentou-se inoculá-lo utilizando a técnica de transfecção hidrodinâmica. Dessa forma, após a realização do experimento, os animais foram sacrificados e

os rins, fígado e cérebro removidos. Em seguida, realizou-se o PCR em tempo real. Os resultados estão mostrados na Fig. 17.

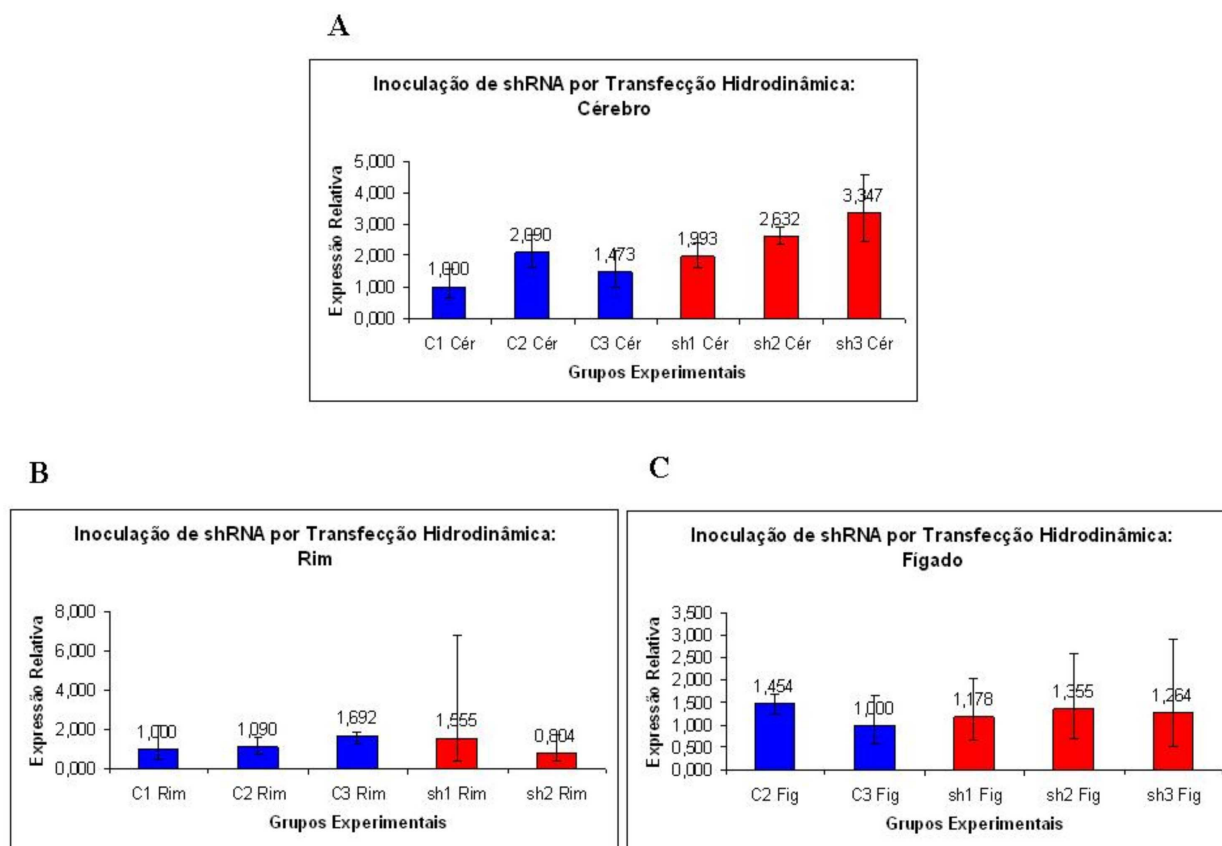


Figura 17. Gráficos mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro, nos rins e no fígado de camundongos injetados com siRNA e nos animais controle. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa. (A), (B) e (C) representam, respectivamente, os valores de expressão gênica obtidos para o cérebro, para os rins e para o fígado. Em todos os gráficos, as colunas azuis representam os animais controle e as vermelhas referem-se aos camundongos injetados com o shRNA do gene *Efhc1*. A amostra C1 foi usada como calibrador na análise da expressão gênica no cérebro e rins e a amostra C3, no fígado. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 17 permite observar que a expressão do gene *Efhc1* nos rins e fígado foi semelhante entre os grupos experimentais ($p=0,8435$ e $p=0,8376$, respectivamente). Em relação ao cérebro, houve um aparente aumento na expressão do gene *Efhc1* em dois dos três animais inoculados com siRNA (animais inoculados 2 e 3, em comparação com o animal C2, que

apresentou a maior expressão entre os animais controle), mas sem significado estatístico ($p=0,0862$).

Entretanto, resolveu-se investigar se os níveis da proteína *Efhc1* haviam sido elevados em função do aumento da quantidade de mRNA deste gene observado no cérebro. O resultado do *Western blot* está mostrado na Fig. 18.

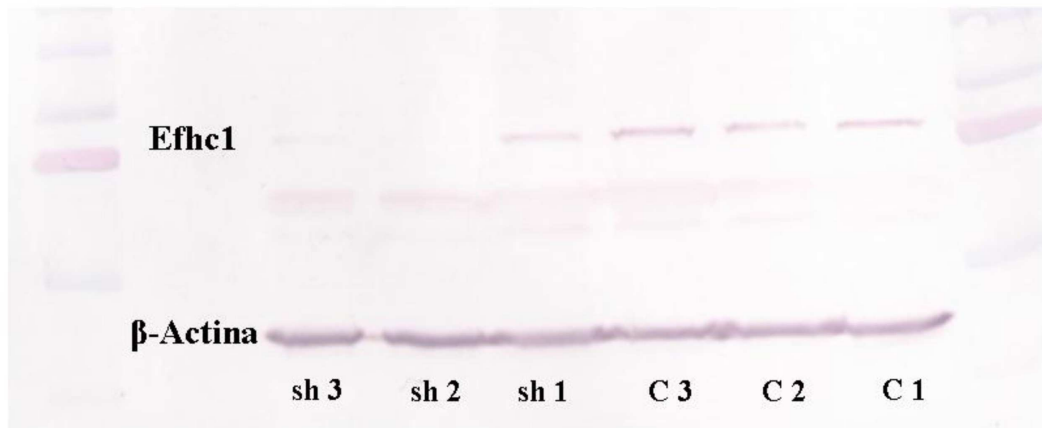


Figura 18. *Western blot* mostrando a abundância da proteína *Efhc1* no cérebro dos animais inoculados com o shRNA e nos animais controle. Todas as reações foram realizadas com extratos protéicos totais (30μg). As linhas “sh 1 a 3” correspondem às amostras dos animais injetados com o shRNA e as linhas “C 1 a 3” referem-se às amostras dos animais controle. Como controle endógeno, utilizou-se o anticorpo contra a proteína β-actina. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Kaleidoscope*TM (Bio-Rad).

