



Universidade de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Unidade de Biotecnologia

ANIELI GAVERIO MANTELLO

**SILENCIAMENTO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR
GLUTAMATÉRGICO NMDA E SEU POTENCIAL EFEITO
ANTIEPILEPTOGÊNICO**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

ANIELI GAVERIO MANTELLO

**SILENCIAMENTO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR
GLUTAMATÉRGICO NMDA E SEU POTENCIAL EFEITO
ANTIEPILEPTOGÊNICO**

Dissertação
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Ribeirão Preto
UNAERP. Área de concentração
Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Renê Oliveira
Beleboni.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2019

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Mantello, Anieli Gaverio, 1991-

M292s Silenciamento da subunidade nr2b do receptor glutamatérgico
NMDA e sua potencial atividade antiepiléptogênica / Anieli Gaverio
Mantello. -- Ribeirão Preto, 2019.

47 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Renê Oliveira Beleboni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,

ANIELI GAVÉRIO MANTELLO

**SILENCIAMENTO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO
NMDA E SUA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIEPILEPTOGÊNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 12 de dezembro de 2019

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. René de Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dr. Paulo Peitl Júnior
DNAPTA

Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2019

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter permitido a concretização desta jornada.

Ao meu esposo Jeffrey Nelson Heim que nesses quatro anos juntos sempre me deu força e coragem. Pela motivação, paciência e compreensão e pelos ensinamentos da língua inglesa.

Aos meus pais Elisa e Braz pelo amor, dedicação e valores que me ensinaram.

À minha irmã e melhor amiga Annelise por estar sempre ao meu lado e pelos momentos de descontrações.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni, por ter acreditado e confiado em mim para realização desse projeto.

À Dr.^a Daiane Santos Rosa Aguiar pela amizade, carinho, dedicação, ensinamentos, suporte na realização deste trabalho.

Às minhas amigas de laboratório Bruna e Raphaela pela ajuda na execução dos experimentos.

Aos Professores da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos técnicos de laboratório Carla, Carlos, Patrícia e Simone pelo suporte e ajuda.

A UNAERP, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos animais pela eutanásia.

RESUMO

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) representa aproximadamente 40 a 60% dos casos diagnosticados dentre os mais diferentes tipos de epilepsias, sendo a mais refrataria ao tratamento tradicional. A ELT pode ser estudada através do modelo de pilocarpina em ratos. Este modelo mimetiza com fidelidade as condições comportamentais e fisiopatológicas observadas em pacientes com ELT, sobretudo em termos das lesões hipocâmpais e alterações neuroquímicas características da doença. De fato, há um aumento considerável da densidade populacional e/ou de função de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em áreas específicas do hipocampo e/ou rearranjo de suas subunidades formadoras, quando animais e humanos sejam acometidos do *status epilepticus* (SE), um evento que marca consideravelmente o início e manutenção da ELT. A subunidade NR2B é uma das mais importantes para a dinâmica funcional do receptor. Uma abordagem terapêutica interessante para distúrbios neurológicos em que genes alvos apresentem ganho de função é a técnica de RNAi, em que pequenas moléculas de RNA interferente (siRNA) inibem a expressão gênica por degradação de um RNAm específico. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da aplicação intranasal de siRNA associado de sistema de transfecção e desenhado para silenciamento seletivo da subunidade NR2B de receptores NMDA em animais submetidos ao modelo da pilocarpina. A principal conclusão deste trabalho se baseia nos resultados de Western Blotting e na dose de siRNA/sistema de transfecção de 25 µg/µL e releva que foi possível demonstrar efetivamente o silenciamento hipocâmpal da subunidade NR2B em animais submetidos ao SE, ao mesmo tempo em que se mostra discreta proteção dos animais contra as crises epilêpticas de maior score. Os resultados mostram que o sistema de transfecção escolhido e o siRNA desenhado silenciam a subunidade NR2B seletivamente no hipocampo, sem que outras áreas estudadas em paralelo, e aqui representadas pelo córtex, sejam atingidas. Apesar da necessidade de novos experimentos, é possível dizer que o sistema de transfecção escolhido foi efetivo em proteger o siRNA da degradação enzimática, na sua solubilização/veiculação ao longo do muco nasal e no ultrapassar de barreiras biológicas. A soma deste dado com a seletividade hipocâmpal e validação da via intranasal como rota de siRNA dirigido ao receptor hipocâmpal e específico dão a este trabalho pioneiro marcando interesse translacional e biotecnológico.

Palavras-chave: Anticonvulsivante; Epilepsia; Modelo de Pilocarpina; RT-PCR; Western Blotting.

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) represents approximately 40 to 60 percent of all diagnosed epilepsy cases, and is the most refractory to traditional treatment. TLE can be studied using the pilocarpine rat model. This model faithfully mimics the behavioral and pathophysiological conditions observed in patients with TLE, especially in terms of hippocampal lesions and neurochemical changes characteristic of the disease. In fact, there is a considerable increase in population density and/or function of NMDA-type glutamatergic receptors in specific areas of the hippocampus and/or rearrangement of their forming subunits when animals and humans are affected by *status epilepticus* (SE). This event considerably marks the beginning and maintenance of ELT. The NR2B subunit is one of the most important for the functional dynamics of the receiver. An interesting therapeutic approach for neurological disorders in which target genes have gain in function is the RNAi technique, where small interfering RNA (siRNA) molecules inhibit gene expression by degradation of a specific mRNA. The objective of this work was to evaluate the effect of intranasal application of transfection-associated siRNA designed for selective silencing of the NMDA receptor NR2B subunit in animals submitted to the pilocarpine model. The main conclusion of this work is based on the results of Western Blotting and siRNA dose/transfection system of 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and shows that it was possible to effectively demonstrate hippocampal NR2B subunit silencing in animals undergoing SE, while discreet protection of animals against the highest score of epileptic seizures is shown. The results show that both the chosen transfection system and the designed siRNA silenced the subunit NR2B selectively in the hippocampus without affecting other areas studied in parallel, represented here by the cortex. Despite the need for further experiments, it can be said that the transfection system chosen was effective in protecting the siRNA from enzymatic degradation, its solubilization/delivery along the nasal mucus, and in overcoming biological barriers. The sum of this data with hippocampal selectivity and intranasal pathway validation as a specific hippocampal receptor-directed siRNA route gives this pioneering work marking translational and biotechnological interest.

Key words: Anticonvulsant; Epilepsy; Pilocarpine Model; RT-PCR; Western Blotting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de ação do siRNA.....	18
Figura 2 – Cavidade nasal de ratos.....	19
Figura 3 - Corte da membrana entre a subunidade NR2B e a β -actina.....	29
Figura 4 - Diferença nos tratamentos siRNA-NR2B via intranasal usando micropipeta /ponteira versus seringa de Hamilton acoplada ao tubo de polietileno, sendo gráfico (A) hipocampo e gráfico (B) córtex por RT-PCR.....	32
Figura 5 – Gráfico de latência para primeira crise de score 4/5 em segundos no modelo animal de pilocarpina.....	33
Figura 6 – Gráfico dos animais que não obtiveram crises de score/ no modelo animal de pilocarpina.....	34
Figura 7 – Expressão relativa do gene NR2B na dose de $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ normalizado com GADPH, relativo ao grupo Controle por RT-PCR.....	36
Figura 8 – Expressão relativa da proteína da subunidade NR2B normalizada pela β -actina relativo ao grupo veículo por Western-blot.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças gerais entre siRNA e MicroRNA.....	17
Tabela 2 - Sequência do siRNA dirigido para subunidade NR2B.....	22
Tabela 3 – Classificação das Crises convulsivas.....	24
Tabela 4 – “Primers”utilizados para o RT-PCR.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ELT - Epilepsia do Lobo Temporal

i.p - intraperitoneal

i.v - intraventricular

i.c.v intracerebroventricular

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

ng - nanograma

nm – nanômetro

pb - Pares de bases

RNAi – RNA de interferência

SE – *Status epilepticus*

SNC – Sistema Nervoso Central

WB – Western blotting

μM- Micromolar

μg - Micrograma

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1.EPILEPSIA.....	10
1.2.RECEPTOR NMDA.....	12
1.3.SUBUNIDADE NR2B.....	13
1.4.ANIMAL MODELO DE PILOCARPINA.....	14
1.5.DROGAS ANTIEPILEPTICAS.....	15
1.6.RNA DE INTERFERÊNCIA.....	16
2. OBJETIVO	21
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1.FÁRMACOS.....	22
3.2. PREPARAÇÃO DO SIRNA DIRIGIDO PARA SUBUNIDADE NR2B.....	22
3.3. ANIMAIS.....	23
3.4. ENSAIOS PILOTOS: PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS POR VIA INTRANASAL: DEFINIÇÃO DA DOSE, TEMPO DE EXPOSIÇÃO E DISPOSITIVO/MÉTODO DE ADMINISTRAÇÃO DO SIRNA EM ANIMAIS LIVRES DE SE.....	23
3.5. INDUÇÃO DO STATUS EPILEPTICUS (SE) E ANÁLISE COMPORTAMENTAL DAS CRISES/DESEMPENHO ANTICONVULSIVANTE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO TRATAMENTO siRNA.....	24
3.6. RT-PCR: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO RNAm CODIFICANTE PARA SUBUNIDADE NR2B EM ANIMAIS LIVRES DE SE OU SUBMETIDOS AO SE PELO MODELO DE PILOCARPINA.....	25
3.6.1. EXTRAÇÃO DO RNAs.....	25
3.6.2. PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RNA POR RT-PCR.....	26
3.7. WESTERN BLOTTING: ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTÍNAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA NA PRESENÇA DO TRATAMENTO INTRANASAL COM siRNA.....	27
3.7.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	27
3.7.2. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	27
3.7.3. ELETROFORESE.....	28
3.7.4. TRANSFERÊNCIA.....	28
3.7.5.BLOQUEIO E INCUBAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	28
3.7.6. NORMALIZAÇÃO: CONTROLE DE CARREGAMENTO DAS AMOSTRAS NO GEL.....	29
3.7.7.REVELAÇÃO: DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR NMDA.....	30
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIA

Os primeiros relatos sobre epilepsia foram encontrados em papiros egípcios e pedras cuneiformes da Babilônia (1050 a.C.), nos quais indivíduos epiléticos eram considerados endemoninhados. Em torno de 400 anos a.C., Hipócrates descreveu a epilepsia como uma disfunção do cérebro e argumentou contra as ideias a respeito de que as convulsões fossem frutos de esconjurações (MASIA, DEVINSKY 2000).

A epilepsia é uma desordem neurológica que pode ocorrer em qualquer idade, atingindo ambos os gêneros, sendo determinada pelo surgimento de ataques epiléticos recorrentes, não provocados e autossustentados (BORGES et al., 2009; D'AVILA et al., 2011; FISHER et al., 2014; MINJAREZ et al., 2017).

Atualmente a epilepsia é definida como aquelas crises espontâneas e consecutivas, de naturezas convulsivas ou não, que resultam de uma atividade elétrica anormal em áreas específicas do encéfalo, principalmente na região do córtex e/ou em áreas subcorticais como o hipocampo. Embora 30% dos tipos de epilepsia sejam idiopáticos (doença causada por razões desconhecidas), alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da epilepsia, entre eles estão as doenças cerebrovasculares, os tumores cerebrais, as desordens neurodegenerativas, as complicações perinatais, o traumatismo craniano, as infecções de diferentes origens e as infestações parasitárias no Sistema Nervoso Central (SNC). Nos países mais pobres, as infecções endêmicas como malária e neurocisticercose são fatores de maior risco à população potencialmente exposta (DUNCAN et al., 2006; SCORZA et al 2009; MINJAREZ et al., 2017).

