

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MYKAELLA ANDRADE DE ARAÚJO

Identificação de microRNAs em epilepsia experimental e desenvolvimento de um nanosistema carreador de inibidores de microRNAs para ensaios funcionais

Maceió-AL

2018

MYKAELLA ANDRADE DE ARAÚJO

Identificação de microRNAs em epilepsia experimental e desenvolvimento de um nanosistema carreador de inibidores de microRNAs para ensaios funcionais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Neurociência clínica e experimental

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai

Co-orientadora: Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Maceió-AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB: 1664

A658i Araújo, Mykaella Andrade de.
Identificação de microRNAs em epilepsia e desenvolvimento de um nanosistema carreador de inibidores de microRNAs para ensaios funcionais / Mykaella Andrade de Araújo. – 2018.
103 f.: il. color. ,grafs., tabs.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitaí.
Co-orientadora: Camila Braga Dornelas.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 94-101.
Anexos: f.102-103.

1. Neurociência . 2. Epilepsia. 3. MicroRNAs. 4. Hidróxidos duplos lamelares. 5. Ensaios funcionais. I. Título.

CDU: 616-009



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppacs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Mykaella Andrade de Araújo

Identificação de microRNAs em Epilepsia experimental e desenvolvimento de nanossistema
carreador de inibidores de microRNAs para ensaios funcionais.

Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 7 de agosto de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Cláudio Wagner Castro - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Renata Santos Rodarte - (UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite - (UNCISAL)

Dedicatória

***A Deus, que concedeu toda a capacidade
para concretização desse objetivo***

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que é grande, dono de tudo e ainda assim ama a todos de maneira bem particular. Obrigada, Senhor! Obrigada pela capacitação, manutenção, fortalecimento, cuidados de pai e amigo ao longo desses anos. Obrigada por trilhar bem juntinho a mim essa jornada e em nenhum minuto me deixar sem a bênção e paz da Sua presença. Ele me deu o livre arbítrio pra que eu escolhesse que rumo seguir, mas quando eu O devolvi mesmo podendo não o fazer recebi a maior bênção: andar no centro da vontade dEle, e isso me trouxe aqui. Ele é maravilhoso e Seus propósitos são seguros, certos e sem possibilidade de erros. Obrigada, Senhor. Eterna gratidão.

À Família mais especial. Seguramente, eu não teria conseguido sem esse apoio incondicional. Sem as palavras sábias do meu Pai (direcionadas pelo nosso Senhor), sem os caprichos e cuidados da minha mãe, sem a compreensão e incentivos da minha irmã Larissa e sua linda família (que por sinal me deram um presentinho em formato de bebê nesse período). Vocês são incríveis. Amo vocês demais! Ao meu noivo que foi um dos meus maiores presentes “acadêmicos” do doutorado. Obrigada pelos cuidados manifestos de diversas maneiras, Phê! Quantas memórias registradas nessa fase e em quase todas elas você se fez presente. Obrigada pela companhia nas idas extras ao laboratório, pelas coorientações, pelos aconselhamentos, pelas palavras sábias e por sonhar junto esse sonho! Tenho muito orgulho de você! Sua perseverança, comprometimento e responsabilidade em tudo me inspiram demais. Te amo, Phê. Thanks so much!

Ao Professor Daniel, pela oportunidade e orientação! Seu pensamento científico é realmente inspirador e admirável e, para mim, inigualável. Obrigada pela confiança, especialmente no seu período de afastamento para o pós-Doc. Através da sua vida fui ensinada por Deus quanto à resiliência e amadurecimento. Deus o recompense, professor. À Professora Camila linda, obrigada pela co-orientação e por ter sido também um instrumento no meu crescimento acadêmico. Quem diria que uma disciplina eletiva traria esse boom de mudanças no percurso?! Através da sua vida fui lembrada sobre a importância dos desafios e do quanto eles nos ensinam. Fiquei mais forte e acreditando que posso ir muito mais longe. Aprendi sobre autonomia e que ciência não se faz sozinho. Gratidão!

Aos meus amigos do GPECE. Ahhhh se eu pudesse traduzir a gratidão por ter vocês! Eu realmente não teria conseguido sem essa leveza e companheirismo! Que equipe maravilhosa e seleta é essa? Cada madrugada em experimento, cada *Status epilepticus*, cada nanopartícula sintetizada, cada *knockdown* de microRNA. Vocês fazem parte da minha vida como uma “família fora de casa”! Obrigada Thalits, Wanessa, Helô, Carmem, Gabi. Amo vocês! Quero agradecer em especial à Bruna, quem uniu forças, me impulsionou e trouxe aquele gás que eu estava precisando. Gratidão pela sua responsabilidade e comprometimento, àquela que se tornou a dupla de laboratório e minha mais que amiga. Ela sempre diz que somos bem diferentes: ela bem racional e eu emoção à flor da pele... essa junção foi um equilíbrio e que nessa relação todas nós aprendemos e amadurecemos muito. Aos meninos PIBIC: Junior, Igor, Peter, Thay que carinhosamente os chamamos de Nanos... meninos, vocês são um dos maiores prêmios desse meu doc. Aprendi a amá-los como filhos. É um sentimento de gratidão mesclado com desejo que voem muito alto. Obrigada por tornarem nossas nanopartículas possível. Sem dúvidas, vocês foram fundamentais! Aprendemos juntos e crescemos juntos. Vocês estão

prontos para os próximos desafios e eu estarei sempre na torcida, de perto ou de longe! Aos alunos que eu pude acompanhar e que se envolveram com o mundo dos microRNAs comigo: Gabriele e Arthur. A todo o grupo, obrigada por me isentarem de algumas responsabilidades semanais nessa etapa final. Obrigada pela amizade, GPECE! Vocês moram no meu coração.

Ao Eid que tão gentilmente nos ajudou, discutiu protocolo, colocou-se à disposição em tantos momentos. Obrigada pela atenção e boa vontade em ajudar. Ao Abner, que por muitas vezes nos auxiliou com os questionamentos químicos. Obrigada por ser tão solícito! Aos professores Mario Meneghetti e Maritza por disponibilizar os reatores durante os testes iniciais. Obrigada pelo apoio.

Às meninas do Laboratório TecNano, especialmente a Tamires, Valzinha e Clarisse. Obrigada pelo carinho, discussões, pela amizade e companheirismo. Devo muito a vocês por tudo e por tornarem a nanotecnologia mais simples.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação, obrigada pelas discussões e momentos de descontração. Em especial às amigas Mile e Nanda. Eu amo vocês por tudo! Pelo comecinho da nossa história, pela amizade linda que foi solidificada, pelos aprendizados e pelo amor dividido. À Navylla e Igor, obrigada queridos. Ao Zeca, por ser tão solícito e prestativo. Ao Antonio por ter aberto sua casa para estudarmos juntos Bioquímica, à Luciana e Bruna Koike exemplos de proatividade e dedicação. Obrigada!

Aos Irmãos da igreja, em especial ao Zé Maria, durante uma fase bem difícil ele intercedia a Deus quase que diariamente por mim. Gratidão!!!!

Ao professor João Pereira Leite e ao pesquisador José Peixoto da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, obrigada pela colaboração científica e fornecimento de um material tão precioso e raro. Muito obrigada!

À professora Dra. Maria Luisa Paçó-Larson (Laboratório de Estrutura, Regulação e Função Gênica em Eucariotos – FMRP/USP) que tão simpaticamente nos recebeu em seu laboratório. Sentou conosco e nos proveu tudo necessário para a extração de RNA de tecidos humano. Obrigada!

Ao professor Renato, obrigada pelo auxílio e total acesso ao material para os ensaios em cultura de células. Obrigada por deixar seus alunos sempre disponíveis para nos auxiliar. Obrigada pela gentileza, leveza e carinho de sempre! À Thay, e ao Marcus, o meu muito obrigada!

Ao Professor Ênio Bassi (LAPEVI), obrigada pelo apoio com as análises em citometria de fluxo, pelas discussões, pela disponibilidade de sempre. O meu muito obrigada

À professora Salete Smaniotto pelo apoio e fornecimento das células usadas nesta pesquisa, o meu muito obrigada; e ao Marvin, obrigada por me ajudar nas etapas iniciais com cultura de células, pela amizade e atenção. Deus os abençoe.

À professora Janira Lúcia, minha primeira mãe científica. Serei sempre grata pela semente plantada. Seus ensinamentos ecoam até hoje no meu coração: Um verdadeiro mix de competência, humildade, amar o conhecimento e valorização da família. Obrigada por tudo. Sempre!

Ao professor Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva do Laboratório de DNA Forense da UFAL e à professora Tami Motti pela disponibilidade do uso do espectrofotômetro.

Aos funcionários do ICBS, que trabalham na coordenação, direção e limpeza. Obrigada pela gentileza de sempre.

Às instituições CNPQ, CAPES, UFAL pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, que torcem por mim de uma forma muito genuína. Amo muito vocês.

A todos que passaram pela minha vida durante essa etapa! O meu muito obrigada! Minha vida tem um pouquinho de todos vocês. Obrigada por me ensinar, incentivar, torcer ou orar comigo. Que Deus abençoe a todos vocês.

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”

(Romanos 11:36).

RESUMO

Estudos de expressão gênica diferencial acoplados a ensaios funcionais tem sido uma estratégia eficiente na identificação de vias moleculares subjacentes a patologias. Considerando o papel regulador dos microRNAs (miRs), utilizamos esta estratégia para investigar miRs associados ao processo epileptogênico. **Objetivos:** 1. Identificar miRs diferencialmente expressos em modelo de Epilepsia do lobo temporal (ELT) e 2. Desenvolver um nanocarreador do tipo Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) para inibidores de miRs. **Métodos:** Através de hibridização em *microarray*, avaliou-se a expressão de 662 miRs em hipocampus de ratos submetidos ao *Status epilepticus* (SE) induzido pela injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Os miRs 10a-5p, 128a-3p, 196b-5p, 352 e 324-3p analisados individualmente através de RT-qPCR em diferentes tempos após o SE (0h, 24h e crônico) e em pacientes farmacorresistentes com ELT. Para o desenvolvimento do nanocarreador do tipo HDL (Mg-Al), utilizamos o método de coprecipitação. A complexação do oligonucleotídeo aos HDL foi realizada através de agitação vigorosa das soluções. Os nanocomplexos obtidos foram caracterizados fisico-quimicamente quanto tamanho e potencial zeta através da técnica DLS; cristalinidade através da difração de raios X; e grupamentos químicos por espectroscopia FT-IR. Para os ensaios *in vitro*, utilizou-se células da linhagem tEND.1 selecionadas previamente pelo perfil de expressão significativo do miR-196b-5p e U6snRNA. A viabilidade celular após tratamento com os HDLs foi avaliada pelas técnicas de exclusão por azul de trypan e MTT. A eficiência de transfecção do nanocomplexo HDL:Oligo foi avaliada através de citometria de fluxo. Por fim, para testar a eficiência de depleção nos níveis do miR e consequente validação do sistema desenvolvido, avaliou-se através de RT-qPCR os níveis de transcritos do miR 196b-5p e dos seus genes alvos preditos, Slc9a6 e HMGA2. **Resultados:** Identificou-se 73 microRNAs que apresentaram níveis de expressão significativamente diferentes no hipocampo de ratos eutanasiados na fase aguda da epileptogênese (24 h pós-SE). Através de RT-qPCR, observou-se o aumento dos níveis dos miRs 196b-5p e 352 e a diminuição do miR-128a-3p em hipocampus de ratos submetidos ao SE. Os níveis do miR-128a-3p foram significativamente reduzidos em todos os tempos analisados quando comparados com ratos *naive*. Observamos que os níveis de expressão dos miRs-196b-5p e 128a-3p em hipocampus de pacientes epiléticos apresentaram a mesma direção de expressão comparadas àquelas obtidas em modelo animal. O nanocarreador HDL (Mg-Al) desenvolvido, apresentou tamanho médio de 90 d.nm e potencial zeta de +45 mV, além de difratograma padrão e grupamentos químicos específicos para HDL. Após complexação houve uma diminuição da cristalinidade, aumento no tamanho da partícula e diminuição do potencial zeta (média de 160 d.nm;-37 mV) indicando complexação. A eficiência de transfecção do nanocomplexo foi de 93% e com ausência de toxicidade nas concentrações de até 100 µg/ml, o que evidencia alta biocompatibilidade. Quanto aos ensaios funcionais utilizando o nanosistema produzido, observou-se depleção significativa nos níveis de transcritos do miR 196b-5p, 48h após o tratamento, validando o nanosistema aqui produzido. Identificou-se que os miRs 196b-5p, 352 e 128-3p estão diferencialmente expressos em modelo de ELT e desenvolveu-se uma ferramenta eficiente para ensaios funcionais baseados na depleção de miRs. O nanosistema desenvolvido permitirá a investigação do papel dos miRs 196b-5p na epileptogênese em modelos animais. **Palavras-chave:** Epilepsia, microRNAs, Hidróxidos Duplos Lamelares, Ensaios funcionais.

ABSTRACT

Differential gene expression studies coupled with functional assays have been an effective strategy in the identification of molecular pathways underlying pathologies. Considering the regulatory role of miRs, we used this strategy to investigate miRs associated with the epileptogenic process. **Objectives:** 1. To identify microRNAs differentially expressed in TLE model and 2. To develop a Layered Double Hydroxide (LDH) nanocarrier for miRs inhibitors. **Methods:** The expression of 662 miRs in hippocampus from rats subjected to Status epilepticus (SE) induced by intra-hippocampal injection of pilocarpine was evaluated by microarray hybridization. The miRs 10a-5p, 128a-3p, 196b-5p, 352 and 324-3p were subjected to individual analysis by RT-qPCR at different times after SE (0h, 24h and chronic) and in drug-resistant ELT patients. For the development of the LDH nanocarrier (Mg-Al), we used the coprecipitation method. Complexation of the oligonucleotide to HDL was accomplished by vigorous stirring of the solutions. The nanocomplexes obtained were physicochemically characterized as molecular size and zeta potential through the DLS technique; crystallinity through X-ray diffraction; and chemical groups by FT-IR spectroscopy. For the in vitro assays, tEND.1 lineage cells were used, which showed significant expression profile of miR-196b-5p and U6snRNA for validation of the system according to previous analyzes. After treatment with HDLs cell viability was assessed by trypan blue exclusion and MTT techniques. The transfection efficiency of the HDL: Oligo nanocomplex was assessed by flow cytometry. Finally, to test the depletion efficiency at miR levels and following validation of the developed system, the levels of miR 196b-5p transcripts and their predicted target genes, Slc9a6 and HMGA2, were evaluated by RT-qPCR. **Results:** We identified 73 microRNAs that showed significantly different levels of expression in the hippocampus of euthanized rats in the acute phase of epileptogenesis (24 h after SE). Through RT-qPCR, were observed the levels of miRs 196b-5p and 352 increase and miR-128a-3p decrease in the hippocampus of rats submitted to SE. The levels of miR-128a-3p were significantly reduced at all time points compared to naive and miR-352 in the acute and chronic (epileptic rats) period. We observed that the expression levels of miRs-196b-5p and 128a-3p in the hippocampus of epileptic patients presented the same direction of expression compared to those obtained in an animal model. The developed LDH (Mg-Al) nanocarrier presented an average size of 90 d.m and zeta potential of +45 mV, besides standard diffractogram and specific chemical groups for HDL. After complexation, there was a decrease in crystallinity, an increase in particle size and a decrease in zeta potential (mean of 160 d.m., ranging from -15 to -37 mV) indicating effective complexation. The transfection efficiency of the nanocomplex was 93% and absence of toxicity at concentrations up to 100 µg/ml, which shows high biocompatibility. As for the functional assays using the produced nanosystem, significant depletion was observed in transcript levels of miR 196b-5p, 48h after treatment, validating the nanosystem produced here. It has been identified that miRs 196b-5p, 352 and 128-3p are differentially expressed in the ELT model and have developed an efficient tool for functional assays based on miRs depletion. As a perspective, we will investigate the role of mirs 196b-5p in epileptogenesis in animal models using the HDL carrier nanosystem developed here.

Keywords: Epilepsy, microRNAs, Layered Double Hydroxides, Functional Assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biogênese dos microRNAs e mecanismo de inibição da função dos miRs baseado em antagomirs/antimiRs

Figura 2 - Modificações químicas dos Oligonucleotídeos *antisense*

Figura 3 - Número de artigos científicos com as palavras-chave “Nanomaterials AND microRNAs” no banco de dados Pubmed, entre os anos de 2010 e 2017

Figura 4 - Estrutura esquemática de Hidróxidos Duplos Lamelares

Figura 5 - Interação proposta entre moléculas de DNA e HDL

Figura 6 - Esquema da endocitose e do tráfico celular dos HDL

Figura 7 - Delineamento experimental da pesquisa

Figura 8 - Morfologia dos nanocarreadores do tipo HDL sintetizados obtida através da microscopia eletrônica de transmissão

Figura 9 - Difratoograma de Raios X de HDL produzidas

Figura 10 - Espectros de absorção na região do infravermelho de HDL Mg-Al obtidos através de Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Figura 11 - Ensaio de retardamento em gel de Agarose dos complexos: A) HDL: oligo. B) HDL: Block-itt

Figura 12 - Difratoograma de raios-X de A) HDL; B) Complexo HDL:Oligo

Figura 13 - Espectros de absorção na região do infravermelho do complexo formado entre HDL: oligonucleotídeos

Figura 14 - Viabilidade celular da linhagem tEND.1 após tratamento com HDL

Figura 15 - Eficiência de transfecção às células da linhagem t.END.1 dos oligonucleotídeos marcados com Alexa-fluor 555 mediados pelos complexos formados com HDL e com Lipofectamina

Figura 16 - Expressão relativa do miR-196b-5p após tratamento com os complexos

Figura 17- Expressão relativa do gene alvo predito SLC9A6 após tratamento com o inibidor do miR-196b-5p

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - HDL utilizado como carreadores gênicos

Tabela 2 - Reagentes empregados nas sínteses dos HDL e nos sistemas HDL:oligo

Tabela 3 - Resumo das modificações realizadas durante o estabelecimento do protocolo de síntese de HDL

Tabela 4 - Quantificação de HDL produzidos

Tabela 5 - Resumo dos oligonucleotídeos usados nas reações de complexação para a formação do nanosistema

Tabela 6 - Reação de complexação com os nanocarreadores do tipo HDL

Tabela 7 - Lista de primers para genes codificadores

Tabela 8 - Porcentagem de células transfectadas após tratamento com os complexos HDL:Block-itt e controles

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| 2'-MOE | 2'-O-metoxietil |
| 2'-OME | 2'-O-metil |
| Ago-9 | Argonauta-9 |
| AMO | AntimicroRNA |
| ASO | <i>Oligonucleotide antisense</i> |
| ATR | <i>Attenuated Total Reflectance</i> |
| BCL-2 | <i>B-cell lymphoma protein 2</i> |
| CA | Corno de Amnon |
| DAEs | Drogas antiepilépticas |
| DEPC | Diethyl Pirocarbonato |
| DLS | Espalhamento dinâmico da Luz |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DRX | Difração de Raios X |
| dsDNA | <i>Double Strand DNA</i> |
| ELT | Epilepsia do lobo temporal |
| FAM | 6-carboxi-fluoresceína |
| FT-IR | Espectroscopia no infravermelho com de transformada Fourier |
| HDL | Hidróxidos Duplos Lamelares |
| ICP | Espectroscopia com Plasma Acoplado Indutivamente |
| LNA | <i>Locked nucleic acid</i> |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| miR | microRNA |
| MTT | <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PDI | Índice de Polidispersão |
| RISC | Complexo de Silenciamento gênico |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |

| | |
|--------|---|
| SBF | Soro bovino fetal |
| SE | <i>Status epilepticus</i> |
| siRNA | small interfering RNA (Pequeno RNA de interferência) |
| ssDNA | <i>Single Strand DNA</i> |
| tEnd.1 | Linhagem celular murina proveniente de endoteliomas tímicos |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 2 OBJETIVOS GERAIS | 20 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS EM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL | 21 |
| DE ARAÚJO, M. A. et al. Identification of microRNAs with dysregulated expression in status epilepticus induced epileptogenesis. PloS one, v. 11, n. 10, p. e0163855, 2016. | 21 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 39 |
| 3.1 ESTUDOS FUNCIONAIS BASEADOS EM OLIGONUCLEOTÍDEOS | 39 |
| 3.2 NANOMATERIAS, NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA | 44 |
| 3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS NANOSISTEMAS E OS HIDRÓXIDOS DUPLO LAMELARES | 45 |
| 3.4 HDL COMO CARREADORES GÊNICOS | 48 |
| 3.4.1 Mecanismo de incorporação de HDL pelas células | 51 |
| 3.5 ENSAIOS FUNCIONAIS DE MICRORNAS E EPILEPSIA | 52 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 55 |
| 4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 55 |
| 4.2 MATERIAL E REAGENTES | 56 |
| 4.3 SÍNTESE DE HDL | 56 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HDL | 58 |
| 4.4.1 Espalhamento Dinâmico da luz (DLS) | 58 |
| 4.4.2 Difração de raios X (DRX) | 59 |
| 4.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) | 60 |
| 4.5 COMPLEXAÇÃO DO INIBIDOR DE microRNA AO NANOCARREADOR HDL | 60 |
| 4.5.1 Associação/complexação HDL: oligonucleotídeos | 61 |
| 4.5.2 Complexação Lipofectamina: oligonucleotídeo | 62 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO HDL: OLIGONUCLEOTÍDEO | 63 |
| 4.6.1 Ensaio de retardação em gel de agarose | 63 |
| 4.6.2 Espalhamento dinâmico da luz – Tamanho e potencial zeta | 63 |
| | 16 |

| | |
|---|-----|
| 4.6.3 Difração de raios X (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) | 64 |
| 4.7 CITOMETRIA DE FLUXO (EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO) | 64 |
| 4.8.1 Ensaio de exclusão por azul de Trypan | 65 |
| 4.8.2 Ensaio de MTT | 66 |
| 4.9 ENSAIOS DE KNOCKDOWN DE microRNAs <i>IN VITRO</i> | 66 |
| 4.10.2 Extração e quantificação de RNA total | 67 |
| 4.10.3 RT-qPCR para análise dos microRNAs | 68 |
| 4.10.4 RT-qPCR para análise dos genes alvos preditos do miR-196b-5p | 69 |
| 4.10.5 Análises estatísticas | 70 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 5.1 SÍNTESE DE NANOCARREADORES DO TIPO HDL E ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO | 71 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DE HDL | 72 |
| 5.2.1 Tamanho da partícula, potencial Zeta e morfologia dos HDL | 72 |
| 5.2.2 Cristalinidade e grupamentos químicos presentes | 75 |
| 5.3 FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS HDL:OLIGO E CARACTERIZAÇÕES | 77 |
| 5.3.1 Seleção da proporção HDL: Oligonucleotídeos | 77 |
| 5.3.2 Cristalinidade e grupamentos químicos | 80 |
| 5.3.3 Viabilidade celular | 83 |
| 5.3.4 Eficiência de internalização dos complexos HDL: inibidor às células | 84 |
| 5.3.5 Avaliação do ensaio de <i>knockdown</i> do microRNA 196b-5p | 87 |
| 5.4 PROPOSTA PARA AVALIAÇÃO DE UMA VIA DO MIR-196B-5P NA EPILEPTOGÊNESE | 91 |
| 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 92 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |
| ANEXO | 101 |
| A– TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS | 101 |
| B– TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS COMPLEXOS HDL:OLIGONUCLEOTÍDEOS | 102 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é um tipo de epilepsia focal caracterizada por crises recorrentes e espontâneas que se originam em estruturas límbicas, como o hipocampo. Pacientes com ELT associada à esclerose hipocampal (ELTM) apresentam os maiores índices de fármaco-resistência (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). ELTM na maioria dos casos é causada por um insulto epileptogênico, como por ex. *status epilepticus*, que deflagra uma série de alterações estruturais e fisiológicas, culminando na conversão de um cérebro normal em um cérebro epiléptico. Tal processo, denominado de epileptogênese, envolve astrogliose, perda neuronal, neurogênese, inflamação tanto em pacientes quanto em modelos animais (PITKÄNEN; LUKASIUK, 2011). Essas alterações são acompanhadas por uma reorganização global no perfil de expressão gênica, gerando um ambiente bioquímico compatível com o processo epileptogênico (GITAÍ, 2007).

Portanto, estudos de expressão gênica diferencial acoplados a ensaios funcionais tem sido uma estratégia eficiente na identificação de vias moleculares subjacentes a patologias, bem como para o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico.

A reorganização da expressão gênica envolve diferentes níveis de controle, com destaque nos últimos anos para o envolvimento de microRNAs (miRs). Os miRs consistem em RNAs não codificadores, que controlam a expressão gênica a nível a) pós transcricional, exercendo seus efeitos regulatórios através da ligação por complementariedade de bases às sequências presentes na região 3' UTRs (não traduzidas) dos RNAm alvos (BARTEL, 2004; RI; RANA, 2014). A forma de inibição depende do grau de complementariedade entre a região *seed* do miR e o RNAm, reprimindo a tradução antes ou após iniciação; ou levando a degradação do RNAm alvo quando a complementariedade de bases é perfeita (RI; RANA, 2014). A outra forma de controle exercida pelos miRs recentemente reportada é a nível nuclear, podendo contribuir na regulação geral do transcriptoma de RNAs não codificadores (CATALANOTTO et al., 2017). No presente trabalho, investigamos o envolvimento dos miRs no processo epileptogênico.

O trabalho foi organizado em dois capítulos. No primeiro, **apresentado em formato de artigo publicado** (*Plos one*) realizamos análises de hibridização em *microarray* acoplado a validação por RT-qPCR para investigar miRs associados a ELT em modelo animal e em pacientes farmacorresistentes.

No segundo capítulo, **apresentado no formato de tese**, desenvolvemos um nanocarreador do tipo Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) para inibidores dos miRs identificados neste estudo. Os carreadores tradicionais, embora úteis, apresentam limitações como alto custo e toxicidade às células (DEBSKI; LUKASIUK, 2013; HENSHALL, 2013). Como alternativa, os HDL tem sido reportados como carreadores eficientes a uma ampla categoria de oligonucleotídeos (CHOI et al., 2018), contudo, ainda não há estudos referente ao seu uso com inibidores de miRs.

2 OBJETIVOS GERAIS

-Identificar microRNAs diferencialmente expressos em hipocampos de modelo experimental de epilepsia e de pacientes epilépticos.

-Desenvolver inibidores de microRNAs nanocarreados para ensaios funcionais

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar os níveis de transcritos de microRNAs em modelo experimental de epilepsia;
2. Avaliar a expressão de microRNAs em hipocampos de pacientes epilépticos farmacorresistentes e controle;
3. Sintetizar e caracterizar nanocarreadores do tipo Hidróxidos Duplos Lamelares;
4. Promover a complexação dos oligonucleotídeos e nanocarreadores HDL;
5. Avaliar em cultura de células a eficiência de transfecção do nanosistema;
6. Avaliar a eficácia de depleção dos microRNAs pelo nanosistema

CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS EM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

DE ARAÚJO, M. A. et al. Identification of microRNAs with dysregulated expression in status epilepticus induced epileptogenesis. PloS one, v. 11, n. 10, p. e0163855, 2016.

RESEARCH ARTICLE

Identification of microRNAs with Dysregulated Expression in Status Epilepticus Induced Epileptogenesis

Mykaella Andrade de Araújo¹, Thalita Ewellyn Batista Sales Marques¹, Shirley Octacílio-Silva², Carmem Lúcia de Arroxelas-Silva¹, Marília Gabriella Alves Goulart Pereira³, José Eduardo Peixoto-Santos⁴, Ludmyla Kandratavicius⁴, João Pereira Leite⁴, Norberto Garcia-Cairascó⁵, Olagide Wagner Castro⁶, Marcelo Duzzioni⁶, Geraldo Aleixo Passos⁷, Maria Luisa Paçó-Larson⁸, Daniel Leite Góes Gitai^{1*}

1 Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **2** Department of Morphology, Health and Biological Sciences Center, Federal University of Sergipe, Aracajú, Sergipe, Brazil, **3** Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, **4** Division of Neurology, Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **5** Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **6** Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **7** Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **8** Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

* danielgitai@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Araújo MAd, Marques TEBS, Octacílio-Silva S, Arroxelas-Silva CLd, Pereira MGAG, Peixoto-Santos JE, et al. (2016) Identification of microRNAs with Dysregulated Expression in Status Epilepticus Induced Epileptogenesis. PLoS ONE 11 (10): e0163855. doi:10.1371/journal.pone.0163855

Editor: Partha Mukhopadhyay, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: April 29, 2016

Accepted: September 15, 2016

Published: October 3, 2016

Copyright: © 2016 Araújo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All Microarray data are available from the ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MEXP-4633.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number: 484911/2012-0; DLG, JPL, NGC, MLP; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), DLG, TEBSM; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MAA, TEBSM;

Abstract

The involvement of miRNA in mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) pathogenesis has increasingly become a focus of epigenetic studies. Despite advances, the number of known miRNAs with a consistent expression response during epileptogenesis is still small. Addressing this situation requires additional miRNA profiling studies coupled to detailed individual expression analyses. Here, we perform a miRNA microarray analysis of the hippocampus of Wistar rats 24 hours after intra-hippocampal pilocarpine-induced Status Epilepticus (H-PILO SE). We identified 73 miRNAs that undergo significant changes, of which 36 were up-regulated and 37 were down-regulated. To validate, we selected 5 of these (10a-5p, 128a-3p, 196b-5p, 352 and 324-3p) for RT-qPCR analysis. Our results confirmed that miR-352 and 196b-5p levels were significantly higher and miR-128a-3p levels were significantly lower in the hippocampus of H-PILO SE rats. We also evaluated whether the 3 miRNAs show a dysregulated hippocampal expression at three time periods (0h, 24h and chronic phase) after systemic pilocarpine-induced status epilepticus (S-PILO SE). We demonstrate that miR-128a-3p transcripts are significantly reduced at all time points compared to the naïve group. Moreover, miR-196b-5p was significantly higher only at 24h post-SE, while miR-352 transcripts were significantly up-regulated after 24h and in chronic phase (epileptic) rats. Finally, when we compared hippocampi of epileptic and non-epileptic humans, we observed that transcript levels of miRNAs show similar trends to the animal models. In summary, we successfully identified two novel dysregulated miRNAs (196b-5p

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant numbers: 2016/17590-3 and 2015/208409, JPL, NGC, MLP; and Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HCRP), JPL, NGC, MLP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

and 352) and confirmed miR-128a-3p downregulation in SE-induced epileptogenesis. Further functional assays are required to understand the role of these miRNAs in MTLE pathogenesis.