Surpreendentemente, é possível observar que os níveis da proteína *Efhc1* no cérebro dos animais que receberam o shRNA é menor do que nos controles. Este resultado nos levou a concluir que o silenciamento do gene ocorreu de fato e que, em função disto, pode ter entrado em ação um mecanismo compensatório para restabelecer os níveis de mRNA e, subsequentemente, da proteína. Uma explicação para este resultado é a de que quando as amostras foram coletadas, os níveis de mRNA do gene *Efhc1* já haviam sido restabelecidos, mas os da proteína ainda estavam diminuídos. Infelizmente, estes resultados não foram confirmados em experimentos posteriores (dados não mostrados).

3. Experimentos de inoculação do siRNA 350 do gene *Efhc1* na veia jugular direita de camundongos adultos

Recentemente, Clemente *et al.* (2007) demonstraram que é possível obter silenciamento gênico sistêmico pela inoculação de siRNA na veia jugular de camundongos adultos. Esses autores verificaram que há uma redução na expressão da Quinase de Adesão Focal (*FAK: Focal Adhesion Kinase*) no ventrículo esquerdo do coração, nos pulmões e nos rins, mas não conseguiram os mesmos resultados quando analisaram o fígado. Devido a isso, resolveu-se fazer um teste para saber se era possível silenciar o gene *Efhc1* sistemicamente, uma vez que os experimentos seriam realizados sob a orientação dos autores deste artigo. O resultado do PCR em tempo real está mostrado na Fig. 19.

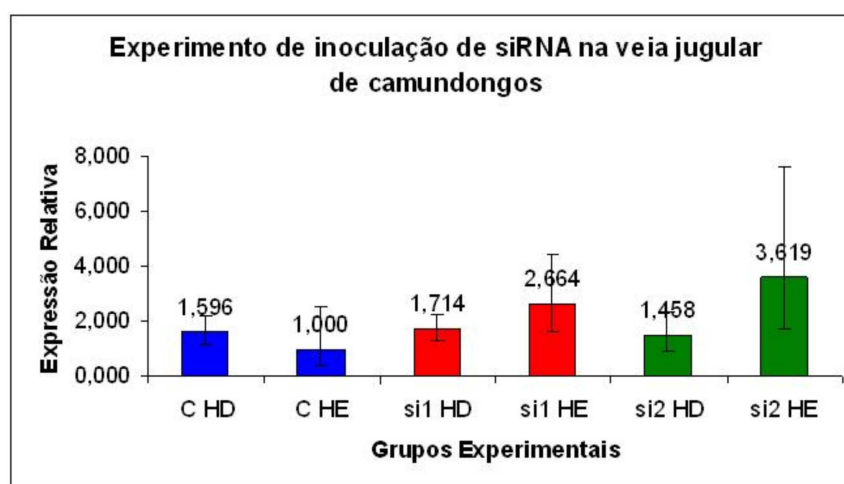


Figura 19. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de animais inoculados com siRNA pela veia jugular e grupo controle. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa, sendo que “C HD e HE” (colunas azuis) representam os hemisférios direito e esquerdo, respectivamente, do animal controle, “si1 HD e HE” (colunas vermelhas) referem-se aos hemisférios de um dos animais inoculados com siRNA e “si2 HD e HE” (colunas verdes) referem-se aos hemisférios do outro animal que recebeu a molécula. A amostra “C HE” foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

Pela análise da Fig. 19, é possível observar que a expressão gênica nos hemisférios direito e esquerdo é diferente em todos os animais. Nos animais inoculados com o siRNA, o gene *Efhc1*

está mais expresso no hemisfério esquerdo do que no direito, enquanto que no animal controle, ocorre o oposto. Quando se compara animais diferentes, observa-se que há homogeneidade na expressão gênica no hemisfério direito de todos os animais, sendo que no hemisfério esquerdo, a expressão varia. A análise de variância mostrou que essas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,1388$). Como não há nenhum motivo para supor que esta metodologia favoreça o silenciamento gênico em qualquer um dos hemisférios, pode-se concluir que não houve alteração na expressão do gene *Efhc1*. Essas diferenças observadas podem ser atribuídas à variação individual, uma vez que se tratava apenas de um animal controle e dois inoculados com siRNA e de uma linhagem de camundongos não isogênica (Swiss).

4. Experimentos de inoculação dos siRNAs *Efhc1* 350 e 1355 no cérebro de neonatos

Um dos grandes impedimentos para o silenciamento de genes no sistema nervoso central (e para tratamento de doenças neurológicas) é a barreira hematoencefálica, a qual impede a passagem de moléculas provenientes do sangue. Recentemente, entretanto, Kumar *et al.* (2007) relataram o sucesso no silenciamento gênico no cérebro de camundongos pela associação do siRNA com um peptídeo derivado de uma glicoproteína do vírus da raiva, o *RVG*. Segundo estes autores, este peptídeo de 29 aminoácidos liga-se especificamente a receptores de acetilcolina expressos em neurônios. A adição de 9 resíduos de D-arginina tem a função de facilitar a ligação do siRNA ao *RVG*, além de aumentar a captação do siRNA pelos neurônios (Kumar *et al.*, 2007). Esta quimera foi capaz de transfectar células e silenciar genes eficiente e especificamente tanto em neurônios mantidos em cultura quanto em experimentos *in vivo* (Kumar *et al.*, 2007). Em função disto, esse peptídeo foi adquirido e utilizado em alguns experimentos de inoculação do siRNA no cérebro de neonatos de camundongo e rato.

No primeiro experimento, o peptídeo foi complexado ao siRNA 350 do gene *Efhc1* e este complexo foi injetado no cérebro de animais P1. O resultado da avaliação da expressão gênica nos hemisférios cerebrais dos camundongos após este procedimento está mostrado na Fig. 20.

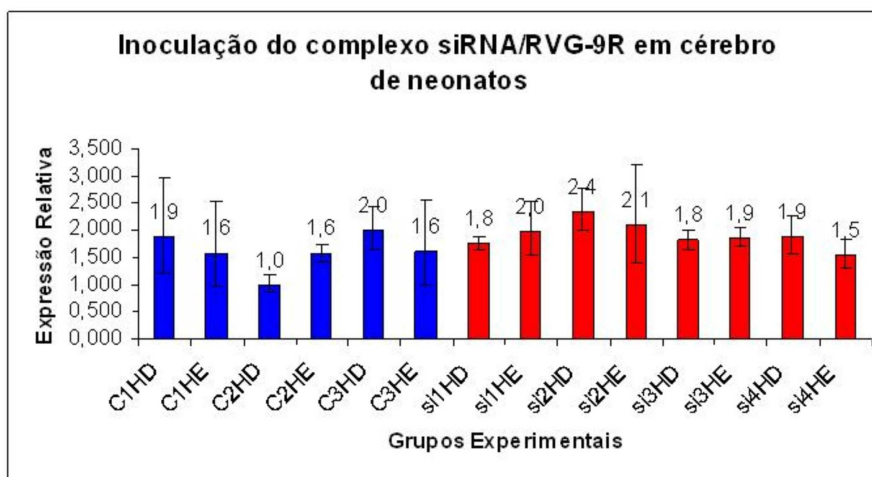


Figura 20. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de animais P1 inoculados com o complexo siRNA/RVG-9R. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa. As colunas “C1 a 3 HD e HE” (colunas azuis) representam os hemisférios direito e esquerdo, respectivamente, dos animais controle, e as colunas “s1 a 4 HD e HE” (colunas vermelhas) referem-se aos hemisférios dos animais inoculados com siRNA/RVG-9R. A amostra “C2HD” (terceira coluna a partir da esquerda) foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

Os valores de expressão relativa obtidos neste experimento foram submetidos à análise de variância. O resultado deste teste ($p=0,0720$) mostra que não há diferença significativa na expressão gênica entre o grupo controle e os animais inoculados, ou seja, não ocorreu silenciamento do gene *Efhc1* no cérebro destes animais.