No mundo, calcula-se que 50 milhões de pessoas apresentem algum tipo de epilepsia, sendo que aproximadamente 80% dessas pessoas são de países de baixo ou médio poder econômico-social. Deste montante, aproximadamente 70% dos pacientes poderiam viver sem crises epiléticas se os tratamentos disponíveis atualmente no mercado fossem altamente eficazes (WHO, 2017). Nos Estados Unidos, referências de base epidemiológica mostraram que 48 em cada 100.000 pessoas poderão desenvolver algum tipo de epilepsia ao longo de suas vidas (SHAFER; SIRVEN, 2013). Para países da América Latina,

incluindo o Brasil, a doença atinge mais de 20 em cada 10.000 pessoas (NORONHA et al., 2007).

Dentre os muitos tipos de epilepsia, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) responde por aproximadamente 40 a 60% de todos os quadros epilépticos diagnosticados, acometendo principalmente os adultos. A ELT é a forma de mais árduo tratamento em virtude de sua alta refratariedade farmacológica (PEDROSO, 2005; TOYODA, 2013; FURMAN, 2013).

Dado fato de a condição epiléptica trazer grandes prejuízos pessoais, por conta dos inúmeros fatores limitantes impostos aos pacientes acometidos, bem como quanto ao seu alto custo econômico-social, novas pesquisas se fazem necessárias de modo a se melhorar o entendimento da doença e, principalmente, para o melhor ajuste de seu tratamento, atualmente, pouco efetivo.

Nas ocorrências mais graves, a crise epiléptica inicia-se e se agrava pela ocorrência do *status epilepticus* (SE). O SE é designado por ser uma ocorrência de crise(s) envolvendo dois ou mais estágios que incluem convulsões generalizadas tônico - clônicas e descargas elétricas contínuas e agudas, de modo paroxístico e coincidentes com o processo de epileptogênese. Nestes casos, o paciente permanece inconsciente, caracterizando um ataque epiléptico prolongado ou ataques repetidos em breves intervalos de tempo, com manifestações clínicas características e, a presença marcante, em maior ou menor grau, da esclerose hipocampal, responsável direta pela autosustentação das crises epilépticas (LOWENSTEIN et al. 1999; LÖSCHER, 2002; TRINKA et al., 2015; MINJAREZ et al., 2017).

O SE apresenta alto índice de morbidade e mortalidade entre os pacientes, sendo capaz de levar a óbito em 58% dos casos. Além disso, quanto maior a duração das convulsões/SE, maiores serão as lesões neuronais e alterações gliais no hipocampo e, conseqüentemente, maiores as dificuldades para o tratamento das futuras crises e, pior o prognóstico do quadro clínico (GARZON, 2008; FISHER et al., 2014).

No início do evento do SE há uma diminuição significativa dos receptores pós-sinápticos gabaérgicos e, portanto da sua ação inibitória, fazendo-se por outro lado, predominar assim a atividade excitatória nas regiões de esclerose hipocampal. Nas fases mais tardias, há um aumento da expressão e da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N – metil – D aspartato (NMDA), principal receptor excitatório do SNC. Essa

associação de alterações neuroquímicas entre os receptores gabaérgicos e glutamatérgicos resulta na formação e manutenção do SE, que irá progredir para crises autossustentadas que excedem o tempo do estímulo de origem, marcam o início da epileptogênese e caracterizam, sobremaneira, a evolução e manutenção da doença (GUEDES et al., 2005; GHASEMI; SCHACHTER, 2011; DEEB et al., 2012). Dito de outro modo, tanto receptores gabaérgicos, quanto sobretudo aqueles glutamatérgicos (principalmente do tipo NMDA), do ponto de vista de seus desequilíbrios relativos, são fundamentais para o estabelecimento de diferentes tipos de epilepsia, o que inclui naturalmente a ELT.

1.2. RECEPTOR NMDA

A ação do neurotransmissor excitatório glutamato no SNC é principalmente mediada pelo receptor do tipo NMDA. Diversas mutações em subunidades específicas desse receptor podem causar distúrbios neurológicos, especialmente a epilepsia (XU, LUO; 2017). O receptor NMDA se caracteriza por suas propriedades especiais, como a ativação dependente de co-agonista, o bloqueio dependente de voltagem exercido pelo Mg^{2+} , a alta permeabilidade a íons Ca^{2+} , e a lenta cinética de ativação e desativação. Os mesmos também são diferenciados quando levados em conta sua distribuição ampla pelo SNC, participação em diferentes funções fisiológicas, como memória/aprendizado e sensibilidade farmacológica específica (PAOLETTI; NEYTON, 2007; TRAYNELIS et al., 2010; PAOLETTI et al., 2013; XU, LUO; 2017).

Tais receptores são complexos proteicos heteroméricos com estrutura geral similar aos outros receptores ionotrópicos que sejam transmembrânicos. Existem ao menos sete subunidades na sua composição, a determinante subunidade NR1, as complementares/auxiliares NR2A-D e as subunidades NR3A-B que não formam complexos funcionais, mas podem se associar as demais para aumento da diversidade bioquímica e farmacológica destes receptores (CULL-CANDY et al., 2001; FURUKAWA et al., 2003; PAOLETTI; NEYTON, 2007; TRAYNELIS et al., 2010; BURNASHEV; SZEPETOWSKI, 2015; XU, LUO; 2017).

O canal associado ao receptor é ativado quando a glicina ou a D-serina se ligam à NR1 e o L-glutamato à NR2. As subunidades NR1, NR2A e NR2B também são frequentemente associadas à ligação de diferentes moduladores alostéricos e são elas que dão as maiores variações funcionais aos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA

(PAOLETTI; NEYTON, 2007; TRAYNELIS et al., 2010; BURNASHEV; SZEPETOWSKI, 2015; XU, LUO; 2017).

1.3. SUBUNIDADE NR2B

A subunidade NR2B começa a ser expressa desde o décimo sétimo dia de desenvolvimento do embrião de ratos, com expressão elevada na região do córtex. Em contrapartida, o hipocampo tem uma expressão mais baixa nesse estágio do processo embrionário, se elevando somente no período próximo ao nascimento (MONYER et al, 1994). Na fase adulta, os receptores NMDA presentes no hipocampo são comumente formados pela subunidade essencial NR1 associada ao conjunto da NR2A e/ou NR2B, donde se liga o glutamato, podendo ocasionalmente se identificar associações entre NR2C e NR3B, o que mostra por outro lado, a grande diversificação bioquímica e, pois, farmacológica de tais receptores (SZCZUROWSKA; MAREŠ, 2013).

Estudos que realizaram o *knockout* da NR2B na fase neonatal de camundongos resultou na morte desses animais, enquanto a superexpressão dessa mesma subunidade na região do proencéfalo de animais adultos aumentou a potenciação do hipocampo e o desempenho cognitivo (memória), evidenciando a importância da expressão dessa subunidade no desenvolvimento cerebral normal e em sua maturação final e preservada (KUTSUWADA et al., 1996; TANG et al., 1999; HU et al., 2015).

De fato, genes modificados referentes à subunidade NR2B que resultem em modificações no aumento da expressão proteica (receptores NMDA) estão associados a diversas desordens neurológicas, como deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, transtorno do espectro autista, esquizofrenia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, deficiência visual cerebral, doença de Alzheimer e principalmente na epilepsia, bem como em desajustes de aprendizado/memória (BURNASHEV; SZEPETOWSKI, 2015; HU et al., 2015; XU, LUO; 2017). Além disso, experimentos usando culturas de células hipocampais originadas de animais (RICE; DELORENZO, 1998; GHASEMI; SCHACHTER, 2011) e de tecidos extraídos cirurgicamente de pacientes epiléticos (MÖDDEL et al., 2005) revelaram uma ativação e hiperfunção dos receptores de NMDA, como sendo fator fundamental para a epileptogênese, sustentação e progressão de diferentes tipos de epilepsia, o que claro, inclui a ELT (GHASEMI; SHACHTER, 2011).

Com efeito, pesquisas recentes a respeito de alterações no receptor NMDA propõem sua relação com a epileptogênese e por conseguinte, como alvo molecular potencial para novas terapias anti-epilépticas. Todavia, ainda se faz necessário melhor entendimento da participação de cada uma de suas subunidades em sua relação com a epilepsia, e, pois, no desenvolvimento de terapias mais precisas e inovadoras.

1.4. ANIMAL MODELO DE PILOCARPINA

Experimentos *in vitro*, como aqueles em cultura de células, são excelentes formas de analisar a correlação dos fenótipos e genótipos de mutações que venham a atingir tais subunidades. Contudo, não se mostram apropriados ou completos para detecção de mudanças globais na fisiologia animal e, sobretudo, quanto as manifestações clínico-patológicas decorrentes de tais mutações. Assim, ainda se faz necessário o uso de modelos animais que fidelizem com as ocorrências da ELT em humanos. Isto possibilita priorizar a investigação mais realística e completa do quadro de doença na presença e ausência de novas e potenciais alternativas terapêuticas, que por suas vezes, podem trazer novas informações da patologia subjacente ao quadro clínico observado (XU, LUO; 2017).

Um dos modelos animais mais utilizados no entendimento da ELT e na prospecção de novos agentes farmacológicos anticonvulsivantes e/ou antiepilépticos, que agrega inclusive a ocorrência do SE, é o modelo animal da pilocarpina (MINJAREZ et al., 2017).

O modelo, utilizado e validado há mais de 30 anos, é considerado um dos melhores modelos de epilepsia devido a pilocarpina induzir as diferentes fases do SE e, por provocar crises epilépticas generalizadas, mimetizando as manifestações clínicas decorrentes do SE/ELT em humanos. Extraída das folhas da planta *Pilocarpus jaborandi*, a pilocarpina é um alcaloide agonista colinérgico muscarínico, que pode ser administrada por diferentes vias enterais (i.v ou i.p) ou diretamente no cérebro (i.c.v), levando aos graves danos cerebrais e, sequencialmente, ás alterações clínico-comportamentais características da ELT (MINJAREZ et al., 2017). De fato, esse modelo de epilepsia em roedores tem tradicionalmente fornecido informação importante sobre as características anatomo-morfológico/funcionais nos circunspectos comportamentais, celulares e moleculares associados com as crises epilépticas, tendo em vista reproduzir as lesões hipocampais (esclerose hipocampal) características da ELT em humanos (CURIA et al., 2008).

Tanto o modelo da pilocarpina, como diferentes outros que pretendam mimetizar doenças ou distúrbios neurológicos que ocorram em humanos, tem sido fundamentais para o melhor avanço terapêutico contra diferentes distúrbios (MINJAREZ et al., 2017).

1.5. DROGAS ANTIEPILEPTICAS

Atualmente, existem vários fármacos antiepilépticos no mercado, podendo ser usados isoladamente ou, mais comumente, em combinações para o controle das crises epilépticas (GOLDENBERG, 2010). Esses ativos agem via modulação de canais iônicos voltagem dependentes, e/ou pela modulação de receptores, transportadores e outras estruturas envolvidas com a liberação, ligação, síntese e degradação de diversos neurotransmissores. Eles tendem a promover uma elevação do sinal inibitório sináptico, sobretudo de natureza gabaérgica, e/ou a suprimir a excitação sináptica anormal no cérebro, sobretudo, a de natureza glutamatérgica mediada principalmente pelo receptor NMDA (PERUCCA; GILLIAM, 2012; YOUNUS; REDDY, 2017).