Introduction

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is a common and often medically intractable chronic disease, characterized by spontaneous and recurrent seizures (SRS) [1]. It may develop as a result of a strong cerebral insult, such as status epilepticus (SE) an prolonged epileptic seizure of greater than five minutes or more than one seizure within a five-minute period without the person returning to normal between seizures [2]. SE can cause permanent structural and physiology alterations in the brain, leading to the establishment of an epileptogenic state [3, 4]. These changes include neurodegeneration, neurogenesis, gliosis, axonal damage or sprouting, dendritic plasticity, and inflammation in hippocampus and other limbic structures [5–10]. Although our understanding of epileptogenesis is incomplete, previous research indicates that it is associated with a network-wide reorganization of gene expression in the affected brain [11–20]. Therefore, uncovering the specific factors that lead to the dysregulation of several genes may provide important insights into the epileptogenic process. Recent studies have identified transcription factors driving up- and down-regulation of protein-coding genes after SE [21–24]. Moreover, evidence is emerging that MTLE pathogenesis is controlled by epigenetic factors, including chromatin methylation and small noncoding RNAs [25–29].

MicroRNAs (miRNAs) represent an evolutionarily conserved class of small (22–24 nucleotides) double-strand non-coding RNAs that regulate the expression of target mRNAs by inducing degradation or a reduction in its translational efficiency [30]. Each miRNA can bind to several different transcripts, regulating more than 60% of protein-coding genes [31]. Genes encoding miRNA are transcribed by either RNA polymerase II or III, producing a primary miRNA which is further processed by a Drosha microprocessor complex into stem-loop precursor miRNA (pre-miRNA). After export to the cytoplasm, the pre-miRNA undergoes a final processing by the RNase III enzyme Dicer, generating mature double-stranded miRNA (22–24 nt). One strand is selected and loaded onto the RNA-induced silencing complex (RISC), where Argonaute (Ago) proteins mediate the base-pairing interactions between the miRNA and the 3' untranslated region (3' UTR) of target mRNAs resulting in selective post-transcriptional inhibition [32–34].

miRNAs are involved in numerous physiological processes and evidence is emerging that they are dysregulated in acute and chronic diseases of the nervous system such as epilepsy [35–39]. Indeed, since the first report of a change in miRNA expression (miR-132) after a seizure [40], the involvement of miRNAs in epilepsy pathogenesis has become a focus for epigenetic research. Recent work suggests that interfering with miRNA biogenesis increases neuronal excitability and seizure severity [41]. This is consistent with the results of profiling studies, showing that miRNAome undergoes changes in expression during epileptogenesis in both TLE human and animal models [42–57]. However, despite this progress the detailed mechanisms underlying changes in miRNAs and their functional effects during MTLE pathogenesis remain unclear. Part of the reason for this might be the limited number of miRNAs so far identified that show a conserved expression response [58]. Thus, additional miRNA profiling studies are needed to support the cross-comparison of data and to elucidate the role of miRNA in MTLE epileptogenesis. Here, we directly address this shortfall by employing a miRNA microarray

approach to screen miRNAs in acute phase of the PILO-induced SE. Furthermore, by using RT-qPCR, we extend expression analysis to other epileptogenic phases, including the chronic phase of epilepsy in human patients.

Materials and Methods

Ethics statement

All procedures were performed according to the appropriate ethical guidelines and were approved by the ethical committees of the institutions enrolled. The Brazilian Society for Neuroscience and Behavior approved the experimental model studies, according to international guidelines for ethical use of animals in research, such as those from the Society for Neuroscience. Research Ethics Committee of the Federal University of Alagoas (#011462/2010-83) and Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (#195/2005) approved all research protocols performed. All efforts were made to reduce the number of animals used and to avoid unnecessary suffering.

All TLE patients or next-of-kin (for control cases) enrolled in this study read and signed a written Informed Consent Term, previously approved by the Research Ethics Committee. The collection and evaluation of human samples followed the principles of the Declaration of Helsinki, were registered in Brazilian's Health Ministry and approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas, where samples were collected (processes HCRP 1781/2010, 15703/2011 and 9370/2003).

Animal

Experiments were conducted on 48 male adult Wistar rats (200–250 g): 36 were designated for systemic pilocarpine (S-PILO) and respective control groups and were sourced from the main breeding stock of the Federal University of Alagoas; 12 rats were designated for the intra-hippocampal PILO (H-PILO) injection and respective control group and were sourced from the main breeding stock of the University of São Paulo (Ribeirão Preto campus). Rats were kept at 22°C in groups of four per cage with free access to food and water, in a 12-h light/dark cycle (lights on at 08:00 am). Animal health was monitored throughout the experimental period as described previously [59]. No animals presented clinical/behavioral signals of pain or unexpected distress used as humane endpoint criteria for euthanasia.

S-PILO SE induction

Animals were injected intra-peritoneally (ip) with scopolamine butyl bromide (1 mg/kg) in order to minimize peripheral effects, followed by S-PILO (320 mg/kg; ip) after 30 min. SE was defined as self-sustained seizure behavior or intermittent seizures of less than 5 minutes. PILO administration (110 mg/kg) was repeated after 45 min if the rat did not display seizure behavior. Animals were kept in SE for 90 min before seizure interruption with diazepam (5 mg/kg; ip). All rats presented seizures higher than stage 3 according to the Racine scale [60].

For the chronic group, animals were individually placed in acrylic cages and their behavior was recorded for up to 8 hours per day, during 10 weeks. All the videos were analyzed by two independent observers and the severity of spontaneous seizures was classified according to Racine scale [60]. All of these animals showed two or more spontaneous recurrent seizure with severity scores equal or greater than 3.

In total, three groups of rats were subjected to S-PILO induced SE: i) animals euthanized immediately (0h) after SE reversion (n = 6); ii) animals euthanized 24h after SE reversion

(n = 6), and; iii) animals euthanized 11 weeks after SE (Chronic group, n = 6). Naive rats were used as the control group (n = 6).

H-PILO SE induction

Surgery and microinjections were performed according to Marques et al. [61]. The experimental group (n = 6) was injected with pilocarpine (1.2 mg/ μ l, 1 μ l) and the control group (n = 6) was injected with saline (0.9%; 1 μ l). The H-PILO injected animals had 90 minute duration SE, after which seizures were stopped with diazepam (DZP; 5 mg/kg; ip). Control animals were also injected with DZP under the same conditions. These animals were euthanized 24h after SE reversion and only the contra lateral hippocampus was used for gene expression analysis.

Euthanasia

All the animals were euthanized by decapitation using a guillotine. Hippocampi were immediately removed, dissected on an ice-chilled plate and stored in liquid nitrogen until RNA isolation.

MTLE patients and controls

All patients were referred for pre-surgical assessment due to drug-resistant epilepsy. Patients were evaluated at the Ribeirão Preto Epilepsy Surgery Program using standardized protocols. Pre-surgical investigation at the Epilepsy Monitoring Unit included detailed clinical history, neurological examination, interictal and ictal video-electroencephalography (Video-EEG), and neuropsychology evaluation. The definition of MTLE followed Engel's criteria [62]. Clinical data from the MTLE patients were obtained from medical records, and included the following information: presence and age of initial precipitant injury (IPI); estimated monthly frequency of seizures; epilepsy duration; global IQ; verbal and non-verbal memory performance. MTLE specimens were derived from 14 drug-resistant MTLE patients who underwent a standard en bloc anterior temporal resection for seizure control.

Age- and sex-matched tissue from non-epileptic controls (Ctrl, n = 4), obtained in necropsies, were processed and analyzed in the same manner as the surgical cases. All control tissue was collected between 4 ± 1.6 hours after death (maximum of 6 hours postmortem). Underlying diseases causing death were cardiomyopathy, sepsis, or hepatic failure, with no history or evidence of brain pathological abnormalities on postmortem examination of the mesial temporal structures. Surgical and necropsy specimens were cut into 1 cm thick slices, in the coronal plane, immediately frozen and stored at -80°C .

RNA purification

Total RNA was purified using mirVana total RNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) for microarray experiment or Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) for RT-qPCR, following the manufacturers protocol. The quality of total RNA was assessed by analysis of the ratio of 28S to 18S ribosomal RNAs after electrophoresis in 1% agarose gel. For microarray experiments, the miRNA fraction was isolated from 50 μ g of total RNA using a flashPAGE Fractionator System (Ambion).

miRNA microarray analysis

For miRNA labeling, microarray hybridization and data analysis, we followed the procedures described in [63]. The oligo microarray was prepared by spotting the mirVana miRNA Probe Set (Ambion AM 1564V2) on Schott Nexterion E-Scho-1064016 slides (Schott, Mainz,

Germany) using a Generation III Array Spotter (Amersham Biosciences-Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Cy3 labeled miRNAs (for microarray hybridization) were generated using the mirVana miRNA Labeling Kit protocol (Ambion). Labeled miRNA were hybridized with the microarray slides in salt solution for 15 h at 42°C in an Automated Slide Processor ASP (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). After washing, the slides were scanned using a Generation III array scanner (Amersham Biosciences-Molecular Dynamics) in association with the ArrayVision microarray quantification software (Imaging Research Inc., GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Normalization of data was performed by quantile in the R environment (version 2.11.0) using the AROMA light package (<http://www.bioconductor.org>). Statistical data were analyzed using the Multiexperiment Viewer (MeV) software (version 3.1 available online at <http://www.tm4.org/mev.html>). The paired significance analysis of microarrays analysis (SAM available online at <http://www.stat.stanford.edu/tibs/SAM>), with a false discovery rate (FDR) of 0.05, were used as statistical method to identify the differentially expressed miRNAs [64]. Cluster-TreeView was used to perform the cluster analysis and to construct the miRNA expression profiles [65]. The Microarray data are available in the ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MEXP-4633.

RT-qPCR

The RT-qPCR was performed by using TaqMan MicroRNA Assay (Life Tech) to assess the expression of miR-128a-3p (2216 Assay ID); miR-196b-5p (2215 Assay ID); miR-352 (1339 Assay ID), miR-324-3p (579 Assay ID), miR-10a-5p (387 Assay ID). In the reverse transcription (RT) step, cDNA was generated from 1 µg of total RNA using Taqman MicroRNA reverse transcription kit (Life Tech) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was carried out on a StepOnePlus PCR System (Applied Biosystems) by using TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Tech) according to the supplier's instructions. miR expression was normalized by the combination of U6snRNA and snoRNA for animal analysis as described previously [66], and with U6snRNA and RNU24 for human analysis. Relative fold change was determined by the 2^{-DDCt} method [67]. The absence of contamination was confirmed by PCR amplification in the absence of cDNA. Each assay was performed in triplicate and mean values were used for further analysis.

Statistical Analysis

Statistics were performed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Unpaired Student's *t*-test or Mann Whitney tests were used for comparison of RT-qPCR results related to: i) the microarray validation step (24h versus control), and ii) the human epileptic and non-epileptic analysis. A parametric ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test was used to compare among the different epileptogenesis time points for the expression analysis. For TLE patients, Spearman's correlation test was used to evaluate the associations between clinical characteristics and microRNA levels, and Student's *t*-test were used to evaluate differences in microRNA levels regarding memory scores, surgical outcome (remission vs no-remission), occurrence of initial precipitating injury (IPI), epilepsy focus (right vs left temporal lobe), and sex. Mean differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Bioinformatics analysis

Experimentally validated targets of hsa-miR-128a-3p and 196b-5p were compiled from the MicroRNA Target database (miRTarBase)(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). Pathway

analysis was performed by Gene Ontology (GO) to determine the biological significance of these targets, and evaluate their representation (p-value <0.05).

Results

microRNAs microarray profile coupled to RT-qPCR validation in hippocampus of rat 24h after H-PILO induced SE

We used the mirVana miRNA Probe Set covering over 662 miRNAs to identify novel dysregulated miRNAs in rat hippocampi 24h after SE. The miRNA microarray data from the control versus PILO-induced SE experiment showed clear hierarchical clustering (Fig 1). We identified 73 significantly dysregulated microRNAs: 36 (Fig 1A) up-regulated (p < 0.05, FC > 1) and 37 miRNAs (Fig 1B) down-regulated (p < 0.05, FC < 1).

To verify the accuracy of microarray results we chose a selection of miRNAs from up-regulated (miR-10a-5p, miR-196b-5p, miR-352 and miR-324-3p) and down-regulated (miR-128a-3p) categories for confirmation using the RT-qPCR method. These miRNAs were selected because of their consistent profile among the replicates of each experimental group. We

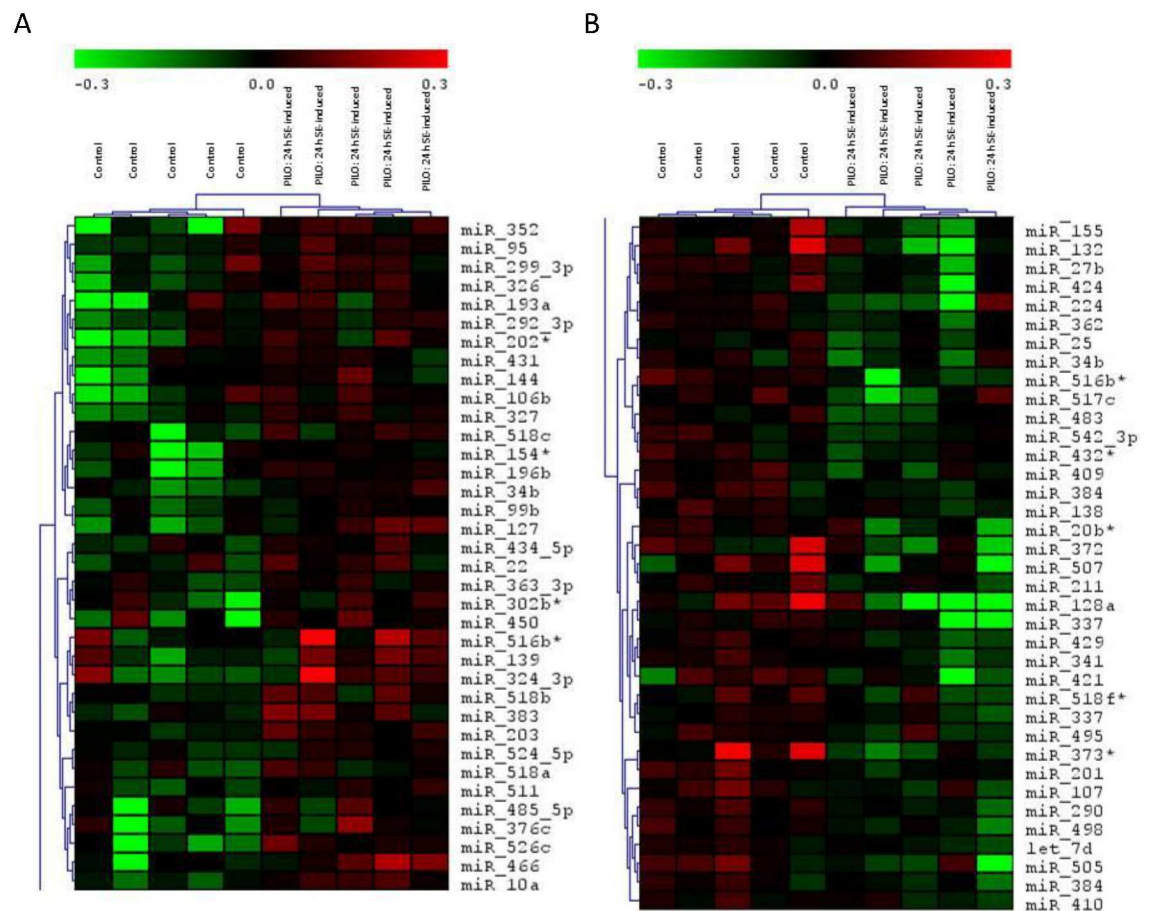


Fig 1. Hierarchical clustering of the 73 miRNA with significantly different expression in 24h post-SE hippocampus versus control experiment. Rows represent individual genes, and columns represent individual samples. The colorgram depicts high (red), average (black) and low (green) expression levels. A) Upregulated microRNAs. B) Downregulated microRNAs. (n = 5 for both H-PILO and control groups).

doi:10.1371/journal.pone.0163855.g001

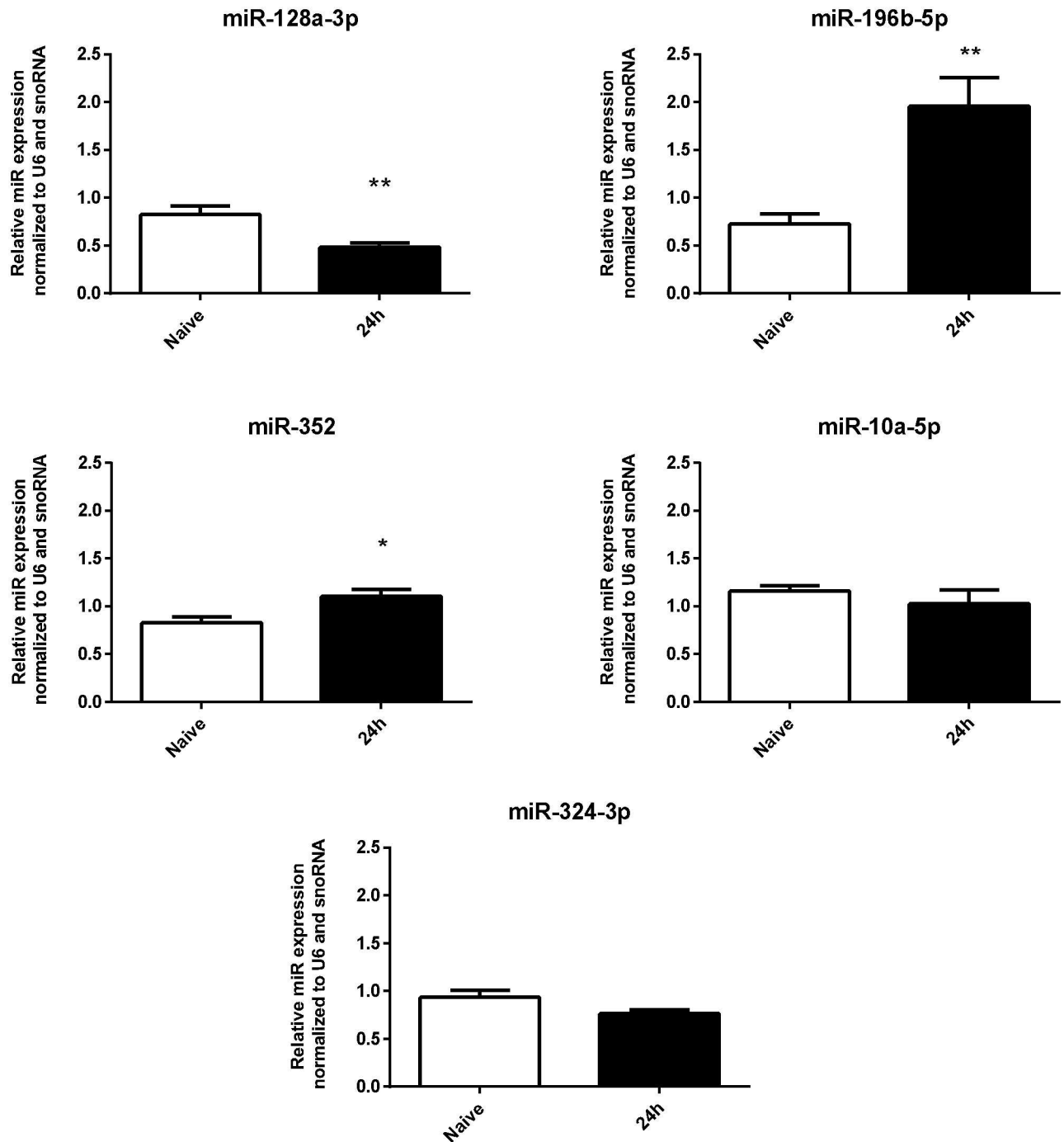


Fig 2. RT-qPCR validation of microarray results. miRs 196b-5p and 352 were significantly increased and miR-128a-3p was significantly reduced in 24h post-SE hippocampus compared with control group. miRs 10a-5p and 324-3p did not show statistically significant differences. (values are mean±SEM, n = 5-6 in each group, *p < 0.05, Unpaired t test).

doi:10.1371/journal.pone.0163855.g002

observed that the relative levels of miRs 196b-5p and 352 were significantly higher while the level of miR-128a-3p was significantly reduced in the hippocampi of SE-induced rats in comparison with the control groups (Fig 2). For these miRNAs, the RT-qPCR results were consistent with the microarray analysis.

However, there were no statistical differences between the RT-qPCR for miRs 10a-5p and 324-3p, and the results observed in the microarray analysis could therefore not be validated.

Expression Patterns of miR-128a-3p, miR-196b-5p and miR-352 in three Stages of S-PILO-SE induced epileptogenic process

We evaluated whether the selected miRNAs also show a dysregulated hippocampal expression at different time points after S-PILO-induced SE. The analysis was performed by RT-qPCR using tissue samples of control rats and rats that were euthanized immediately (0h), 24h, and 10-12 weeks (chronic phase) after SE (Fig 3). miR-128a-3p transcripts were found to be significantly reduced in post-SE rat hippocampi for all three time points compared with the naïve group. For miR-196b-5p transcript levels, the only significant change was a large increase in the 24h post-SE group compared with all other groups. Finally, miR-352 transcripts were significantly up-regulated in the 24h group compared with naïve, and in the chronic phase group compared with naïve or 0h groups.

Evaluation of miR-128a-3p and miR-196b-5p expression in the hippocampi of epileptic and non-epileptic humans

Since that only miR-128a-3p and miR-196b-5p are conserved in human and to strengthen the clinical relevance of our study, we assessed whether these miRs expression are dysregulated in human tissue samples. To achieve this, we compared hippocampal specimens from TLE patients with hippocampal sclerosis (HS) against hippocampal samples from non-epileptic individuals. Although the RT-qPCR results were not significantly different for the two

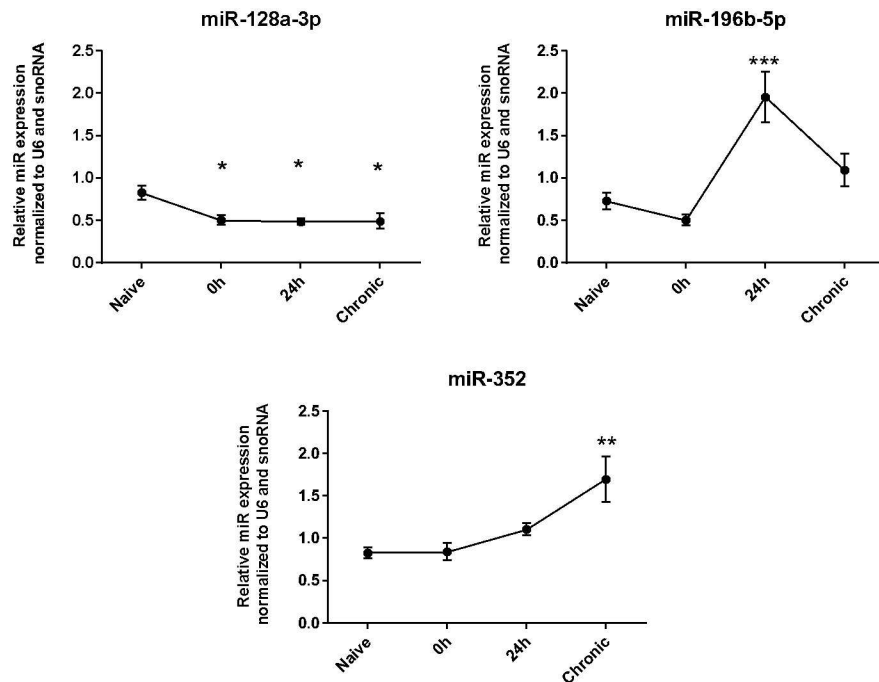


Fig 3. Expression patterns of miR-128a-3p, miR-196b-5p and miR-352 during S-PILO-SE induced epileptogenesis. RT-qPCR measurements of the relative miRs levels (hippocampus) in three different time points after SE-induction (values are mean±SEM, n = 5-6 in each group, *p < 0.05, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

doi:10.1371/journal.pone.0163855.g003

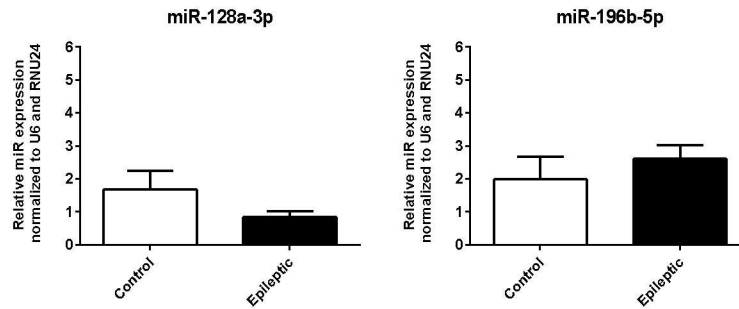


Fig 4. Relative expression of miR-128a-3p and miR-196b-5p in hippocampi from epileptic and non-epileptic humans. RT-qPCR analysis (values are mean±SEM, biopsy specimens from TLE-HS patients (n = 10-14) and non-epileptic autopsy samples (n = 4), Mann Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0163855.g004

miRNAs, transcript levels showed similar downward (miR-128a-3p) or upward (miR-196b-5p) trends to those observed in the animal model (Fig 4).

In TLE patients, there was no correlation between miR-128a-3p or miR-196b-5p levels and age at surgery, seizure frequency, age at first seizure, age at seizure recurrence, or global IQ (S1 Table). Moreover, there was no difference in the expression of miR-128a-3p or miR-196b-5p when comparing surgical outcome, verbal memory score, non-verbal memory score, IPI, epileptic focus, or sex (S2 Table).

Bioinformatics analysis of miR-128a-3p and 196b-5p targets

To gain insights into functional links between changes in the expression of miR-128a-3p and 196b-5p and epileptogenesis, we performed an analysis of cellular pathways potentially enriched in these miRs targets. We identified 490 and 139 validated targets of hsa-miR-128a-3p and 196b-5p, respectively, deposited in miRTarBase (S3 and S4 Tables). The pathways significantly over-represented in these miRNA targets are listed in Tables 1 and 2, where enrichment test p values for each GO term are indicated.

Discussion

Emerging data show that status epilepticus (SE) triggers a reorganization of miRNA expression in the brain [58, 68, 69]. We employed microarray analyses to identify dysregulated miRNAs in SE-induced epileptogenesis, detecting 73 miRNAs (37 downregulated and 36 upregulated) with differential expression in 24h post-SE rat hippocampi (Fig 1). To strengthen the discussion of our own data in the context of previously published studies, we performed a cross-comparison using data from large-scale profile of miRNA responses during the epileptogenic process, which are available in the EpimiR database [70]. Only 15 of the miRNAs identified in our analysis (miRs 518c-3p, 516b-3p, 518b, 524-5p, 518a-3p, 362-5p, 517c-3p, 409-3p, 20b-3p, 372-3p, 507, 421-5p, 518f-5p, 373-5p, 201-5p) had not yet been linked to epilepsy/seizure. In order to identify which of our miRNAs had a conserved response in acute phase of SE-induced epileptogenesis, we further restricted the comparison to studies with profiled miRNA responses in the 24 h after SE induction [47, 49, 54, 57]. A total of 24 miRNAs detected in our study have also been identified in previous studies. Moreover, 14 of our miRNAs showed a change in expression that was in the same direction in at least one of these profiling studies. Interestingly, despite the acknowledged difficulties of cross-comparing data derived from different experimental protocols, most of the miRNAs (22-3p, 139-5p, 144-3p, 203-3p, 326-3p, 431-5p, 196b-5p, 25-3p, 337-3p, 495-3p, 34b-5p, 542-3p) showed overlap with other post-SE models such as

Table 1. GO Pathway significantly overrepresented among the miR-128a-3p validated targets.

| Term | Description | P-value |
|----------|---|----------|
| (P06959) | CCKR signaling map | 3.20E-04 |
| (P00027) | Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway | 8.51E-04 |
| (P00047) | PDGF signaling pathway | 1.04E-03 |
| (P00059) | p53 pathway | 1.38E-03 |
| (P00048) | PI3 kinase pathway | 2.22E-03 |
| (P06664) | Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway | 4.67E-03 |
| (P00032) | Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade | 8.34E-03 |
| (P04398) | p53 pathway feedback loops 2 | 9.20E-03 |
| (P00020) | FAS signaling pathway | 9.23E-03 |
| (P00005) | Angiogenesis | 1.03E-02 |
| (P05911) | Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin | 1.46E-02 |
| (P00033) | Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade | 1.72E-02 |
| (P00034) | Integrin signalling pathway | 1.78E-02 |
| (P00029) | Huntington disease | 1.92E-02 |
| (P04385) | Histamine H1 receptor mediated signaling pathway | 2.16E-02 |
| (P00056) | VEGF signaling pathway | 2.98E-02 |
| (P00049) | Parkinson disease | 3.35E-02 |
| (P04380) | Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway | 4.15E-02 |
| (P00018) | EGF receptor signaling pathway | 5.00E-02 |

doi:10.1371/journal.pone.0163855.t001

lithium-PILO, kainite or electrical stimulation. These common miRNAs are particularly attractive for further functional investigation because they likely to be disease, rather than model-specific. On the other hand, the response of certain miRNAs (e.g. miR-146 and miR-134) following SE contrasts with results from other studies, probably due to specificities of the H-PILO or technical limitations inherent in the use of a large-scale experimental approach. Indeed, there are few overlaps among miRNAs profiles generated by using high-throughput platforms,

Table 2. GO Pathway significantly overrepresented among the miR-196b-5p validated targets.

| Term | Description | P-value |
|----------|---|----------|
| (P00010) | B cell activation | 1.70E-04 |
| (P00028) | Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction | 1.99E-04 |
| (P06664) | Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway | 1.44E-03 |
| (P06959) | CCKR signaling map | 1.48E-03 |
| (P00006) | Apoptosis signaling pathway | 1.80E-03 |
| (P00053) | T cell activation | 4.88E-03 |
| (P00026) | Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway | 6.25E-03 |
| (P02773) | S-adenosylmethionine biosynthesis | 2.08E-02 |
| (P00047) | PDGF signaling pathway | 2.14E-02 |
| (P00019) | Endothelin signaling pathway | 2.31E-02 |
| (P05911) | Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin | 3.11E-02 |
| (P00036) | Interleukin signaling pathway | 3.22E-02 |
| (P04378) | Beta2 adrenergic receptor signaling pathway | 4.19E-02 |
| (P04377) | Beta1 adrenergic receptor signaling pathway | 4.19E-02 |
| (P04373) | 5HT1 type receptor mediated signaling pathway | 4.19E-02 |
| (P00034) | Integrin signalling pathway | 4.70E-02 |

doi:10.1371/journal.pone.0163855.t002

even considering those from the same model. One reason for this is that miRNA microarray data need to undergo an individual validation step. We observed that, from the subset of five miRNAs (10a-5p, 128a-3p, 196b-5p, 324-3p and 352) selected for individual RT-qPCR analysis, three (miRs-128a-3p, 196b-5p and 352) presented consistent results with the microarray analysis (Fig 1). These were consequently chosen for more extensive expression analysis during the epileptogenic process.