Devido a isso, resolveu-se repetir o experimento, mas agora utilizando animais um pouco mais velhos (P3) e removendo-se os encéfalos no dia seguinte à injeção. Os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* estão mostrados na Fig. 21.

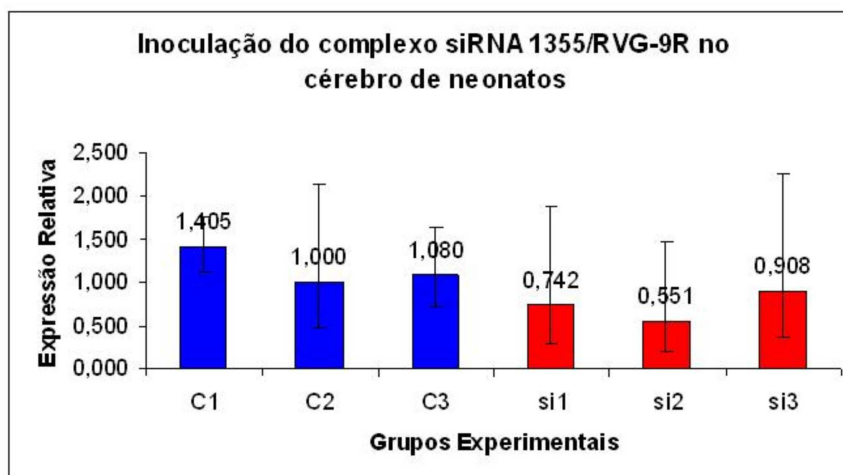


Figura 21. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de animais P3 inoculados com o complexo siRNA/RVG-9R. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa. As colunas “C1 a 3” (colunas azuis) representam os animais controle e as colunas “si1 a 3” (colunas vermelhas) referem-se aos animais inoculados com siRNA/RVG-9R. A amostra “C2” (segunda coluna a partir da esquerda) foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

A análise da Fig. 21 mostra que, apesar de estatisticamente iguais ($p=0,0566$), os valores de expressão do gene *Efhc1* foram consistentemente menores nos animais que receberam o siRNA. Este foi o primeiro e mais forte indício de que realmente ocorreu o silenciamento gênico no cérebro dos neonatos. Porém, na tentativa de confirmar se o silenciamento gênico observado era consistente, repetiu-se o procedimento. A Fig. 22 mostra o resultado.

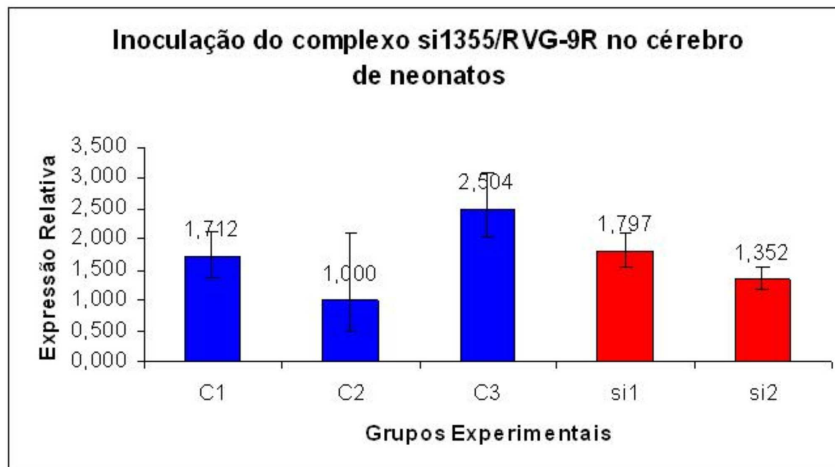


Figura 22. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de animais P3 inoculados com o complexo siRNA/RVG-9R para confirmação do silenciamento gênico. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa. As colunas “C1 a 3” (colunas azuis) representam os animais controle e as colunas “si1 e 2” (colunas vermelhas) referem-se aos animais inoculados com siRNA/RVG-9R. A amostra “C2” (segunda coluna a partir da esquerda) foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

Infelizmente, o silenciamento gênico verificado no experimento anterior não foi obtido nesta tentativa ($p=0,7903$). Há, inclusive, uma amostra controle que apresenta expressão do gene *Efhc1* menor do que a observada nos animais que receberam o siRNA. Este resultado inviabilizou qualquer tentativa de prosseguir com experimentos de avaliação fenotípica desses animais.

Devido à maior disponibilidade desses animais no CEMIB, no experimento seguinte foram utilizados neonatos P3 de ratos da linhagem Wistar que, apesar de ser heterogênea, é amplamente utilizada em experimentos para estudos sobre fisiologia e genética animal. O resultado da avaliação da expressão do gene *Efhc1* no cérebro dos neonatos está mostrado na Fig. 23.

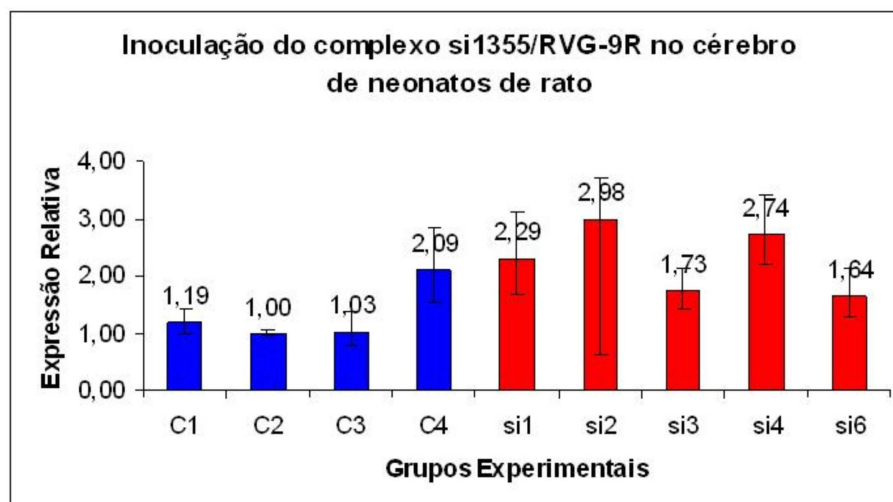


Figura 23. Gráfico mostrando os valores de expressão relativa do gene *Efhc1* no cérebro de neonatos de rato inoculados com o complexo siRNA/RVG-9R. As colunas representam os valores de expressão gênica relativa. As colunas “C1 a 4” (colunas azuis) representam os animais controle e as colunas “si1 a 6” (colunas vermelhas) referem-se aos animais inoculados com siRNA/RVG-9R. A amostra “C2” (segunda coluna a partir da esquerda) foi escolhida como calibrador. As barras verticais representam o desvio padrão.