Segundo a Liga Brasileira de Epilepsia, algumas considerações devem ser analisadas antes de se determinar a droga antiepiléptica ou a associação de drogas de escolha para o emprego em cada caso/paciente. A escolha do fármaco advém primeiro da correta classificação nosológica/diagnóstica das crises epilépticas e, pois, do tipo de epilepsia associado. Obviamente outros fatores mais genéricos são imperativos na escolha, como, idade, sexo, condições físicas e socioeconômicas do paciente. Com efeito, a carbamazepina, por exemplo, é a droga de primeira escolha para tratamento de crises focais em adultos e crianças. Apesar disso, o fenobarbital é o mais prescrito para crises focais e generalizadas em países em desenvolvimento, especialmente pelo custo. Nas convulsões mioclônicas e tônico – clônicas, o fármaco de escolha entre os clínicos é o valproato (IAPADRE et al., 2018).

Todavia, a maioria dos tratamentos disponíveis são ineficazes para cerca de 30-40% de todos os casos de epilepsia, e em até 60-70% para os casos de ELT (LEPPIK, 1992; GOLDENBERG, 2010; LOSCHER et al., 2013; YOUNUS; REDDY, 2017). Além disso, essas drogas, especialmente quando usadas em associações, causam diversos efeitos colaterais como indução de distúrbios metabólicos, fadiga, letargia, náuseas, depressão, ganho ponderal, alterações de apetite e libido, aumento do risco de doenças cardiovasculares, problemas ósseos e sobretudo, as conhecidas alterações de sono (sedação)

e do desempenho cognitivo/aprendizado, particularmente em crianças em idade escolar (VERMEULEN; ALDENKAMP, 1995; MINTZER; MAIO; FOLEY, 2014; DE KINDEREN et al., 2014). A falta de uma eficácia completa no tratamento para boa parte dos casos, associada aos severos efeitos colaterais acima relatados, faz com que a busca por novas e mais sofisticadas abordagens terapêuticas seja relevante e imperativa.

Diante disso, considerando o ganho de função do receptor NMDA na ELT, bem como a importância de sua subunidade NR2B na formação do receptor e no desenvolvimento da doença, faz-se crescente o interesse de neurocientistas pela técnica do RNA de interferência (RNAi).

1.6. RNA DE INTERFERÊNCIA

A técnica do RNAi é definida pela entrega de pequenos RNAs que sejam complementares a RNAm específicos e de escolha para degradação. Sendo induzida a degradação do RNAm escolhido, conseqüentemente, será reduzida ou bloqueada a expressão gênica intracelular de uma dada proteína alvo que seja codificada pelo RNAm degradado (XIN et al, 2017).

No contexto dos RNAs interferentes existem os microRNAs e os siRNA. Os microRNAs são RNAs não-codificantes endógenos envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica, contendo uma fita dupla de, em média, 22 nucleotídeos. Já o siRNA apresenta fita dupla contendo entre 19 a 23 nucleotídeos, é exógeno e pode ser entregue a diferentes conjuntos celulares por mecanismos diversos. O siRNA tem grande potencial terapêutico e também no auxiliar do entendimento de muitas doenças, sobretudo, quando ocasionadas pelo ganho de função gênica (FRANÇA et al., 2010; XIN et al, 2017). A Tabela 1 traz as principais diferenças entre os tipos de RNAs interferentes.

Brevemente e no contexto do RNAi, uma nucleasse (Dicer) cliva uma das fitas da dupla de RNA para um tamanho menor (miRNA e shRNA). Esses fragmentos resultantes ou os já prontos e exógenos (siRNA) irão se associar a um complexo ribonucleico chamado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), no qual uma das fitas é trabalhada pela enzima helicase e a outra se ligará ao RNAm específico, por pareamento de bases complementares entre si. Esse RNAm, então, é degradado pela enzima RNase (Slicer), diminuindo ou impedindo a expressão da proteína alvo correspondente (Figura 1)

(AIGNER, 2007; HAMMOND, 2005; NISHIKURA, 2001; GENC; KOROGLU; GENC, 2004; FRANÇA et al., 2010).

Tabela 1 – Diferenças gerais entre siRNA e MicroRNA

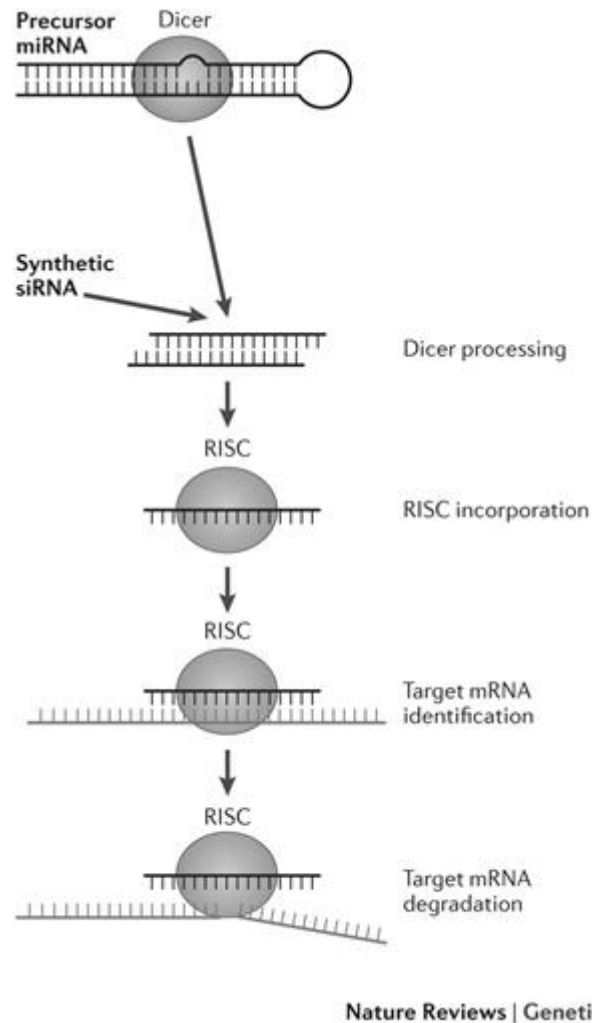
	siRNA	MicroRNA
Ocorrência	Em plantas e animais	Em plantas e animais
Configuração	Dupla hélice	Única hélice
Comprimento	19-23 pb	19-22 pb
Complementariedade (alvo)	Específico ao gene alvo	Não é exato, um único miRNA pode atingir vários mRNAs alvos
Ação	Clivagem do mRNA	Inibição da tradução do mRNA

Adaptado de MACK (2007). MicroRNA gets down to business. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 6, p.631-638.

Apesar da imensa potencialidade tecnológica e inovadora do RNAi, seja na descoberta de novas terapias ou no entendimento de diferentes desordens, o emprego clínico-prático do RNAi apresenta vários desafios a serem superados. De fato, os maiores entraves para o uso da técnica continuam sendo aqueles relacionados a correta e seletiva entrega do ativo, a definição precisa do(s) gene(s) alvo(s) para cada doença, a definição das dosagens mais seguras/eficientes e a estabilidade e permeabilidade do ativo ao ser exposto aos diferentes tecidos e no atravessar de diferentes barreiras biológicas, respectivamente (AIGNER, 2007; FRANÇA et al., 2010; ZHAO; FENG, 2015; XIN et al, 2017). Apesar disso e mais recentemente, foram desenvolvidos uma série de formulações/vetores/sistemas de entrega e/ou uso alternativo de modos e vias de administração que asseguram a melhor estabilidade e entrega seletiva do ativo, possibilitando novos avanços no emprego da técnica (AIGNER, 2007; ZHAO; FENG, 2015; XIN et al, 2017).

Uma maneira de entregar drogas diretamente no SNC em modelos animais é por meio da cirurgia estereotáxica. Ela permite a entrega de drogas em regiões específicas do cérebro, bem como economia na quantidade utilizada do ativo. Devido a sua alta eficiência, essa via é muito utilizada para administração de RNAs no SNC. No entanto, a cirurgia estereotáxica é muito demorada e trabalhosa, depende da experiência do operador e demanda cuidados pós-cirúrgicos, como aplicação antibióticos para prevenir infecções e de analgésicos para o amenizar da dor. Além disso, essa cirurgia reduz a vida média do animal, o que dificulta o trabalho em testes crônicos, bem como por ser invasiva, diminui seu interesse translacional (GARDINER; TOTH, 1999; MALHOTARA et al., 2013).

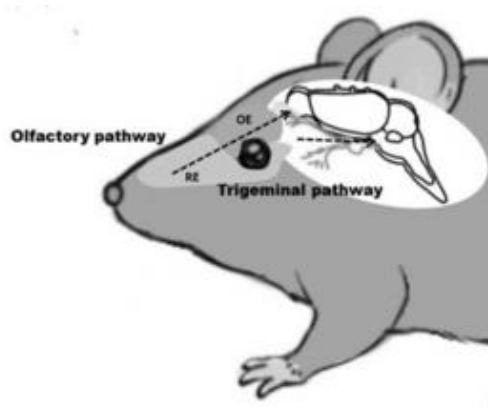
Figura 1 - Mecanismo de ação do siRNA



Adaptado de Wittrup e Lieberman (2015). Mechanism of gene knockdown by siRNAs **Nature Reviews**, v. 16, n. 9, p.543-552.

Em contrapartida a essa estratégia, a via intranasal tem possibilitado por meio menos ou quase nada invasivo, a entrega de drogas e correlatos diretamente no SNC, de maneira efetiva e rápida. Além disso, essa via, quando comparada a algumas outras vias sistêmicas, evita o metabolismo de primeira passagem que ocorre sobretudo no fígado e pode inativar parte ou o todo do ativo de interesse. A cavidade nasal é dividida em três principais áreas, região olfativa, região respiratória e vestíbulo nasal, sendo a primeira a mais profunda e a que viabiliza o transporte da droga para o SNC, sendo esta a utilizada para este propósito (WESTIN, 2007; MALHOTARA et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2- Cavidade nasal de ratos



Adaptado de Gänger S e Schindowski K. (2018). Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. **Pharmaceutics**, v. 10, p.116-144

No entanto, complicadores para esta via também existem, como o muco nasal, viscoso e rico em diferentes enzimas proteolíticas, e a membrana aracnoide, que serve de barreira física entre o líquido cérebro espinhal olfatório e o espaço subjacente ao muco. De modo geral, o tamanho e a natureza do ativo são fundamentais na passagem seletiva através de barreiras biológicas (MALHOTARA et al., 2013).

Entretanto, a tecnologia aparece novamente para o contorno total ou ao menos parcial deste problema. Atualmente, várias formulações têm aperfeiçoado o transporte de drogas, inclusive de siRNAs para o SNC. Um exemplo disso é o uso de sistemas nanoparticulados de transfecção do RNAi, que tem ganhado grande atenção como veículos eficientes na entrega de drogas e correlatos para o SNC. As nanopartículas podem ser dispersas ou sólidas, com tamanhos entre 10-1000 nm (NAGAL; SINGLA, 2013; XIN et al, 2017). Uma das vantagens desse sistema de transfecção é a proteção das moléculas de RNAi, evitando a degradação enzimática e o reconhecimento imunológico, e principalmente, aumento da eficiência de transportar o RNAi pela membrana celular e através da barreira hematoencefálica e outras barreiras biológicas (XIN et al, 2017). Assim, os sistemas nanoparticulados de transfecção tem potencializado o funcionamento dos RNAi(s) e feito a técnica avançar de maneira destacada.