We used RT-qPCR to measure changes in expression of miR-128a-3p, 196b-5p and 352 expression at three time periods (0h, 24h and 10-12 weeks) after S-PILO induced SE. We observed: i) down-regulation of miR-128a-3p in the three stages of epileptogenesis; ii) up-regulation of miR-196b-5p only at 24h post-SE, and; iii) up-regulation of miR-352 in both 24h and chronic post-SE time points. It is important to highlight that the results obtained with S-Pilo model were similar to those observed for the H-Pilo model. Thus, the potential differences between the activated/suppressed pathways in the induction of seizures in these two models do not seem to have a differential impact on the expression of these miRs.

Despite of miR-128a-3p expression is dysregulated in hippocampus of epileptic rats (chronic group), we did not observe a statistical significant differences of its levels in hippocampal biopsy specimens from TLE-HS patients comparing with non-epileptic autopsy samples. This finding could be a consequence of the fundamental physiological differences between rats and humans. Alternatively, it could be due to various confounding factors that are common in the analysis of differential expression using human specimens, such as ethnicity, BMI, lifestyle, and other individual characteristics. Tissue origin (i.e. biopsy or autopsy) is also a critical issue because autopsy delay would tend to confound the difference between control and TLE hippocampal biopsy samples [42, 46]. Indeed, this could explain why our RT-qPCR results show that miR transcript levels tend to change in a similar direction to that observed in the animal model. However, whether dysregulation of miRs 128a-3p and 196b-5p can be extended to epileptic patients requires further clarification.

In favor of that is our finding of hsa-miRs 128a-3p and 196b-5p target genes enrichment in common signaling pathways that have been associated to the molecular mechanisms underlying seizures and epilepsy. For instance, we observed that the integrin signalling pathway that was found significantly over-represented for both miR-128a-3p and 196b-5p targets (Table 3) plays a role in several neuropathological processes of epileptogenesis [71–74].

It is also known that miR-128 is highly enriched in adult mouse and human brains, and has recently been linked to epilepsy [75]. Similar to our observation, prominent down-regulation of miR-128 has been recorded in the acute and chronic phase of Litio-PILO induced epileptogenesis [75]. Moreover, it has been shown that the absence of miR-128 expression in miR-128-2–/– mice causes seizure-induced death, which is prevented by its overexpression [76]. Although the mechanism of action remains a source of speculation, these data strongly suggest an anti-epileptogenic role for miR128a. In fact, the bioinformatics analysis of the validated

Table 3. GO Pathway commonly overrepresented among the miR-128a-3p and 196b-5p validated targets.

| GO | Description |
|----------|---|
| (P06959) | CCKR signaling map |
| (P00027) | Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway |
| (P00047) | PDGF signaling pathway |
| (P06664) | Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway |
| (P05911) | Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin |
| (P00034) | Integrin signalling pathway |

doi:10.1371/journal.pone.0163855.t003

targets of hsa-miR-128 showed a significantly over-representation of pathways such as P53, Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade (Table 1), which are enhanced after SE insult.

In contrast, the involvement of miR-196b-5p in epileptogenesis and epilepsy is unknown. miR-196b has been identified as a regulator of tumorigenesis and its overexpression may be associated with the occurrence of preoperative seizures in low-grade gliomas [77]. Significantly over-represented signaling pathways for miR-196b-5p include apoptosis signaling (Table 2). A negative regulation of anti-apoptotic genes, by the up-regulation of miR-196b, could contribute to the cell death seen after the SE. In fact, the MiRTar tool indicated BCL2 as a potential target of miR-196b-5p by immunohistochemical-based validation. The anti-apoptotic BCL2 gene is down-regulated in the hippocampus of rats 48 hours after KA-induced SE [78], which may contribute to neurodegeneration occurring during epileptogenesis. However, the potential involvement up-regulation of miR-196b-5p in MTLE pathogenesis by regulating the BCL2 will require further study. On the other hand, a recent study showed that the expression of PI3K/AKT/mTOR proteins and mRNAs were increased following upregulation of the expression of miR-196b-5p in cancer cells [79]. Interesting some member of this pathway (P-Akt and p70S6K) are also increased in the hippocampi of children with MTLE and the negative modulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway has been suggested as a novel therapeutic target for the treatment of MTLE [80]. Further study may show whether the up-regulation of miR-196b-5p contribute to activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in MTLE pathogenesis.

Identifying a potential link between miR-352 and epilepsy is challenging because the biological role of this miR is unknown. An additional complication is the absence of an experimentally validated target for miR-352. The only functional assay indicated that this miRNA targets the HEXB gene and may regulate lysosomal-associated proteins following ischemic stroke [81]. Hexb is the beta subunit of the lysosomal enzyme beta-hexosaminidase. When mutated, this gene can cause Sandhoff disease—a progressive neurodegenerative disorder characterized by accumulation of GM2 gangliosides that can correlate with seizures [82]. This suggests that an investigation of HEXB and the identification of other direct targets would be a productive next step towards uncovering the role of miR-352 in epileptogenesis. A recent study showed that SE results in significant accumulation of autophagosome- and lysosome-associated proteins in neurites [83]. The authors suggested that lysosomal/autophagic mechanisms reflect an attempt to survive the epileptic insult by breaking down non-essential components. Further functional studies are required to investigate the miR-352 involvement in autophagy dynamics during epileptogenesis.

Supporting Information

S1 Table. Correlation between clinical characteristics and miR-128a-3p and miR-196b-5p expression levels in TLE patients.

(DOCX)

S2 Table. Levels of miR-128a-3p and miR-196b-5p in accordance to memory performance, epilepsy remission, IPI, epileptic focus or sex.

(DOCX)

S3 Table. Validated targets of miR-128a-3p based on miRTarBase.

(XLSX)

S4 Table. Validated targets of miR-196b-5p based on miRTarBase.

(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: JPL MLPL NGC DLGG.

Formal analysis: JEPS LK MAA SOS.

Funding acquisition: JPL NGC MLPL.

Investigation: MAA TEBSM CLAS MGAGP SOS JEPS.

Methodology: MLPL GAP DLGG.

Project administration: DLGG.

Resources: JPL MLPL DLGG.

Supervision: JPL MLPL DLGG.

Validation: MD OWC MAA TEBSM.

Visualization: DLGG.

Writing – original draft: GAP LK MD OWC MAA TEBSM MLPL DLGG.

Writing – review & editing: MLPL JPL NGC DLGG.

References

1. Engel J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996; 26: 141–150. doi: [10.1016/S0920-1211\(96\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00043-5) PMID: [8985696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8985696/)
2. Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014; 10: 1693–705. doi: [10.2147/NDT.S50371](https://doi.org/10.2147/NDT.S50371) PMID: [25228809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25228809/)
3. Williams PA, Hellier JL, White AM, Staley KJ, Dudek FE. Development of spontaneous seizures after experimental status epilepticus: implications for understanding epileptogenesis. *Epilepsia.* 2007; 48 Suppl 5: 157–63. doi: [10.1111/j.1528-1167.2007.01304.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01304.x) PMID: [17910596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17910596/)
4. Lewis DV. Losing neurons: selective vulnerability and mesial temporal sclerosis. *Epilepsia.* 2005; 46 Suppl 7:39–44. doi: [10.1111/j.1528-1167.2005.00306.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00306.x) PMID: [16201994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16201994/)
5. Meldrum B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 1991; 10: 55–61. doi: [10.1016/0920-1211\(91\)90095-W](https://doi.org/10.1016/0920-1211(91)90095-W) PMID: [1790773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1790773/)
6. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2009; 1: 97–115. PMID: [21383882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383882/)
7. Coulter DA. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia.* 1999; 40 Suppl 1: S23–33. doi: [10.1111/j.1528-1157.1999.tb00875.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00875.x) PMID: [10421558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10421558/)
8. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011; 7: 31–40. doi: [10.1038/nrneurol.2010.178](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178) PMID: [21135885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135885/)
9. Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, et al. Pathophysiological mechanisms of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic?. *Curr Med Chem.* 2014; 21: 663–88. doi: [10.2174/0929867320666131119152201](https://doi.org/10.2174/0929867320666131119152201) PMID: [24251566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24251566/)
10. Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* Elsevier Inc.; 2009; 14: 16–25. doi: [10.1016/j.yebeh.2008.09.023](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.09.023) PMID: [18835369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835369/)
11. Laurén HB, Lopez-Picon FR, Brandt AM, Rios-Rojas CJ, Holopainen IE. Transcriptome analysis of the hippocampal CA1 pyramidal cell region after kainic acid-induced status epilepticus in juvenile rats. *PLoS One.* 2010; 5: e10733. doi: [10.1371/journal.pone.0010733](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010733) PMID: [20505763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20505763/)
12. Jimenez-Mateos EM, Hatazaki S, Johnson MB, Bellver-Estelles C, Mouri G, Bonner C, et al. Hippocampal transcriptome after status epilepticus in mice rendered seizure damage-tolerant by epileptic preconditioning features suppressed calcium and neuronal excitability pathways. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 442–53. doi: [10.1016/j.nbd.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.008) PMID: [18804535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804535/)
13. Okamoto OK, Janjoppi L, Bonone FM, Pansani AP, da Silva A V, Scorza FA, et al. Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. *BMC Genomics.* 2010; 11: 230. doi: [10.1186/1471-2164-11-230](https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-230) PMID: [20377889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20377889/)

14. Lukasiuk K, Kontula L, Pitkänen A. cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 271–9. doi: [10.1046/j.1460-9568.2003.02461.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02461.x) PMID: [12542663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12542663/)
15. Hunsberger JG, Bennett AH, Selvanayagam E, Duman RS, Newton SS. Gene profiling the response to kainic acid induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005; 141: 95–112. doi: [10.1016/j.molbrainres.2005.08.005](https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.08.005) PMID: [16165245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16165245/)
16. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Breit T, Rauwerda H, Lopes da Silva FH, et al. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2006; 26: 11083–110. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2766-06.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-06.2006) PMID: [17065450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17065450/)
17. Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DH. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci*. 2003; 23: 2218–27. PMID: [12657681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12657681/)
18. Magwire MM, Bayer F, Webster CL, Cao C, Jiggins FM. Successive increases in the resistance of *Drosophila* to viral infection through a transposon insertion followed by a Duplication. *Neurosci*. 2003; 18: 2792–802. doi: [10.1371/journal.pgen.1002337](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002337) PMID: [22028673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22028673/)
19. Hansen KF, Sakamoto K, Pelz C, Impy S, Obrietan K. Profiling status epilepticus-induced changes in hippocampal RNA expression using high-throughput RNA sequencing. *Sci Rep*. 2014; 4: 6930. doi: [10.1038/srep06930](https://doi.org/10.1038/srep06930) PMID: [25373493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25373493/)
20. Romcy-Pereira RN, Gitaí DLG, Gitaí LLG, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML. Genes e epilepsia II: expressão gênica diferencial. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54: 461–466. doi: [10.1590/S0104-42302008000500022](https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000500022) PMID: [18989569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18989569/)
21. Mazzuferi M, Kumar G, van Eyll J, Danis B, Foerch P, Kaminski RM. Nrf2 defense pathway: Experimental evidence for its protective role in epilepsy. *Ann Neurol*. 2013; 74: 560–8. doi: [10.1002/ana.23940](https://doi.org/10.1002/ana.23940) PMID: [23686862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23686862/)
22. McClelland S, Flynn C, Dubé C, Richichi C, Zha Q, Ghestem A, et al. Neuron-restrictive silencer factor-mediated hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2011; 70: 454–64. doi: [10.1002/ana.22479](https://doi.org/10.1002/ana.22479) PMID: [21905079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21905079/)
23. Engel T, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Mateos EM, Concannon CG, Jimenez-Pacheco A, Moran C, et al. CHOP regulates the p53-MDM2 axis and is required for neuronal survival after seizures. *Brain*. 2013; 136: 577–92. doi: [10.1093/brain/aws337](https://doi.org/10.1093/brain/aws337) PMID: [23361066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23361066/)
24. Torres-Peraza JF, Engel T, Martín-Ibáñez R, Sanz-Rodríguez A, Fernández-Fernández MR, Esglesas M, et al. Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain*. 2013; 136: 1161–76. doi: [10.1093/brain/awt044](https://doi.org/10.1093/brain/awt044) PMID: [23518711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23518711/)
25. Miller-Delaney SFC, Bryan K, Das S, McKiernan RC, Bray IM, Reynolds JP, et al. Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2015; 138: 616–31. doi: [10.1093/brain/awu373](https://doi.org/10.1093/brain/awu373) PMID: [25552301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25552301/)
26. Lee DY, Moon J, Lee S-T, Jung K-H, Park D-K, Yoo J-S, et al. Dysregulation of long non-coding RNAs in mouse models of localization-related epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 462: 433–40. doi: [10.1016/j.bbrc.2015.04.149](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.149) PMID: [25976677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976677/)
27. Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, McKiernan RC, Tanaka K, Mouri G, et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med*. 2012; 18: 1087–94. doi: [10.1038/nm.2834](https://doi.org/10.1038/nm.2834) PMID: [22683779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22683779/)
28. Kobow K, Blümcke I. The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis?. *Epilepsia*. 2011; 52 Suppl 4: 15–9. doi: [10.1111/j.1528-1167.2011.03145.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03145.x) PMID: [21732935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21732935/)
29. Gitaí DLG, Fachin AL, Mello SS, Elias CF, Bittencourt JC, Leite JP, et al. The non-coding RNA BC1 is down-regulated in the hippocampus of Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain after audiogenic kindling. *Brain Res*. Elsevier B.V.; 2011; 1367: 114–121. doi: [10.1016/j.brainres.2010.10.069](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.069) PMID: [20974111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974111/)
30. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281–97. doi: [10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5) PMID: [14744438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744438/)
31. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 2012; 149: 515–24. doi: [10.1016/j.cell.2012.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005) PMID: [22541426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22541426/)
32. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 126–39. doi: [10.1038/nrm2632](https://doi.org/10.1038/nrm2632) PMID: [19165215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19165215/)
33. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 597–610. doi: [10.1038/nrg2843](https://doi.org/10.1038/nrg2843) PMID: [20661255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20661255/)
34. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011; 12: 99–110. doi: [10.1038/nrg2936](https://doi.org/10.1038/nrg2936) PMID: [21245828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21245828/)
35. Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. Epilepsy and microRNA. *Neuroscience*. 2013; 238: 218–29. doi: [10.1016/j.neuroscience.2013.02.027](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.027) PMID: [23485811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23485811/)

36. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 172. doi: [10.3389/fncel.2013.00172](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00172) PMID: [24109432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24109432/)
37. Reschke CR, Henshall DC. microRNA and Epilepsy. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 888: 41–70. doi: [10.1007/978-3-319-22671-2_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_4) PMID: [26663178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26663178/)
38. Lukiw WJ, Alexandrov PN. Regulation of complement factor H (CFH) by multiple miRNAs in Alzheimer's disease (AD) brain. *Mol Neurobiol.* 2012; 46: 11–9. doi: [10.1007/s12035-012-8234-4](https://doi.org/10.1007/s12035-012-8234-4) PMID: [22302353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22302353/)
39. Hébert SS, De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 2009; 32: 199–206. doi: [10.1016/j.tins.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.003) PMID: [19268374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19268374/)
40. Nudelman AS, DiRocco DP, Lambert TJ, Garelick MG, Le J, Nathanson NM, et al. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus.* 2010; 20: 492–8. doi: [10.1002/hipo.20646](https://doi.org/10.1002/hipo.20646) PMID: [19557767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19557767/)
41. Fiorenza A, Lopez-Atalaya JP, Rovira V, Scandaglia M, Geijo-Barrientos E, Barco A. Blocking miRNA Biogenesis in Adult Forebrain Neurons Enhances Seizure Susceptibility, Fear Memory, and Food Intake by Increasing Neuronal Responsiveness. *Cereb Cortex.* 2015; doi: [10.1093/cercor/bhu332](https://doi.org/10.1093/cercor/bhu332) PMID: [25595182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25595182/)
42. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, Engel T, Brennan GP, Sano T, et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *PLoS One.* 2012; 7: e35921. doi: [10.1371/journal.pone.0035921](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035921) PMID: [22615744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615744/)
43. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T, Bray I, Stallings RL, Simon RP, et al. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol.* 2012; 237: 346–54. doi: [10.1016/j.expneurol.2012.06.029](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.029) PMID: [22771761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771761/)
44. Sun Z, Yu JT, Jiang T, Li MM, Tan L, Zhang Q, et al. Genome-wide microRNA profiling of rat hippocampus after status epilepticus induced by amygdala stimulation identifies modulators of neuronal apoptosis. *PLoS One.* 2013; 8: e78375. doi: [10.1371/journal.pone.0078375](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078375) PMID: [24205215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24205215/)
45. Schouten M, Fratantoni SA, Hubens CJ, Piersma SR, Pham TV, Bielefeld P, et al. MicroRNA-124 and -137 cooperativity controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells. *Sci Rep.* 2015; 5: 12448. doi: [10.1038/srep12448](https://doi.org/10.1038/srep12448) PMID: [26207921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26207921/)
46. Roncon P, Soukupová M, Binaschi A, Falcicchia C, Zucchini S, Ferracin M, et al. MicroRNA profiles in hippocampal granule cells and plasma of rats with pilocarpine-induced epilepsy—comparison with human epileptic samples. *Sci Rep.* 2015; 5: 14143. doi: [10.1038/srep14143](https://doi.org/10.1038/srep14143) PMID: [26382856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26382856/)
47. Hu K, Zhang C, Long L, Long X, Feng L, Li Y, et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 2011; 488: 252–7. doi: [10.1016/j.neulet.2010.11.040](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.040) PMID: [21094214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21094214/)
48. Song YJ, Tian XB, Zhang S, Zhang YX, Li X, Li D, et al. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res.* 2011; 1387: 134–40. doi: [10.1016/j.brainres.2011.02.073](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.073) PMID: [21376023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376023/)
49. Jimenez-Mateos EM, Bray I, Sanz-Rodriguez A, Engel T, McKiernan RC, Mouri G, et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am J Pathol.* 2011; 179: 2519–32. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.07.036](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.036) PMID: [21945804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945804/)
50. Pichardo-Casas I, Goff LA, Swerdel MR, Athie A, Davila J, Ramos-Brossier M, et al. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res.* 2012; 1436: 20–33. doi: [10.1016/j.brainres.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.001) PMID: [22197703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197703/)
51. Hu K, Xie YY, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci.* 2012; 13: 115. doi: [10.1186/1471-2202-13-115](https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-115) PMID: [22998082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22998082/)
52. Risbud RM, Porter BE. Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. *PLoS One.* 2013; 8: e53464. doi: [10.1371/journal.pone.0053464](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053464) PMID: [23308228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23308228/)
53. Bot AM, Debski KJ, Lukasiuk K. Alterations in miRNA levels in the dentate gyrus in epileptic rats. *PLoS One.* 2013; 8: e76051. doi: [10.1371/journal.pone.0076051](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076051) PMID: [24146813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24146813/)
54. Gorter JA, Iyer A, White I, Colzi A, van Vliet EA, Sisodiya S, et al. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2014; 62: 508–20. doi: [10.1016/j.nbd.2013.10.026](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.026) PMID: [24184920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184920/)

55. Moon J, Lee S-T, Choi J, Jung K-H, Yang H, Khalid A, et al. Unique behavioral characteristics and microRNA signatures in a drug resistant epilepsy model. *PLoS One*. 2014; 9: e85617. doi: [10.1371/journal.pone.0085617](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085617) PMID: [24454901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24454901/)
56. Li M-M, Jiang T, Sun Z, Zhang Q, Tan C-C, Yu J-T, et al. Genome-wide microRNA expression profiles in hippocampus of rats with chronic temporal lobe epilepsy. *Sci Rep*. 2014; 4: 4734. doi: [10.1038/srep04734](https://doi.org/10.1038/srep04734) PMID: [24751812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751812/)
57. Kretschmann A, Danis B, Andonovic L, Abnaof K, van Rikxoort M, Siegel F, et al. Different microRNA profiles in chronic epilepsy versus acute seizure mouse models. *J Mol Neurosci*. 2015; 55: 466–79. doi: [10.1007/s12031-014-0368-6](https://doi.org/10.1007/s12031-014-0368-6) PMID: [25078263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25078263/)
58. Henshall DC. MicroRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. *Front Mol Neurosci*. 2013; 6: 37. doi: [10.3389/fnmol.2013.00037](https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00037) PMID: [24282394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24282394/)
59. Santos EA da S, Marques TEBS, Matos H de C, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML, et al. Diurnal Variation Has Effect on Differential Gene Expression Analysis in the Hippocampus of the Pilocarpine-Induced Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One*. 2015; 10: e0141121. doi: [10.1371/journal.pone.0141121](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141121) PMID: [26473354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26473354/)
60. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972; 32: 281–94. doi: [10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0) PMID: [4110397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4110397/)
61. Marques TEBS, de Mendonça LR, Pereira MG, de Andrade TG, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML, et al. Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One*. 2013; 8: 1–9. doi: [10.1371/journal.pone.0071892](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071892) PMID: [24009668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24009668/)
62. Engel J. Surgery for seizures. *N Engl J Med*. 1996; 334: 647–52. doi: [10.1056/NEJM199603073341008](https://doi.org/10.1056/NEJM199603073341008) PMID: [8592530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8592530/)
63. Macedo C, Evangelista AF, Marques MM, Octacílio-Silva S, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, et al. Autoimmune regulator (Aire) controls the expression of microRNAs in medullary thymic epithelial cells. *Immunobiology*. 2013; 218: 554–60. doi: [10.1016/j.imbio.2012.06.013](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.06.013) PMID: [22883565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883565/)
64. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5116–21. doi: [10.1073/pnas.091062498](https://doi.org/10.1073/pnas.091062498) PMID: [11309499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11309499/)
65. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 14863–8. doi: [10.1073/pnas.95.25.14863](https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863) PMID: [9843981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9843981/)
66. De Araújo MA, Marques TEBS, Taniele-Silva J, Souza FMDA, De Andrade TG, Garcia-Cairasco N, et al. Identification of endogenous reference genes for the analysis of microRNA expression in the hippocampus of the pilocarpine-induced model of mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2014; 9 doi: [10.1371/journal.pone.0100529](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100529) PMID: [24964029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24964029/)
67. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3: 1101–8. doi: [10.1038/nprot.2008.73](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73) PMID: [18546601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18546601/)
68. Ashhab MU, Omran A, Kong H, Gan N, He F, Peng J, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013; 51: 950–8. doi: [10.1007/s12031-013-0013-9](https://doi.org/10.1007/s12031-013-0013-9) PMID: [23636891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636891/)
69. Henshall DC. Antagomirs and microRNA in status epilepticus. *Epilepsia*. 2013; 54 Suppl 6: 17–9. doi: [10.1111/epi.12267](https://doi.org/10.1111/epi.12267) PMID: [24001063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24001063/)
70. Dai E, Yu X, Zhang Y, Meng F, Wang S, Liu X, et al. EpimiR: a database of curated mutual regulation between miRNAs and epigenetic modifications. *Database (Oxford)*. 2014; 2014: bau023. doi: [10.1093/database/bau023](https://doi.org/10.1093/database/bau023) PMID: [24682734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24682734/)
71. Weinberg MS, Blake BL, McCown TJ. Opposing actions of hippocampus TNF α receptors on limbic seizure susceptibility. *Exp Neurol*. 2013 Sep; 247:429–37. doi: [10.1016/j.expneurol.2013.01.011](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.011) PMID: [23333565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23333565/)
72. Wu X, Reddy DS. Integrins as receptor targets for neurological disorders *Pharmacol Ther*. 2012 Apr; 134(1):68–81. doi: [10.1016/j.pharmthera.2011.12.008](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.008) PMID: [22233753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22233753/)
73. Kim GW, Kim HJ, Cho KJ, Kim HW, Cho YJ, Lee BI. The role of MMP-9 in integrin-mediated hippocampal cell death after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2009 Oct; 36(1):169–80. doi: [10.1016/j.nbd.2009.07.008](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.008) PMID: [19631748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19631748/)
74. Gall CM, Lynch G. Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 548:12–33. doi: [10.1007/978-1-4757-6376-8_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6376-8_2) PMID: [15250583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15250583/)
75. Alsharafi W, Xiao B. Dynamic Expression of MicroRNAs (183, 135a, 125b, 128, 30c and 27a) in the Rat Pilocarpine Model and Temporal Lobe Epilepsy Patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2015; 14: 1096–102. doi: [10.2174/1871527314666150317225945](https://doi.org/10.2174/1871527314666150317225945) PMID: [25801837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25801837/)

76. Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, et al. MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science*. 2013; 342: 1254–8. doi: [10.1126/science.1244193](https://doi.org/10.1126/science.1244193) PMID: [24311694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24311694/)
77. You G, Yan W, Zhang W, Wang Y, Bao Z, Li S, et al. Significance of miR-196b in tumor-related epilepsy of patients with gliomas. *PLoS One*. 2012; 7: e46218. doi: [10.1371/journal.pone.0046218](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046218) PMID: [23049982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23049982/)
78. Zhang J, Yan H, Wu YP, Li C, Zhang GY. Activation of GluR6-containing kainate receptors induces ubiquitin-dependent Bcl-2 degradation via denitrosylation in the rat hippocampus after kainate treatment. *J Biol Chem*. 2011; 286: 7669–80. doi: [10.1074/jbc.M110.156299](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156299) PMID: [21148565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148565/)
79. Li NA, Wang W, Xu B, Gong H. miR-196b regulates gastric cancer cell proliferation and invasion via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncol Lett*. 2016; 11(3):1745–9. doi: [10.3892/ol.2016.4141](https://doi.org/10.3892/ol.2016.4141) PMID: [26998071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26998071/)
80. Xiao Z, Peng J, Yang L, Kong H, Yin F. Interleukin-1 β plays a role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol*. 2015; 282:110–7 doi: [10.1016/j.jneuroim.2015.04.003](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.04.003) PMID: [25903737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25903737/)
81. Tao J, Liu W, Shang G, Zheng Y, Huang J, Lin R, et al. MiR-207/352 regulate lysosomal-associated membrane proteins and enzymes following ischemic stroke. *Neuroscience*. 2015; 305: 1–14. doi: [10.1016/j.neuroscience.2015.07.064](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.064) PMID: [26232047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26232047/)
82. Gaignard P, Fagart J, Niemir N, Puech J-P, Azouguene E, Dussau J, et al. Characterization of seven novel mutations on the HEXB gene in French Sandhoff patients. *Gene*. 2013; 512:521–6. doi: [10.1016/j.gene.2012.09.124](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.124) PMID: [23046579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23046579/)
83. Rami A, Benz AP, Niquet J, Langhagen A. Axonal Accumulation of Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP1) Accompanying Alterations of Autophagy Dynamics in the Rat Hippocampus Upon Seizure-Induced Injury. *Neurochem Res*. 2016; 41(1–2):53–63. doi: [10.1007/s11064-015-1704-0](https://doi.org/10.1007/s11064-015-1704-0) PMID: [26329516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26329516/)

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DE MICRORNAS NANOCARREADOS PARA ENSAIOS FUNCIONAIS

3 REVISÃO DE LITERATURA

Desde que os microRNAs são reguladores da expressão gênica, identificar aqueles que apresentam expressão diferencial é o ponto de partida para compreensão de suas funções e das vias envolvidas, como descrito no capítulo 1 deste trabalho. O segundo ponto, diz respeito à modulação dos níveis deles, com subsequente avaliação dos efeitos provenientes. Portanto, os ensaios funcionais do tipo ganho e perda de função têm recebido destaque na comunidade acadêmica, especialmente no desenvolvimento de estratégias de manipulação da expressão gênica relacionadas aos níveis de microRNAs. Assim, a proposta da segunda parte deste trabalho consistiu em sintetizar e avaliar Hidróxidos Duplos Lamelares para carregamento e transfecção de inibidores de microRNAs de interesse em cultura de células.

3.1 ESTUDOS FUNCIONAIS BASEADOS EM OLIGONUCLEOTÍDEOS

O passo que sucede a identificação de microRNAs (miRs) de interesse é a caracterização funcional *in vitro* e *in vivo*. A manipulação da expressão gênica ficou conhecida como estudos de ganho e perda de função, representando a abordagem mais frequentemente empregada em Biologia celular e molecular (CHANG et al., 2016).

De modo geral, os níveis de microRNAs podem ser interferidos através de i) Knockout genético, ii) microRNAs esponjas (EBERT; NEILSON; SHARP, 2007), iii) edição por CRISPR (CHANG et al., 2016) e iv) manipulação dos níveis de miRs individualmente (CHANG et al., 2016). Os últimos, têm obtido um destaque significativo, compreendendo uma categoria bem difundida de possíveis terapias baseadas em oligonucleotídeos.