Surpreendentemente, ao contrário do que era esperado, houve um aumento significativo da expressão do gene *Efhc1* no cérebro dos neonatos que receberam a molécula de siRNA ($p=0,0387$, já com a correção de Tukey). Este resultado é muito semelhante ao obtido no experimento com cultura de células L929. Mais uma vez, as diferenças na expressão gênica observada entre os grupos experimentais podem ter ocorrido como consequência das variações individuais na expressão do gene *Efhc1* nestes animais.

DISCUSSÃO

Neste ano, Suzuki *et al.* (2009) geraram camundongos deficientes (*knockout*) em *Efhc1*. Apesar da proteína *Efhc1* ser expressa predominantemente no flagelo dos espermatozóides e no oviduto, a fertilidade dos machos e fêmeas mutantes não foi prejudicada, indicando que a motilidade e funcionalidade dos gametas não foram afetadas pela ausência da proteína. Os camundongos mutantes apresentaram movimentos involuntários recorrentes em todo o corpo (mioclonias) por volta do sétimo mês de idade. Cada episódio durava menos de 200 ms e consistia de 1 a 3 crises, imediatamente após as quais os animais retomavam o comportamento normal. As mioclonias consistiam de movimentos sincronizados por todo o corpo, afetando simultaneamente os ombros e a cabeça, frequentemente impulsionando o animal para trás. Estes resultados sugerem que essas mioclonias não têm origem no córtex cerebral, originando-se, possivelmente, em regiões subcorticais, como o tálamo, por exemplo. Curiosamente, Mory *et al.* (2003) apresentaram evidências de que há disfunções neuronais no tálamo de pacientes com EMJ e argumentaram que estas disfunções talâmicas podem ter participação nos mecanismos de geração de crises neste tipo de epilepsia.

Suzuki e colaboradores (2009) mostraram também que, quando desafiados com pentilenotetrazol, um antagonista da subunidade $\alpha 1$ do receptor de GABA e um dos fármacos mais utilizados como indutor de crises, o número de camundongos mutados (tanto os heterozigotos quanto os homozigotos) que apresentou crises convulsivas generalizadas foi maior do que o de animais selvagens. O tempo de latência até o surgimento da crise também foi significativamente menor nos animais mutados.

As análises histológicas em animais P0 (neonatos nascidos no dia), P30 e com 2 meses de idade revelaram que os animais homozigotos possuíam os ventrículos cerebrais mais largos do que os camundongos heterozigotos e selvagens em todos os estágios do desenvolvimento. Não

foi observada nenhuma obstrução no aqueduto cerebral nem no Forâmen de Monro que pudesse causar o alargamento ventricular. A microscopia eletrônica não apontou nenhuma anormalidade no diâmetro ou comprimento dos cílios das células endoteliais. Entretanto, a frequência de batimento ciliar nos animais homozigotos foi significativamente menor em comparação aos heterozigotos e selvagens. Estes resultados sugerem que a alteração no batimento ciliar pode ser a causa do alargamento dos ventrículos, o que já foi observado em camundongos com outros defeitos nos cílios das células endoteliais (Davis *et al.*, 2007; Lehtrekk *et al.*, 2008). Curiosamente, como os animais heterozigotos não apresentaram nem ventrículos mais largos nem defeitos na função ciliar, é provável que essas anormalidades por si só não sejam suficientes para o surgimento das mioclonias e para o aumento da susceptibilidade a crises observadas nos homozigotos. Além disso, é importante ressaltar que os animais mutantes não desenvolveram crises tônico-clônicas e de ausência nem alteração no padrão eletrencefalográfico. Em conjunto, esses resultados evidenciam que fatores adicionais (ambientais, genéticos ou espécie-específicos) contribuem para o surgimento das crises em humanos.

Em camundongos, tanto a produção de neurônios na zona ventricular quanto a formação do neocórtex ocorrem por volta do décimo primeiro dia de vida uterina (E11) e se estendem até E18 (Gupta *et al.*, 2002; Gotz & Huttner, 2005). Em E11, o neocórtex consiste de muitas células precursoras proliferativas arranjadas na zona ventricular. A primeira onda de neurônios parte da zona ventricular e move-se em direção à superfície pial, formando uma camada de neurônios denominada de pré-placa. Aproximadamente em E13, uma segunda onda migratória de neurônios divide a pré-placa em zona marginal (superficial) e em sub-placa, sendo que a camada intermediária entre as mesmas é a placa cortical. Entre E14 e E18, novos neurônios deixam a zona ventricular e migram através da sub-placa para formar as camadas da placa cortical (Gupta *et al.*, 2002). A fase de organização do córtex é marcada, dentre outros processos, pela

eliminação do excesso de neurônios que migraram para esta região (Suzuki *et al.*, 2004). Como nós demonstramos, a expressão do gene *Efhc1* é mais pronunciada nas primeiras etapas do desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente no período embrionário (Conte *et al.*, 2009). Dada as funções atribuídas a este gene (batimento ciliar das células endimárias e participação na apoptose), é possível inferir que sua expressão contribui, mesmo que indiretamente, para a correta formação do córtex cerebral.

Portanto, os dados moleculares apontam para o seguinte cenário: mutações no gene *EFHC1* (perda de função) ou diminuição de sua expressão inviabilizam a associação da proteína EFHC1 com os microtúbulos constituintes dos cílios das células endimárias. A diminuição da frequência de batimento ciliar observada nestas células, além de acarretar alargamento dos ventrículos cerebrais, pode ocasionar outras pequenas alterações estruturais, as chamadas microdisgenesias, as quais não são observadas em análises histológicas. As microdisgenesias surgiriam como consequência da alteração do padrão de migração neuronal, pois as células endimárias participam ativamente deste processo. Essas anormalidades estruturais podem se concentrar no lobo frontal em alguns pacientes (como mostram os dados de neuroimagem, neuropsicológicos e os testes cognitivos) ou em outras regiões do cérebro, como no tálamo, por exemplo. A associação da proteína EFHC1 com canais de cálcio voltagem dependentes e a alteração funcional destes canais na presença de versões mutadas da proteína EFHC1 constituiriam a base eletrofisiológica para a geração das crises epiléticas observadas nos pacientes com EMJ.

Entretanto, a confirmação desta hipótese só seria possível pela realização de experimentos que determinassem inequivocamente a função da proteína EFHC1 ao longo do desenvolvimento do SNC. Dentre as várias possibilidades metodológicas disponíveis para se fazer estudos funcionais, foi utilizada a técnica de interferência por RNA.

A interferência por RNA é uma técnica extremamente versátil cujas aplicações abrangem, por exemplo, a genética reversa (e genômica funcional), a terapia gênica, o desenvolvimento de animais modelos, a validação de alvos para novas drogas e o combate a patógenos.