Um estudo utilizou a técnica do siRNA direcionado a subunidade NR2B do receptor NMDA na avaliação da nocicepção em ratos induzidos por formalina, isso resultou no

silenciamento do gene na região da medula espinhal desses animais no sétimo dia do tratamento com o siRNA-NR2B, este trabalho mostra a viabilidade do silenciamento da subunidade NR2B utilizando a técnica do RNAi (TAN et al., 2005).

Além disso, atualmente nos EUA existem alguns medicamentos aprovados pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) contra a hipercolesterolemia familiar e um antiviral baseados na estratégia do RNAi, o que mostra os grandes avanços neste setor (MAGEN; HORNSTEIN, 2014).

Considerando os avanços supracitados, a inovação envolvida na temática do RNAi e a importância da epilepsia que afeta milhões de pessoas no mundo, é conveniente notarmos que a busca por novas abordagens terapêuticas que envolvam estas entidades seja interessante. Isto é particularmente verdadeiro quando consideramos que os fármacos antiepilépticos atuais são ineficientes para cerca de 30-40% de todos os casos de epilepsia, e em até 60-70% nos casos de ELT. Considerando o ganho de função do receptor NMDA nas fases mais tardias do SE e ao longo do desenvolvimento da ELT, bem como a importância de sua subunidade NR2B (sítio ligante para o glutamato) para o funcionamento do receptor, é natural supormos que o seu potencial silenciamento possa ser de valia: tanto no melhor entendimento da ELT e, do próprio modelo de pilocarpina, quanto para o potencial desenvolver de novas estratégias terapêuticas baseadas na Biotecnologia e de grande interesse médico-farmacêutico no futuro.

2. OBJETIVO

Promover e avaliar o efeito do silenciamento da subunidade NR2B nos receptores glutamatérgicos NMDA, por meio da utilização da técnica de siRNA, no modelo animal da pilocarpina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar quanto a dose, tempo de exposição e método/dispositivo de administração o silenciamento da subunidade NR2B em animais livres de SE e tratados com siRNA via intranasal (ensaios pilotos);
- Avaliar o potencial silenciamento da subunidade NR2B em modelos animais submetidos ao modelo de pilocarpina (SE) por RT-PCR e Western Blotting (WB);
- Analisar a potencial atividade anticonvulsivante do tratamento com siRNA-nanopartícula intranasal, por meio da latência e proteção contra crises epiléticas, em animais modelos de pilocarpina (SE).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. FÁRMACOS

Os fármacos mais importantes foram: cetamina (Ketalar – Parke Davis Warner Lambert) e xilazina (Hertape Calier), Cloridrato de pilocarpina (Sigma-Aldrich), brometo de metil escopolamina (Sigma Aldrich), tiopental sódico (Tiopentax® - Cristália). Reagentes e materiais de outras naturezas serão descritos ao longo de cada secção no descritivo de métodos.

3.2. PREPARAÇÃO DO siRNA DIRIGIDO PARA SUBUNIDADE NR2B

A sequência de siRNA destinada para o RNAm codificante da subunidade NR2B foi sintetizada pela Sigma-Aldrich (USA) e selecionada de acordo com um maior escore de pontuação para modulação de expressão gênica, o que se encontra validado *in silico* pelo referido fabricante. O duplex de 19 nucleotídeos voltado ao gene Grin2B/NR2B está apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Sequência do siRNA dirigido para a subunidade NR2B

Gene	Direção	siRNA
NR2B	Fwd.	F'-CUCAGAAGAAGAAUCGGAA-3'
	Rev.	R'-UCCGAUUCUUCUUCUGAG-3'

O sistema de transfecção escolhido foi o kit de transfecção *in vivo* NANOPARTICLE - cat # 5031 da Altogen Biosystems – USA, baseado no uso de nanopartículas bases positivas contendo ferro como íon de coordenação. Brevemente, o preparo da solução de transfecção com o siRNA foi realizado de acordo com o manual do fabricante, prevendo entrega eficiente de siRNA para o SNC. Antes do uso, o oligonucleotídeo de RNA liofilizado foi ressuscitado a 100 µM em água isenta de RNase e estéril (Sigma-Adrich), sendo em seguida conjugado com sistema de transfecção. Resumidamente, foi adicionado a um tubo de microcentrífuga o siRNA e o reagente de transfecção, permanecendo a mistura em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida foi adicionado o *Enhancer* (intensificador da reação) e, o complexo reacional foi agitado em vórtex, seguido de repouso por 5 min em temperatura ambiente. O volume da solução foi completado com solução de salina – glicose 5%.

3.3. ANIMAIS

Esse trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto sob o número definitivo: 10/2015 (Anexo A). Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram estabelecidos conforme as diretrizes para o uso de animais em pesquisa segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e as normas do *American Guidelines for Animal Care*, evitando o uso irracional de animais.

Os animais foram obtidos junto à empresa ANILAB (Paulínia-SP), ficando os mesmos alojados no biotério da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Foram utilizados ratos Wistar machos (200-230 g) acondicionados em grupos de 5 animais por caixa, e mantidos no biotério com manutenção de ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade (55%) controladas e alimentação *ad libitum*.

3.4. ENSAIOS PILOTOS: PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS POR VIA INTRANASAL: DEFINIÇÃO DA DOSE, TEMPO DE EXPOSIÇÃO E DISPOSITIVO/MÉTODO DE ADMINISTRAÇÃO DO SIRNA EM ANIMAIS LIVRES DE SE

Nos ensaios pilotos, a dose única utilizada para se obter o silenciamento gênico da subunidade NR2B foi a de $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ do siRNA conjugado ao sistema de transfecção seguindo a referência inicial de TAN et al., 2005. Os animais foram divididos em grupos controle *naïve* (sem qualquer tratamento) e grupos experimentais tratados com $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ do siRNA/sistema de transfecção por via intranasal ($n = 5/\text{grupo}$). Para fins de comparação/padronização da eficácia do método de administração intranasal, dois grupos de animais foram tratados com siRNA/sistema de transfecção e eutanasiados após 24 horas e comparados ao grupo controle. Neste caso, os animais foram anestesiados via i.p. com cloridrato de cetamina a 10% e xilazina nas doses de 10 mg/Kg e 8 mg/Kg, respectivamente. Em seguida, estes foram posicionados em decúbito dorsal, com a cabeça levemente inclinada. Para administração do RNAi/sistema de transfecção segundo o primeiro método, foi utilizada uma micropipeta acoplada de ponteira de $10 \mu\text{L}$ posicionada na narina do animal. Foi administrado $5 \mu\text{L}$ em cada narina com intervalo de 2-3 minutos até

atingir o volume final de 50 µL. Para o segundo método de administração, a administração do RNAi/sistema de transfecção foi feita usando seringa Hamilton de 10 µL conectada a um tubo de polietileno. Esse tubo foi introduzido na narina do animal (aproximadamente 1,2 mm) e através do mesmo foi administrado 10 µL do RNAi/sistema de transfecção em cada narina, em intervalos de 2-3 minutos, até que o volume final de 50 µL fosse atingido. A eficácia de silenciamento dos dois dispositivos/métodos de administração intranasal foi comparada entre os grupos experimentais e grupo controle por RT-PCR.

3.5. INDUÇÃO DO *STATUS EPILEPTICUS* (SE) E ANALISE COMPORTAMENTAL DAS CRISES/DESEMPENHO ANTICONVULSIVANTE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO TRATAMENTO siRNA

Para critério de definição do SE foi utilizada a tabela de classificação de crises límbicas segundo Racine, (1972) (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação de Crises Convulsivas

Classe	Comportamentos
1	Movimentos orofaciais, piscar de olhos
2	Mioclona de cabeça e/ou movimentos clônicos faciais severos
3	Mioclona dos membros anteriores
4	Convulsões clônicas dos membros anteriores com elevação
5	Convulsões tônico-clônicas generalizadas associadas à perda do controle postural

Modificado de Racine, 1972

Neste trabalho, pequenas alterações foram feitas no protocolo de indução de SE na medida em que os resultados práticos foram sendo desenvolvidos, e se mostrando carentes de ajustes para os ensaios de RT-PCR ou Western Blotting (WB).

Com efeito, para os ensaios de RT-PCR, os animais dos diferentes grupos receberam dose i.p de brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg dissolvido em salina estéril) para inibir a ação colinérgica da pilocarpina em nível periférico. Após 30 minutos, os animais foram tratados com pilocarpina (320 mg/Kg; i.p.). Depois de três horas após o início das crises, o SE foi interrompido pela administração do tiopental sódico (30 mg/kg i.p.) a fim de minimizar a gravidade das crises e, pois, a taxa de mortalidade dos animais. Para os

experimentos de WB, nova parcela de animais e grupos foram submetidos ao SE, contudo, pequenas alterações na indução deste evento seguiram o trabalho de Maio et al. 2011, de modo que a dose de escopolamina subiu para 2 mg/kg (i.p) e a da pilocarpina para 360 mg/kg. Para este caso, o tempo total de SE foi reduzido para 90 minutos, e o tiopental sódico foi substituído pelo diazepam na dose de 3mg/kg para fins de interrupção do SE.

Tanto para os experimentos de RT-PCR quanto para os experimentos de WB, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6-7): naive (sem SE), controle veículo/sistema de transfecção (com SE) e grupo tratado com sistema de transfecção/siRNA-NR2B (com SE). Os diferentes animais foram submetidos ao modelo de pilocarpina com indução do SE 24 horas após os tratamentos, sendo então realizada uma avaliação do desempenho anticonvulsivante do tratamento em comparação ao grupo controle e ao longo do tempo de desenvolvimento do SE (90 min ou 3 hs). Neste caso, foram registradas a latência para a primeira crise e o número de animais que apresentaram crises na presença e ausência do tratamento intranasal com siRNA nas doses de 5 ou 25 µg/µL de siRNA/sistema de transfecção.

3.6. RT-PCR: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO RNAm CODIFICANTE PARA SUBUNIDADE NR2B EM ANIMAIS LIVRES DE SE OU SUBMETIDOS AO SE PELO MODELO DA PILOCARPINA

3.6.1 EXTRAÇÃO DOS RNAs

Inicialmente os animais dos diferentes grupos foram decapitados e o hipocampo e córtex foram rapidamente dissecados em uma placa de Petri fixada em gelo, lavados com solução salina estéril gelada para remoção do sangue, pesados e armazenados a -70°C. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em Trizol (1 ml para cada 50-100mg de tecido), e após 15 minutos, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (para cada 1ml de trizol), sendo então as amostras mantidas em repouso por 5 minutos á temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 15 minutos a 12000 g (4°C), sendo a fase aquosa coletada e transferida para um novo tubo, onde novamente foi adicionado 0.5 ml trizol e o processo repetido.

Subsequentemente, foram adicionados 0,9 ml de 2-propanol, seguido de repouso da amostra por 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12000 g (4°C). O sobrenadante foi descartado e precipitado constituído de RNA

ressuspendido em 1,5 ml de etanol 75%, homogeneizado e centrifugado por 5 minutos á 7500g (4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado mantido em repouso para evaporação do etanol, seguindo-se da ressuspensão do mesmo em 30µL de água DEPC.

A concentração de RNA extraído das amostras foi determinada por espectrofotometria UV (260 nm) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1% sob condições de voltagem constante (90 V) (45 minutos), e de acordo com protocolo amplamente conhecido.