Dependendo do nível de transcritos do gene (miR) de interesse, estabeleceu-se duas abordagens: i) reposição do miR, que proporciona o ganho de função. Esta

é realizada através da introdução de miRNA sintético; ii) Inibição do miR, em que a perda de função é empregada através de oligonucleotídeos *antisense*, que são complementares aos miRs alvos (ISHIDA; SELARU; EDU, 2013; ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013).

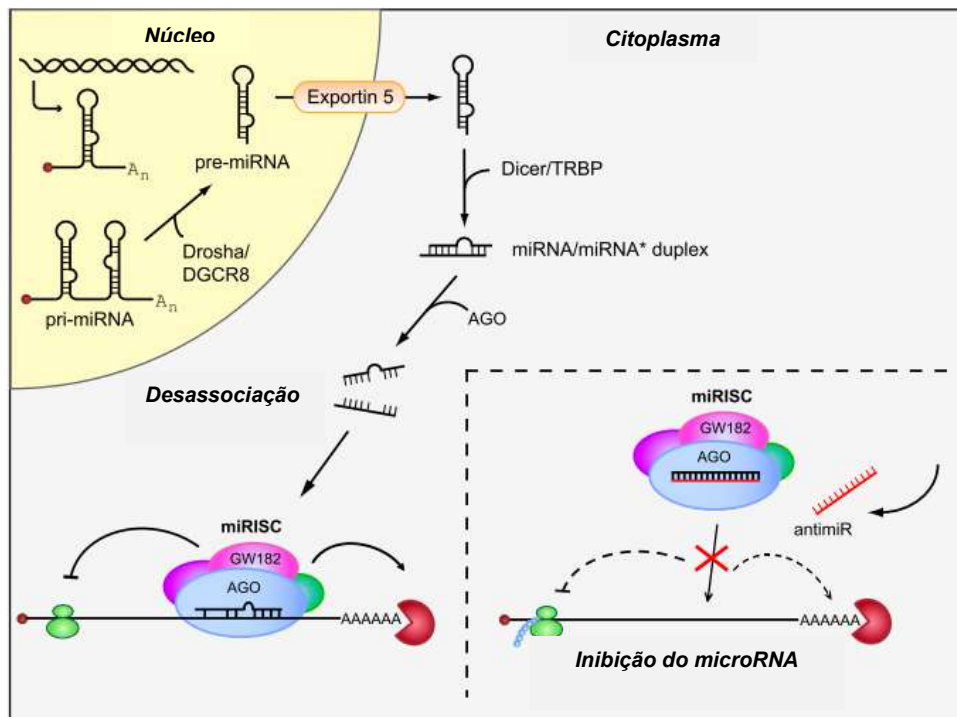
No intuito de se repor os níveis fisiológicos dos miRs ou induzir uma superexpressão, a primeira abordagem suplementa os níveis baixos de miRs por meio de moléculas conhecidas por mimics, cujas sequências são idênticas à fita guia do miR maduro endógeno (ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013).

Um miR regula intrinsecamente múltiplos genes alvos (LEWIS et al., 2003), desse modo, a vertente de suplementação de miRs também age sobre múltiplos transcritos, oferecendo um mecanismo para conhecimento de vias e aplicação terapêutica. Os mimics assim como os siRNAs, atuam à jusante da RISC e requerem as funções catalíticas desse complexo enzimático para que a sua utilização seja satisfatória, no entanto, os mimics apresentam vantagens sobre aqueles, já que os siRNAs foram projetados para reprimir um único RNAm de interesse (BADER et al., 2011). De fato, Cao e colaboradores (2017) observaram que o miR 6743-5p é responsável por aumentar a proliferação celular e apoptose em linhagem celular de gliomas, regulando diretamente o GRIM-19, um gene supressor tumoral. Sequencialmente, utilizando-se da abordagem de ganho de função por meio de mimics, os pesquisadores observaram que este miR medeia a ativação da caspase-3 dependente de Bcl-2, bem como a apoptose celular, concluindo que este miR possa ser um novo alvo terapêutico para o tratamento de várias doenças neurodegenerativas (LIU et al., 2016).

Adicionalmente aos mimics clássicos, há os mimics precursores, que apresentam sequências mais longas e variam em apenas alguns nucleotídeos adicionais comparados aos miRs endógenos (TERASAWA; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 2011). Durante a biogênese dos miRs, quando em processo final de maturação ou já em estado maduro, a via clássica de regulação mediadas pelos miRs tem seu ambiente de atuação no citoplasma, desse modo, os mimics devem ser direcionados a esse compartimento celular. Em contrapartida, se a proposta é mimetizar miRs primários, deve-se direcionar ao núcleo, já que requer a maquinaria para processamento dessa molécula. Assim, os mecanismos de entrega desses oligonucleotídeos sintéticos devem ser distintas.

Por outro lado, diante da relação direta entre aumento dos níveis de transcritos (super expressão) de um miR e uma determinada patologia, a abordagem baseada na inibição do miR é útil para impedir que proteínas alvos dos miRs endógenos sejam reprimidas. (ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013). Nesse sentido, a utilização de oligonucleotídeos complementares aos miRs maduros, os anti-microRNAs (AMOs), também conhecidos como antagomirs (CZECH, 2006), tem contribuído na compreensão de vias associadas a condições patológicas. Os AMOs se ligam com alta afinidade as miRISCs, bloqueando a ligação aos RNAm alvos do miR, inviabilizando a sua atividade endógena (LI; RANA, 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Biogênese dos microRNAs e mecanismo de inibição da função dos miRs baseado em antagomirs/antimiRs



miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em miRNA primários longos, denominados pri-miRNAs e possuem 5'CAP e uma cauda poli (A). Pri-miRNAs são processados no núcleo com ~ 70 nt em pre-miRNAs pelo complexo Microprocessador nuclear Drosha que contém DGCR8 e a enzima RNase III. Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela Exportin-5 e processados posteriormente pela Dicer, os miRNAs de fita dupla com ~ 22 nt são associados a proteína Argonata no miRISC e desenrolados rapidamente. Durante este processo, o miRNA maduro é retido no miRISC, enquanto a cadeia complementar, conhecida como miRNA star (miR *) é liberada. Os miRNAs de metazoários guiam o miRISC para locais parcialmente complementares nas 3'UTRs de mRNAs alvo para promover sua repressão translacional ou degradação. Oligonucleotídeos anti-miR quimicamente modificados sequestram o miRNA maduro em competição com mRNAs alvo celular levando à inibição funcional do miRNA e desrepressão dos alvos diretos. Fonte: Adaptado de STENVANG et al., 2012

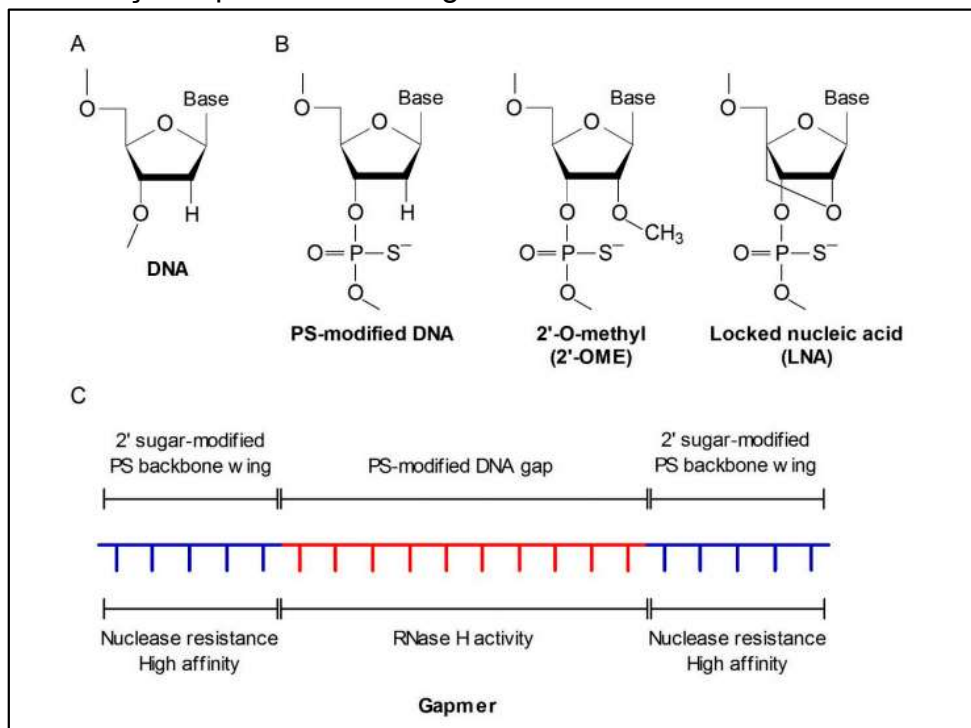
Desta forma, alguns autores, utilizando essa abordagem de inibição, destacaram vias celulares que são afetadas pelos miRs, salientando que os mesmos podem ter um papel importante na etiologia da doença (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018). De fato, a supressão do miR 130b inibiu a proliferação e invasão em linhagem celular de gliomas (U87). Foi observado que a atuação do antimir 130b induziu a apoptose *in vitro* e inibiu a tumorigenicidade *in vivo*. Além disso, elucidaram o envolvimento da via PTEN como alvo direto, regulando, por tabela, a via AKT (GU et al. 2018). Wang e seu grupo de pesquisa observaram que a depleção do miR-613 ativa vias neuroprotetoras em células primárias hipocâmpais, especialmente mediada pela superexpressão do seu gene alvo, Esfingosina quinase 2 (Sphk2) (DI et al. 2017). Ainda nesse sentido, Zhou e colaboradores (2016) observaram que o miR 146a reconhece a região 3'UTR de genes pró apoptóticos, como a caspase 7 e fator de transcrição associado à Bcl-2; assim, promoveram a inibição desse miR em linhagem celular de glioma, e obtiveram resultados satisfatórios quanto a mecanismos neuroprotetores.

Antes do descobrimento dos miRs e conseqüentemente das estratégias de manipulação da expressão deles, estava em evidência a abordagem baseada em oligonucleotídeo *antisense* (ASO), e durante esses 40 anos de estabelecimento (KHVOROVA; WATTS, 2017), algumas modificações químicas foram adicionadas a essas moléculas, objetivando proporcionar maior estabilidade. Atualmente, foram incorporadas aos AMOs algumas dessas modificações, permitindo que estas moléculas se liguem ao miR de interesse, promovendo maior estabilidade (ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013).

Desse modo, o AMO modificado com 2'-O-metil (2'-OMe) é quimicamente mais estável comparado com o oligonucleotídeo sem a modificação, por apresentar resistência às nucleases devido à base hidroxila metilada (YOO et al., 2004). Em seguida, foram empregadas outras modificações químicas, no intento de melhorar a eficiência de ligação entre oligonucleotídeo e miR alvo, o 2'-Fosforotioato 2'-O-metoxietil (2'-MOE) e 2'-fluoro/ 2'-metoxietil (2'-F/ MOE) (CROOKE et al., 1996). Além disso, a conjugação com o colesterol parece melhorar a atividade da sequência nucleotídica. A modificação LNA consiste na formação de ponte entre a posição 2'-O e o 4'-C com o metileno. Esta estrutura cíclica permite que o oligo não mude de conformação, o que confere resistência a ação de nucleases, forte afinidade com o

nucleotídeo alvo, além de não promover citotoxicidade (Figura 2) (WAHLESTEDT et al., 2000).

Figura 2 - Modificações químicas dos Oligonucleotídeos *antisense*



(A) estrutura básica de um oligonucleotídeo de DNA; (B) modificações químicas de ASOs; (C) Estrutura de um gapmer. A terceira geração de ASOs é principalmente projetada com uma estrutura gapmer, tipicamente com 20 nucleotídeos modificados por fosforotioato (PS). A sequência central consiste em aproximadamente 10 resíduos simples de DNA modificados por PS, referidos como a lacuna, que podem ligar-se a RNAase H e induzir a clivagem de RNAm alvo. Os resíduos modificados com açúcar são suspensos em ambas as extremidades da abertura como asas de proteção para resistir à atividade da nuclease e aumentar a afinidade de ligação do mRNA. Fonte: LIAO et al., 2017

Fica evidente que os estudos baseados em ASO e miRs são ferramentas interessantes. Embora os esforços não sejam poucos, o desafio que persiste diz respeito a entrega e direcionamento dessas moléculas as células de maneira eficiente, sem causar toxicidade, especialmente em se tratando de células do sistema nervoso central.

Neste sentido, ferramentas nanotecnológicas representam uma alternativa promissora (GANDHI; TEKADE; CHOUGULE, 2014), as quais podem minimizar essas limitações, de modo a tornar os inibidores de miRs nanocarreados bem mais eficazes e facilitar o processo de compreensão das suas funções, bem como acelerar a gama de aplicações terapêuticas possíveis baseadas nesses inibidores.

3.2 NANOMATERIAS, NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

O Prefixo “nano” deriva da palavra *anão* em grego, que compreende uma importante e reduzida escala de medida cuja grandeza é o nanômetro, equivalente à 10^{-9} metros. Tornando-a inteligível, um nanômetro é cerca de 60.000 vezes menor que o diâmetro de um fio de cabelo ou que ao tamanho de um vírus; o DNA apresenta diâmetro na faixa de 2,5 nm e uma hemácia tem cerca de 2.000 a 5.000nm (KAWADKAR; CHAUHAN; MAHARANA, 2011).

Nanociência engloba uma grande área de estudo de materiais cujas dimensões apresentem pelo menos uma escala nanométrica (RAO et al., 2007), categorizando-os como nanomateriais. O termo *matéria* designa tudo o que apresenta massa e volume, com potencialidade para ser caracterizada como um material. O aspecto limitante que define se esta corresponde a um material ou não é a presença de pelo menos uma propriedade, seja ela elétrica, óptica, mecânica ou magnética que lhe proporcione uma função específica (ZARBIN, 2007). Portanto, os materiais apresentam propriedades distintivas, cujas ilimitadas aplicações são consideradas indispensáveis para subsistência (ZARBIN, 2007). Dentre estes, os nanomateriais tem se apresentado como promissores.

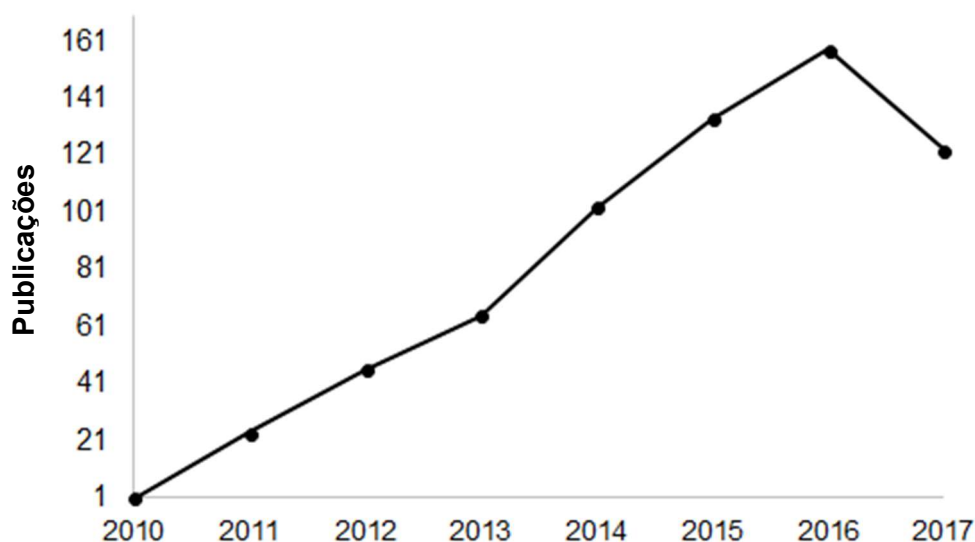
Os nanomateriais possuem propriedades químicas, físicas e biológicas diferentes daquelas que são encontradas nas moléculas ou em sua forma macroscópica, tais propriedades são intrinsecamente atreladas ao tamanho e forma, em decorrência dos efeitos de tamanho e superfície característicos nas dimensões entre 1 e 100nm (MARTINS; TRINDADE, 2012), fundamento norteador da nanotecnologia.

A nanotecnologia é definida como engenharia molecular de sistemas funcionais cujos objetivos são gerar tecnologias de alto desempenho nas áreas da pesquisa e indústria (LEE; STOKES, 2009; RAJ; KHAN, 2016). Especificamente, o uso de engenharia molecular envolvendo sistemas biológicos hoje é conhecido como Nanobiotecnologia, uma fusão entre biotecnologia e nanotecnologia (KHAN et al., 2015). Whitesides (2003) mencionou que o interesse científico nessa interseção de campos é baseado na percepção de que a nanotecnologia oferece novas ferramentas à Biologia e que a Biologia oferece acesso à nanotecnologia aos

nanosistemas funcionais, os componentes celulares, que são inquestionavelmente interessantes e úteis.

De fato, as aplicações são inestimáveis, englobando técnicas que vão desde melhoramento de imagens (YOO et al., 2014) ao uso de nanopartículas como vetores de drogas ou vacinas (ZHENG et al., 2016). Nesse contexto, a utilização de nanomateriais para caracterização da função dos miRs e consequente ensaios terapêuticos baseados em oligonucleotídeos tem se mostrado crescente desde o seu descobrimento (Figura 3).

Figura 3 - Número de artigos científicos com as palavras-chave “Nanomaterials AND microRNAs” no banco de dados Pubmed, entre os anos de 2010 e 2017.



Fonte: Autora, 2018

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS NANOSISTEMAS E OS HIDRÓXIDOS DUPLO LAMELARES

Estruturalmente, os materiais podem ser classificados em (0-D), unidimensionais (1-D), bidimensionais (2-D) e tridimensionais (3-D) (KLABUNDE; RICHARDS, 2009). Os 0-D apresentam todas as dimensões menores que 100 nm (comprimento= largura), e podem ser usados para formar outros materiais. Nesta categoria, compreendem as nanopartículas e os nanocristais (KLABUNDE;

RICHARDS, 2009). Os nanomateriais 1-D, apresentam uma dimensão fora da escala nanométrica (comprimento maior que largura), com o diâmetro variando entre 1 e 100 nm e comprimento em faixa micrométrica, a exemplo, tem-se os Nanotubos e nanofibras. Os materiais 2D, por sua vez apresentam duas dimensões fora da nanoescala, cuja espessura é inferior a 100 nm. Argilas nanométricas e grafeno são exemplos deles (BENÍCIO et al., 2015).

Dentre as argilas nanométricas destacam-se os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL), também conhecidos como argilas aniônicas, apresentam uma versatilidade de aplicações (DA CONCEIÇÃO; PERGHER; MORO, 2007). Embora não tão abundantes, existem em condições naturais, e podem ser sintetizados em laboratório.

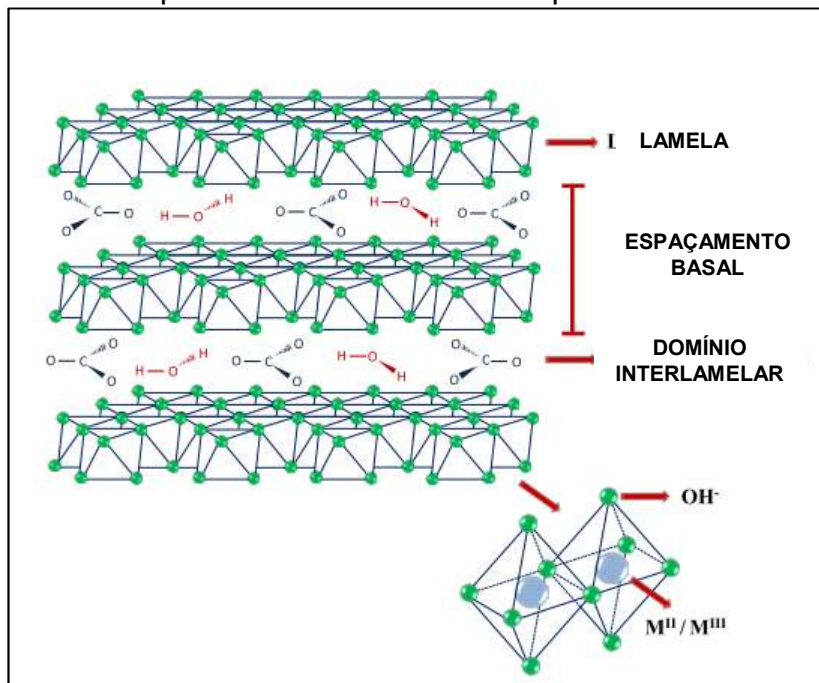
As primeiras sínteses de HDL ocorreram no ano de 1930 pelo pesquisador Feitknecht (REICHLE, 1986). Inicialmente, ele preparou pequenas quantidades desse material através das reações de soluções metálicas com uma base. Após tempo apropriado, seguido de lavagem e secagem foi obtido um pó com planos de difração de raios X semelhantes à hidrotalcita. Em sequência, uma série de pesquisadores passou a estudar esse material, elucidando informações que envolvem a caracterização estrutural, bem como suas propriedades e aplicações (ALBISTON et al., 1996; MIYATA, 1977; TAYLOR, 1984)

Há uma gama de variáveis que implicam na estrutura destes nanocarreadores e estas determinam o subtipo de HDL e em consequência os seus melhores campos de aplicações. A estrutura é definida pela fórmula geral: $[M^{+2}_{1-x} M^{+3}_x (OH)_2] [A^{n-}]_{x/n} \cdot z H_2O$, de modo que M^{+2} e M^{+3} representam os cátions di e trivalentes, respectivamente (OLFS et al., 2009).

Estruturalmente, são formadas por lamelas que se sobrepõem, semelhantes ao mineral Brucita, que apresenta fórmula $Mg(OH)_2$, onde o metal ocupa o centro do octaedro e o grupamento hidroxila as arestas. Estas arestas são compartilhadas e formam camadas que são conectadas por ligação de hidrogênio. Para a formação de HDL, no entanto, alguns metais bivalentes são substituídos isomorficamente por metais trivalentes e passam a apresentar as lamelas com carga final positiva. A presença de ânions e moléculas de água entre as lamelas conferem estabilidade ao sistema, permitindo, assim, o empilhamento destas que são sustentadas por

ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (BENÍCIO et al., 2015). Esses ânions apresentam uma escala de capacidade de estabilização lamelar, com a seguinte ordem decrescente, descrita inicialmente por Miyata: $\text{CO}_3^{2-} > \text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ (MIYATA, 1983).

Figura 4 - Estrutura esquemática de Hidróxidos Duplos Lamelares



Fonte: Adaptado de BENÍCIO et al., 2015

Uma vez que apresentam esse espaço entre as lamelas e alta capacidade de troca iônica, esta categoria de nanomateriais tem a capacidade de albergar inúmeros tipos de moléculas negativamente carregadas (CUNHA et al., 2010). Assim, estes têm sido utilizadas para diferentes aplicações: i) trocadores iônicos, ii) catalisadores, iii) adsorventes, na síntese de materiais cerâmicos avançados, iv) na preparação de eletrodos, v) em aplicações medicinais e de interesse biológico como antiácidos, imagem de ressonância magnética, carreadores de fármacos e gênicos (CUNHA et al., 2010; BENÍCIO et al., 2015; SANI USMAN et al., 2017). No campo de interesse biotecnológico, HDL tem se destacado dentre outros nanomateriais inorgânicos.

3.4 HDL COMO CARREADORES GÊNICOS

Os carreadores gênicos tradicionais, apesar de úteis (BOT; DEBSKI; LUKASIUK, 2013; HENSHALL, 2013; JIMENEZ-MATEOS et al., 2012; MCKIERNAN et al., 2012), esbarram em algumas limitações técnicas, ressaltando-se o alto custo no preparo, pouca proteção aos nucleotídeos e ainda, para algumas categorias não virais, a limitada eficiência de transfecção (WONG et al., 2010). Em contrapartida, dentre os materiais inorgânicos, HDL apresenta propriedades pertinentes, como baixos efeitos imunogênicos, baixa citotoxicidade, boa biodisponibilidade, alta biocompatibilidade e capacidade de inserção de espécies iônicas, além da possibilidade de funcionalização da superfície (CUNHA et al., 2010), tornando-os uma interessante classe de carreadores de drogas e genes.

HDL vêm recebendo um crescente destaque para esse tipo de aplicação (BALCOMB; SINGH; SINGH, 2015). De fato, dada a sua carga positiva, os mais diferentes tipos de nucleotídeos podem ser associados eficazmente a estes nanomateriais, já tendo sido relatado como um potente carreador gênico (KWAK et al., 2002).

Os primeiros experimentos que reportaram a utilização de HDL para este fim foram descritos por Choy e colaboradores (1999), levando-os a conclusão de que biomoléculas como CMP, AMP, GMP e DNA eram protegidas pelos HDL, via mecanismo de troca iônica. Posteriormente, outros trabalhos no mesmo direcionamento, do mesmo grupo de pesquisa e de outros, corroboraram esses achados iniciais, trazendo novas abordagens, inclusive que moléculas de RNA também podiam ser incorporadas (SWADLING; COVENEY; CHRISTOPHER GREENWELL, 2012). Desde então, esta aplicação para HDL tem se expandido.

De fato, há relatos na literatura mostrando a utilização e associação de HDL com mononucleotídeos (NAKAYAMA; HATAKEYAMA; TSUHAKO, 2010), plasmídeo (LADEWIG et al., 2010a), SiRNA (LADEWIG et al., 2010b) e apenas um artigo trazendo a associação com inibidores de miRs (YOO et al., 2014). A tabela 2 traz um resumo dos principais dados.

Tabela 1- HDL utilizados como carreadores gênicos

| Tipo de HDL | Oligonucleotídeo | Autor e ano/DOI |
|--------------------|------------------------------|---|
| MgAl-NO3 | siRNA | PARK et al, 2016 10.1002/anie.201510844. Epub 2016 Feb 16.ca |
| MgAl-Cl | dsDNA | ZUO et al., 2015 10.1016/j.jcis.2015.07.063 |
| MgAl-NO3 | dsDNA | DONG et al., 2014 |
| Gd-HDL | AMO (antimiR) miRCURY LNA | YOO et al, 2014 10.1088/0957-4484/25/42/425102. Epub 2014 Oct 3. |
| MgAl-Cl | siRNA | CHEN et al., 2013 |
| MgAl-Cl | dsDNA e SiRNA | WONG et al, 2012 http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.046 |
| MgAl-NO3 | siRNA | LADEWIG et al., 2010 |
| MgAl-Cl | siRNA e dsDNA | WONG et al., 2010 |
| MgAl-NO3 | Plasmídeo | LADEWIG et al., 2010 10.1016/j.clay.2009.11.032 |
| MgAl-Cl | dsDNA e SiRNA | WONG et al, 2010 10.1016/j.biomaterials.2010.07.077 |
| MgAl-Cl | Plasmídeo | XU et al., 2007 |

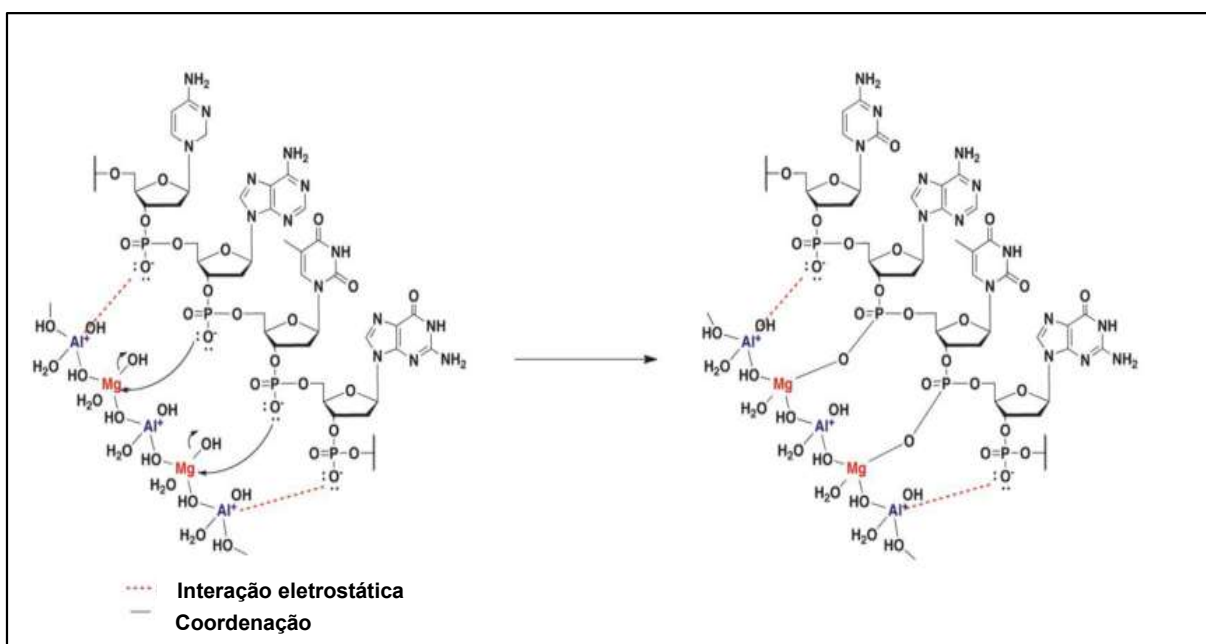
Fonte: AUTORA, 2018

Apesar de crescente o número de trabalhos englobando HDL como carreadores gênicos, há pouco ainda discutia-se sobre os tipos de interações físico-químicas que ocorre entre ambos. ANDREA et al., (2017) apresentou uma proposta sobre essa interação utilizando oligonucleotídeos marcados com 6-carboxi-fluoresceína, FAM. Por meio de análises de cinética de adsorção os autores observaram que essas moléculas eram rapidamente adsorvidas na superfície dos

nanomateriais, corroborados às informações obtidas por dados de difração em raios X, embora também seja possível sua intercalação, mediado por ligações com os açúcares (pentose ou ribose, se for ribonucleotídeo) (Figura 5). Esta rápida adsorção é termodinamicamente favorável, dada a atração eletrostática entre cargas negativas do oligonucleotídeo e positivas das lamelas de HDL.