A aplicação médica da RNAi foi contemplada desde sua descoberta, mas a introdução de dsRNAs maiores que 30 pb em células de mamíferos ativa a via da proteína Quinase R (PKR), levando a uma resposta mediada por interferon e à conseqüente morte celular. Isso foi por muito tempo um bloqueio à aplicação da técnica em mamíferos, uma vez que os dsRNAs utilizados eram de 300 a 800 pb. O uso de células sem atividade de PKR, tais como linhagens tumorais ou embrionárias, permitiu os primeiros ensaios em mamíferos (Svoboda *et al.*, 2000; Billy *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Entretanto, o número de tais linhagens era limitado e uma ampla aplicação da técnica exigia um avanço metodológico. Em 2001, Elbashir e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a RNAi poderia ser desencadeada em células de mamíferos por duplexes de 21 nt, os siRNAs, sem induzir a resposta interferon. Esta descoberta tornou a técnica viável em mamíferos.

Nesta tese, os experimentos com cultura de células tiveram por finalidade a verificação da eficiência do método de transfecção utilizado, a avaliação da taxa de silenciamento do gene *Efhc1* e o período pelo qual este era mantido.

A cultura de cardiomiócitos de rato foi aqui utilizada com o intuito de testar a eficiência de silenciamento do gene *Efhc1* em células deste roedor, uma vez que experimentos *in vivo* também estavam programados. O insucesso no silenciamento gênico nas células em cultura inviabilizaria qualquer tentativa de silenciar o gene *Efhc1* nos animais, pois seria um prenúncio dos resultados que seriam obtidos nos experimentos *in vivo*. A análise das seqüências codificantes do gene *Efhc1* de camundongo e rato mostrou que, na região de ligação do siRNA, há dois nucleotídeos diferentes entre essas seqüências. Foi verificado que se houver similaridade

de sequência em até 11 nucleotídeos contíguos entre o siRNA para um determinado gene e um alvo inespecífico, este último pode ter sua expressão reduzida (Jackson *et al.*, 2003). Isso foi demonstrado em cultura de células HeLa, quando foram utilizados siRNAs dos genes *IGF1R* (*Insulin-like Growth Factor Receptor*) e *MAPK14* (*Mitogen-activated Protein Kinase 1*) e, em seguida, foi determinado o perfil de expressão de genes que possuem algum grau de similaridade de sequência com os genes alvo. Estes autores demonstraram que o silenciamento de genes inespecíficos não ocorria em função da redução da expressão dos genes alvo (isso exclui a hipótese de que o gene alvo regula a expressão dos genes inespecíficos), mas sim devido à similaridade de sequência com o siRNA (Jackson *et al.*, 2003).

Curiosamente, tanto os cardiomiócitos que receberam o siRNA do gene *Efhc1* quanto aqueles transfectados com o siRNA do gene *GFP* apresentaram diminuição da expressão do primeiro. Este resultado suscita algumas hipóteses acerca dos motivos pelos quais ele ocorreu. Uma possibilidade é a de que o que causou o aparente silenciamento gênico foi o agente de transfecção (lipofectina) utilizado. De fato, Fedorov *et al.* (2005) demonstraram por *microarray* que a utilização de lipofectina em cultura de células altera a expressão de aproximadamente 65 genes. A segunda hipótese baseia-se no fato de que Sledz *et al.* (2003) demonstraram que a transfecção de células de mamíferos (T98G) com siRNAs de 21 nucleotídeos pode causar a ativação da via de sinalização *Jak-Stat* mediada por interferon. Esta via faz parte do sistema imune inato e é desencadeada por infecções com vírus de RNA dupla-fita. Esses autores provaram que a ativação da resposta mediada por interferon pela adição de siRNAs ocorria via participação da Proteína Quinase R (PKR). A ativação de PKR (auto-fosforilação) por RNAs dupla-fita resulta na fosforilação, em última instância, do Fator de Iniciação Eucariótico 2 α (eIF2 α), culminando com o bloqueio geral (e inespecífico, no sentido do siRNA) da tradução (Sledz *et al.*, 2003). Além disso, essa via ativa a RNase L, a qual degrada mRNAs de maneira

inespecífica (Sledz *et al.*, 2003). Dessa forma, o gene *Efhc1* teria sido silenciado como consequência da ativação da resposta de interferon, e não pelo siRNA. Entretanto, os níveis de PKR e interferon não foram medidos nesta cultura, tornando esta hipótese apenas especulativa.

As células L929 são células de camundongo rotineiramente mantidas no CEMIB e, devido a isso, foram utilizadas com o mesmo propósito dos cardiomiócitos de rato. Neste experimento, mais uma vez, resultados curiosos foram obtidos. Ao invés de ser observado o silenciamento do gene *Efhc1*, o que se viu foi o aumento da expressão deste gene nas células inoculadas tanto com o siRNA quanto com o shRNA. Essa indução nos níveis de mRNA pode ser efetivamente resultante da transfecção dessas células, abrindo uma nova frente para o estudo funcional deste e outros genes.

Recentemente, Li *et al.* (2006) verificaram que, após transfecção de linhagens de células humanas com siRNAs desenhados contra promotores de diferentes genes, houve a indução duradoura e específica da expressão dos genes alvos. Esses autores demonstraram que este efeito era dependente da complementariedade de sequência entre a extremidade 5' da fita antisenso do siRNA e o mRNA e da participação da enzima Argonauta 2 (Ago2) (constituente de *RISC*). Em relação ao gene *E-caderina*, Li *et al.* (2006) observaram que a remoção do grupo metil da lisina 9 da histona 3 da região do promotor contra a qual o siRNA foi desenhado facilitava a ativação deste gene. Em outro estudo, Janowski *et al.* (2007) também verificaram maiores níveis do mRNA e da proteína do receptor de progesterona (PR) quando utilizaram siRNAs desenhados contra o promotor deste gene. Portanto, parece que o aumento na expressão gênica induzida por siRNAs não é um fenômeno isolado ou um artefato da técnica, mas sim uma propriedade intrínseca de algumas moléculas de siRNA, principalmente daquelas direcionadas aos promotores dos genes. Este processo de ativação gênica mediada por moléculas de siRNA foi chamado de ativação por RNA (RNAa – *RNA activation*) e os siRNAs capazes de desempenhar tal função

foram designados saRNA (para *small activating* RNA) (Li *et al.*, 2006; Janowski *et al.*, 2007). Como ambos os siRNAs desenhados não foram dirigidos ao promotor do gene, o aumento da expressão de *Efhc1* observado neste experimento pode ser decorrente da variação natural na expressão do mesmo em cultura de células L929.

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a RNAi promovia única e exclusivamente o silenciamento gênico (Pushparaj *et al.*, 2008). Entretanto, a demonstração de que os siRNAs direcionados contra os promotores de genes podem ativar a expressão gênica (Li *et al.*, 2006; Janowski *et al.*, 2007) criou um novo paradigma na biologia molecular e abriu novas frentes para a aplicação das moléculas de siRNA. Uma utilização interessante da RNAa foi a demonstração de que a ativação da expressão do gene codificador da proteína E-caderina em células de tumor de bexiga promoveu uma redução significativa nas capacidades de migração e invasão destas células *in vitro* (Mao *et al.*, 2008). Este estudo demonstrou o potencial da RNAa como uma opção terapêutica para o tratamento de doenças humanas, como, por exemplo, a ativação da expressão de genes supressores de tumor em células cancerosas (Mao *et al.*, 2008; Pushparaj *et al.*, 2008).