3.6.2 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RNA POR RT-PCR

Inicialmente, foi realizado a padronização dos *primers* (senso e anti-senso) para determinação das concentrações ideais da reação de RT-PCR, utilizando-se de primer específico para NR2B e para o gene de referência GAPDH (Tabela 3). As concentrações analisadas foram de 70, 100, 150 e 200 nM e as amostras do cDNA foram investigadas em 6 diluições diferentes, partindo-se da concentração original de 20 ng (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64). Após a padronização, foi realizada então a síntese de cDNA das amostras partindo-se da concentração de 20 ng do RNA total. Para cada síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher™): 10x RT Buffer (1µL), 25x dNTP Mix (0,4µL), 10x RT Random Primers (1µL), MultiScribe Reverse Transcriptase (0,5µL), Nuclease-free H₂O (2,1µL) totalizando 5 µL do Mix mais 5 µL da amostra 20 ng diluída (1:4) de modo a se completar o volume final de 10µL para cada reação. A síntese foi realizada no termociclador sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

A RT-PCR foi realizada por SYBR® Green JumpStart Taq ReadyMix for RT-PCR (#S4438 Sigma Aldrich – EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em triplicata, contendo Jump Start Taq Ready Mix, Reference Dye, primers, produto da reação RT (cDNA) e água livre de nuclease. Em seguida as amostras foram levadas ao Termociclador MXPRO 3005 (Stratagene™) e submetidas às seguintes condições de ciclagem: 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, com volume final de 25µL.

Tabela 4 - “Primers” utilizados para o RT-PCR

Gene	Direção	“Primers”	Temperatura de anelamento	Referência
NR2B	Fwd.	F'-AAC CCT CGT GGC CAG CA-3'	64.8°C	Tan et al., 2005
	Rev.	R'-GGT GGA CAG ATG CGG GAA-3'	65.7°C	
GADPH	Fwd.	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTAG-3'	62.6°C	Horii et al., 2002
	Rev.	5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTTC-3'	63.0°C	

3.7. WESTERN BLOTTING: ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCAPINA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO TRATAMENTO INTRANASAL COM siRNA

3.7.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Primeiramente as amostras dos hipocampos e córtices dos diferentes grupos animais submetidos ao SE foram homogeneizadas. Para isso, as amostras anteriormente colhidas segundo descrito acima, foram retiradas do freezer -70°C e preservadas em gelo durante todo o processo. Em seguida, foi adicionado a cada amostra o tampão RIPA (0,2 mg/μL) contendo inibidor de proteases. Os tecidos foram macerados e homogeneizados nessa mesma solução durante 2 horas sobre branda agitação. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas (16000 g, 20 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e novamente armazenado em freezer -70°C.

3.7.2. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Para quantificação das proteínas foi utilizado o método colorimétrico de Bradford. Uma curva padrão foi feita a partir da diluição seriada de uma solução padrão de albumina soro bovina (BSA) a 2% diluída no mesmo tampão de lise utilizado para as amostras. A curva foi composta por 7 concentrações de BSA: 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.250, 0.125 mg/mL. Em seguida a curva padrão, uma amostra-branco (0 mg/ml de proteína) e as amostras experimentais foram pipetadas em triplicata em uma microplaca de 96 poços (5μL/poço). 250 μL do reagente de Bradford (Bio-rad) foram adicionados a cada poço. Prosseguiu-se com uma incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo em seguida a medida da absorbância tomada em uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

3.7.3. ELETROFORESE

A partir da quantificação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, as amostras foram diluídas em água Milli-Q, de modo a se obter uma concentração final de 1µg de proteína/µL. Após o preparo, as amostras foram colocadas em banho seco por 5 minutos (70°C). Em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida (Bis-tris 4-12%); as amostras foram carregadas no gel de poliacrilamida (4-10% Bis-Tris), juntamente com o padrão de peso molecular (ECL rainbow - GE Healthcare Life Sciences). A corrida do gel se deu a uma voltagem de 80V por três horas, sendo esta sempre acompanhada por corrida paralela feita na canaleta do padrão de peso molecular.

3.7.4. TRANSFERÊNCIA

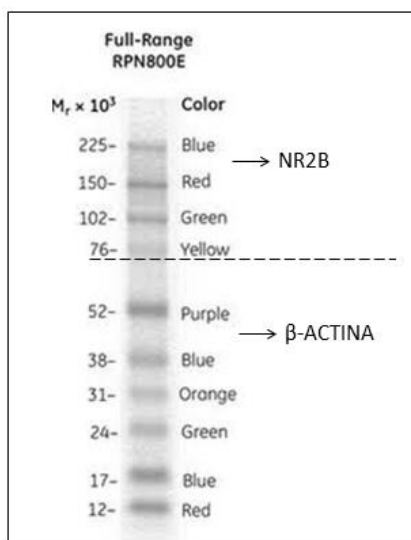
Após a eletroforese, iniciou-se o processo de transferência das proteínas separadas no gel para uma membrana de nitrocelulose de 45 µm (GE Healthcare Life science). Em uma cuba de transferência, foi montado um “sanduíche” onde o gel foi colocado aderido à membrana, estando esta última posicionada ao pólo positivo da cuba. A transferência se deu pela aplicação de um pulso elétrico (100V) que se estendeu pelo período de uma hora. A eficiência da transferência foi verificada com base no marcador de peso molecular ECL.

3.7.5. BLOQUEIO E INCUBAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Confirmada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em uma solução com salina tris-tamponada/tween 20 (TBST 0.1%) e leite desnatado em pó 5% por uma hora e meia, com a finalidade de evitar ligações inespecíficas do anticorpo na membrana. Ao término do bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes em TBST 0.1% e mantida sob leve agitação por 5 minutos, sendo o processo repetido por cinco vezes. A membrana depois de lavada foi dividida em duas partes na região do marcador amarelo (Figura 2). A parte superior foi incubada com o anticorpo primário dirigido contra a subunidade NR2B (NMDAε2 Antibody (A-8)-prod # SC-365597 – Santa Cruz Biotechnology – diluição 1:100) *overnight* à 4° C. A parte inferior foi reservada para a análise do controle de carregamento das amostras descrito a seguir. Após a incubação com

o anticorpo primário, foi feita outra lavagem em TBST 0.1%, como descrito anteriormente, e então a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG-BP-HRP – SC-516102 – Santa Cruz Biotechnology – diluição 1:1000) por uma hora. Em seguida foi feita uma nova lavagem e prosseguiu-se com a detecção das proteínas.

Figura 3 – Corte da Membrana entre a subunidade NR2B e a β -actina



Adaptado do *data sheet* do marcador de peso molecular ECL

3.7.6 NORMALIZAÇÃO – CONTROLE DE CARREGAMENTO DAS AMOSTRAS NO GEL

Depois de feita a revelação da membrana com o anticorpo de interesse, foi realizado o controle do carregamento das amostras no gel, a fim de detectar falhas de pipetagem que pudessem interferir na análise. Para tanto, foi utilizado o anticorpo para β -actina, proteína estrutural que deve ser encontrada nos mesmos níveis em todas as amostras. Assim, a membrana foi incubada *overnight* a 4° C com o anticorpo anti- β actina (Anti-Actin antibody, clone c4 – cat. # MAB1501 – Merck Millipore – diluição 1:100000). Ao término da incubação, realizou-se outra lavagem como descrito anteriormente e, então prosseguiu-se com a incubação do anticorpo secundário (anti-mouse IgG-HRP – sc-2314 – Santa Cruz Biotechnology - diluição 1:1000) por uma hora. Por fim, uma última lavagem foi realizada e o processo de revelação da membrana pelo método de quimioluminescência seguiu-se conforme descrito abaixo.

3.7.7. REVELAÇÃO - DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR NMDA

A membrana foi incubada, protegida da luz, por 5 minutos com o reagente de quimioluminescência ECL (Amersham ECL Prime WB detection reagent – GE® Healthcare Life Sciences). Imediatamente após a incubação, foi removido o excesso do reagente ECL e seguiu-se com a leitura da membrana no equipamento ImageQuant LAS 500 (Figura 2), tendo sido o tempo de exposição ajustado para um minuto.

Após reveladas por quimioluminescência, as imagens geradas pelo equipamento ImageQuant LAS 500 foram processadas utilizando o programa ImageJ. A quantificação da subunidade NR2B foi feita por análise densitométrica, ou seja, pela mensuração da intensidade da banda, sendo calculada para cada amostra a razão de NR2B/ β -actina.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Quando conveniente, o pós-teste de comparações múltiplas também foi utilizado. As análises estatísticas e a construção de gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, versão 5.03, USA).

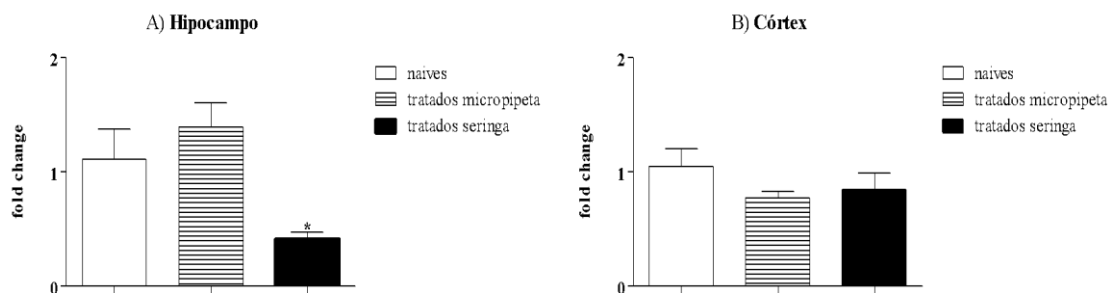
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização dos *primers* (senso e anti-senso) para determinação das concentrações ideais da reação de RT-PCR foi realizada por meio do teste das concentrações dos primers. As concentrações analisadas foram de 70, 100, 150 e 200 nM e as amostras do cDNA foram investigadas em 6 diluições diferentes, partindo-se da concentração original de 20 ng (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64). Dentre as diluições averiguadas, a diluição 1:4 foi a escolhida com base na melhor eficiência de amplificação. Seguindo tal parâmetro, foi atingida a eficiência de amplificação de 94% para o GAPDH (100 nM, gene constitutivo) e 103% para o NR2B (100 nM, gene de interesse). Este resultado é fundamental para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos a seguir.

Os ensaios pilotos para definição/checagem de dose sugerida, do tempo de exposição ao siRNA e do dispositivo/método para administração intranasal de siRNA transcorreram com sucesso.

Ao menos nestes ensaios preliminares, a dose referência de siRNA, segundo TAN et. al 2005, e o tempo de exposição de 24 horas ao siRNA foram confirmados como sendo eficientes para silenciamento hipocampal da subunidade NR2B quando utilizando o método da seringa de Hamilton acoplada ao tubo de polietileno (Figura 4A). De fato, quando analisamos os animais tratados pelo método da seringa de Hamilton observamos uma redução na expressão hipocampal de NR2B nas ordens de 62,7% e 70% quando comparados aos grupos *naive* e tratados com micropipeta respectivamente [[F(2,14)=6.448, p=0.0125] (Figura 4A). No córtex não foi observado diferença de expressão entre os grupos analisados [[F(2,14)=1,282 p=0,3130] (Figura 4B), tendo em vista se esperar uma entrega seletiva do siRNA para o hipocampo através do uso do sistema de transfecção. A importância desta seletividade será discutida a frente e, é efetivamente, um resultado positivo para o propósito potencialmente translacional e futuro deste trabalho.