Usando análogos dos componentes estruturais do DNA, os pesquisadores apontaram o modo de interação entre ambos. A proposta apresentada inicialmente mostrou que o DNA marcado com FAM era adsorvido em MgO, contido em Al₂O₃ esta não ocorria. Desse modo, propuseram um mecanismo como especificado a seguir: O Al³⁺ promove, inicialmente, uma carga superficial positiva, que por sua vez, viabiliza a atração do DNA à sua superfície; o DNA, então, por meio do seu esqueleto de fosfato, se liga ao Mg²⁺ através de um processo de troca de ligante, de modo que o oxigênio interage com o Mg²⁺, o que leva à formação de pontes Mg-O-P. Nesse contexto, os cátions Al³⁺ continuam a exercer uma estabilização eletrostática fraca. O Al³⁺ de maneira indireta também pode interagir com o DNA por coordenação secundária através das moléculas de água adsorvidas. Além do mais, é possível a ligação de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila abundantes na superfície de HDL e o DNA. Essas interações descritas participam da formação estável dos complexos DNA-HDL (ANDREA et al., 2017).

Figura 5- Interação proposta entre moléculas de DNA e HDL

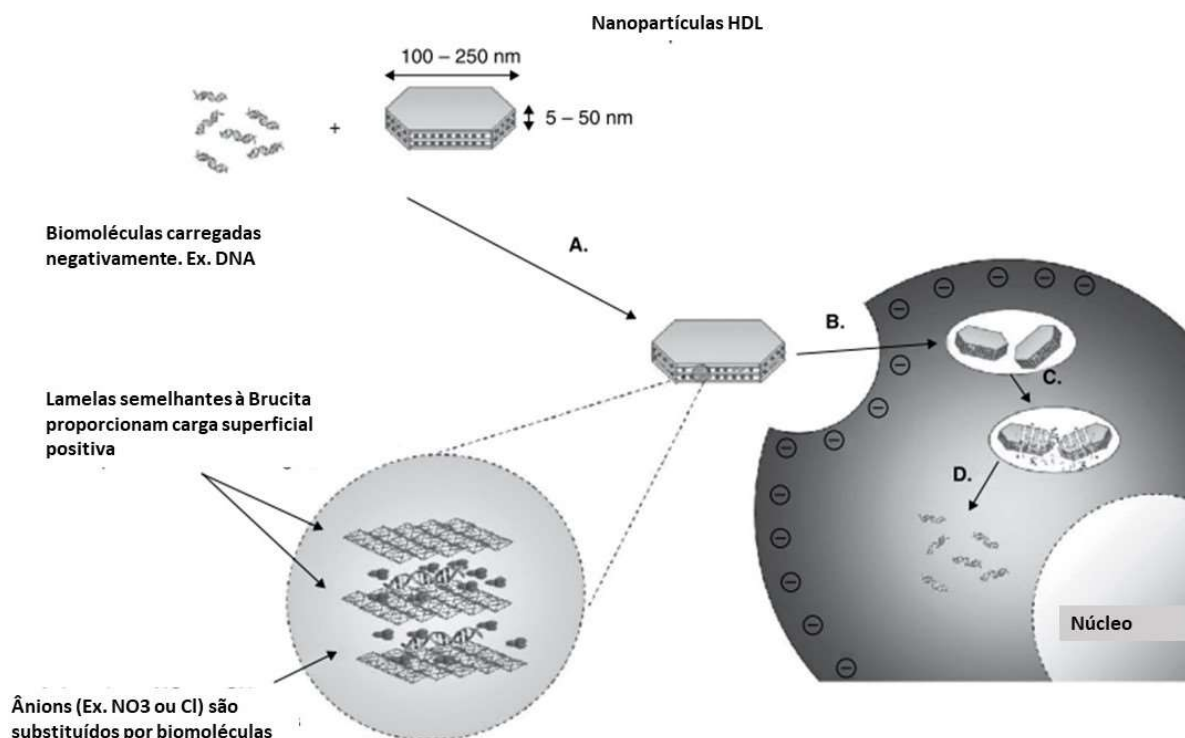


Fonte: Adaptado de ANDREA et al., 2017

3.4.1 Mecanismo de incorporação de HDL pelas células

A internalização celular dos oligonucleotídeos é um fator crítico para o sucesso da técnica de ganho e perda de função. Nesse sentido, a via de entrada mediada pelos HDL, associados aos oligos ou não, já foi reportada, apontando o mecanismo de endocitose como a via principal. Inicialmente, ocorre a aderência de HDL na superfície das células devido a sua carga positiva, seguida da endocitose mediada por proteínas da família clatrina. Em sequência, as nanopartículas são encapsuladas. Os prótons são bombeados para o endossoma, facilitando a acidificação, em seguida ocorre o influxo de íons cloretos (XU et al., 2008a). Alguns HDL iniciam o processo de dissolução, com o intuito de tamponar/amortizar a acidificação, e assim liberam ainda mais íons ao sistema. Com o aumento de íons internamente, ocorre também a entrada de moléculas de água, levando ao aumento osmótico e conseqüentemente ao rompimento do endossoma e a liberação do oligonucleotídeo de interesse no citoplasma. (YANG, 2013) (Figura 6). Esse mecanismo de escape endossomal é bem proeminente em HDL, e uma das inúmeras propriedades que o faz um nanomaterial de boa escolha na entrega de genes e drogas.

Figura 6 - Esquema da endocitose e do tráfego celular dos HDL



A – Troca iônica entre os íons interlamelares com biomoléculas, por exemplo DNA, leva a formação do HDL-nanohíbrido. B – Endocitose mediada por receptor. C – Acidificação do endossomo leva a dissolução de algumas partículas de HDL, levando ao tamponamento endossomal e liberação da biomolécula. O influxo de H⁺ no endossomo e dissolução de partículas de HDL levam ao aumento da força iônica no endossomo o que culmina na ruptura da membrana, liberando a carga e partículas não dissolvidas. Fonte: Adaptado de LADEWIG et al., 2009

O conjunto de informações acima justificam a junção entre moléculas inibitórias de miRs para estudos de suas funções com nanocarreadores do tipo Mg-Al-HDL. A complexação entre ambos garantiria uma boa transfecção às células, de maneira mais econômica.

3.5 ENSAIOS FUNCIONAIS DE MICRORNAS E EPILEPSIA

Como mencionado acima, os ensaios funcionais permitem que vias envolvidas às condições anormais sejam desobscurecidas. Concernente ao processo epileptogênico não tem sido diferente.

A epilepsia é uma desordem neurológica crônica, caracterizada por crises com caráter recorrente e espontâneo. Dentre as alterações que acompanham a transformação do cérebro de condição normal em epilético diz respeito aos gatilhos moleculares envolvidos na reorganização da expressão gênica. Assim, sabendo-se que os miRs regulam o perfil de expressão pós transcricionalmente e suas ações são pleiotrópicas, alguns grupos de pesquisa vêm seguindo essa direção em seus campos de interesse.

Lee e colaboradores (2017) elucidaram um mecanismo de ação do miR-203 em epilepsia. Desde que os receptores inibitórios estão desregulados no cérebro de pacientes e em modelos experimentais de epilepsia, estes receptores são alvos terapêuticos para o tratamento. Os autores identificaram, inicialmente, através de algoritmos de predição por bioinformática o receptor de Glicina-Beta como alvo do miR-203. Desse modo, realizaram ensaios funcionais utilizando a abordagem perda de função através de moléculas antagomirs (AM203). Com isso, os níveis hipocámpais desse receptor foram restaurados o que promoveu a redução na frequência das crises recorrentes e espontâneas (CREs), sugerindo que a expressão deste receptor em cérebro epilético é direcionada pelo miR-203 (LEE et al., 2017).

Jimenez e colaboradores em um dos seus primeiros estudos nessa vertente, também avaliaram os efeitos da injeção de antagomirs para o miR-132 como um prétratamento antes da indução do SE. Embora os autores não tenham observado diferença significativa na duração de alta amplitude, descargas de alta frequência e no EEG total durante as crises autosustentadas comparado com os animais controle, foi verificada uma diminuição do dano em CA3 e aumento de neurônios viáveis por técnicas histoquímicas (JIMENEZ-MATEOS et al., 2011). Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa contribuiu com a elucidação da associação do miR-134 na fase crônica da epilepsia. Como bem consolidado, durante a epileptogênese há uma proeminente perda neuronal, rearranjo das fibras musgosas e gliose, um dos eventos que os pesquisadores avaliaram após a injeção do antagomir. Interessantemente, para os animais cujos miRs foram depletados pelos antagomirs, observou-se diminuição significativa das crises durante o SE, comparável a ação dos benzodiazepínicos, bem como a proteção contra os danos advindos destas. Ainda neste estudo, um outro achado interessante mostrou que animais que receberam a injeção do antagomir após o SE raramente apresentaram CREs aos animais que

foram injetados com uma molécula antagomiRs controle (*Scrambled*). Os autores finalizaram este estudo levantando a questão se esse antagomir teria efeito anticonvulsivante, como as DAEs comercializadas ou se apresenta atividade antiepileptogênica. Ainda assim, afirmaram a necessidade de novos estudos que avaliem a frequência das crises em tempo superior à 2 meses após SE (JIMENEZ-MATEOS et al., 2012).

Além da avaliação de alguns aspectos acima mencionados, no modelo de lítio-pilocarpina, um outro grupo observou que após 7 dias da inibição do miR-34a promovida por injeção de antagomir, houve uma diminuição significativa da expressão da proteína caspase-3 ativada, o que pode contribuir com o aumento da sobrevivência neuronal e diminuição da morte celular e apoptose (HU et al., 2012).

A contribuição do nosso grupo de pesquisa diz respeito ao perfil de expressão do miR-196b-5p. Ele foi identificado com os níveis de transcritos aumentados na fase aguda do processo epileptogênico. As vias envolvidas, no entanto, ainda não foram elucidadas. Entender os mecanismos regulatórios dele na epilepsia, portanto, é de nosso interesse

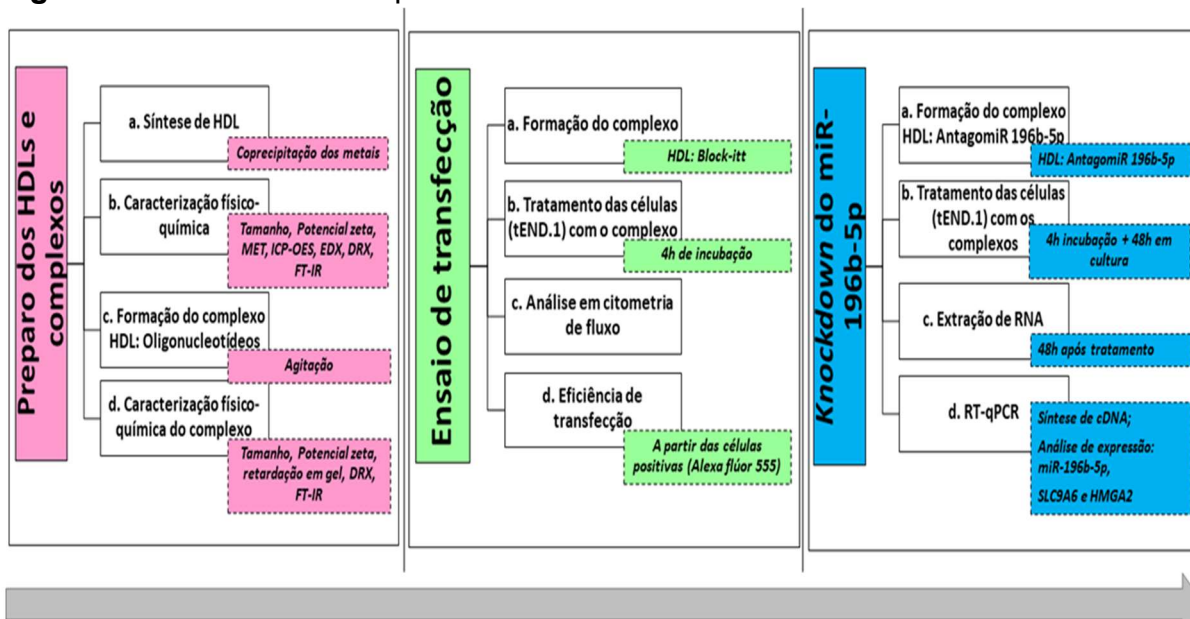
Desse modo, caracterizar as funções do miR-196b-5p e avaliar a modulação de vias relacionadas em ELT é de grande interesse do grupo de pesquisa. O presente estudo propôs uma nova ferramenta baseada em inibidores de miRs nanocarreados por HDL para execução de ensaios funcionais do tipo perda de função, *in vitro*. Com isso, abriu-se caminhos para o avanço na compreensão de vias associadas, desenvolvimento e aprimoramento de estudos funcionais do tipo perda de função em modelo de ELT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O trabalho englobou três etapas distintas: i) síntese e caracterização de nanocarreadores do tipo HDL; ii) Formação dos complexos HDL: oligonucleotídeos e caracterização dos mesmos; e iii) Ensaios em cultura de células para validação do sistema formado. A síntese e caracterização dos nanocarreadores foram realizadas junto ao Grupo de pesquisa coordenado pela professora Dra. Camila Dornelas (TecNano/ ESENFAR/UFAL), a exceção da aquisição das fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão, que foram adquiridas no Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE) no Instituto Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz/PE) e a análise de espectroscopia com Plasma acoplado Indutivamente (ICP-OES), na Central Analítica (USP-SP). Os ensaios para validação do sistema foram realizados junto ao Grupo de Pesquisa em Epilepsia Clínica e Experimental-GPECE (LBCM/ICBS/UFAL), a exceção aos ensaios de Citometria de fluxo, que foram conduzidos no (LBC/IQB/UFAL), com auxílio do professor Dr. Ênio Bassi.

Figura 7 - Delineamento experimental



Fonte: AUTORA, 2018

4.2 MATERIAL E REAGENTES

Tabela 2- Reagentes empregados nas sínteses dos HDL e nos sistemas HDL: oligo

| Reagente | Marca |
|--|--------------|
| Cloreto de Magnésio (CAS:7791-18-6, $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; M0250-IKG, $\geq 99,0\%$) | Sigma |
| Cloreto de Alumínio (95%P.A., P.M. 241,43, $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | Sigma |
| Hidróxido de sódio em pérolas (CAS: 1310-73-2, NaOH) | Fmaia |
| MicroRNA inhibitor | Exiqon |
| Alexa Fluor -555 | Invitrogen |
| Lipofectamine RNAimax | Invitrogen |

Fonte: Autora, 2018

4.3 SÍNTESE DE HDL

Dentre as possibilidades de preparo de HDL, o método de co-precipitação com pH variável foi utilizado nessa tese (BENÍCIO et al., 2015), modificado a partir do protocolo descrito por Chen e colaboradores (2013). A princípio, foram preparadas 3 formulações. A F3, contudo, é a que apresenta todo o protocolo descrito abaixo e estabelecendo-a como a formulação da síntese de HDL padrão. Em sequência há um pequeno resumo das modificações que acompanharam as formulações prévias (F1 e F2).

1 Preparo das soluções e co-precipitação dos metais

Inicialmente, foram preparadas as soluções de Cloreto de Alumínio (10 mL, 3 mmol), Cloreto de Magnésio (10 mL, 1 mmol) e Hidróxido de Sódio (40 mL, 0,2 M), para todos, utilizou-se água ultrapura. A solução de NaOH foi transferida para um béquer de 100 mL, cobriu-se com papel filme para minimizar os interferentes atmosféricos e submeteu-a à agitação de 1000 rpm por 5 minutos, até o momento da adição dos cloretos. Concomitantemente, em um tubo cônico, adicionou-se 5 mL da solução de MgCl_2 e 5mL de AlCl_3 , foram homogeneizadas rapidamente e em seguida vertida na

solução de NaOH que permaneceu sob agitação vigorosa por 10 minutos. O produto obtido foi transferido para um tubo cônico de 50 mL.

2 Coleta e lavagens de HDL

O produto em suspensão foi centrifugado por 5 minutos, à 4500 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 40mL de água ultrapura. Este processo foi repetido 8 vezes, na última, entretanto, o precipitado foi submetido à agitação manual/vortex vigorosa até a dispersão completa.

3 Tratamento hidrotérmico

A suspensão foi transferida para uma autoclave revestida de teflon (MAITEC – Fornos INTI, São Paulo, Brasil) e submetida a tratamento hidrotérmico em temperatura de 100°C, durante 16h, em estufa de circulação forçada de ar (NOVA, Instrumentos, São Paulo, Brasil). Após esse período, os HDL foram transferidos para um tubo cônico de 50mL e mantidos em temperatura ambiente.

A tabela 3 traz as mudanças no protocolo ao longo da pesquisa.

Tabela 3 - Resumo das modificações realizadas durante o estabelecimento do protocolo de síntese de HDL

| Formulação | Agitação - coprecipitação (rpm) | Número de lavagens | Autoclave e tipo de tratamento hidrotérmico | Tempo (h) e temperatura de tratamento hidrotérmico (°C) |
|------------|---------------------------------|--------------------|---|---|
| F. 1 | 450 | 2 | Vidro e Placa quente | 15 e 100 |
| F. 2 | 1000 | 2 | Teflon e Estufa | 16 e 100 |
| F. 3 | 1000 | 9 | Teflon e Estufa de circulação forçada de ar | 16 e 100 |

Fonte: AUTORA, 2018

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HDL

4.4.1 Espalhamento Dinâmico da luz (DLS)

A DLS é uma técnica utilizada para medição de tamanho de partículas. Estas, quando dispersas em líquido, são submetidas à fonte de luz, proveniente do laser. Esta exposição induz o movimento browniano das partículas que, por sua vez, permite que a luz seja espalhada com intensidades distintas. Tais flutuações são convertidas em impulsos elétricos e assim realizada a correlação digital. O ângulo de dispersão da luz é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, assim, fica clara a relação que partículas grandes dispersam luz em ângulos pequenos tomando como base o feixe de luz incidente. A partir dos dados de espalhamento angular é possível calcular o tamanho das partículas, onde os dados de média, mediana e modo das amostras podem ser coletados (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016)

Assim como o tamanho de partículas, através do DLS é possível mensurar o potencial zeta. É sabido que as partículas ao entrarem em contato com líquido adquirem carga elétrica superficial. Forma-se então uma bicamada elétrica, a interna onde os íons são ligados à superfície da partícula, e a externa, onde o equilíbrio entre as forças eletrostáticas e movimento térmico determinam como os íons serão distribuídos. Na técnica, aplica-se um campo elétrico e os íons da camada interna se movem como uma unidade. Portanto, o potencial zeta consiste na diferença entre esta unidade e o meio circundante. As partículas se movem com a velocidade relacionada ao seu potencial zeta, velocidade que é medida pelo espalhamento da luz com análise de fases. Quanto maior o potencial zeta, maior a estabilidade da suspensão (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

O tamanho da partícula e o potencial zeta foram determinados pela técnica de espalhamento em luz dinâmica (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments). Este possui cuba interna com capacidade de 2mL para tamanho hidrodinâmico e 1mL de amostra para potencial zeta, com tamanho detectável entre 0,3 nm à 5,0 μ m. As análises foram realizadas em triplicata e para o potencial zeta foi selecionado o modo de leitura de 36 corridas.

4.4.2 Difração de raios X (DRX)

A difração em raios X consiste numa técnica de caracterização amplamente utilizada. Esta determina as fases cristalinas do material, uma vez que nos sólidos os átomos estão ordenados em planos cristalinos e estes são distanciados entre si na mesma ordem de grandeza de onda dos raios X (ALBERS A. P. F. et al., 2002). É possível estabelecer essa comparação usando um feixe de raios X que incide sobre um cristal, interagindo com os átomos, levando à difração dos raios; e cada substância tem um padrão de difração bem característico.

Desse modo, a cristalinidade dos nanocarreadores foi avaliada pela técnica de difração de Raios X, utilizando-se o equipamento XRD-7000 (Shimadzu). As amostras liofilizadas foram preparadas no porta amostra de vidro e foram analisadas as difrações nos intervalos de 2theta de 3 a 90°. A fim de comparação, os HDL também foram caracterizados em suspensão, para isso, as amostras foram preparadas em filmes finos, secando-se 200µL de HDL no porta amostra de vidro. Além disso, foi aplicado a fórmula da lei de Bragg ($n\lambda = 2d\sin\theta$), onde $n = 1,2,3$ é o comprimento de onda dos raios-X (Å), d é distância interplanar, θ é o ângulo de incidência ou reflexão do feixe incidente para conhecimento do espaçamento basal entre as lamelas.

4.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Consiste numa técnica analítica de cunho quali e quantitativo amplamente utilizada. Fundamenta-se no princípio que a radiação infravermelha emitida em uma amostra, parte é absorvida e parte transmitida (MANUAL, 2002). A absorção desta radiação para determinados grupos funcionais ocorre sobre intervalos de frequência definidos e previamente conhecidos. Assim, pode-se usar essas frequências para determinar quais grupos funcionais estão presentes em uma amostra. O espectro resultante designa uma “impressão digital” molecular da amostra (GANZOURY et al., 2015; LONG, 2004).

Desse modo, no que diz respeito aos grupamentos químicos presentes, os nanocarreadores foram avaliados pela técnica de espectroscopia de infravermelho

com transformada de Fourier (FT-IR), utilizando o equipamento SSU-8000 (Shimadzu). As amostras foram avaliadas em pó, utilizando-se pastilhas de KBr.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica é uma importante técnica na caracterização de materiais nanométricos, especialmente por elucidar eficazmente a morfologia desses materiais, e quando acoplada à espectroscopia, permite também o conhecimento da cristalinidade. Inicialmente, há emissão de feixes de elétrons sobre a amostra, sendo possível a detecção dos que foram transmitidos e difratados. As mudanças nas ondas eletromagnéticas provocadas pela interação amostra-feixes podem ser de amplitude ou de fase, tais mudanças permitem a formação do contraste por difração e contraste de fase, respectivamente. Na formação da imagem, é possível utilizar apenas o feixe transmitido (campo claro) ou apenas o feixe refratado (campo escuro). (NAVARRO, 2013).

Neste trabalho, foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI de 200 kV, modelo Tecnai 20, emissor LAB6 ou W. Com auxílio de uma haste artesanal de cobre, foi adicionada pequena quantidade da amostra em grades de cobre revestidas com um filme de carbono (200 mesh) e encaminhadas para análise.

4.5 COMPLEXAÇÃO DO INIBIDOR DE microRNA AO NANOCARREADOR HDL

A complexação foi realizada com três tipos de oligonucleotídeos diferentes, em momentos distintos e com finalidades específicas: i) Um oligonucleotídeo fita simples, para os testes iniciais e caracterizações ii) Block-itt (oligonucleotídeo marcado com o fluorocromo Alexa Flúor 555, para análises em citometria de fluxo, e iii) Inibidores de microRNAs 196b-5p propriamente dito, para os ensaios de *knockdown*.

Inicialmente, os HDL sintetizados, tanto em suspensão quanto liofilizados, foram quantificados pelo método Espectroscopia com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), utilizando o equipamento (Spectro, modelo Arcos com visão radial - SOP), na Universidade de São Paulo-USP (Tabela 4). O reagente limitante (aquele que é totalmente usado na reação de síntese) foi tomado como referencial para o estabelecimento da concentração, neste caso o metal Alumínio,

fundamental na estrutura dos HDL. Desse modo, utilizou-se a fórmula molecular $Mg_2Al(OH)_6Cl_2H_2O$ que possui a massa molar de 248,5g/mol. Obteve-se uma concentração de 5,4mg/ml de HDL.

Al=26,981539u; Mg=24,305u; O=15,9994u; H= 1,00794u; Cl= 35,453.

Tabela 4 - Quantificação de HDL produzidos

| HDL | Al | Mg |
|-------------|------------|-----------|
| Liofilizada | 8,44% | 20,97% |
| Suspensão | 583,275ppm | 1508,5ppm |

Fonte: AUTORA, 2018

4.5.1 Associação/complexação HDL: oligonucleotídeos

Foram realizados três tipos de complexação com HDL, e estas foram baseadas nos distintos oligonucleotídeos especificados na (tabela 5).

Tabela 5 - Resumo dos oligonucleotídeos usados nas reações de complexação para a formação do nanosistema

| Oligonucleotídeo | Tipo | Sequência (5'-->3') | Empresa | Utilização na pesquisa |
|---------------------------------|---|-----------------------------------|----------------|--|
| Primer | Fita simples | GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC | Invitrogen | Caracterizações |
| Block-itt | Fita dupla marcado com fluorocromo Alexa flúor 555 | Não fornecida | Invitrogen | Caracterizações e ensaios de transfecção |
| Inibidor de microRNA 196b-5p | Fita simples | CCAACAACA GGAAACTAC CT | Exiqon | Ensaio de knockdown do miR |

Fonte: AUTORA, 2018

O mix foi submetido à agitação de 1100 rpm no vórtex BV 100 Vortex mixer (Benchmark) durante 10 minutos, à 37°C. Em sequência, foi dado um spin nas amostras, utilizando-se a mini centrífuga C1008-B (Benchmark). A **tabela 6** resume os respectivos volumes dos reagentes utilizados para as preparações dos complexos.

Tabela 6 - Reação de complexação com os nanocarreadores do tipo HDL

| Tipo de Complexo | Volume de HDL (µL) | Volume de oligonucleotídeo (µL) | Volume de água (µL) |
|-------------------------|---------------------------|--|----------------------------|
| HDL: Oligo | 1 | 1,55 | 17,45 |
| HDL:Block-itt | 1 | 3,1 | 15,9 |
| HDL:inibidor miR | 0,57 | 9,0 | 10,43 |

Fonte: AUTORA, 2018

4.5.2 Complexação Lipofectamina: oligonucleotídeo

A lipofectamina é um reagente comercial que é sabidamente útil na transfecção de células. O complexo com este foi realizado com o intuito de obter um controle positivo no processo de validação do sistema de carregamento proposto nesta tese. O tipo aqui usado foi a Lipofectamina RNAi max.

A reação foi conduzida segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Inicialmente, a lipofectamina foi diluída em meio de cultura com soro reduzido (OPTI-MEM– Gbico), de modo que para cada reação foram usados 1,5 µL de lipofectamina e 25 µL deste meio, foi reservado. Em seguida, foi feita a diluição do oligonucleotídeo, seguindo a proporção de 1 µL de inibidor e 25 µL de meio. Posteriormente, fez-se a junção entre ambas as diluições, de modo que foi adicionado 25 µL de lipofectamina diluída, 25 µL de inibidor diluído em seguida, homogeneizado.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO HDL: OLIGONUCLEOTÍDEO

4.6.1 Ensaio de retardação em gel de agarose

O ensaio permite a separação de biomoléculas, desde RNA à proteínas, de acordo com tamanhos e cargas. Desse modo, auxilia na determinação da associação entre alguns materiais e biomoléculas. As amostras são submetidas a eletroforese e avalia-se a quantidade dos complexos que ficam retidos no gel, sem migrar para o polo negativo.

Objetivando avaliar a eficiência da reação de complexação, bem como selecionar a melhor proporção de massa entre HDL e oligonucleotídeos, realizou-se o ensaio de retardação em gel de agarose. Previamente, foram preparados os complexos como descritos na seção anterior, utilizando-se ambos os oligonucleotídeos (primer e Block-itt).

Inicialmente, foi preparado o gel de agarose a 3,5% com tampão TBE (0,5X). 20 µL dos complexos foram pipetados nos poços. Usou-se 6 µL de tampão de carregamento (tampão 6X), que confere peso e viabiliza o carregamento da amostra para o polo negativo. As condições para a migração foram 80V, durante 40 minutos. Após separação eletroforética, o gel foi colocado em solução de Brometo de etídio (5 µg/mL) por 10 minutos. Em seguida, foi visualizado através da luz ultravioleta e as imagens foram capturadas utilizando o transiluminador (ECX-20.M, Vilber Lourmat).

4.6.2 Espalhamento dinâmico da luz – Tamanho e potencial zeta

Para esta avaliação, os complexos foram preparados com o oligonucleotídeo 1, em diferentes proporções de massa. O tamanho e o potencial zeta dos complexos foram determinados pela técnica DLS, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). As análises foram realizadas em triplicata e para o potencial zeta foi selecionado o “36 runs”. Diferente da análise de HDL apenas, aqui, os complexos foram diluídos em água de injeção, desde que o volume do complexo obtido era ínfimo (20 µL) em relação ao requerido pelo equipamento, mínimo de 750 µL. No entanto, essa diluição não comprometeu a eficácia da análise, visto que a concentração permaneceu dentro do mínimo estabelecido pelo equipamento.

4.6.3 Difração de raios X (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para estas análises, a complexação de HDL foi realizada com o oligonucleotídeo e/ou com o BLOCK-iTAlexaFluor® Red Fluorescent utilizando a proporção de massa 1:1 (1 µg de HDL: 1 µg de oligo), seguindo o protocolo descrito em Wong et al. (2012). A caracterização dos complexos quanto à cristalinidade foi realizada em filmes finos.

Para análise dos grupamentos químicos do complexo com o oligo e Block-itt, avaliou-se em modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*), método que permite análise das amostras em suspensão, importante nesta etapa do processo.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO (EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO)

A eficiência de transfeção foi avaliada por citometria de fluxo. Inicialmente, a etapa de complexação foi realizada tanto com HDL: Block-itt, quanto com lipofectamina: Block-itt, este último atuando como controle de transfeção.

As células utilizadas nesta tese são oriundas de endoteliomas tímicos (tEND.1), gentilmente cedidas pelo professor Dr. T. C. Barja-Fidalgo (Universidade Federal do Rio de Janeiro) por intermédio da professora Dra. Salete Smaniotto, avaliadas previamente quanto ao nível de transcritos do miR-196b-5p e o gene de referência. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de Gentamicina (40 mg/mL) e Anfotericina B. As células foram semeadas em placas de 24 poços, na ordem de 1×10^5 células/poço e incubadas à 37°C e 5% de CO₂. Após 16h, tempo recomendado para a total aderência dessa linhagem testadas à priori através de ensaios de proliferação celular, bem como referenciados na literatura (MESSIAS DE LIMA et al. 2017), o meio antigo foi removido. Em seguida, foi realizado o tratamento com os complexos. As células permaneceram por 4h em incubação. Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: Células, Block-itt, lipofectamina, HDL, complexo HDL:Block-itt e complexo lipofectamina: Block-itt. As análises foram conduzidas em triplicatas biológicas.