Muitos trabalhos de RNAi em neurônios foram realizados *in vitro*. A utilização desta técnica permitiu o estudo do crescimento de neuritos (Arakawa *et al.*, 2003), da função de canais iônicos voltagem-dependentes (McCrossan *et al.*, 2003), do processo de apoptose (Sarkar *et al.*, 2003) e até da diferenciação e crescimento neuronais (Vojtek *et al.*, 2003). Como um dos principais objetivos da tese era estudar a função do gene *Efhc1* no SNC ao longo do desenvolvimento, tentou-se o seu silenciamento em cultura de células Neuro2A, uma linhagem celular derivada de um neuroblastoma. Estes experimentos forneceram os resultados mais promissores, pois se obteve efetivamente o silenciamento do gene *Efhc1*. O silenciamento gênico obtido foi tão eficiente que, mesmo após 6 dias de cultura, a expressão do gene *Efhc1* nas células que receberam o siRNA era aproximadamente a metade das células controle. Como a associação

da proteína Efhc1 com microtúbulos está muito bem sacramentada (Ikeda *et al.*, 2005; de Nijs *et al.*, 2006), a avaliação fenotópica deveria contemplar processos nos quais a participação destas estruturas já é bem conhecida, como, por exemplo, a divisão celular. Entretanto, infelizmente, faltou tempo hábil para realizar tais avaliações.

Portanto, os experimentos com cultura de células demonstraram que o método de transfecção utilizado foi eficiente. Apesar de ter sido obtido silenciamento gênico no experimento com cultura de células Neuro2A, os resultados com as demais culturas de células foram contraditórios (silenciamento inespecífico e até aumento da expressão gênica), o que inviabilizou qualquer tipo de análise fenotípica neste sistema.

Apesar dos experimentos com cultura de células permitirem a verificação dos efeitos do silenciamento de um determinado gene, o propósito final desta tese e de outros projetos desta área é determinar como os mecanismos definidos *in vitro* se organizam para atuarem no ambiente dinâmico do sistema nervoso intacto *in vivo*. Dessa forma, foram realizados vários experimentos em que se tentou o silenciamento do gene *Efhc1* no cérebro de animais de diferentes idades.

Inicialmente, foi estabelecido o perfil de expressão do gene *Efhc1* em cérebro de roedores em diferentes estágios de desenvolvimento e, em função disso, verificou-se que o período de maior expressão ocorre no estágio embrionário, em camundongos. Desta forma, com o intuito de silenciar o gene *Efhc1* em seu pico de expressão, os primeiros experimentos foram realizados em embriões.

Nos primeiros experimentos, a molécula de siRNA foi injetada diretamente no cérebro dos embriões e eletroporada logo em seguida. Apesar de serem utilizadas condições descritas na literatura, o que se observou foi que todos os embriões, sem exceção, nasceram mortos após a realização deste procedimento. Duas hipóteses possíveis surgiram para explicar este resultado. A primeira e mais intrigante explicação seria a de que o silenciamento do gene *Efhc1*, nesta fase do

desenvolvimento embrionário, fosse letal para o organismo. Entretanto, Suzuki *et al.* (2009) produziram camundongos cuja expressão do gene *Efhc1* foi abolida e, mesmo assim, os animais nasceram e se desenvolveram normalmente (à exceção da presença de crises mioclônicas e alargamento dos ventrículos cerebrais) sendo, inclusive, férteis. A segunda e mais provável hipótese seria a de que o procedimento de eletroporação tenha sido muito agressivo para animais tão jovens. Saito e Nakatsuji (2001) relataram que as condições ótimas de eletroporação, ou seja, aquelas que promoviam a maior taxa de transfecção com o menor número de animais mortos, eram pulsos elétricos de 40V e 50 milissegundos disparados cinco vezes em intervalos de 1 segundo. Estas foram exatamente as condições utilizadas neste estudo. Portanto, apesar desses autores terem utilizado esta metodologia com sucesso na transfecção de cassetes de expressão dos genes *Notch* e *Hes1* no cérebro de embriões de camundongos, conseguindo, inclusive, verificar o fenótipo esperado nas células adjacentes aos locais de eletroporação, nesta tese esta técnica não se mostrou eficiente.

Como nas tentativas anteriores não se obteve silenciamento gênico, utilizou-se a técnica de transfecção hidrodinâmica para a inoculação de moléculas de siRNA. Mais uma vez, não se obteve sucesso neste experimento. Uma explicação plausível para a ausência de silenciamento é a de que a molécula de siRNA não conseguiu entrar nos neurônios, apesar de ter sido usado um veículo de transfecção de natureza lipídica (lipofectina) e, dessa forma, as diferenças observadas na expressão do gene podem ser atribuídas à variação individual, apesar da linhagem utilizada ser isogênica.

Entretanto, quando se analisou os resultados obtidos para o fígado, pôde-se observar que houve um aumento na expressão do gene quando foi injetado o siRNA. Uma explicação para este resultado é a de que, como este gene tem papel em atividades celulares essenciais e os órgãos foram removidos um dia depois da cirurgia, pode ter entrado em ação um mecanismo de

retroalimentação, no qual a ausência do mRNA deste gene foi detectado pela célula e, a partir disso, foi desencadeado um aumento na sua transcrição, tentando compensar pela sua momentânea falta. Portanto, o silenciamento do gene *Efhc1* pode até ter ocorrido, mas foi mascarado por este mecanismo compensatório e, devido a isso, não foi detectado pelo PCR em tempo real (quando as amostras foram coletadas, a queda nos níveis do mRNA de *Efhc1* já havia desaparecido).

Em seguida, foram realizados experimentos de inoculação dos siRNAs do gene *Efhc1* no cérebro de neonatos de camundongos e ratos. Como Kumar *et al.* (2007) relataram o sucesso no silenciamento de genes no cérebro de camundongos pela associação do siRNA com um peptídeo derivado de uma glicoproteína do vírus da raiva, o *RVG-9R*, resolveu-se adotar esta metodologia nesta tese. Em um dos experimentos realizados, os valores de expressão do gene *Efhc1* foram consistentemente menores nos animais que receberam o siRNA. Este foi o primeiro e mais forte indício de que realmente ocorreu o silenciamento gênico no cérebro dos neonatos. Entretanto, infelizmente, o silenciamento gênico não foi reproduzido em experimentos subsequentes.