Figura 4 - Diferença nos tratamentos siRNA-NR2B via intranasal usando a micropipeta/ponteira *versus* seringa de Hamilton acoplada ao tubo de polietileno, sendo gráfico (A) hipocampo e gráfico (B) córtex por RT-PCR.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Newmans-Keuls, sendo* para diferença estatística entre os grupos de animais tratados (com análise de diferentes métodos da via intranasal) e o grupo naives (sem tratamento) e animais tratados com a micropipeta para $p < 0,05$.

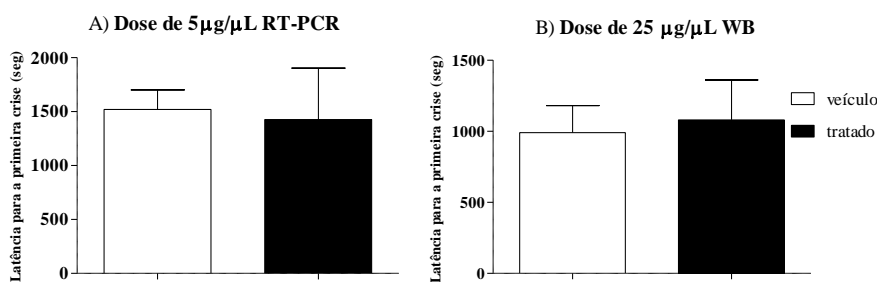
A cavidade nasal é dividida principalmente em vestíbulo nasal, região respiratória e região olfativa. Em termos de importância para administração intranasal destacam-se as duas últimas porções, a primeira por entregar a droga ou correlato terapêutico de maneira sistêmica (sangue) e, a segunda por possibilitar a entrega da droga diretamente ao SNC (WESTIN, 2007). A região olfativa permite a entrega da droga ao SNC através de duas vias (LIN et al., 2009; THORNE et al, 2004): células nervosas olfatórias para o bulbo olfatório e deste local para o cérebro ou através da mucosa olfativa direto para o fluido cérebro espinhal, bulbos olfativos e/ou cérebro (WESTIN, 2007). Inúmeros trabalhos demonstraram a viabilidade da via intranasal na entrega de drogas e correlatos terapêuticos nas áreas límbicas cerebrais, incluindo o hipocampo, locais estes onde se circunscrevem ou se delimitam em maior grau as lesões características da ELT (CHEN et al.1998; THORNE et al. (2004); RODRIGUEZ et al. 2017). Neste contexto, o uso da técnica micropipeta/ponteira permite acesso a apenas as regiões mais baixas da narina animal, enquanto o uso da seringa Hamilton acoplada ao tubo de polietileno aquelas mais altas e profundas. Isto implica que o uso da micropipeta possa dispensar mais material (siRNA) para o sangue, enquanto a técnica da seringa mais diretamente para o SNC. Tendo em vista a liberação sistêmica enfrentar maior número de barreiras fisiológicas (Barreira Hematoencefálica), isto pode explicar o sucesso de silenciamento para NR2B obtido pelo dispositivo/método da seringa em contraponto á técnica da micropipeta. Deve ser lembrando que o primeiro método (seringa Hamilton) atinge regiões mais profundas da narina, de modo a facilitar a entrega e acesso de material terapêutico diretamente ao SNC.

Tais resultados, apesar de algumas limitações de predição, foram importantes para o padronizar da técnica de administração intranasal no laboratório, sendo útil no seu avançar

tecnológico. Ademais, tais resultados foram importantes para o abalizar dos experimentos seguintes deste trabalho. De fato, a totalidade dos experimentos mostrados a seguir foram feitos pelo uso da administração intranasal prevendo o uso da técnica padronizada da seringa acoplada ao tubo de polietileno. Apesar disso, ajustes de outros parâmetros, como a dose de siRNA tiveram de ser empenhados.

Além da avaliação de expressão nos animais submetidos ao SE, também foram analisados o comportamento dos animais durante as crises e o potencial efeito anticonvulsivante do tratamento em questão. O período de latência para início da primeira crise foi avaliado nos grupos veículo e tratado com siRNA-NR2B nas doses de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (parcelas de diferentes grupos animais que serviram ao RT-PCR) e 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (parcelas de diferentes grupos animais que serviram ao WB). Quando se analisou o período de latência para início das crises tônico-clônicas (score 4/5) em animais submetidos ao modelo de pilocarpina, não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma das doses de siRNA avaliadas em relação ao grupo controle [T(8)=0.2155, p=0.8347] (Figura 5A) e [T(8)=0.2754, p=0.7900] (Figura 5B).

Figura 5 - Gráfico de latência para primeira crise de score 4/5 em segundos no modelo animal de pilocarpina.

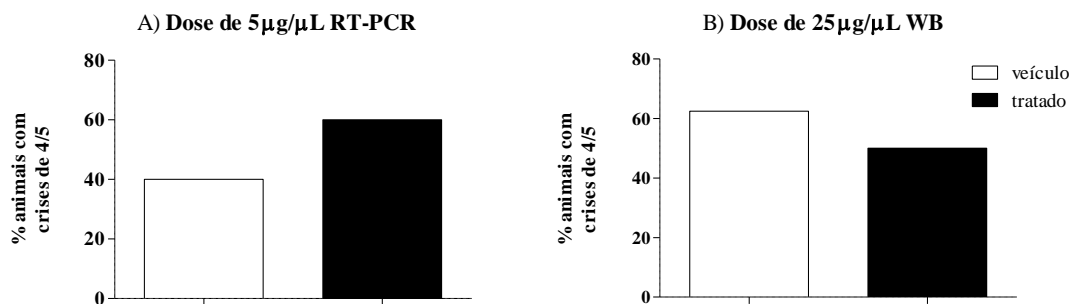


As barras apresentam a média \pm desvio padrão do tempo em segundos para o início da primeira crise de score 4/5 para cada grupo. Veículo = animais tratados com sistema de transfecção submetidos ao modelo de pilocarpina. Tratado = animais tratados com siRNA-NR2B e submetidos ao modelo de pilocarpina. Os dados foram analisados pelo teste T - não paramétrico, com p<0,05.

Também a avaliação de proteção dos animais contra as crises foi analisada entre os grupos controle/veículo e tratados com siRNA-NR2B após 24 horas do tratamento nas doses de 5 μg e 25 μg do siRNA-NR2B. De fato, foi contado o número de animais que não alcançaram crises com score 4/5 individualmente em cada um dos grupos, todos durante o

tempo de observação/desenvolvimento do SE. Na dose de 5 μg do siRNA – NR2B, ao invés de se observar uma proteção, foi visto um ligeiro aumento no número de animais com crises de score 4/5, mostrando assim que a dose de 5 μg não foi suficiente para proteger os animais contra essas convulsões (Figura 6A). No entanto, nos animais tratados na dose de 25 μg do siRNA-NR2B notou-se uma proteção de 12,5% quanto a ocorrência de crises, quando comparados ao grupo de animais veículo, mostrando proteção dos animais pelo tratamento com siRNA, ainda que discretamente, contra as crises mais severas (score 4/5) (Figura 6B).

Figura 6 - Gráfico dos animais que não obtiveram crises de score 4/5 no modelo animal de pilocarpina



As barras apresentam a porcentagem de animais que não apresentaram crises de score 4/5 sendo 100% o número total de animais de cada grupo. Veículo = animais tratados com sistema de transfecção submetidos ao modelo de pilocarpina. Tratado = animais tratados com siRNA-NR2B e submetidos ao modelo de pilocarpina.

Ainda que o tratamento com siRNA-NR2B intranasal tenha oferecido apenas uma discreta proteção contra as crises, isso não descarta seu potencial efeito neuroprotetor como um todo. Isto é verdadeiro, sobretudo quando considerados os desdobramentos das manifestações clínicas mais tardias do SE e mesmo aqueles em nível celular, significando menor morte neuronal nas áreas CA1, CA3 e GD do hipocampo, bem como o evitar dos processos inflamatórios mediados pela gliose reativa, bastante comuns nos eventos de lesão da ELT (ZHANG et al., 2010). Novos experimentos, que compreendam a análise do nível de citocinas pró-inflamatórias (sobretudo, TNF α e Il-6) nos hipocampos de animais controles e experimentais, bem como a análise da morte neuronal (Coloração de Nissl ou imunohistoquímica por NeuN) e gliose reativa (Imunohistoquímica por GFAP) nas diferentes áreas hipocampais são fundamentais para o elucidar definitivo deste mister. Isto também se aplica para as análises comportamentais dos eventos de crises em estados mais

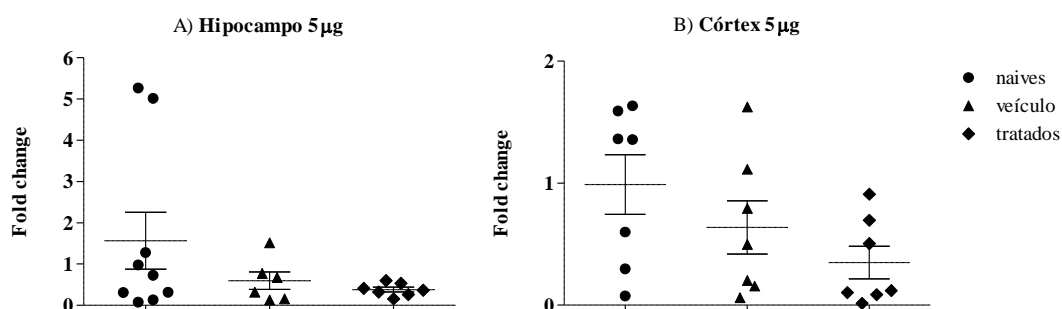
tardios da epileptogênese, bem como o uso de ferramentas mais sofisticadas para análises de crises, como o monitoramento vídeo-eletroencefalográfico.

Condizente com esta discussão está o trabalho de Chen et al. (2007). Este avaliou por vídeo EEG a ação anticonvulsivante do ifenprodil (inibidor do receptor NMDA, especificamente das subunidades NR1 e NR2B) em animais submetidos ao modelo de pilocarpina. Seus dados resultaram em nenhum efeito antiepilético significativo. Entretanto, em suas análises histológicas por coloração de Fluoro-Jade B e Nissl foi possível testemunhar a redução da morte neuronal induzida pelo SE nas regiões do hipocampo CA1 e CA3 nos animais tratados pelo inibidor do NR2B. Isto implica em claro efeito neuroprotetor, que nem sempre está vinculado nítida e temporalmente com a proteção das crises enquanto manifestações clínicas de um quadro patológico bastante complexo, tal qual o quadro de ELT. Além disso, Chen et al. (2007) sugerem que o desempenho antiepilético do antagonista do NR2B é dissociado do seu efeito neuroprotetor, tendo em vista que o inibidor de NMDA utilizado em seu trabalho tenha apresentado desempenho anticonvulsivante nulo e efeito neuroprotetor acentuado.

Além da avaliação do desempenho anticonvulsivante do tratamento do siRNA-NR2B em comparação ao grupo controle, foi realizado uma análise de RT-PCR para avaliar a expressão do gene da subunidade NR2B nos diferentes grupos de animais submetidos ao SE pelo modelo da pilocarpina. Para a dose de 5µg/µl de siRNA (dose única para testes de RT-PCR), os resultados mostram que o tratamento não foi efetivo na promoção significativa do silenciamento da subunidade NR2B, tanto na região do córtex quanto na do hipocampo, de maior interesse [F(3,25)=2.102, p=0.1291] (Figura 7B) e [F(3,28)=1.597, p=0.2151] (Figura 7A).