Após o tempo de transfecção, as células foram desaderidas dos poços com 200 µL de tripsina, inativadas com RPMI com 10% de SBF e transferidas para tubos de citometria de 5 mL (12 x 75 mm) correspondentes e centrifugadas. Em seguida, foi adicionado 100 µL de tampão de fixação (PBS + 2% formaldeído), armazenados à 4° por 24h, até a leitura no equipamento. A análise de fluorescência foi realizada utilizando-se o equipamento BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, California, USA).

4.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

4.8.1 Ensaio de exclusão por azul de Trypan

Inicialmente, as células da linhagem tEnd.1 foram semeadas em placa de 96 poços, e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1 % de Gentamicina e 0,33 % de Anfotericina B. As mesmas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, à 37°, por um período de 16h. Em sequência, o meio antigo foi removido e as células foram tratadas com concentrações de HDL, formando os seguintes grupos experimentais: 1 µg, 10 µg, 50 µg e 100 µg, bem como o controle (apenas células sem tratamento). Os grupos foram compostos por triplicatas biológicas.

Após as 24h de tratamento com HDL, foram adicionados 100 µL de tripsina em cada poço para desaderência celular. O conteúdo foi transferido para tubos de 1,5 mL que continham 100 µL de RPMI, previamente nomeados. Em seguida, foi realizada uma homogeneização e prosseguido com a contagem. Para isso, retirou-se 10µl de células e adicionou em 10 µL de azul de trypan. As células foram colocadas em câmara de Neubauer e a leitura feita em microscópio óptico, usando a objetiva de 10X. A contagem foi realizada em duplicata, e por dois experimentadores distintos, em seguida, fez-se a média para ambos os conjuntos de dados coletados.

As células viáveis permanecem com a coloração inicial, próximo de transparentes, enquanto que as células não viáveis apresentam coloração azul, devido a entrada do corante na célula em decorrência da ruptura na membrana plasmática das mesmas.

4.8.2 Ensaio de MTT

Consiste em um ensaio colorimétrico que mensura a redução de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) pela desidrogenase mitocondrial (KUANK, 2002).

Assim como no teste de exclusão por azul de Trypan, foram usados 1×10^4 células, em placa de 96 poços e estabelecidos os grupos experimentais que receberam o tratamento com as seguintes concentrações de HDL: 1 μg , 10 μg , 50 μg e 100 μg , controle positivo, e acrescido os grupos controle de morte e apenas meio de cultura sem células. Após 24h de tratamento com HDL, foi adicionado MTT em cada poço (5 mg/mL) e permaneceram em tratamento por 4h. Em seguida, foi adicionado Dimethylsulfoxide (DMSO) e realizada a leitura em placa no comprimento de onda de 530 nm.

4.9 ENSAIOS DE KNOCKDOWN DE microRNAS *IN VITRO*

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementados com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 1 % de Gentamicina (40 mg/ml) e 0,33 % de Anfotericina B. As células foram semeadas em placas de 24 poços, na ordem de 1×10^5 células/poço e incubadas à 37°C e 5% de CO₂. Após 16h, tempo recomendado para a total aderência dessa linhagem (DE LIMA et al., 2017). O meio antigo foi removido, em seguida, foi realizado o tratamento, estabelecendo-se os grupos experimentais complexos HDL: inibidor de miRs, lipofectamina: inibidor e apenas células. As células permaneceram por 4h em incubação. Após esse período, o meio antigo foi removido, adicionado novo meio seguido de um tratamento por mais 48h.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS

4.10.1 Análise de bioinformática para seleção dos genes alvos do miR-196b-5p

Foram utilizados algoritmos de predição computacional e base de dados de alvos validados: TargetScan, DIANA Tools, mirDB, miRWalk, miRTarBase e Tarbase v.8). Os dados indicam que, quanto maior o escore, maior a confiança do dado de predição do gene alvo. Assim, o predito pelo software que apresenta escore maior que 80 possui maior probabilidade de ser um gene cuja 3'UTR seja alvo de ligação do miR. Se o escore é menor que 60, no entanto, é necessário ser cauteloso e recomenda-se avaliar outras evidências.

4.10.2 Extração e quantificação de RNA total

O meio de cultura foi removido e adicionado 440 µL de trizol em cada poço. A placa manteve-se em TA por aproximadamente 3 min e em seguida foram dados jatos com o trizol já adicionado para promover a lise celular.

A solução foi transferida para tubos de 1,5 mL, adicionou-se 88 µL de Clorofórmio e homogeneizou-se invertendo algumas vezes, em temperatura ambiente, por aproximadamente 3 minutos. A solução foi centrifugada a 12.000 g, à 4°C, por 10 minutos. Em seguida, a fase aquosa, camada superior do tubo, foi transferida para um novo tubo de 2 mL.

Foi adicionado 220 µL de isopropanol à solução, que permaneceu por 30 minutos para precipitação (15 em TA e 15 no gelo), neste momento, foram dados algumas “batidas” no fundo do tubo. A solução foi centrifugada por 12000 g, à 4°C por 30 minutos. Após este processo, pôde-se visualizar o *pellet* de RNA. O sobrenadante foi desprezado com cuidado para não perder o *pellet*, e lavado utilizando o vórtex com 250 µL de etanol 75%, que foi diluído na hora com água DEPC. Centrifugou-se à 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O último passo foi repetido e ao término, os tubo permaneceram em temperatura ambiente para secagem.

Por fim, o pellet foi ressuspensionado em 15 µL de água DEPC (15 minutos em temperatura ambiente e 15 minutos no gelo). Foi separada uma alíquota de 2 µL para cada amostra para a posterior quantificação de RNA. Os RNAs foram armazenados no freezer -80°C. A concentração dos RNAs foi avaliada através de espectrofotometria (Nanodrop). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260 nm.

4.10.3 RT-qPCR para análise dos microRNAs

A PCR quantitativa pode ser realizada em um ou dois passos. Aqui, foi utilizado o modo “two step”, que, separadamente, sintetiza-se o cDNA a partir do RNA total extraído e em seguida procede-se com as reações de amplificação. O cDNA consiste em moléculas de DNA complementar aos transcritos de RNAs. Essa conversão é justificada pela instabilidade do RNA conferida pela sua alta reatividade quando comparada às moléculas de DNA.

É possível utilizar duas categorias de ensaios, aqueles baseados em mixes contendo o reagente Syber green, um fluorocromo que intercala fitas dupla de DNA e por quantificação indireta ao longo dos ciclos, pode-se estabelecer a quantidade de transcritos oriundos da amostra. E aqueles baseados em sondas TaqMan.

A transcrição reversa específica para o miR 196b-5p e U6snRNA foi realizada através do sistema TaqMan microRNA Transcription e TaqMan MicroRNA Assay (ambos da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi utilizado 0,15 µg do RNA total das amostras. Seguindo as instruções do fabricante, as reações foram realizadas em volume final de 15 µL. Ao mix da reação foram adicionados 0,15 µL de dNTPs 100 mM, com dTTP, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,5 µL de 10 X Reverse Transcription Buffer, 0,19 µL de RNase Inhibitor (20 U/µL) e 4,16 µL de água livre de nuclease. Após o preparo do mix, foi adicionado 3 µL da *probe* específica por reação. Em seguida, 10 µL desse mix foi distribuído à solução de RNA (solução de 0,15 µg de RNA em 5 µL de água DEPC). As reações foram incubadas nas seguintes condições de temperatura: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 5 minutos à 85°C. As amostras foram armazenadas a -80°C.

A obtenção dos perfis de expressão foi realizada através da metodologia RT-qPCR utilizando o equipamento StepOne Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando o TaqMan kit (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. Ao mix das reações foram adicionados, contendo 5,0 µL de Master Mix, 1,0 µL de sonda específica (20X), 2,0 µL de água DEPC e 2 µL de cDNA. As condições de amplificação da reação foram: 50°C por 2 minutos para a atividade da UNG, 95°C durante 10 minutos para ativação da enzima, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação – O *Cycle threshold* (Ct) – foi determinado

automaticamente pelo programa. Os experimentos foram realizados em triplicatas, e os controles negativos (reações sem cDNA). As análises de expressão relativa foram realizadas através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.10. 4 RT-qPCR para análise dos genes alvos preditos do miR-196b-5p

A avaliação do perfil de expressão dos RNA codificadores, cujos genes são alvos preditos do miR-196b-5p também foi realizado por RT-qPCR. Após a extração do RNA total, seguiu-se o tratamento das amostras com DNase. Aos volumes das amostras correspondentes a 0,25 µg de RNA total (no volume de água DEPC + RNA de 6,87), foi adicionado 1,13µL do mix de tratamento composto por tampão de DNase 1x (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de RNaseout (Invitrogen). As reações foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 uL de EDTA 5 mM e as reações foram incubadas a 75°C por 10 minutos. Obteve-se uma solução de 10ul de RNA tratado. Logo em seguida, o cDNA foi sintetizado, como especificado abaixo utilizando o kit High Capacity (Invitrogen). Inicialmente, ao mix da reação foram adicionados 2.0 µL de Tampão (10x), 0,8 µL de dNTPs (25x), 2 µL de Random primer e 1 µL Transcriptase reversa (50 U/µL). Ao RNA tratado, foi adicionado 10 µL do mix. As reações foram incubadas à 25°C por 10 minutos, à 37°C por 120 min e à 85°C por 5 min. Em seguida, armazenadas à -80°C.

A análise do nível de transcritos foi realizada através de RT-qPCR, utilizando-se o kit goTaq (Promega Technology). Ao mix foi adicionado 6 µL de Syber, 3 µL de primer (F+R), 0,5 µL de água DEPC, 0,12 µL ROX e 2,5 µL de cDNA. As condições de amplificação da reação foram 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C.. As análises de expressão relativa foram realizadas através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 7 - Lista de primers para genes codificadores

| Gene | Referência (NCBI) | Sequência | Concentração usada (uM) |
|--------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| SLC9A6 - F' | NM_177909.5 | 5'-CCCCTCTCTTGTCTGTGTAC-3' | 0,2 |
| SLC9A6 - R'' | | 5'-GGACCAAATGGGAGGAGGG-3' | |
| HMGA2 - F | NM_010441.3 | 5' - AACCTGTGAGCCCTCTCCTAAG - 3' | 0,6 |
| HMGA2 - R | | 5' - GCCGTTTTTCTCCAATGGTC | |
| RPLP1 -F | NM_001007604 | 5' -ACGGTCACGGAGGATAAGAT-3' | 0,2 |
| RPLP1 -R | | 5'- GCAGATGAGGCTTCCAATGT | |

Fonte: AUTORA, 2018

4.10.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram examinados quanto aos pressupostos paramétricos de normalidade (teste Kolmogorov). Para a análise estatística dos dados foi utilizado análise de variância (ANOVA). As comparações post-hoc foram realizadas com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni/Dunns. Para todos os casos foi considerado Valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Utilizou-se o pacote estatístico GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DE NANOCARREADORES DO TIPO HDL E ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO

A síntese de nanopartículas do tipo HDL ficou estabelecida nos laboratórios LBCM do ICBS e TecNano da ESENFAR a partir da adaptação do método descrito por Chen e colaboradores (2013). As modificações ao longo da pesquisa resultaram em 3 formulações: F.1, F.2 e F.3 cujos resultados de tamanho de partícula e potencial zeta estão descritos abaixo. As formulações 1 e 2 não compreenderam propriedades satisfatórias, apresentando tamanho de partícula grande e instabilidade coloidal. Apenas a formulação 3 apresentou parâmetros elegíveis, justificando sua escolha nas subseqüentes etapas do estudo aqui exposto.

Um fator importante para o estabelecimento da F.3 diz respeito às condições ideais de síntese, sobretudo àquelas que compreendem o tratamento hidrotérmico. O tratamento hidrotérmico permite que haja uma distribuição uniforme dos metais nas camadas dos HDL, produzindo então partículas cristalinas (GU et al., 2014). Tempo e temperatura já foram descritos como essenciais para obtenção de HDL homogêneas. De fato, a relevância do tempo no tratamento foi evidenciada, quando os materiais foram submetidos às condições de temperatura de 60°C por 12 horas, produziu-se nanomateriais amorfos, e quando submetidos ao tratamento à 100°C, nanomateriais cristalinos (BERBER et al., 2011). Por outro lado, tratamento hidrotérmico prolongados podem levar a agregação das partículas, devido a repulsão eletrostática que é superada, culminando com tamanhos maiores (GU et al. 2014). Além disso, Gursky e colaboradores (2006) afirmam que é imprescindível a utilização de autoclave cujo revestimento seja de material inerte, como o teflon, para a produção adequada desses nanomateriais, já que impede que ocorra a reação entre reator e HDL, produzindo materiais inadequados.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE HDL

5.2.1 Tamanho da partícula, potencial Zeta e morfologia dos HDL

As caracterizações iniciais de tamanho de partícula e potencial zeta foram avaliadas pela técnica DLS. Obteve-se tamanho hidrodinâmico médio de 88,39 d.nm. (Anexo A), similar aos dados anteriormente reportados na literatura. De fato, dentre os estudos que prepararam HDL pelo método de coprecipitação e cuja aplicação diz respeito a ensaios de modulação gênica, a maioria obteve tamanho de partículas semelhantes ao encontrado nesta presente pesquisa, variando entre 50 à 98 nm (CHEN et al., 2013; DONG et al., 2014a; LADEWIG et al., 2010b).

O tamanho da partícula é um aspecto crítico em se tratando de nanomateriais produzidos especialmente para aplicações biológicas. Segundo Leong et al., (2005), 200 nm é o tamanho máximo viável para que possam ser internalizados pelas células. Esta variável é, portanto, um dos principais fatores limitantes (CHAMPION et al., 2007), e se correlaciona diretamente com o processo de endocitose mediado por proteínas da família clatrina, como o caso dos HDL. Choi e Choy (2011) explicam que o tamanho é crucial para a interação e reconhecimento celular, bem como o futuro mecanismo de captação (CHOI; CHOY, 2011).

Embora não tenham dados publicados que envolvam a relação do tamanho de HDL do tipo Mg-Al e moléculas inibidoras de miRs, Chen e seu grupo de pesquisa (2013) avaliaram a importância do tamanho de partícula desse nanomaterial cuja aplicação era voltada para a entrega de siRNAs às células. Os autores observaram que os HDL menores (s-HDL), cujas medidas eram aproximadamente 40 nm, apresentaram maior taxa de internalização e porcentagem de inibição do gene.

Além disso, uma outra medida importante oriunda dessa análise é o índice de polidispersão da partícula (PDI), que apresenta uma relação inversamente proporcional à homogeneidade de tamanho entre elas, e varia entre 0 e 1. Quanto menor esse índice, maior a indicação de homogeneidade entre as partículas. Valores inferiores à 0,05 indicam padrão altamente monodispersos, PDI maiores que 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanho de partícula muito ampla (DANAIE et al. 2018).

Aqui, obteve-se o valor de 0,158, indicando que os HDL foram produzidos em tamanhos similares. Esses achados satisfatórios de tamanho e PDI estão também

intrinsecamente relacionados ao tratamento hidrotérmico que os nanocarreadores aqui foram submetidos. Ladewig e colaboradores (2010a) afirmam que o tratamento hidrotérmico dispersa agregados presentes no produto bruto, bem como adequam o tamanho das partículas de HDL usando o efeito de maturação de Ostwald. Xu e colaboradores (2016) afirmaram que o tempo ideal para o tratamento hidrotérmico é de 16h à 100°C, semelhantes ao que foi realizado no presente trabalho. De fato, dentre as inúmeras formulações de HDL preparadas e testadas, Dong e colaboradores (2014) observaram PDI com média de 0,2, especialmente àquelas que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico adequado.

Em se tratando do potencial zeta, os HDL produzidos apresentaram o valor de +45 mV (Anexo A). A partir do resultado é possível observar dois aspectos: i) carga residual, indicando positividade das lamela e ii) valor do resultado em modulo, que quanto maior, indica maior estabilidade coloidal, fato que também corrobora à interpretação da quase nula possibilidade de agregação das nanopartículas aqui produzidas, Estes nanomateriais preparados pelo método de coprecipitação, em sua maioria, apresenta alta estabilidade, similar aos dados anteriormente reportados (LADEWIG et al. 2010; XU et al. 2007; CAO et al. 2018). Desde que a determinação do tamanho e potencial zeta são propriedades importantes e que podem interferir fortemente nas abordagens de uso de HDL, neste estudo essas medidas foram tomadas como parâmetros críticos iniciais para confirmação de produção dos nanocarreadores. Ambos apresentaram resultados satisfatórios, assim os próximos experimentos foram conduzidos.

Um outro parâmetro importante diz respeito a morfologia do material. Os HDL produzidos apresentaram formas hexagonais, conforme microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8), o que corrobora com os dados outrora reportados na literatura (CHEN et al., 2013; CHOI et al., 2018).

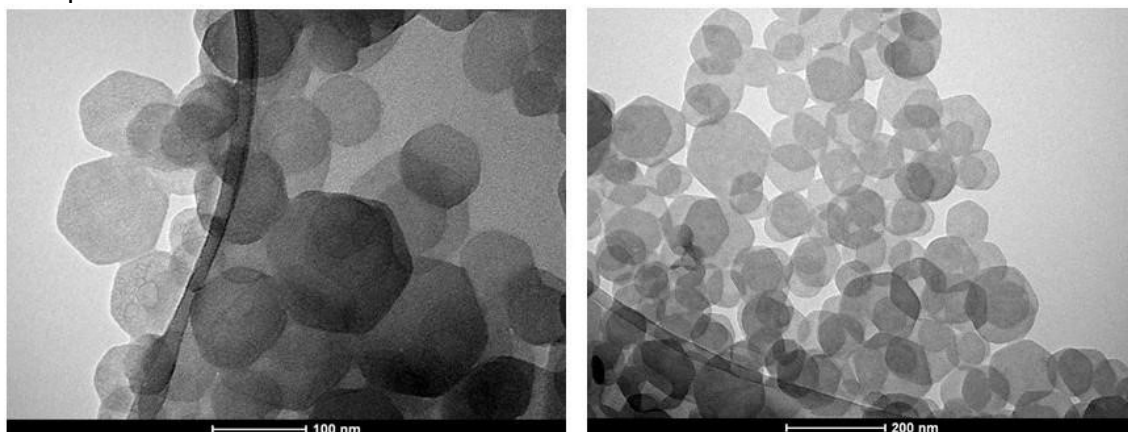
O formato do nanomaterial produzido tem implicação direta na sua aplicação. Shimoni e colaboradores (2013) avaliaram a morfologia de nanocápsulas de hidrogel produzidas. Interessantemente, os pesquisadores observaram formatos distintos entre elas. Estendendo essa pesquisa no intento de avaliar a internalização desses nanomateriais *in vitro*, a partir da conjugação de moléculas fluorescentes à elas, observaram que quando apresentavam formato esférico, esses nanomateriais eram mais eficazes em transfectar às células quando comparados aqueles com formato

alongados. Para os HDL, no entanto, não há descrição quanto a relação entre formato e a eficiência de internalização. Contudo, já foi reportado que o formato dos HDL pode repercutir em outra propriedade.

De fato, Xu e seu grupo de pesquisa (2008a) apontaram uma diferença no tráfico celular de HDL e atribuíram esses achados à morfologia. Os autores sintetizaram HDL hexagonais e em formato “*typical rods*” em seguida associaram-nos ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) no intuito de avaliar o direcionamento aos compartimentos subcelulares específicos mediados por ambos os formatos de HDL. Após o escape endossomal, foi observado que para o formato “*rods*” os FITC transportados pelos complexos eram acumulados no núcleo, enquanto que os transportados pelos HDL hexagonais permaneciam na região perinuclear das células. Ressalta-se que o presente estudo teve por objetivo a construção de um nanossistema para carreamento de moléculas inibidoras de miRs, e estas moléculas por sua vez, devem ter ação no citoplasma, já que os miRs maduros atuam nesse compartimento celular. Diante disso, o quesito morfologia foi altamente satisfatório.

Assim, os HDL com diferentes morfologias são os primeiros nanomateriais conhecidos que facilitam o direcionamento de compartimentos intracelulares específicos para fins de liberação de drogas ou genes (XU et al., 2008a). Tamanho e morfologia interferem em aspectos diretamente relacionados com a capacidade de internalização e de complexação, quantidade complexada e direcionamento celular do complexo respectivamente. Assim, segundo os parâmetros até então discutidos, as nanopartículas produzidas mostraram-se com características satisfatórias para as etapas subsequentes que dizem respeito a complexação com os oligonucleotídeos.

Figura 8 - Morfologia dos nanocarreadores do tipo HDL sintetizados obtida através da microscopia eletrônica de transmissão

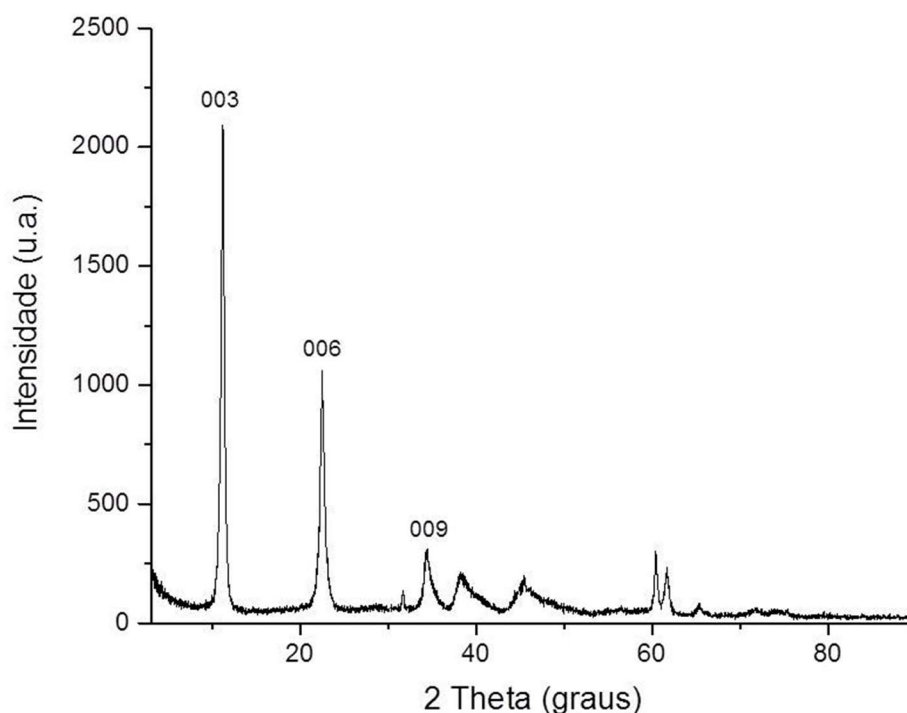


Fonte: AUTORA, 2018

5.2.2 Cristalinidade e grupamentos químicos presentes

Para avaliar a cristalinidade dos HDL, foi utilizada a técnica de difração de raios X. Os HDL produzidos apresentaram difratograma padrão, com difrações basais nos planos 003, 006 e 009 (Figura 9). A partir da análise desses dados, é possível observar a organização estrutural da nanopartícula sintetizada. Os dados aqui descritos corroboram aos achados da literatura (DONG et al., 2014b; XU et al., 2007).

Figura 9 - Difratograma de Raios X de HDL produzidas

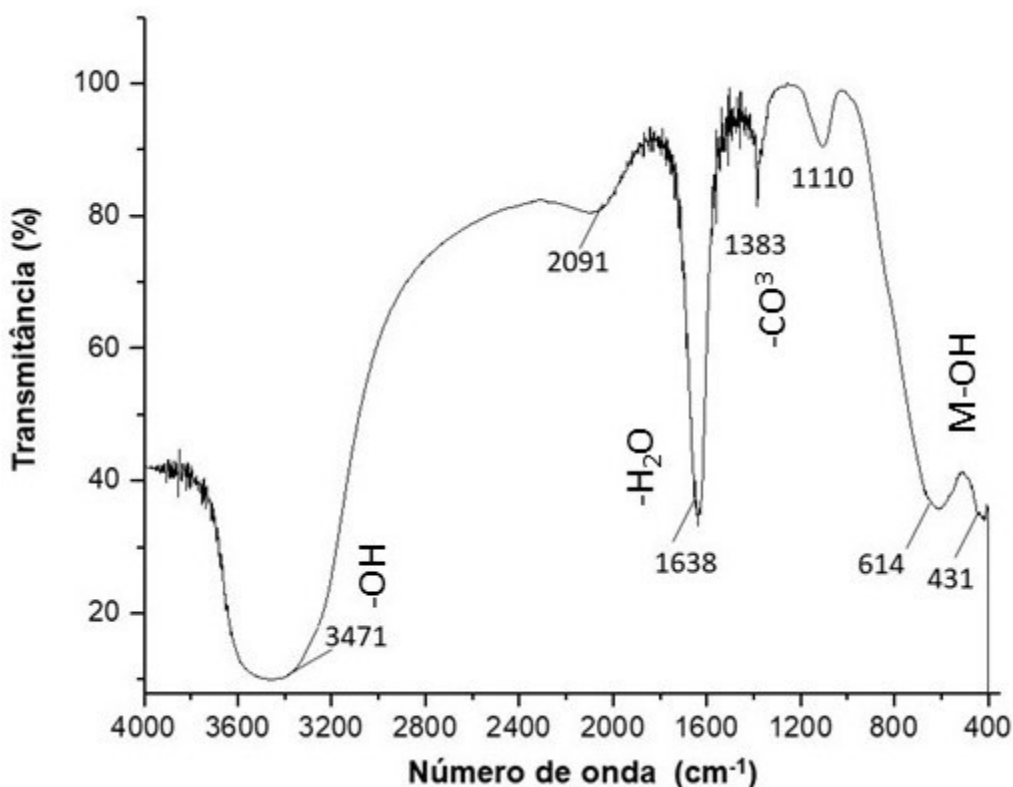


Fonte: AUTORA, 2018

Além disso, o espaçamento basal calculado a partir do pico de maior intensidade, nesse caso o 003, apresentou resultado de 7,9 Å, corroborando com trabalhos anteriormente publicados por Wong et al (2014), Chen et al (2013), Menezes et al (2014).

Para avaliar os grupamentos químicos presentes, os HDL foram analisados pelo método de FT-IR. A figura 10 traz o resultado dos espectros de absorção e mostram que são característicos para HDL do tipo Mg-Al, conforme Benicio et al, (2015) e Ladewig et al (2010).

Figura 10 - Espectros de absorção na região do infravermelho de HDL Mg-Al obtidos através de Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)



Fonte: AUTORA, 2018

Como característico dos HDL, a banda que apresentou intensa absorção a 3471 cm^{-1} é referente às vibrações do grupo OH ligado ao Hidrogênio, do mesmo modo que de moléculas de água nas intercamadas. A banda a 1638 cm^{-1} é concernente às vibrações da curvatura da água, semelhantes aos dados reportados por MENEZES et al. (2014). Quando a síntese é realizada em ar atmosférico é comum a presença de contaminantes, informação corroborada pela presença da

banda 1383 cm^{-1} , que corresponde às vibrações de íons de carbonato. As bandas abaixo de 800 cm^{-1} são caracterizadas pela presença de metais (KLOPROGGE; FROST, 1999; OLFS et al., 2009).

5.3 FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS HDL:OLIGO E CARACTERIZAÇÕES

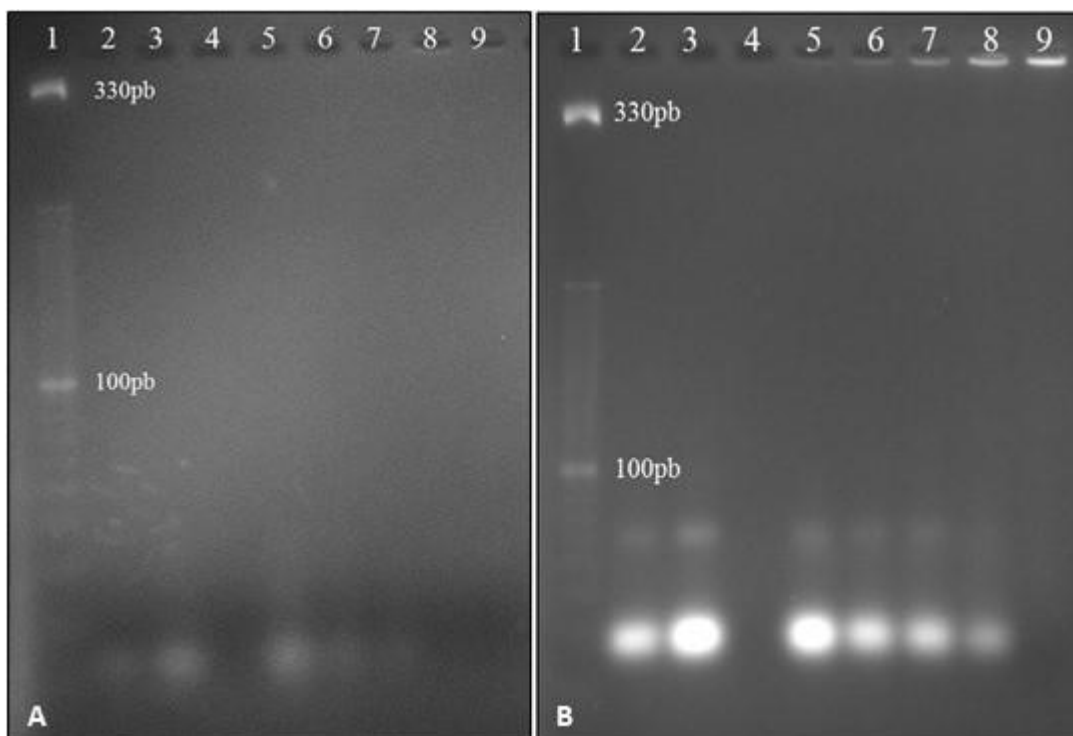
5.3.1 Seleção da proporção HDL: Oligonucleotídeos

Objetivando avaliar a eficácia da complexação de dois diferentes oligonucleotídeos aos HDL, foram realizados ensaios de retardação em gel de agarose, que permitiu a comparação do padrão eletroforético dos complexos formados a partir de diferentes proporções de massa entre HDL e Oligos.