Curiosamente, o que se observou no experimento com neonatos de rato foi exatamente o oposto. Hong *et al.* (2005) e Yang *et al.* (2005) mostraram que a administração de doses comparativamente elevadas de siRNA contra um gene qualquer, tanto em cultura de células quanto *in vivo*, ocasionavam a rápida recuperação da expressão gênica aos níveis anteriores à inoculação da molécula. Esses autores demonstraram que este efeito estava associado ao aumento da expressão dos genes *mEri-1* (*mouse enhanced RNAi*) e *Adar-1* (*Adenosine Deaminase acting on RNA*), os quais codificam, respectivamente, uma exonuclease e uma adenosina desaminase específica de RNA. Sugere-se que *mEri-1* iniba a interferência por RNA pela degradação das protrusões 3' dos siRNAs (impedindo a entrada da molécula no complexo *RISC*) e que *Adar-1* converta adenosina em inosina, eliminando a complementariedade entre o mRNA e o siRNA

(Hong *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Dessa forma, a administração de altas doses de siRNA ativa a expressão desses genes, os quais, por sua vez, modificam estruturalmente a molécula de silenciamento, reduzindo drasticamente a eficiência da técnica de interferência por RNA. Este fenômeno pode ter ocorrido, uma vez que foi realizado com animais recém-nascidos, para os quais a dose utilizada pode ter sido alta. Sendo assim, mesmo que tenha havido silenciamento do gene *Efhc1*, este não pôde ser detectado, pois os níveis de expressão basal foram rápida e vigorosamente restabelecidos. Entretanto, a possibilidade de variação individual na expressão deste gene nestes animais não pode ser descartada.

Portanto, das várias metodologias empregadas nesta tese para o silenciamento do gene *Efhc1* no cérebro de roedores, a que se mostrou mais promissora foi, sem dúvida, a complexação do siRNA com o peptídeo *RVG-9R*. Entretanto, novos experimentos são necessários para compreender melhor a dinâmica do silenciamento do gene *Efhc1* e os efeitos fenotípicos subsequentes.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta tese contribuíram da seguinte forma para o conhecimento sobre o perfil de expressão e distribuição do gene *Efhc1* no cérebro de roedores em diferentes estágios de desenvolvimento:

1. O gene *Efhc1* é expresso desde o estágio intra-uterino até a idade adulta, em roedores;
2. Não há diferenças na expressão do gene *Efhc1* entre os hemisférios cerebrais de animais da mesma idade. Isso é válido tanto para camundongos quanto para ratos;
3. Tanto o transcrito quanto a proteína codificada pelo gene *Efhc1* são mais abundantes durante o estágio intra-uterino em camundongos;
4. A expressão do gene *Efhc1* de ratos é maior nos animais adultos. Entretanto, sua expressão não foi avaliada em embriões;
5. Em comum, o gene *Efhc1* de camundongos e ratos apresenta diminuição da expressão entre neonatos de 1 e 14 dias de vida;
6. A distribuição do transcrito do gene *Efhc1* de camundongos e ratos é muito semelhante; o gene é expresso principalmente nas células da zona subventricular, nas células ependimárias e no plexo coróide;
7. O silenciamento do gene *Efhc1* foi observado em cultura de células Neuro2A por um período de até 6 dias após a inoculação do siRNA;
8. O silenciamento do gene *Efhc1* no sistema nervoso central de roedores foi alcançado pela complexação do siRNA com um peptídeo derivado do vírus da raiva, o RVG-9R.

BIBLIOGRAFIA:

- Akhtar, S., Benter, I.F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, **117**(12): 3623-3632.
- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., Narumiya, S. (2003). Control of axon elongation via an SDF-1a/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Cell Biology*, **161**: 381-391.
- 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. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá, 291pp.
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nature Neuroscience*, **6**(12): 1277-1283.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**: 363-366.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **98**(25): 14428-14433.
- Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., Morgan, R.A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene*, **252**(1-2): 95-105.
- Clemente, C.F.M.Z., Tornatore, T.F., Theizen, T.H., Deckmann, A.C., Pereira, T.C., Lopes-Cendes, I., Souza, J.R.M., Franchini, K.G. (2007). Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation Research*, **101**(12): 1339-1348.
- Coimbra, V.C., Yamamoto, D., Khusal, K.G., Atayde, V.D., Fernandes, M.C., Mortara, R.A., Yoshida, N., Alves, M.J.M., Rabinovitch, M. (2007). Enucleated L929 cells support invasion, differentiation and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Infection and Immunity*, **75**(8): 3700-3706.
- Conte, F.F., Ribeiro, P.A., Marchesini, R.B., Pascoal, V.D., Silva, J.M., Oliveira, A.R., Gilioli, R., Sbragia, L., Bittencourt, J.C., Lopes-Cendes, I. (2009). Expression profile and distribution of *Efhc1* gene transcript during rodent brain development. *Journal of Molecular Neuroscience*, published online February 4th, 2009.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H., Baulcombe, D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, **20**: 2069-2078.

- Davidson, B.L., Boudreau, R.L. (2007). RNA interference: a tool for querying nervous system function and an emerging therapy. *Neuron*, **53**(6): 781-788.
- Davis, R.E., Swiderski, R.E., Rahmouni, K., Nishimura, D.Y., Mullins, R.F., Agassandian, K., Philp, A.R., Searby, C.C., Andrews, M.P., Thompson, S., et al. (2007). A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **104**: 19422-19427.
- de Nijs, L., Lakaye, B., Coumans, B., Léon, C., Ikeda, T., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., Chanas, G. (2006). EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Experimental Cell Research*, **312**(15): 2872-2879.
- 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**: 7872–7883.
- Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczak, M., Barclay, J., Natt, F.J., et al. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Research*, **32**(5): e49.
- Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D., Pang, K., et al. (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell*, **124**(2): 343-354.
- Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**: 494-498.
- Federici, T., Boulis, N.M. (2007). Ribonucleic acid interference for neurological disorders: candidate diseases, potential targets and current approaches. *Neurosurgery*, **60**(1): 3-16.
- Fedoriw, A.M., Stein, P., Svoboda, P., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science*, **303**(5655): 238-240.
- Fedorov, Y., Anderson, E.M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., et al. (2005). Different delivery methods – different expression profiles. *Nature Methods*, **2**(4): 241.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**: 806-811.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, **408**(6810): 325-330.

- Glazov, E., Phillips, K., Budziszewski, G.J., Schöb, H., Meins Jr., F., Levin, J.Z. (2003). A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **35**(3): 342-349.
- Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S.J., Copley, R.R., et al. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, **408**(6810): 331-336.
- Gotz, M., Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**: 777-788.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortex development. *Nature Reviews Genetics*, **3**: 342-357.
- Haley, B., Zamore, P.D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural Molecular Biology*, **11**(7): 599-606.
- Hamilton, A., Baulcombe, D. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**: 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**: 293-296.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, **418**(6894): 244-251.
- Hassani, Z., Lemkine, G.F., Erbacher, P., Palmier, K., Alfama, G., Giovannangeli, C., et al. (2005). Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *Journal of Gene Medicine*, **7**(2): 198-207.
- Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Research*, **30**(8): 1757-1766.
- Hong, J., Qian, Z., Shen, S., Min, T., Tan, C., Xu, J.F., Zhao, Y., Huang, W. (2005). High doses of siRNAs induce *eri-1* and *adar-1* gene expression and reduce the efficiency of RNA interference in the mouse. *Biochemical Journal*, **390**: 675-679.
- Hughes, C.L., Kaufman, T.C. (2000). 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*, **127**(17): 3683-3694.
- Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**: 2056-2060.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M.K., Hirono, M., Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein

widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Letters*, **579**: 819-822.

- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, **21**(6): 635-637.
- Janowski, B.A., Younger, S.T., Hardy, D.B., Ram, R., Huffman, K.E., Corey, D.R. (2007). Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nature Chemical Biology*, **3**(3): 166-173.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**(2): 209-216.
- Klink, V.P., Wolniak, S.M. (2000). The efficacy of RNAi in the study of the plant cytoskeleton. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**(4): 371-384.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., et al. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, **448**(7149): 39-43.
- Kunath, T., Gish, G., Lickert, H., Jones, N., Pawson, T., Rossant, J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nature Biotechnology*, **21**(5): 559-561.
- Lechtreck, K.F., Delmotte, P., Robinson, M.L., Sanderson, M.J., Witman, G.B. (2008). Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *Journal of Cell Biology*, **180**: 633-643.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**(1): 15-20.
- Li, L.C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H., Dahiya, R. (2006). Small dsRNA induce transcriptional activation in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **103**(46): 17337-17342.
- Lohmann, J.U., Endl, I., Bosch, T.C. (1999). Silencing of developmental genes in Hydra. *Developmental Biology*, **214**(1): 211-214.
- Makimura, H., Mizuno, T.M., Mastaitis, J.W., Agami, R., Mobbs, C.V. (2002). Reducing hypothalamic *AGRP* by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neuroscience*, **3**:18.
- Mao, Q., Li, Y., Zheng, X., Yang, K., Shen, H., Qin, J., Bai, Y., Kong, D., Jia, X., Xie, L. (2008). Up-regulation of E-cadherin by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **375**: 466-470.

- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J., Kay, M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**(6893): 38-39.
- McCrossan, Z.A., Lewis, A., Panaghie, G., Jordan, P.N., Christini, D.J., Lerner, D.J., Abbott, G.W. (2003). MinK-related peptide 2 modulates Kv2.1 and Kv3.1 potassium channels in mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, **23**: 8077-8091.
- Mory, S.B., Li, L.M., Guerreiro, C.A.M., Cendes, F. (2003). Thalamic dysfunction in juvenile myoclonic epilepsy: a proton MRS study. *Epilepsia*, **44**(11): 1402-1405.
- Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C., Ogawa, M. (1997). Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50mAb against reelin. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **94**: 8196-8201.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **95**: 14687-14692.
- Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J. (1970). Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **65**(1): 129-136.
- Pardridge, W.M. (2007). shRNA and siRNA delivery to the brain. *Advances in Drug Delivery Reviews*, **59**(2-3): 141-152.
- Pereira, T.C. (2005). Estudos de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP).
- Pereira, T.C., Bittencourt, V.A.B., Secolin, R., Rocha, C.S., Maia, I.G., Lopes-Cendes, I. (2007). 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*, **30**(4): 1206-1208.
- Pereira, T.C., Pascoal, V.D., Marchesini, R.B., Maia, I.G., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., Lopes-Cendes, I. (2008). *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting *HGPRTase* gene. *Experimental Parasitology*, **118**(4): 619-623.
- Pushparaj, P.N., Aarthi, J.J., Kumar, S.D., Manikandan, J. (2008). RNAi and RNAa - The Yin and Yang of RNAome. *Bioinformation*, **2**(6): 235-237.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, **22**(3): 326-330.
- Saito, T., Nakatsuji, N. (2001). Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental Biology*, **240**: 237-246.

- Salahpour, A., Medvedev, I.O., Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2007). Local knockdown of genes in the brain using small interfering RNA: a phenotypic comparison with knockout animals. *Biological Psychiatry*, **61**(1): 65-69.
- Sarkar, S.N., Das, H.K. (2003). Regulatory role of presenilin-1 and nicastrin in neuronal differentiation during in vitro neurogenesis. *Journal of Neurochemistry*, **87**: 333-343.
- Schoppmeier, M., Damen, W.G. (2001). Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of distal-less is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation. *Development Genes and Evolution*, **211**(2): 76-82.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**(2): 199-208.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**(4): 465-476.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., Willians, B.R.G. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology*, **5**(9): 834-839.
- Suzuki, T., Delgado-Escueta, A.V., Aguan, K., Alonso, M.E., Shi, J., Hara, Y., Nishida, M., Numata, T., Medina, M.T., Takeuchi, T., Morita, R., Bai, D., Ganesh, S., Sugimoto, Y., Inazawa, J., Bailey, J.N., Ochoa, A., Jara-Prado, A., Rasmussen, A., Ramos-Peek, J., Cordova, S., Rubio-Donnadieu, F., Inoue, Y., Osawa, M., Kaneko, S., Oguni, H., Mori, Y., Yamakawa, K. (2004). Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, **36**(8): 842-849.
- Suzuki, T., Inoue, I., Yamagata, T., Morita, N., Furuichi, T., Yamakawa, K. (2008). Sequential expression of Efhc1/myoclonin1 in choroid plexus and ependymal cell cilia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **367**(1): 226-233.
- Suzuki, T., Miyamoto, H., Nakahari, T., Inoue, I., Suemoto, T., Jiang, B., Hirota, Y., Itohara, S., Saido, T.C., Tsumoto, T., Sawamoto, K., Hensch, T.K., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K. (2009). Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Human Molecular Genetics*, HMG advance access published January 15, 2009.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., Schultz, R.M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, **127**(19): 4147-4156.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **306**:1377-1380.
- Torsoni, A.S., Constâncio, S.S., Nadruz, W., Hanks, S.K., Franchini, K.G. (2003). Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circulation Research*, **93**(2): 140-147.

- Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Letters*, **479**(3): 79-82.
- Uprichard, S.L., Boyd, B., Althage, A., Chisari, F.V. (2005). Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **102**(3): 773-778.
- Vojtek, A.B., Taylor, J., DeRuiter, S.L., Yu, J.Y., Figueroa, C., Kwok, R.P.S., Turner, D.L. (2003) Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **23**: 4417-4427.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., Davidson, B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, **20**(10): 1006-1010.
- Wadhwa, R., Kaul, S.C., Miyagishi, M., Taira, K. (2004). Vectors for RNA interference. *Current Opinion in Molecular Therapies*, **6**: 367-372.
- Yang, S., Tutton, S., Pierce, E., Yoon, K. (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, **21**(22): 7807-7816.
- Yang, W.D., Wang, Q.D.W., Howell, K.L., Lee, J.T., Cho, D.S., John, M.M., Kazuko, N. (2005). *ADAR1* RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 3946-3953.
- Zhang, Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M. (2003). In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *Journal of Genetic Medicine*, **5**(12): 1039-1045.
- Zeringue, H.C., Constantine-Paton, M. (2004). Post-transcriptional gene silencing in neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, **14**(5): 654-659.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**(13): 3406-3415.

ANEXO

Declaração de concordância com as normas de Ética na Experimentação Animal e de Biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada “Análise da Expressão e Localização do Transcrito do Gene *Efhc1* no Cérebro de Roedores Durante o Desenvolvimento e no Animal Adulto”:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no **Projeto CIBio/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº 02/2008);

(X) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1020-1);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar:

Galvina Y. Costa

Aluno:

Isaura Lopes Cardoso

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP

Helena Coutinho F. de Oliveira

Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP

2513