A ausência do silenciamento da subunidade NR2B na dose de 5µg/µl em animais submetidos ao modelo de pilocarpina sugere que a severidade do SE, bem como seus graves desdobramentos morfológicos e clínicos, dificultou a reprodução do silenciamento ocorrido nos ensaios pilotos em animais saudáveis obtidos pelo uso desta mesma dose. Isto também pode explicar a ausência da ação anticonvulsivante nesses animais, conforme mostrado acima e nos mesmos termos/dose.

Figura 7 - Expressão relativa do gene NR2B na dose de 5µg/µl normalizado com GAPDH, relativo ao grupo Controle por RT-PCR.



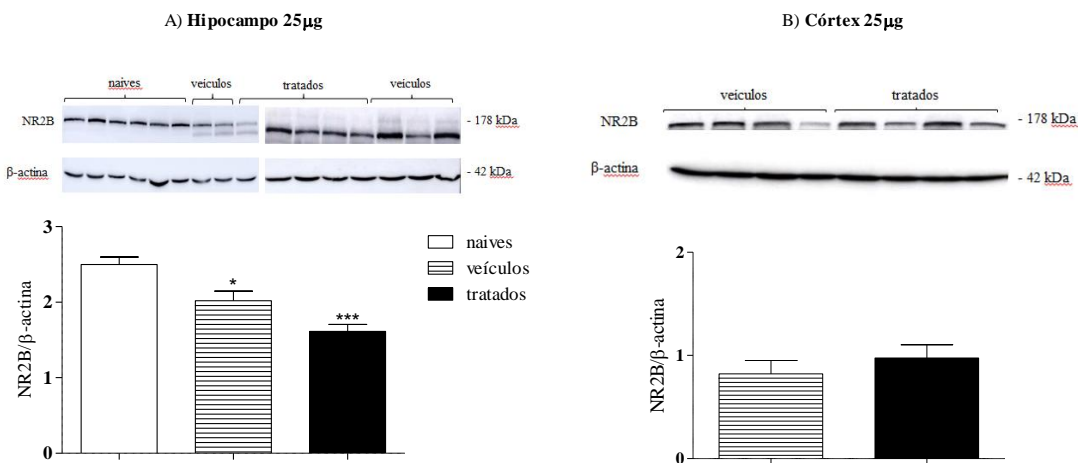
As barras mostram a média \pm desvio padrão do fold change ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para cada grupo. Naive = animais saudáveis. Veículo = animais tratados com sistema de transfecção submetidos ao modelo de pilocarpina. Tratado = animais tratados com siRNA-NR2B e submetidos ao modelo de pilocarpina. A análise estatística foi feita utilizando-se uma ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas Newmans-Keuls para $p < 0,05$.

Outro problema encontrado foi a variação de expressão gênica nos hipocampus e córtices em animais pertencentes a um mesmo grupo. O espalhamento dos dados pode ter prejudicado o aparecimento de diferenças significativas importantes entre estes grupos. Esta variação pode ser explicada pela ação ineficiente do tiopental em minimizar/abolir as crises ao término da indução do SE. Além disso, a indução do SE pode ter sido prejudicada por mecanismos de defesa inerentes aos animais, o que minimiza o seu alcance a depender de como fora induzido. Parte destes mecanismos pode ser exemplificado por rearranjos celulares visando a homeostase da atividade neuronal do animal, bem como a endocitose de receptores NMDA, super-expressão de receptores inibitórios, liberação aumentada de neurotransmissores inibitórios, maior degradação de glutamato na fenda sináptica, entre outros. Condizente com esta explicação e, ainda pela falta de efetividade da dose de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, reajustes no protocolo de indução do SE, bem como o aumento da dose de siRNA para 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ foram empenhados para nova parcela de grupos de animais visando nova análise de desempenho anticonvulsivante e WB. Algumas destas mudanças na indução do protocolo de SE, como a troca do tiopental pelo diazepam, estão amparadas pelos seguintes trabalhos CHEN et al. 2007; GARZON, 2008; MAIO et al. 2011; AMORIN et al. 2017; YANG et al. 2018.

Oportunamente, tais ajustes e correções de estratégias do trabalho surtiram efeito. De fato, o silenciamento da subunidade NR2B pelo siRNA foi demonstrado por meio do WB.

A avaliação do WB dos hipocampus dos animais tratados pelo siRNA-NR2B na dose de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando comparados aos seus grupos veículos evidenciou um silenciamento de 40,5% para a subunidade em estudo, segundo o teste de ANOVA-one way [F(2,15)=15.01, p=0.0004] (Figura 8A). Em contrapartida, na estrutura do córtex não foi observado diferença entre esses dois grupos [T(7)=0.8242, p<0.4317] (Figura 8B), indicando que o tratamento do siRNA-NR2B é específico a estrutura do hipocampo, sendo este último dado de grande importância translacional.

Figura 8 – Expressão relativa da proteína da subunidade NR2B normalizada pela β -actina, relativo ao grupo veículo por Western-blot.



As barras mostram a média \pm desvio padrão do fold change (2^{NR2B}) para cada grupo. Naive = animais sadios. Veículo = animais tratados com sistema de transfecção submetidos ao modelo de pilocarpina. Tratado = animais tratados com siRNA-NR2B e submetidos ao modelo de pilocarpina. A análise estatística do hipocampo foi feita utilizando-se uma ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas Newman-Keuls para e quando p<0,05. Os dados do córtex foram analisados pelo teste T - não paramétrico, com p<0,05.

De fato e, dada a importância dos receptores NMDA nos processos fisiológicos normais de memória e aprendizado, é imperativo que experimentos avaliando o efeito de sua supressão na epilepsia ou em outras desordens sejam acompanhados de experimentos que também avaliem o efeito desta supressão nos processos de formação da memória, afim de que um melhor balanço entre os potenciais benefícios e prejuízos do uso da técnica sejam melhor interpretados (KALEV-ZYLINSKA et al., 2009). Além disso, a seletividade de entrega do correlato terapêutico dirigido para o silenciamento de um dado gene, precisa ser investigado. Dito de outro modo é sempre necessária a checagem da chegada das drogas

ou correlatos em outras áreas cerebrais que não as vislumbradas unicamente para serem atingidas num dado arranjo experimental.

Assim e dentro do âmbito de interesses deste trabalho, áreas outras que não as áreas de esclerose hipocampal (hipocampo) devem ser imperativamente checadas para avaliação do efeito gênico repressor da técnica de RNAi. Isso é importante de modo a se ter ideia de quão seletiva ou não fora a taxa de entrega/transfecção de ativo e, pois, avaliar as consequências disso nos mais variados níveis experimentais, incluindo aqueles relacionados á memória e aprendizado discutidos acima. Diante disso, a análise de silenciamento da mesma subunidade NR2B no córtex é importante. Com base no resultado tanto de ensaios pilotos quanto naqueles de WB deste trabalho, foi possível demonstrar que a entrega do ativo siRNA se deu seletivamente para o hipocampo, tendo em vista não ter sido observado silenciamento paralelo da mesma subunidade NR2B no córtex.

Assim, o sistema de transfecção escolhido, baseado em partícula de ferro coordenado, bem como o dispositivo e via de administração (via intranasal) escolhidos foram efetivos em silenciar a subunidade NR2B seletivamente no hipocampo, área que como discutido anteriormente, centraliza boa parte das lesões celulares e alterações neuroquímicas decorrentes do SE e início, progresso e manutenção da epileptogênese. Ademais e dada a observação efetiva do silenciamento por WB, é possível dizer que o sistema de transfecção escolhido foi efetivo em proteger o siRNA da degradação enzimática, na sua solubilização/veiculação ao longo do muco nasal e no ultrapassar de barreiras biológicas, ainda que menos seletivas em comparação com a barreira hematoencefálica, como no caso da barreira aracnoide quando da passagem da droga/correlato terapêutico da cavidade nasal diretamente para o SNC.

Um dos obstáculos técnicos para que o tratamento da ELT possa ser efetivo usando a técnica do RNAi é a necessidade de redução da expressão de receptores de NMDA de modo sustentado ao longo do tempo e/ou cronicamente (HABERMAN et al., 2002). Neste contexto, o uso de vias de administração facilmente acessíveis, bem toleradas, relativamente seguras e que sejam de fácil repetição/uso contínuo, como para o caso da via intranasal, podem ser de grande valia técnica. Neste contexto, os resultados apresentados por WB ou mesmo nos ensaios pilotos ajudam a validar a via intranasal como útil no silenciamento ou mesmo modulação do receptor NMDA hipocampal, o que é desejável considerando seu ganho de função na ELT e a importância funcional de sua subunidade NR2B.

Obviamente, novos e mais robustos experimentos se fazem necessários para o maior avançar dos objetivos iniciais deste trabalho, bem como da correção de algumas de suas limitações, como por exemplo, a repetição dos experimentos de RT-PCR prevendo o uso da dose maior de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o siRNA/sistema de transfecção. No entanto e finalmente, apesar de algumas limitações quanto ao alcance dos resultados, este trabalho mostra pela primeira vez e, principalmente através dos dados de WB, o silenciamento efetivo da subunidade NR2B do receptor NMDA pelo uso da técnica de RNAi e via intranasal em animais submetidos ao SE.

Segundo Riban, Fitzsimons e During (2009), as epilepsias focais, sobretudo a ELT, parecem ser as melhores opções de pesquisa usando a técnica do RNAi no contexto das diferentes epilepsias como um todo. De fato, a ELT é muito bem estudada a partir de modelos animais que bem reproduzem a ELT em humanos, assim como a partir de amostras cirúrgicas de pacientes e estudos de neuroimagem. Isto cria um conjunto farto de informações facilmente acessíveis. Além disso, as áreas de lesões hipocâmpais são bem conhecidas, circunscritas e bem delimitadas, podendo ser acessíveis sem que outras regiões do cérebro sejam afetadas (RIBAN; FITZSIMONS; DURING, 2009). Apesar da inexistência de um gene dominante causal e da natureza multifatorial da ELT, o grande conhecimento das áreas de lesão adquirido ao longo do tempo tem elencado genes que sejam excelentes candidatos para uso da técnica de RNAi (BOISON, 2010). Este parece ser o caso do receptor glutamatérgico NMDA e de suas subunidades como potenciais alvos terapêuticos para novas e importantes tecnologias, dado ao seu ganho de função e/ou aumento da densidade populacional e, por consequência, sua participação crucial na origem e progressão das lesões e SE. Estas novas tecnologias quando aprimoradas serão úteis não só no potencial tratamento das epilepsias refratárias, como a ELT, mas também no melhor entendimento das bases neuromoleculares subjacentes à doença e, mesmo no melhor compreender dos modelos animais de epilepsia, bastante úteis no cabedal de descobertas relativas ao entendimento e tratamento da ELT, como sabido para o bem estabelecido modelo de pilocarpina.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho dão conta de que:

Os ensaios pilotos iniciais em animais livres de SE, muito embora limitados no quesito de predição, foram importantes no padronizar de parâmetros importantes para a sequência do trabalho, sobretudo, no que tange da escolha do método/dispositivo de administração do siRNA por via intranasal pelo método da seringa de Hamilton. Estes ensaios foram efetivos em mostrar o silenciamento hipocampal da subunidade NR2B (RT-PCR) pelo uso do siRNA por via intranasal ao mesmo tempo em que foram úteis para o arranjo de operações de modo mais racional, rápido e econômico. O silenciamento da subunidade NR2B via RT-PCR não se repetiu em animais submetidos ao SE ao menos para dose de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Todavia e após rearranjos no protocolo de indução do SE e ajustes de dose (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), foi possível demonstrar efetivamente o silenciamento hipocampal da subunidade NR2B em animais 24 hs após a submissão ao SE, ao mesmo tempo em que se mostra discreta proteção dos animais contra as crises epiléticas de maior score. Este último dado (WB) mostra que o sistema de transfecção escolhido e o siRNA desenhado silenciam a subunidade NR2B seletivamente no hipocampo, sem que outras áreas estudadas em paralelo, e aqui representadas pelo córtex, fossem atingidas. Ademais, é possível dizer que o sistema de transfecção escolhido foi efetivo em proteger o siRNA da degradação enzimática, na sua solubilização/veiculação ao longo do muco nasal e no ultrapassar de barreiras biológicas, o que junto com a seletividade hipocampal dão a este trabalho pioneiro marcado interesse translacional, o que poderá ser melhor aprimorado por experimentos complementares no futuro breve.