Observa-se o padrão de migração dos complexos HDL com oligonucleotídeos de fita simples. Também foi avaliado o perfil desses oligos e nanocarreadores sozinhos, como controle de complexação. Nas colunas 2 e 3 são mostrados os perfis dos oligos (0,5 e $1\mu\text{g}$ respectivamente), apresentando bandas intensas, evidenciando que não há retenção dos mesmos no gel dada a negatividade destas moléculas. A coluna 4 expõe o perfil eletroforético da nanopartícula sozinha; não apresentando banda ou indícios de migração, o que é justificado pela positividade de suas lamelas (CUNHA et al, 2005). As colunas 5 à 9 apresentam o perfil eletroforético dos complexos HDL: oligo nas seguintes proporções de massa: 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 respectivamente. À medida que se aumentou a massa de HDL em relação ao oligo, observou-se uma maior retenção da banda na malha do gel de agarose, indicando uma maior complexação entre a nanopartícula e o oligo. Assim, quanto maior a razão HDL: Oligo, interpretou-se como maior associação (Figura 11A).

Além do ensaio de retardação com o oligo fita simples, foi realizado o mesmo experimento, com as mesmas proporções de massa, usando o Bock-itt. A figura 11 B mostra o padrão migratório dos complexos HDL: Block-itt. É perceptível a semelhança neste padrão e intensidade das bandas comparados aos complexos HDL:oligo (A).

Figura 11 - Ensaio de retardamento em gel de Agarose dos complexos



A) HDL:oligo. B) HDL:Block-itt Gel de Agarose 3,5%. Coluna 1: marcador 10 pb. colunas 2 e 3: apenas o oligo/block-itt (0,5 μ g e 1 μ g). Coluna 4: apenas HDL (1 μ g/ μ L). Raias 5 à 9: complexos nas proporções 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, respectivamente. Fonte: AUTORA, 2018.

O padrão eletroforético dos complexos HDL: oligonucleotídeos é comumente acessado para avaliação do grau de complexação entre ambos.

Para corroborar os dados do ensaio de retardação em gel de agarose e definir a razão adequada para este estudo, avaliou-se também o tamanho hidrodinâmico e potencial zeta dos complexos formados a partir de diferentes proporções entre HDL e oligos. Observou-se que a medida que se aumenta a proporção de massa de HDL nos complexos, o tamanho médio também aumenta, o que inviabiliza a internalização dos complexos pelas células. portanto, atrelando os resultados do ensaio de retardação em gel de agarose aos de tamanho dos complexos, a proporção de massa, 1:1 ficou estabelecida com padrão nesta pesquisa. Apesar da não retenção total do complexo na malha do gel nessa proporção, observou-se que o tamanho médio para o complexo foi de 146.nm (Anexo B), semelhante ao reportado por Chen et al (2013), permitido para endocitose celular.

Dados semelhantes aos do presente estudo foram reportados por Wong e colaboradores, estabelecendo a proporção de massa 1:1 como sendo a ideal (WONG et al., 2012). Os autores salientaram uma observação semelhante ao reportado aqui: quanto maior a proporção de HDL na formação do complexo, havia uma maior retenção do complexo na malha do gel, indicando maior grau de associação. Apesar desse aparente ponto positivo, estes complexos apresentavam tamanhos maiores, fato que inviabiliza que estes complexos sejam internalizados pelas células. Além desses autores, Yoo e colaboradores (2014) utilizando Gd-HDL também utilizaram a proporção de massa 1: 1 (HDL: oligo) e obtiveram resultados positivos quanto à taxa de transfecção do nanocomplexos às células. Seguindo o mesmo princípio, Chen e colaboradores (2013) optaram pela mesma proporção de massa. Em contrapartida, Li junto ao seu grupo de pesquisa usaram 10x mais a quantidade de massa de HDL para a co-transfecção de 5-fluorouracil (5-FU) e siRNA (LI et al., 2014).

A capacidade de troca iônica dos HDL formados e conseqüentemente o grau de associação aos oligonucleotídeos depende de fatores relacionados ao tipo HDL e de oligo utilizado. Sanderson e colaboradores (2013) avaliaram diferentes sínteses de HDL para este mesmo fim e concluíram que aqueles produzidos sob temperaturas mais altas e que possuíam capacidade de troca iônica maior, havia uma associação mais facilmente aos diferentes oligos testados, ssDNA e dsDNA.

O padrão de migração no gel, portanto, reflete o grau de associação entre HDL e siRNA. Wong e colaboradores postulou, de um modo geral que há três possibilidades de associação entre eles, fato que precisa ser avaliado por mais de uma técnica: i) intercalação completa, ii) intercalação parcial e iii) adsorção (WONG et al., 2012). A maioria dos trabalhos que abordam a temática de “entrega de genes e HDL” não descreve de fato o tipo de associação ocorrida entre ambos, no entanto o conjunto de caracterizações dão uma sombra das interações ocorridas. Essa falta de clareza na discussão desse tipo de dado pode levar a interpretações imprecisas.

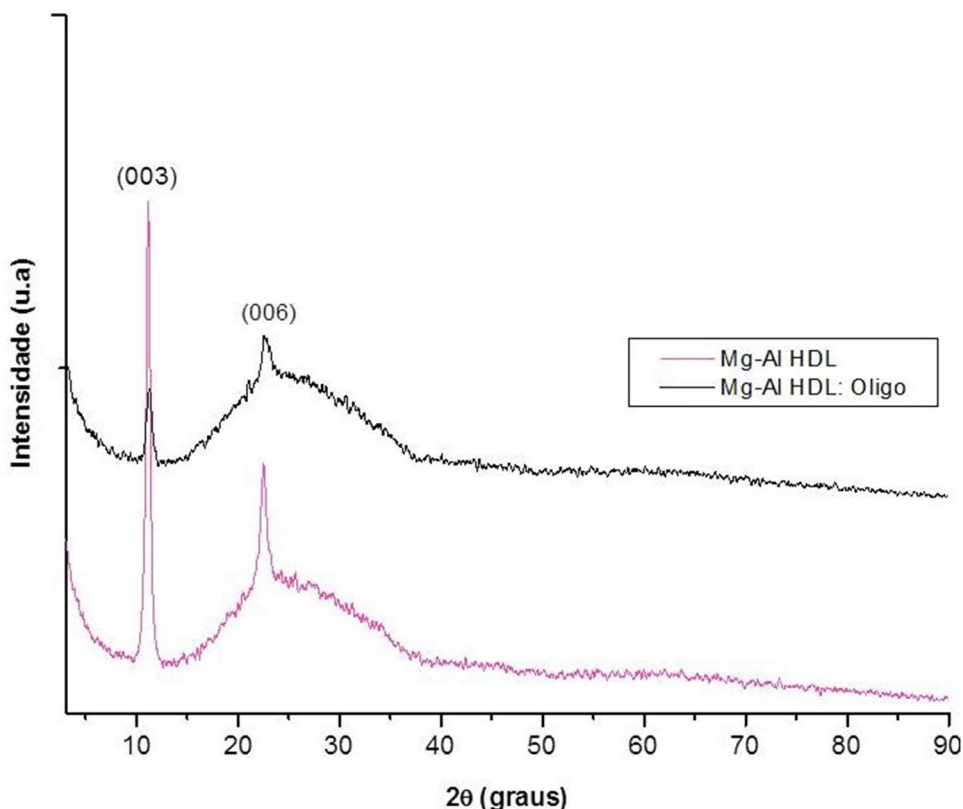
Em se tratando do potencial zeta dos complexos HDL:oligo, observou-se um valor de -37,4 mV (Anexo B). Chen e colaboradores (2012) identificaram dados semelhantes. Essa carga residual negativa também pode indicar o grau de associação. De fato, já foram relatados valores de potencial zeta distintos para complexos com HDL: oligos formados a partir de HDL cujos modos de preparação

foram diferentes. Estes valores refletem a capacidade de troca iônica, apontando que a intercalação dos oligonucleotídeos nas lamelas é maior quanto maior for a área superficial da nanopartícula. Sabendo-se do princípio que nanopartículas menores apresentam maior área superficial, o tamanho do HDL produzido, reflete no tipo de associação que pode ser acessado em conjunto a uma gama de resultados, inclusive a partir do potencial zeta.

4.3.2 Cristalinidade e grupamentos químicos

Os complexos formados, bem como os HDL foram avaliados por difração em raios X, em modo filmes finos. Na figura 12 está exposto o difratograma do complexo HDL: oligo (linha preta) e dos HDL (linha rosa). Os HDL apresentam picos característicos 003, 006 semelhantes aos dados reportados por CHEN et al. (2013). Há picos que não são expostos quando comparados com a figura 9, devido às interferências do vidro do porta amostra, podendo ser observado quando as análises são realizadas com a amostra em suspensão, semelhante ao dado já descrito (XU et al., 2008b). Em se tratando do complexo HDL: oligo, o perfil difratográfico se manteve, no entanto apresenta uma acentuada diminuição na cristalinidade representada pelo pico 003. Os dados reportados corroboram aos descritos na literatura, tanto para HDL associados à monoculeotídeos, quanto oligonucleotídeos fita dupla (dsDNA) (AISAWA et al., 2004).

Figura 12 - Difratoograma de raios X de A) HDL; B) Complexo HDL:Oligo



Fonte: AUTORA, 2018

Os dados aqui expostos informam que não houve mudança no espaçamento basal, apresentando valor de 7,83 Å.

É preciso levar em consideração o tamanho do raio atômico do oligo a ser associado (dsDNA, sDNA, dsRNA). Tendo em vista que o raio atômico do cloreto intercalado nos HDL aqui exposto é maior que a molécula de DNA fita simples, que é de 0,6nm (MAEDA et al, 1999), a depender da posição direcionada do oligo, e o tipo de associação é possível que não ocorra mudança no espaçamento interlamelar. De fato, o único trabalho que utilizou moléculas inibidoras de miRs associadas a nanomateriais do tipo Gd-HDL conduzido por Yoo e colaboradores (2014). Os autores relataram resultados de difrações de raios X dos complexos sem diferença no espaçamento basal quando comparado com os HDL sozinhos (YOO et al., 2014). Arelado a isso, outro aspecto importante é a posição em que os oligos se acomodam quando intercalados, como mencionado anteriormente.

Por outro lado, Wong e colaboradores utilizando siRNA e dsDNA não observaram mudança no espaçamento basal através do DRX como descrito no

presente trabalho, no entanto identificaram, através da ultramicroscopia eletrônica de transmissão, o aumento interlamelar em algumas poucas regiões da fotomicrografia (WONG et al., 2012). Através desses achados, os autores afirmaram que houve intercalação dos oligos. No entanto, ainda discutem que não é possível determinar se o dsDNA é intercalado total ou parcialmente por entre as lamelas dos HDL

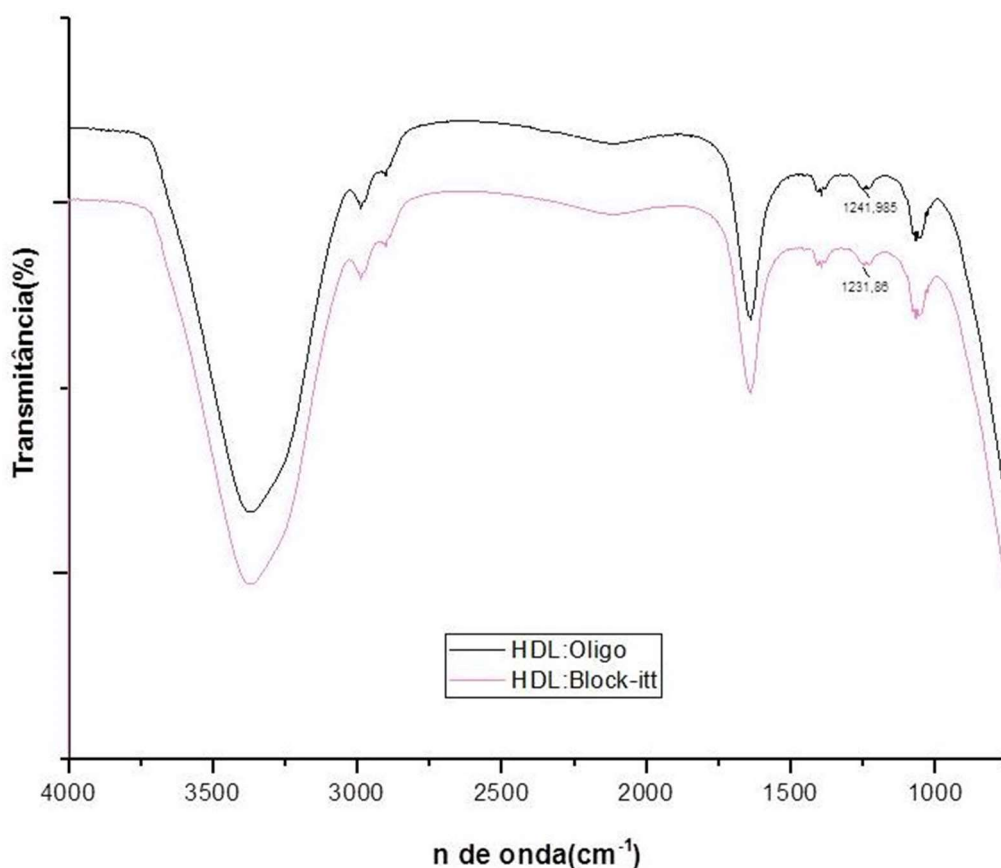
Aisawa e colaboradores (2004), avaliando a associação de HDL com nucleotídeos observaram que o AMP intercalado foi orientado verticalmente na entre as camadas, respaldados pelo tamanho molecular que é estimado em 0,95 nm de comprimento, e à expansão provocada no espaçamento interlamelar (AISAWA et al., 2004). Em outro trabalho o mesmo grupo promoveu a intercalação do aminoácido fenilalanina no espaço interlamelar de diferentes HDL, preparadas com diferentes cátions. A partir de análises de DRX, mostraram dois tipos de orientação da intercalação, a saber, orientação vertical para HDL cujos cátions eram Mn, Al, Zn, Al e Zn, Cr, e orientação horizontal para HDL do tipo Mg-Al (AISAWA et al., 2001). Em contrapartida, não há descrição na literatura sobre o posicionamento dos oligos nos HDLs em função dos diferentes cátions que compõem as lamelas.

Além do tipo e orientação do oligo, é importante observar o protocolo de síntese/complexação com os HDL. Recentemente, foi feita uma compilação dos tipos de protocolos descritos, baseada em ensaios para manipulação gênica carregados por HDL: i) Coprecipitação direta; ii) Troca iônica; iii) Exfoliação e iv) "mixing". E estes têm implicação direta nos resultados (CHOI et al., 2018). Todos os aspectos acima precisam ser levados em conta. Outros pesquisadores obtiveram resultados contrários aos aqui apresentados, mostrando uma mudança evidente no espaçamento interlamelar dos HDL associados com oligonucleotídeos (AISAWA et al., 2004).

A análise dos complexos HDL: oligos também se deu quanto aos grupamentos químicos presentes pela técnica de FTIR (Figura 13). As bandas presentes nos HDL permaneceram, tais quais à 11a, com o acréscimo de nova referente à unidade dos oligonucleotídeos. Os nucleotídeos apresentam estrutura bem definida; base nitrogenada (A, T, G, C para DNA, e A, U, G, C para RNA), açúcar (pentose para DNA e ribose para RNA) e grupamento fosfato (ALBERTS, 2008). Assim, dada a associação, espera-se obter espectros de absorção nas regiões correspondentes

aos grupamentos. A banda de absorção à 1231 e 1241 referem às vibrações assimétricas do PO_2 (TSUBOI, 1970), encontradas para complexos formados com o HDL: Block-itt e HDL: oligo, respectivamente. Dados similares foram reportados por Yoo et al (2014).

Figura 13 - Espectros de absorção na região do infravermelho do complexo formado entre HDL: oligonucleotídeos

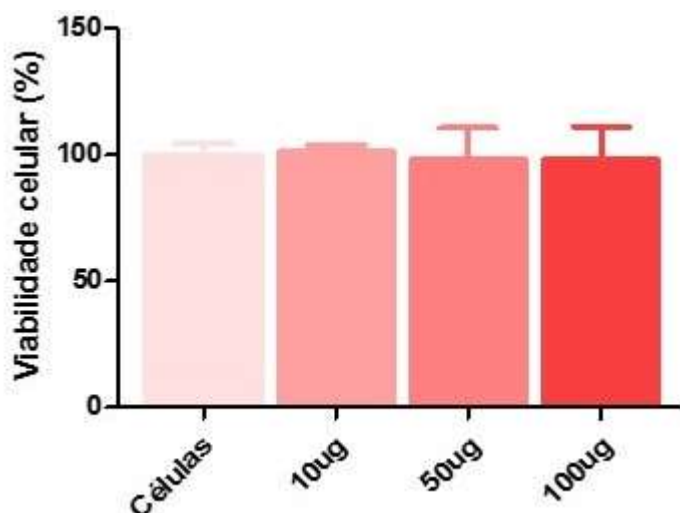


Fonte: AUTORA, 2018

4.3.3 Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular na presença dos HDL, as células foram tratadas com concentrações variando entre 1 à 100 $\mu g/mL$ por 24h e 48h. Em sequência, foram avaliadas quanto a sua viabilidade frente ao tratamento. A figura 14 traz os resultados para os testes de MTT, indicando ausência de toxicidade nas concentrações de até 100 $\mu g/ml$ à linhagem celular t.End.1.

Figura 14 - Viabilidade celular da linhagem tEND.1 após tratamento com HDL



Os dados foram submetidos ao teste ANOVA seguido de pós-hoc Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo. Fonte: AUTORA, 2018

Um aspecto importante e geral na seleção de carreadores é que os mesmos não sejam tóxicos às células alvos. Os dados aqui expostos são concordantes a uma série de artigos que acessaram a viabilidade de diferentes linhagens celulares frente ao tratamento com os HDL, não apresentando danos às mesmas (WONG et al., 2014, CHOI et al., 2018). Chen e colaboradores (2013) não observaram perda significativa da viabilidade das células HEK 293T quando expostas ao s-HDL e l-HDL, mesmo utilizando um intervalo de concentração de HDL até 200 $\mu\text{g/mL}$.

Interessantemente, Choi e Choy (2011) observaram uma moderada toxicidade dos HDL quando comparadas com outros carreadores inorgânicos, atribuíram esses achados às suas propriedades físico-químicas dos materiais sintetizados por eles, como o tamanho de partícula. Quanto menor, maior a superfície de contato e maior a área de adsorção e consequente intercalação.

Tendo em vista o exposto, os HDL aqui produzidos, abrangem satisfatoriamente todos os parâmetros até então discutidos.

5.3.4 Eficiência de internalização dos complexos HDL: inibidor às células

Desde que os nanocarreadores aqui sintetizados apresentaram características físico-químicas ideais para carreamento gênico, que o complexo foi formado e são biologicamente viáveis, a etapa seguinte foi avaliar a eficiência de

entrada dos oligos às células mediadas pelos HDL. Para isso, foram realizadas análises em citometria de fluxo das células tratadas com os complexos formados, HDL: Alexa flúor-555, lipofectamina: Alexa flúor 555 e os controles. A tabela 13 traz o resumo dos resultados de eficiência de transfecção (%).

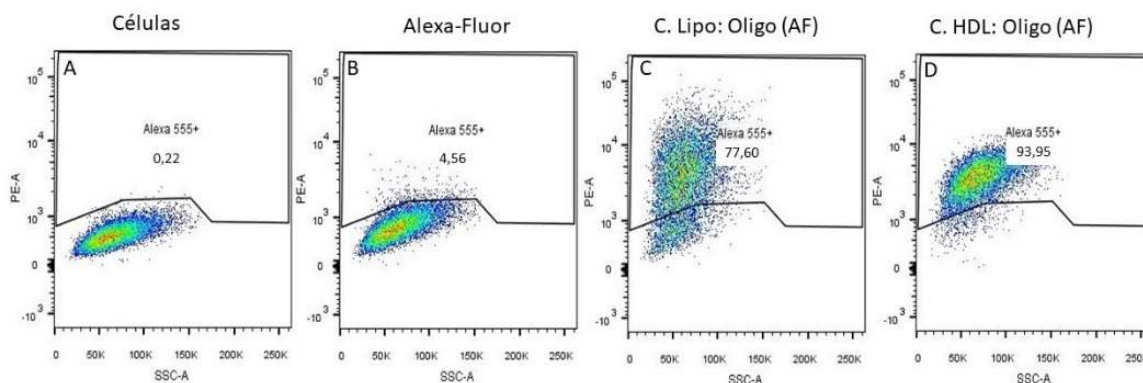
Tabela 13 - Porcentagem de células Alexa-flúor positivas após tratamento com os complexos HDL: Block-itt e controles

| Grupo | Eficiência de transfecção (%) |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Células | 0,22 |
| HDL | 0,72 |
| Oligonucleotídeo (Alexa-fluor) | 4,56 |
| Lipofectamina | 0,38 |
| Complexo HDL:Oligo | 93,95 |
| Complexo lipofectamina: Oligo | 77,60 |

Fonte: AUTORA, 2018

No grupo cujas células foram tratadas com o complexo lipo:Block-it, obteve-se uma eficiência de transfecção de 77,6%. Para o grupo composto pelas células tratado com HDL:Block-itt, obteve-se um sinal de fluorescência provenientes dos oligos marcados com alexa-555 em quase todas as células, apresentando 93,95% de transfecção (Figura 15), enquanto que não foi detectado sinal de fluorescência significativo para os grupos HDL (0,72%), lipofectamina (0,38%) e oligo (4,56%), esse último referente ao ruído de fundo da leitura.

Figura 15 - Eficiência de transfecção às células da linhagem t.END.1 dos oligonucleotídeos marcados com Alexa-fluor 555 mediados pelos complexos formados com HDL e com Lipofectamina.



Porcentagem de células Alexa flúor positivas avaliadas por citometria de fluxo. A) Apenas células; B) Tratadas apenas com oligonucleotídeo AF; C) Tratadas com complexos Lipo: Oligonucleotídeos AF; D) Tratadas com complexos HDL: Oligonucleotídeos AF. AF= Alexa Fluor-555. Fonte: AUTORA, 2018

Esta análise demonstrou alta eficiência para ambos os grupos de complexos, HDL e lipofectamina, sobressaindo-se o grupo cuja transfecção foi mediada via HDL. Essa taxa está de acordo com o único trabalho que usou HDL para transfecção de inibidores de miRs, observando-se 99% de células marcadas (YOO et al., 2014), corroborando, bem como incrementando as aplicações da Mg-Al HDL para estudos de ganho e perda de função de miRs. Além disso, altas taxas de transfecção de diferentes oligonucleotídeos mediados por HDL também já foram reportadas anteriormente (LADEWIG et al., 2010b).

Curiosamente, embora a taxa de transfecção do complexo produzido com HDL tenha sido superior àquela do complexo com a lipofectamina, a quantidade de fluorescência por célula foi maior no grupo Lipo. Dong e colaboradores (2014) encontraram dados semelhantes, contudo comparando HDL:oligo e HDL:oligo:liposoma.

Utilizando uma estratégia de carregamento de plasmídeos de DNA através da associação com HDL, Xu et al (2007) observaram taxa de transfecção reduzida. Para o grupo cuja estratégia de transfecção controle foi utilizando um reagente comercial (FuGENE), obtiveram resultados de 15% de células positivas e o grupo tratado com HDL de 3 a 6%. A baixa internalização dos oligos, segundo os autores, foi em decorrência da agregação dos HDL causadas pelo DNA plasmidial, apresentando complexos DNA-HDL com tamanhos entre 500 e 1000 nm (XU et al., 2007), acima

do preconizado que é em média até 200 nm. Assim, há uma redução drástica na captação celular por endocitose. No presente trabalho, no entanto, o tamanho do complexo foi de 146 nm, contribuindo assim também para obtenção de resultados satisfatórios concernentes a etapa de ensaios de transfecção.

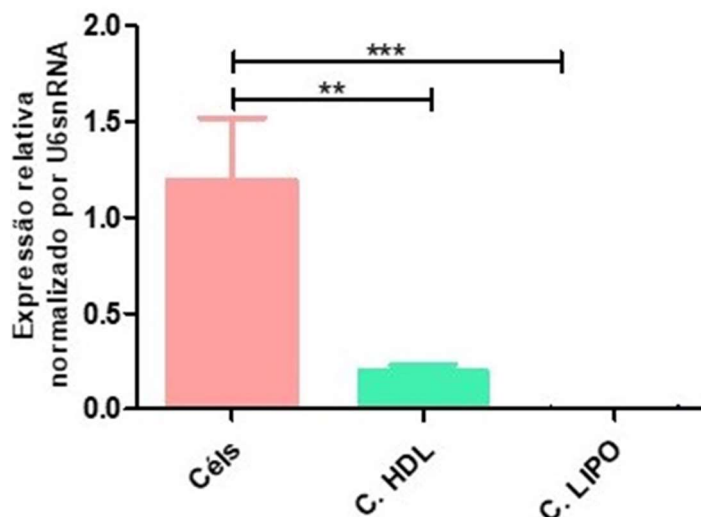
Um dos objetivos primários na seleção de carreadores para estudos de ganho e perda de função é que sejam aptos em carrear os oligos às células alvos eficientemente (LADEWIG; XU; LU, 2009). Desse modo, os resultados até então discutidos comprovam a eficácia do sistema aqui produzido.

5.3.5 Avaliação do ensaio de *knockdown* do microRNA 196b-5p

Diante dos resultados satisfatórios de transfecção, objetivou-se avaliar se o nanocomplexo HDL:inibidor do miR196b-5p era eficiente em depletar os níveis do miR-196b-5p em cultura de células.

Desse modo, após tratamento, avaliou-se a expressão desse miR, bem como de dois possíveis genes alvos preditos por ferramentas de Bioinformática, Slc9a6 e HMGA2. A figura 16 apresenta os dados de expressão relativa do miR-196b-5p, normalizados com o U6snRNA, gene de referência estabelecido para normalização de miRs (DE ARAÚJO et al., 2014). Observa-se que tanto para o grupo HDL: inibidor, quanto lipofectamina: inibidor houve uma diminuição significativa dos níveis de transcritos quando comparados ao grupo sem tratamento (apenas células).

Figura 16 - Expressão relativa do miR-196b-5p após tratamento com os complexos



Os dados foram submetidos ao teste ANOVA seguido de pós-hoc Bonferroni. Os valores representam as médias \pm erro padrão. Céls., células (n=5); C.HDL, complexo HDL: inibidor do microRNA (n=6); C. LIPO, complexo lipofectamina: inibidor do microRNA (n=6). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Fonte: AUTORA, 2018.

O nanosistema aqui sintetizado foi capaz de inibir 83,67% os níveis do miR 196b-5p, comparados com o grupo controle, e o complexo formado a partir do reagente comercial 99,77%. Nanocarreadores do tipo Mg-Al-HDL já foram descritos na literatura como eficientes em carrear distintas classes de oligonucleotídeos e proporcionar a sua liberação eficientemente. Neste estudo, no entanto, descreve-se pela primeira vez a utilização de inibidores de miRs nanocarreados por Mg-Al-HDL. Há uma série de parâmetros que podem repercutir no resultado de depleção dos genes, alguns deles já discutidos anteriormente, englobando aqueles relativos ao nanocarreador, os relativos aos inibidores e aqueles relativos à associação entre ambos, influenciando na subsequente liberação dos oligos.

O tamanho da cadeia do oligonucleotídeo utilizado influencia diretamente a complexação ao HDL, bem como o resultado de knockdown/expressão gênica. Xu e colaboradores utilizando um plasmídeo de 6100 pares de base, (pEF-eGFP) associados ao HDL observaram por meio de fluorescência baixa taxa de transfecção às células da linhagem HEK 293T e conseqüente baixa expressão de GFP. Quanto maior fosse a expressão desse gene, maior teria sido a eficiência do plasmídeo em ser carregado eficazmente pelos HDL. Contudo, para o grupo HDL os dados de

expressão de GFP observados variaram entre 3 e 6% do número total de células e o grupo cujo complexo foi preparado utilizando-se o FuGENE, obteve-se 7 à 15% (XU et al, 2007). Como supracitado, produtos maiores que 200 nm repercutem em uma ineficiente entrada às células. Outro aspecto importante diz respeito ao local direcionado. Por se tratar de modulação direta no gene, já foi reportado que o tipo de HDL para direcionamento nuclear é aquele cuja morfologia é no formato “typical rods” (XU et al., 2008). Na presente pesquisa, entretanto, o direcionamento foi para o citoplasma, e o antimiR 196b-5p pôde ser liberado eficientemente, já que foi apto em inibir os níveis de transcritos dos miRs.

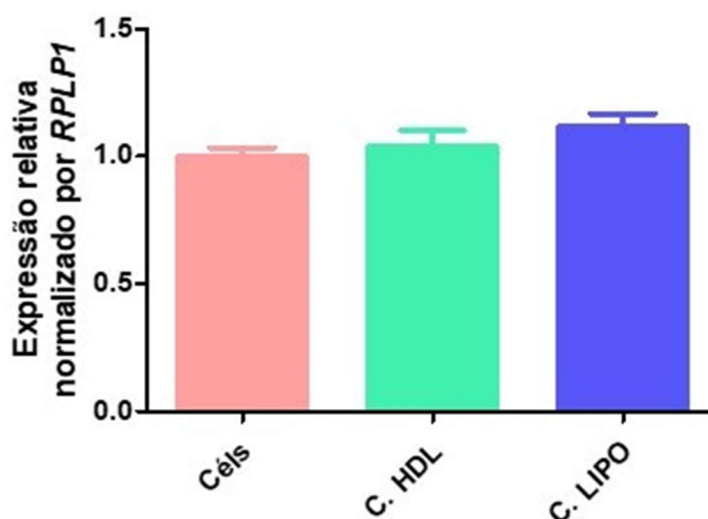
Utilizando uma outra abordagem de alteração da expressão gênica, Wong e colaboradores utilizaram siRNA para inibição do receptor de netrina (DCC), em cultura de neurônios corticais. Os autores observaram uma diminuição de 49% nos níveis protéicos quando tratados com o complexo usando o siRNA:HDL DCC#1 e 62% siRNA:HDL DCC#2. Os símbolos “#” representam dois tipos de sequências distintas contra o mesmo gene. Esses achados de depleção proteica mediados por siRNAs carregadas por HDL são similares a outras pesquisas que trazem dados de inibição mediados por moléculas antisense acessados através de níveis protéicos contudo carregados por reagentes comerciais ou nanopartículas (LIU et al, 2010; GU et al, 2018).

Um ponto importante apresentado no artigo anterior, contudo não discutido pelos autores diz respeito à sequência nucleotídica utilizada e o efeito sobre o gene alvo. Eles observaram que o tamanho do complexo formado não foi influenciado pela sequência do oligo, contudo os dados demonstram uma sutil diferença na depleção dos níveis da proteína promovido pelos complexos formados com as duas sequências do siRNA utilizadas (WONG et al, 2010). Trazendo essa vertente à tona, dois anos após, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que a sequência nucleotídica parece influenciar o nível de transfecção do complexo. De fato, os autores sugerem que o nível de complexação entre HDL e siRNA é proporcional ao conteúdo das bases GC. Contudo, essa premissa não foi verdadeira para o siRNA-DCC #2, que também possuía apenas 29% do conteúdo de GC, mas exibiram um nível intermediário de transfecção às células. Assim, esse conteúdo, embora interfira, por si só, não parece ser o único parâmetro que determina a associação eficiente (WONG et al., 2012).

No que diz respeito ao uso dos HDL com a finalidade de carrear inibidores de miRs, o único trabalho já reportado utilizou HDL diferentes dos aqui produzidos. Os pesquisadores prepararam Gd-HDL e complexaram antagomiRs específicos para depleção do miR 10a. Foi observado 99% de transfecção às células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7 e subsequentemente, avaliaram a eficiência de inibição do miR. Diferente da abordagem da presente tese, os pesquisadores avaliaram o nível de proteína HOXD10, alvo daquele miR, em substituição ao nível de transcritos do miR propriamente dito. Os dados mostraram que houve um aumento significativo na expressão dessa proteína, evidenciando dois pontos importantes, tanto que o nanossistema produzido por eles também foi eficaz; quanto que o HOXD10 é alvo direto desse miR (YOO et al, 2014), já que foi capaz de retomar os níveis de expressão após tratamento com o inibidor do miR.

Nesse sentido de avaliação dos genes alvos preditos do miR, o perfil de expressão, a nível de transcritos, do presente trabalho não foi estatisticamente significativo. (Figura 17).

Figura 17 - Expressão relativa do gene alvo predito SLC9A6 após tratamento com o inibidor do miR-196b-5p



Os dados foram submetidos a ANOVA seguido de pós-hoc de Bonferroni. Os valores representam médias \pm erro padrão. Células., células (n=6); C.HDL, complexo HDL: inibidor do microRNA (n=6); C. LIPO, complexo lipofectamina: inibidor do microRNA (n=6). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,00$. Fonte: AUTORA, 2018

De fato, o perfil de expressão do gene alvo predito do miR pode apresentar-se inalterado após o tratamento com os antagonismos específicos. A atuação dos miRs vai além da via de degradação do RNAm (LI; RANA, 2014), desse modo, é possível que os RNAm fiquem em corpos P, mascarando assim a ação.

Desse modo, a avaliação dos genes alvos pode ser complementada com ensaios que avaliem os níveis protéicos após inibição dos miRs, como Western blotting ou aqueles que confirmem a ligação do miR à região 3'UTR do provável gene alvo clonada; para os últimos, ensaios de Luciferase são bem responsivos (LI; RANA, 2014).

5.4 PROPOSTA PARA AVALIAÇÃO DE UMA VIA DO MIR-196B-5P NA EPILEPTOGÊNESE

Como discutido anteriormente na parte 1 dessa tese, o miR-196b-5p apresenta o nível aumentado dos seus transcritos durante a epileptogênese (ARAÚJO et al., 2016), contudo as vias reguladas por ele nessa condição permanecem desconhecidas.

Dada a escassez de informações das funções desse miR no cérebro, avaliou-se *in silico* os seus genes alvos, preditos e validados. Desse modo, o gene SLC9A6 foi escolhido por apresentar escore alto em todos os programas utilizados.

O gene SLC9A6 codifica a proteína NHE6, membro da família dos NHEs cuja função principal é mediar a troca do íon Na⁺ extracelular por um íon H⁺ das membranas, levando a um aumento do pH intracelular e diminuição do pH extracelular (GILFILLAN et al., 2008; JEAN et al., 1985). Expresso em vários tecidos, inclusive em altos níveis no cérebro tanto de humanos, quanto em roedores.

O pH é uma variável que está intrinsecamente relacionada com o controle entre excitabilidade e inibição neuronal, já que o SNC é afetado por distúrbios ácido-base sistêmicos. Já foi relatado na literatura que o pH intra e extracelular de células excitáveis são regulados por mecanismos homeostáticos, desses, as funções de transporte da barreira hematoencefálica, bem como do plexo coróide mantêm o pH extracelular e os transportadores de membranas plasmáticas regulam o pH intracelular (TAKAHASHI; COPENHAGEN, 1996). O íon H⁺ intracelular, atuando

como segundo mensageiro, regula a excitabilidade neuronal via modulação da atividade de canais iônicos (TAKAHASHI; COPENHAGEN, 1996).

De fato, a proteína NHE6 está envolvida na transmissão de sinais no cérebro. Os principais neurotransmissores do SNC, GABA e Glutamato (inibitório e excitatório, respectivamente). A recaptação de glutamato no cérebro é regulada por NHE6 (ZHAO et al., 2016), de modo que alterações na função do NHE6 levam a um acúmulo de glutamato, que por sua vez aumentam a excitabilidade neuronal, atuando na epilepsia (GILFILLAN et al., 2008; ZHAO et al., 2016).

As crises epiléticas são indicadores de desequilíbrios subjacentes à regulação do pH celular. De fato, mutações do gene SLC9A podem resultar em convulsões, como reportados nas síndromes de Angelman e de Christianson (ROXRUD et al., 2009). Além disso, Ouyang et al., (2013) mencionaram o envolvimento desta proteína na arborização dendrítica, o que evidencia ainda mais o potencial envolvimento desse gene no processo epileptogênico, já que dentre as alterações estruturais desse processo, a densidade dendrítica é alterada em ratos submetidos ao SE (JIMENEZ-MATEOS et al, 2012).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A proposta inicial do presente trabalho consistiu em desenvolver um nanosistema que viabilizasse a transfecção de inibidores de miRs às células para posteriores estudos de funções dos miRs. Desse modo, obtivemos nanopartículas com parâmetros elegíveis, complexos que foram transfectados eficientemente às células e inibição do miR confirmada à nível de transcritos do miR-196b-5p. É necessário, no entanto, estender essa validação a nível proteico. Portanto, o presente trabalho desenvolveu um nanocarreador baseado em HDL para ensaios funcionais de microRNAs, que permitirá investigar o papel do miR 196b-5p e SLC9A6 e miR-352 na epileptogênese em diferentes modelos animais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISAWA, S. et al. Direct intercalation of amino acids into layered double hydroxides by coprecipitation. **Journal of Solid State Chemistry**, 2001.

AISAWA, S. et al. Intercalation of nucleotides into layered double hydroxides by ion-exchange reaction. **Applied Clay Science**, v. 28, p. 137-145, 2004.

ALBERS A. P. F. et al. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p. 34–37, 2002.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Garland Science, 2008.

ALBISTON, L. et al. Rheology and microstructure of aqueous layered double hydroxide dispersions. **Journal of materials chemistry**, v. 6, n. 5, p. 871, 1996.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, vol. 12, n.1. Feb. 2006

ANDREA, K. A. et al. Adsorption of oligo-DNA on Magnesium Aluminum Layered Double Hydroxide Nanoparticle Surfaces: Mechanistic Implication to Gene Delivery. 2017.

ARAÚJO, M. A. DE et al. Identification of microRNAs with Dysregulated Expression in Status Epilepticus Induced Epileptogenesis. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0163855, 3 out. 2016.

BADER, A. G. et al. **Developing therapeutic microRNAs for cancer Gene Therapy**, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/gt201179.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2018

BALCOMB, B.; SINGH, M.; SINGH, S. Synthesis and characterization of layered double hydroxides and their potential as nonviral gene delivery vehicles. **ChemistryOpen**, v. 4, n. 2, p. 137–145, 2015.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, Jan. 2004.

BENICIO, L. P. F. et al. LAYERED DOUBLE HYDROXIDES: NANOMATERIALS FOR APPLICATIONS IN AGRICULTURE. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 39, n. 1, p. 1-13, Feb. 2015.

BERBER, M. R. et al. Control of Nanoparticle Size, Crystal Structure and Growth of Layered Double Hydroxide by Hydrothermal Treatment. **Advanced Materials Development and Performance International Journal of Modern Physics: Conference Series**, v. 6, p. 133–137, 2011.

BOT, A. M.; DEBSKI, K. J.; LUKASIUK, K. Alterations in miRNA Levels in the Dentate Gyrus in Epileptic Rats. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76051, 2013.

CAO, F. et al. miR-6743-5p, as a direct upstream regulator of GRIM-19, enhances proliferation and suppresses apoptosis in glioma cells. **Bioscience Reports**, v. 37,

n. 6, p. BSR20171038, 2017.

CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 2016.

CHAMPION, J. A. et al. Making polymeric micro-and nanoparticles of complex shapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 11901-11904, 2007.

CHANG, H. et al. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. **Nature Publishing Group**, 2016.

CHEN, M. et al. Journal of Colloid and Interface Science Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 390, n. 1, p. 275–281, 2013.

CHOI, G. et al. 2D Nanostructured Metal Hydroxides with Gene Delivery and Theranostic Functions; A Comprehensive Review. **The Chemical Record**, 2018.

CHOI, S.-J.; CHOY, J.-H. Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 803–814, 2011.

CHOY, J.-H. et al. Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 6, p. 1399–1400, fev. 1999.

CROOKE, S. T. et al. Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 2, 1996.

CUNHA, V. R. R. et al. Hidróxidos duplos lamelares: Nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 159–171, 2010.

CZECH, M. P. MicroRNAs as Therapeutic Targets. **New England Journal of Medicine**, v. 11, n. 16, 2006.

DA CONCEIÇÃO, L.; PERGHER, S. B. C.; MORO, C. C. Compósitos Magnéticos Baseados em Hidrotalcitas para a Remoção de Contaminantes Aniônicos em Água. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1077–1081, 2007.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DE ARAÚJO, M. A. et al. Identification of endogenous reference genes for the analysis of microRNA expression in the hippocampus of the pilocarpine-induced model of mesial temporal lobe epilepsy. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100529, 25 jun. 2014.

DI, G. et al. AntagomiR-613 protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation via increasing SphK2 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 1, p. 188-194, 2017.

DONG, H. et al. Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. **Applied Clay Science**, v. 100, p. 66–75, 2014a.

DONG, H. et al. Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. **Applied Clay Science**, v. 100, p. 66–75, out. 2014b.

EBERT, M. S.; NEILSON, J. R.; SHARP, P. A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nature Methods**, v. 4, p. 721–726, 2007.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v.7, p.340- 52, 2001.

GANDHI, N. S.; TEKADE, R. K.; CHOUGULE, M. B. Nanocarrier mediated Delivery of siRNA/miRNA in Combination with Chemotherapeutic Agents for Cancer Therapy: Current Progress and Advances. **J Control Release**, v. 0, p. 238–256, 2014.

GANZOURY, M. A. et al. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1–8, 2015.

GILFILLAN, G. D. et al. SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome. **American journal of human genetics**, v. 82, n. 4, p. 1003–1010, abr. 2008.

GITAI, D. L., **Expressão gênica diferencial em Wistar Audiogenic Rats (WAR)**. 2007. 159f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007.

GU, Jian-Jun et al. Suppression of microRNA-130b inhibits glioma cell proliferation and invasion, and induces apoptosis by PTEN/AKT signaling. **International journal of molecular medicine**, v. 41, n. 1, p. 284-292, 2018.

GURSKY, J. A. et al. Particle-Particle Interactions between Layered Double Hydroxide Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128 n. 26, p. 8376–8377, 2006.

HENSHALL, D. C. MicroRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 6, p. 37, jan. 2013.

HU, K. et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. **BMC Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 115, 2012.

ISHIDA, M.; SELARU, F. M.; EDU, S. miRNA-Based Therapeutic Strategies. **Current Pathobiology Reports**, v. 1, n. 1, p. 63–70, 2013.

JEAN, T. et al. Biochemical properties of the Na⁺/H⁺ exchange system in rat brain synaptosomes. Interdependence of internal and external pH control of the exchange activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 17, p. 9678–9684, 15 ago. 1985.

JIMENEZ-MATEOS, E. M. et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 5, p. 2519–32, nov. 2011.

JIMENEZ-MATEOS, E. M. et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. **Nature medicine**, v. 18, n. 7, p. 1087–94, jul. 2012.

KAWADKAR, J.; CHAUHAN, M. K.; MAHARANA, M. **Nanobiotechnology: Application of nanotechnology in diagnosis, drug discovery and drug development** *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2011. Disponível em: <<http://www.ajpcr.com/Vol4Issue1/218.pdf>>. Acesso em: 31 maio. 2017

KHAN, M. et al. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 396–400, 2015.

KHVOROVA, A.; WATTS, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 238–248, 2017.

KLABUNDE, K. J; RICHARDS, R. M. **Nanoscale Materials in Chemistry**. 2 ed. John Wiley & Sons, 2009.

KLOPROGGE, T.; FROST, Ray L. Fourier transform infrared and Raman spectroscopic study of the local structure of Mg-, Ni-, and Co-hydroxaltes. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 146, n. 2, p. 506-515, 1999.

KWAK, S. Y. et al. Bio-LDH nanohybrid for gene therapy. **Solid State Ionics**, v. 151, p. 229-234, 2002.

LADEWIG, K. et al. Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 1, p. 280–289, 2010a.

LADEWIG, K. et al. Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1821–1829, 2010b.

LADEWIG, K.; XU, Z. P.; LU, G. Q. (MAX). Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 9, p. 907–922, 17 set. 2009.

LEE, S. T. et al. Inhibition of miR-203 Reduces Spontaneous Recurrent Seizures in Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3300–3308, 2017.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787–798, 2003.

LI, L. et al. Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3331–3339, 2014.

LI, Z.; RANA, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 8, p. 622–638, ago. 2014.

LIAO, W. et al. **Oligonucleotide therapy for obstructive and restrictive respiratory diseases** *Molecules*, 2017.

LIU, L. et al. MicroRNA-34b mediates hippocampal astrocyte apoptosis in a rat model of recurrent seizures. **BMC Neurosci**, v. 17, 2016.

LIU, Xi-Qiu et al. Targeted delivery of antisense inhibitor of miRNA for antiangiogenesis therapy using cRGD-functionalized nanoparticles. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 1, p. 250-259, 2010.

LIVAK, K., SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-08, 2001.

LONG, D. A. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts George Socrates John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 35, n. 10, p. 905–905, 2004.

MAEDA, Y.; MATSUMOTO, T.; KAWAI, T. Observation of single-and double-stranded DNA using non-contact atomic force microscopy. **Applied surface science**, v. 140, n. 3-4, p. 400-405, 1999.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MCKIERNAN, R. C. et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35921, 2012.

MENEZES, J. et al. Layered double hydroxides (LDHs) as carrier of antimony aimed for improving leishmaniasis chemotherapy. **Applied Clay Science**, v. 91, p. 127-134, 2014.

MESSIAS DE LIMA, C. F. et al. Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures. **Cell biology international**, v. 41, n. 5, p. 577-584, 2017.

MIYATA, S. Anion-Exchange Properties of Hydrotalcite-Like Compounds. **Clays and Clay Minerals**, v. 31, n. 4, p. 305-311, 1983.

MIYATA, S. Synthesis of Hydrotalcite-Like Compounds and their Physico-Chemical Properties—The Systems Mg₂-Al₃-SO₄²⁻ and Mg₂-Al₃-CrO₄²⁻. **Clays and clay minerals**, v. 25, n. 1, p. 14–18, 1977.

NAKAYAMA, H.; HATAKEYAMA, A.; TSUHAKO, M. Encapsulation of nucleotides and DNA into Mg-Al layered double hydroxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 104–111, 2010.

NAVARRO, M., **Síntese e caracterização de ligas cobre-níquel contendo nanopartículas de alumina**. 122f. PUC do Rio de Janeiro. 2013.

OLFS, H.-W. et al. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. **Applied Clay Science**, v. 43, n. 3–4, p. 459–464, 2009.

PARK, D.-H. et al. Biodegradable Inorganic Nanovector: Passive versus Active Tumor Targeting in siRNA Transportation. **Angewandte Chemie**, v. 55, n. 14, p. 4582–4586, 24 mar. 2016.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet neurology*, v.10, n.2, p.173-86, Feb. 2011.

PORRETTI, J. et al. CLCA2 epigenetic regulation by CTBP1, HDACs, ZEB1, EP300 and miR-196b-5p impacts prostate cancer cell adhesion and EMT in metabolic syndrome disease. **International Journal of Cancer**, 2018.

RAJ, D. B.; KHAN, N. A. Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology. **Nano Convergence**, v. 3, n. 1, p. 22, 2016.

RAO, C. N. R. et al. Synthesis of inorganic nanomaterials. **Dalton Transactions**, v. 14, n. 34, p. 3728-49, 2007.

REICHLER, W. T. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). **Solid State Ionics**, v. 22, n. 1, p. 135-141, 1986.

SANDERSON, B. A. et al. Charge density and particle size effects on oligonucleotide and plasmid DNA binding to nanosized hydrotalcite. **Biointerphases**, 2013.

SANI USMAN, M. et al. Gadolinium-based layered double hydroxide and graphene oxide nano-carriers for magnetic resonance imaging and drug delivery. **Chemistry Central Journal**, v. 11, 2017.

SHIMONI, O. et al. Shape-dependent cellular processing of polyelectrolyte capsules. **ACS Nano**, v. 7, n. 1, p. 522-530, 2013.

STENVANG, J. et al. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. **Silence**, 9;3(1):1, 2012

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

SWADLING, J. B.; COVENEY, P. V.; CHRISTOPHER GREENWELL, H. Stability of free and mineral-protected nucleic acids: Implications for the RNA world. **Geochimica et cosmochimica acta**, v. 83, p. 360-378, 2012.

TAKAHASHI, K.-I.; COPENHAGEN, D. R. Modulation of neuronal function by intracellular pH. **Neuroscience research**, v. 24, n. 2, p. 109-116, 1996.

TAYLOR, R. M. The Rapid Formation of Crystalline Double Hydroxy Salts and Other Compounds by Controlled Hydrolysis. **Clay minerals**, v. 19, n. 4, p. 591-603, 1984.

TERASAWA, K.; SHIMIZU, K.; TSUJIMOTO, G. Synthetic Pre-miRNA-Based shRNA as Potent RNAi Triggers. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

TIWARI, D.; PEARISO, K.; GROSS, C. MicroRNA-induced silencing in epilepsy: Opportunities and challenges for clinical application. **Developmental Dynamics**, v. 247, p. 94-110, 2018.

TSUBOI, M. Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 3, n. 1, p. 45-90, 1970.

WAHLESTEDT, C. et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5633-5638, 2000.

WHITESIDES, G. M. The “right” size in nanobiotechnology. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 10, 2003.

WONG, Y. et al. Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8770–8779, 2010.

WONG, Y. et al. Efficiency of layered double hydroxide nanoparticle-mediated delivery of siRNA is determined by nucleotide sequence. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, n. 1, p. 453–459, 2012.

XU, Z. P. et al. Dispersion and size control of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solutions. **The journal of physical chemistry. B**, v. 110, p. 16923–16929, 2006.

XU, Z. P. et al. Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA. v. 2, n. 2, p. 163–174, 2007.

XU, Z. P. et al. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 1, p. 86–94, 2008a.

XU, Z. P. et al. Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 326, n. 2, p. 522–529, 2008b.

YOO, B. H. et al. 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 6, p. 2008–16, 2004.

YOO, S. S. et al. Layered gadolinium-based nanoparticle as a novel delivery platform for microRNA therapeutics. **Nanotechnology**, v. 25, n. 42, p. 425102, 24 out. 2014.

YOU, G. et al. Significance of miR-196b in Tumor-Related Epilepsy of Patients with Gliomas. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e46218, 2012.

ZARBIN, A. J. G. QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; GEMEINHART, R. A. Progress in microRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v.172, n. 3, p. 962-74, 2013.

ZHAO, H. et al. Emerging roles of Na⁺/H⁺ exchangers in epilepsy and developmental brain disorders. **Progress in neurobiology**, v. 138-140, p. 19–35, 2016. **Não está citado no texto**

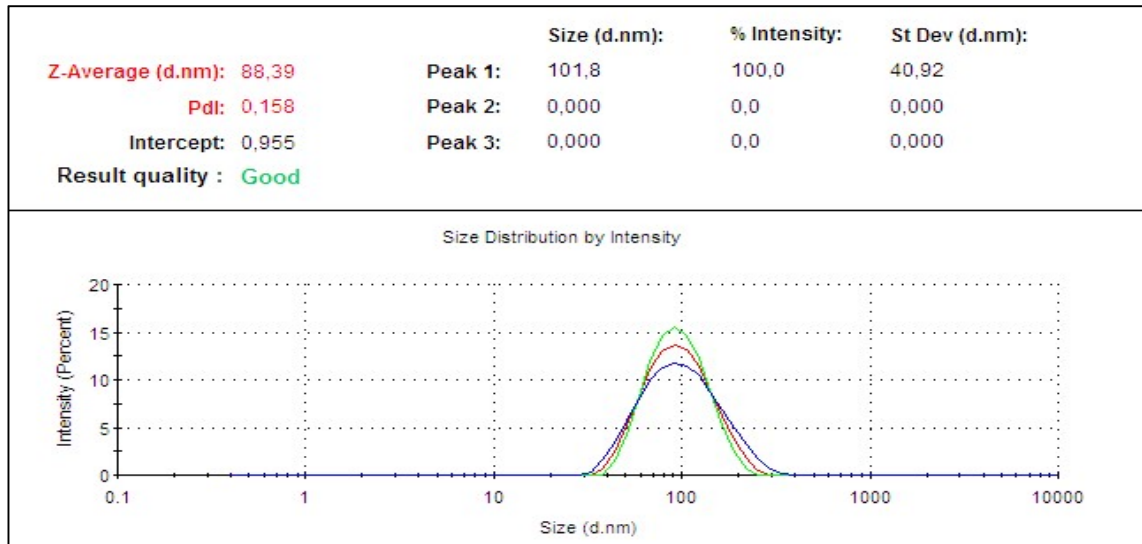
ZHENG, W. et al. Co-delivery of Se nanoparticles and pooled SiRNAs for overcoming drug resistance mediated by P-glycoprotein and class III β -tubulin in drug-resistant breast cancers. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p.197-210, 2016.

ZHOU, X. et al. MicroRNA-146a down-regulation correlates with neuroprotection and targets pro-apoptotic genes in cerebral ischemic injury in vitro. **Brain research**, v. 1648, p. 136-143, 2016.

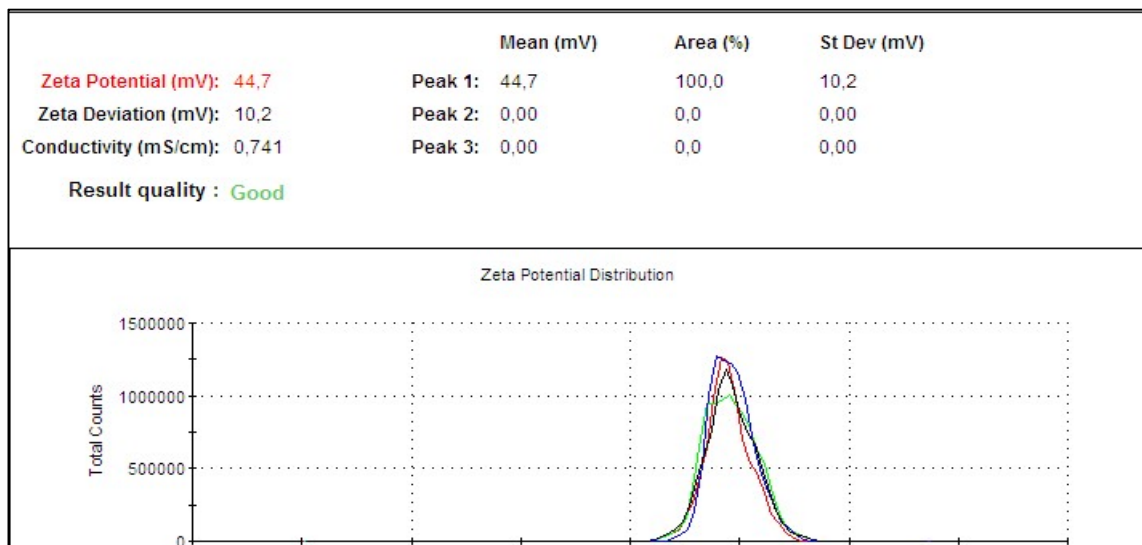
ZUO, H. et al. Crosslinking to enhance colloidal stability and redispersity of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 459, p. 10-16, 2015alber

ANEXO

A- TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS

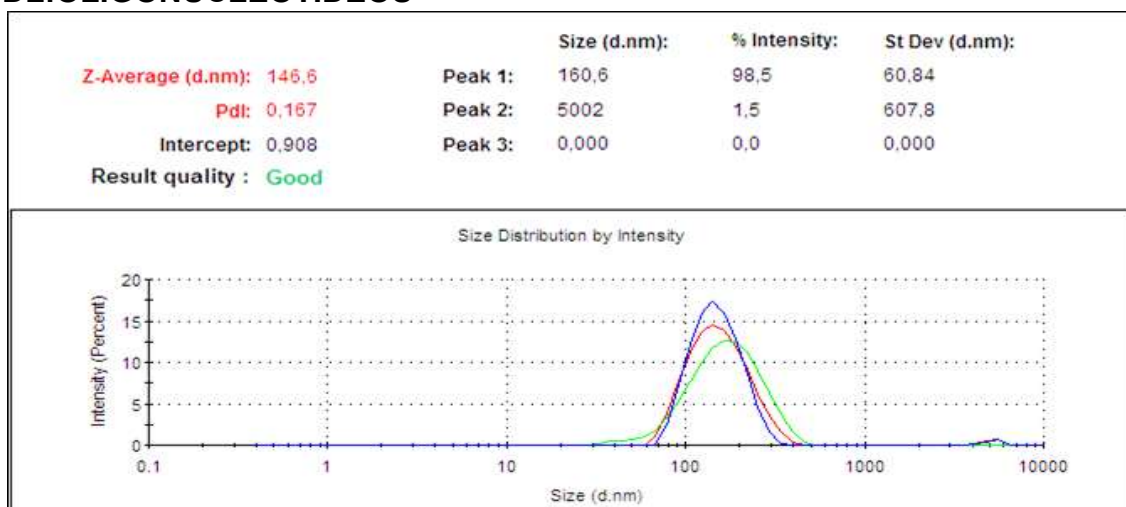


Tamanho médio das nanopartículas sintetizadas.

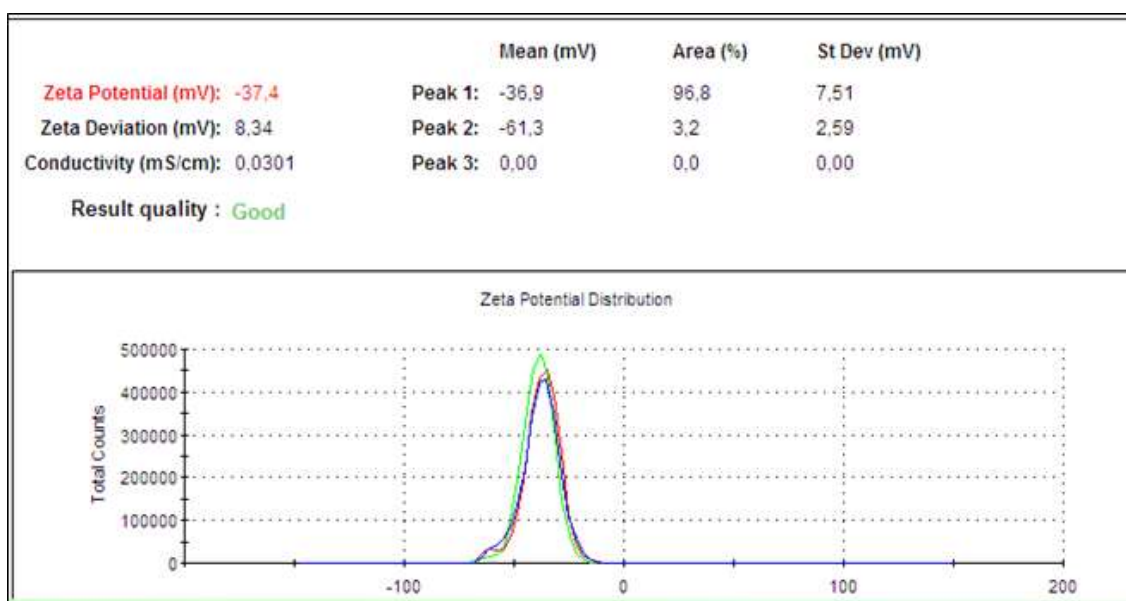


Potencial zeta das nanopartículas sintetizadas.

B- TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS COMPLEXOS HDL:OLIGONUCLEOTÍDEOS



Tamanho médio dos complexos HDL:oligo em d.nm.



Potencial zeta do complexo HDL:oligo na proporção de massa 1:1.