6. REFERÊNCIAS

- AIGNER A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 76, p.9-21, 2007.
- AMORIM RP., et al. Silencing of P2X7R by RNA interference in the hippocampus can attenuate morphological and behavioral impact of pilocarpine-induced epilepsy. *Purinergic Signalling.*, v.11, p. 467-478, 2017.
- BORGES KK., et al. Issues that affect people with epilepsy quality of life. *Revista Brasileira de Terapias Cognitivas*, v. 5, p.28-24, 2009.
- BURNASHEV N; SZEPETOWSKI P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 20, p.73-82, 2015.
- CAO Q., et al. Inhibition of Acid Sensing Ion Channel 3 Aggravates Seizures by Regulating NMDAR Function. *Neurochemical Research*, v. 43, n. 6, p.1227-1241, 2018.
- CHE XQ., et al. Delivery of Nerve Growth Factor to the Brain via the Olfactory Pathway. *Journal Of Alzheimer's Disease*, v. [], n. 1, p.35-44, 1998.
- CHEN Q., et al. Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. *Journal Of Neuroscience*, v. 27, p.542-552, 2007.
- CULL-CANDY S.; BRICKLEY S.; FARRANT M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion In Neurobiology*, v. 11, p.327-335, 2001.
- CURIA G., et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 172, p.143-157, 2008.
- D'AVILA BF., et al. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) on epileptic seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) in rats. *Pharmacologia*, v. 12, p. 362-368, 2011.
- DEEB TZ.; MAGUIRE J.; MOSS SJ. Possible alterations in GABA A receptor signaling that underlie benzodiazepine-resistant seizures. *Epilepsia*, v. 53, p.79-88, 2012.
- DUNCAN JS., et al. Adult epilepsy. *The Lancet*, v. 367, p.1087-1100, 2006.
- FISHER RS., et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, v. 55, p.475-482, 2014.
- FRANÇA NR., et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, p.695-702, 2010.
- FURMAN M., et al. Seizure Initiation and Propagation in the Pilocarpine Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal Of Neuroscience*, v. 33, p.16409-16411, 2013.
- FURUKAWA H. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The Embo Journal*, v. 22, p.2873-2885, 2003.
- GÄNGER S.; SCHINDOWSKI K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, v. 10, p.116-144, 2018.

GARDINER WT.; TOTH LA. Stereotactic Surgery and Long-Term Maintenance of Cranial Implants in Research Animals. *Contemporary Topics In Laboratory Animal Science*, v. 1, p.56-63, 1999.

GARZON E. Estado de Mal Epiléptico. *Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology*, v. 2, p.7-11, 2008.

GENC S.; KOROGLU TF.; GENC K. RNA interference in neuroscience. *Molecular Brain Research*, v. 132, p.260-270, 2004.

GHASEMI M.; SCHACHTER SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy & Behavior*, v. 22, p.617-640, 2011.

GOLDENBERG MM. Overview of Drugs Used For Epilepsy and Seizures. *Pharmacy And Therapeutics*, v. 35, p.392-415, 2010.

GUEDES FA.; GALVIS-ALONSO OY.; LEITE JP. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. *Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiolog*, v. 1, p.10-17, 2005.

HABERMAN R.P., et al. Therapeutic Liabilities of in Vivo Viral Vector Tropism: Adeno-Associated Virus Vectors, NMDAR1 Antisense, and Focal Seizure Sensitivity. *Molecular Therapy*, v. 4, n. 6, p.495-500, 2002.

HAMMOND SM. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *Febs Letters*, v. 579, p.5822-5829, 2005.

HORII A; SMITH PF; DARLINGTON CL. Application of real-time quantitative polymerase chain reaction to quantification of glutamate receptor gene expression in the vestibular brainstem and cerebellum. *Brain Research Protocols*, v. 9, p.77-83, 2002.

HU C., et al. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal Of Pharmacological Sciences*, v. 132, p.115-121, 2016.

IAPADRE G., et al. Pharmacokinetics and Drug Interaction of Antiepileptic Drugs in Children and Adolescents. *Pediatric Drugs*, v. 20, p.429-453, 2018.

KALEV-ZYLINSKA ML.; SYMES W.; YOUNG D.; DURING MJ. Knockdown and overexpression of NR1 modulates NMDA receptor function. *Mol Cell Neurosci*, v. 41, p. 383-96, 2009.

KINDEREN RJA., et al. Side-effects of antiepileptic drugs: The economic burden. *Seizure*, v. 23, p.184-190, 2014.

KUTSUWAD T., et al. Impairment of Suckling Response, Trigeminal Neuronal Pattern Formation, and Hippocampal LTD in NMDA Receptor $\epsilon 2$ Subunit Mutant Mice. *Neuron* v. 16, p.333-344, 1996.

LEPPIK IE. Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy*, p. 7-11, 1992.

LIN S., et al. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Experimental Neurology*, v. 217, n. 2, p.361-370, 2009.

- LÖSCHER W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, v. 50, p.105-123, 2002.
- LÖSCHER W., et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, [s.l.], v. 12, n. 10, p.757-776, 2013.
- LOWENSTEIN DH.; BLECK T.; MACDONALD RL. It's Time to Revise the Definition of Status Epilepticus. *Epilepsia*, v. 40, p.120-122, 1999.
- MACK GS. MicroRNA gets down to business. *Nature Biotechnology*, v. 25, p.631-638, 2007.
- MAGEN I; HORNSTEIN, E. Oligonucleotide-based therapy for neurodegenerative diseases. *Brain Research*, v. 1584, p.116-128, 2014.
- MAIO R., et al. Pilocapine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiology Of Disease*, v. 42, p.482-495, 2011.
- MALHOTRA M., et al. Intranasal, siRNA Delivery to the Brain by TAT/MGF Tagged PEGylated Chitosan Nanoparticles. *Journal Of Pharmaceutics*, v. 2013, p.1-10, 2013.
- MASIA L.; DEVINSKY O. Epilepsy and Behavior: A Brief History. *Epilepsy & Behavior*, v. 1, p.27-36, 2000.
- MINJAREZ B. et al. Behavioral changes in models of chemo convulsant-induced epilepsy: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 83, p.373-380, 2017.
- MINTZER S.; MAIO V.; FOLEY K. Use of antiepileptic drugs and lipid-lowering agents in the United States. *Epilepsy & Behavior*, v. 34, p.105-108, 2014.
- MÖDDEL G., et al. The NMDA receptor NR2B subunit contributes to epileptogenesis in human cortical dysplasia. *Brain Research*, v. 1046, p.10-23, 2005.
- MONYER H et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, v. 12, p.529-540, 1994.
- NAGAL A.; SINGLA RK. Nanoparticles in different delivery systems: a brief review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p96-106, 2013.
- NISHIKURA, K. A Short Primer on RNAi. *Cell*, v. 107, p.415-418, 2001.
- NORONHA ALA., et al. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia*, v. 48, p.880-885, 2007.
- PAOLETTI P.; BELLONE C.; ZHOU Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, p.383-400, 2013.
- PAOLETTI P.; NEYTON J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion In Pharmacology*, v. 7, p.39-47, 2007.
- PEDROSO MF. Epilepsia experimental e fármacos antiepilépticos: efeito na memória espacial e na potenciação de longa duração induzida in vitro. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Neurociências, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 2005.

PERUCCA P.; GILLIAM FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet Neurology*, v. 11, p.792-802, 2012.

RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography And Clinical Neurophysiology*, v. 32, p.281-294, 1972.

REIS SL. Atividades anticonvulsivante e neuroprotetora do alcaloide Eritrartina isolado do extrato hidroalcoólico de flores de *Erythrina verna* Mart. ex Benth. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, *Universidade de Ribeirão Preto*, 2016.

RIBAN V.; FITZSIMONS HL.; DURING MJ. Gene therapy in epilepsy. *Epilepsia*, v. 50, n. 1, p.24-32, 2009.

RICE AC, DELORENZO RJ. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Research*, v. 782, p.240-247, 1998.

RODRIGUEZ M., et al. Myosotys et al. Intranasal drug delivery of small interfering RNA targeting Beclin1 encapsulated with polyethylenimine (PEI) in mouse brain to achieve HIV attenuation. *Nature*, v. 7, p.1-10, 2017.

SCORZA FA., et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, p. 345–365, 2009.

SZCZUROWSKA, E.; MAREL, P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol. Res*, Praga, v. 1, p.21-38, 2013.

TAN P., et al. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Therapy*, v. 12, p.59-66, 2005.

TANG Y., et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, v. 401, p.63-69, 1999.

THORNE RG., et al. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, [s.l.], v. 127, n. 2, p.481-496, 2004.

TOYODA I., et al. Early Activation of Ventral Hippocampus and Subiculum during Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal Of Neuroscience*, v. 33, p.11100-11115, 2013.

TRAYNELIS S.F., et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, v. 62, p.405-496, 2010.

TRINKA E., et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, v. 56, p.1515-1523, 2015.

VERMEULEN J.; ALDENKAMP A.P. Cognitive side-effects of chronic antiepileptic drug treatment: A review of 25 years of research. *Epilepsy Research*, v. 22, p.65-95, 1995.

WESTIN UE. Olfactory Transfer of Analgesic Drugs After Nasal Administration. 2007. Tese (Doutorado) - Curso de Faculty Of Pharmacy, Uppsala Universitet, 2007.

WHO. Epilepsy. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

WITTRUP A; LIEBERMAN J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, p.543-552, 2015.

XIN Y., et al. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 16, p.1-9, 28, 2017.

XU X; LUO J. Mutations of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Epilepsy. *Neuroscience Bulletin*, v. 34, p.549-565, 2017.

YANG Y., et al. GPR40 modulates epileptic seizure and NMDA receptor function. *Science Advances*, v. 4, p.1-12, 2018.

YOUNUS I; REDDY, DS. A resurging boom in new drugs for epilepsy and brain disorders. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 11, p.27-45, 2017.

ZHANG Y., et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Prevents Cognitive Impairment Following Status Epilepticus in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 33, n. 4, p.572-579, 2010.

ZHAO J; FENG S. Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. *Nanomedicine*, v. 10, p.2199-2228, 2015.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Ribeirão Preto, 4 de novembro de 2015

Prezado(a) Pesquisador (a) Rene de Oliveira Beleboni,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“USO DE RNAIS DIRECIONADOS PARA RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO NMDA: ENTENDENDO AS BASES NEUROMOLECULARES DA EPILEPSIA E POTENCIAIS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.”**, tendo como pesquisador(a) Rene de Oliveira Beleboni, registrado sobre o ComÉt: 10/2015

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,



Prof.ª Dr.ª Luciana Rezende Alves Oliveira

**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto**