**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e
miR-1183 em hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia
do lobo temporal mesial**

LUANA GRUPIONI LOURENÇO

Ribeirão Preto

2015

LUANA GRUPIONI LOURENÇO

**Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e
miR-1183 em hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia
do lobo temporal mesial**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de concentração
Clínica Cirúrgica - opção: Morfologia e
Medicina Experimental.

**Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da
Cunha Tirapelli**

RIBEIRÃO PRETO

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lourenço, Luana Grupioni

Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 em hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial. Ribeirão Preto, 2015.

79p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

1. Epilepsia do lobo temporal mesial, 2. Hipocampo. 3. Biomarcadores, 4. microRNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lourenço, Luana Grupioni

Título: Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 em hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial.

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICO

Aos meus pais, Antônio e Maria de Lourdes,
pelo amor , paciência, apoio e dedicação.
Para mim vocês são exemplo de força e de
vida.

Aos meus irmãos, Jéssica e Alan, pela amizade,
respeito, companheirismo e amor. Vocês fazem
dos meus dias mais felizes e estão sempre de
prontidão para os momentos de necessidade.

Ao Rafael, meu marido, pela paciência, dedicação,
companheirismo, carinho, compreensão e amor.
Você que de forma especial me deu força e
coragem, me apoiando em todos os momentos.
Meu eterno e verdadeiro incentivador.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela vida, saúde e oportunidade de aprender com todos.

À Prof. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, orientadora dessa dissertação, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, dedicação e compreensão. Todo o convívio que tivemos permitiram meu amadurecimento profissional e a elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, o meu agradecimento pela coorientação dessa dissertação. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela disponibilidade e valiosas sugestões.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, pela atenção e por me proporcionarem uma excelente formação.

Aos amigos de laboratório, Renata Sicchieri, Fermينو, Andressa, Vagner, Renata Collares, Fabianna, Willian, Heriton, Serguey, Fernanda Carvalho, Fernanda Marques, Cláudia, Cristiane e também àqueles que já passaram pelo laboratório, nesse caso, em especial ao Paulo. Pessoas nas quais conviveram comigo durante a realização deste trabalho e tornaram-no mais divertido e especial.

Aos funcionários do centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), em especial ao auxiliar de enfermagem João, por toda ajuda e disponibilidade durante as coletas de material biológico.

Ao Dr. Fabiano Pinto Saggioro pela contribuição na aquisição das necropsias.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por oferecer toda estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Antonio e Maria de Lourdes, aos meus irmãos, Jéssica e Alan, aos meus cunhados, Stefen, Juliana, Fernanda, Thiago Antônio e Tiago, aos meus sogros, Fernando (*in memoriam*) e Carmen. Obrigada pela constante disponibilidade, apoio e amor fraterno. Vocês são meu verdadeiro significado de vida.

Ao meu marido, Rafael, por todo apoio, amor, carinho, compreensão, dedicação, inspiração, companheirismo e encorajamento.

E finalmente, agradeço a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a minha formação e realização deste trabalho.

“[...] Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão
perder com classe,
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”

Augusto Branco

RESUMO

RESUMO

Lourenço, L.G. **Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 em hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial.** 79 f. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP, 2015.

Introdução: A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é a forma mais comum de epilepsia parcial e com índices significativos de resistência aos tratamentos farmacológicos. Um dos grandes desafios para a neurociência na atualidade é o desenvolvimento de biomarcadores que facilitem o diagnóstico e prognóstico para a epilepsia. Recentemente, algumas pesquisas demonstraram que microRNAs circulantes no sangue são biomarcadores sensíveis e específicos para várias doenças, incluindo do SNC, podendo ser obtido de forma não invasiva e representando um método de detecção eficiente e de baixo custo. Portanto, nosso trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR199a e miR-1183 no hipocampo e fração leucocitária do sangue de pacientes com ELTM e investigar se os mesmos podem auxiliar como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para a epilepsia. **Pacientes e métodos:** Foram utilizadas amostras de hipocampo e sangue de 20 pacientes com ELTM, sendo 10 com boa evolução pós-operatória (Engel I) e 10 com evolução pós-operatória insatisfatória (Engel III e IV), e para controle foram utilizados hipocampus de necropsias e sangue de indivíduos saudáveis. A análise de expressão dos miRNAs foi feita utilizando a técnica de RQ-PCR. **Resultados e Conclusões:** As expressões dos miRNAs se comportaram de forma diferente no hipocampo e sangue de pacientes com ELTM quando comparados aos grupos controles. O miR-145 apresentou-se hipoexpresso no hipocampo e hiperexpresso no sangue. Os miRNAs miR-145, miR-181c, miR199a e miR-1183 apresentaram-se hiperexpressos na fração leucocitária do sangue de pacientes com ELTM, podendo estes contribuir como possíveis biomarcadores para auxiliarem no diagnóstico. Ainda, não encontramos diferenças estatística desses miRNAs no sangue e hipocampo de pacientes Engel I versus Engel III e IV, no entanto, o miR-1183 apresentou-se progressivamente mais expresso no sangue dos pacientes nos grupos controle, no grupo Engel I e no grupo Engel III e IV respectivamente.

ABSTRACT

ABSTRACT

Lourenço, L.G. **Expression of microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a and miR-1183 in blood and hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy 79f** – Medical School of Ribeirao Preto/USP, 2015.

Introduction: The mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most common form of partial epilepsy and also presents significant resistance to pharmacological treatment. A major challenge for neuroscience today is the development of biomarkers that facilitate the diagnosis and prognosis for epilepsy. Recently, research has shown that microRNAs circulating in the blood are sensitive and specific biomarkers for various diseases, including CNS, they can be obtained non-invasively and represent a low cost detection method. Thus, our study aimed to analyze the expression profile of microRNAs miR-145, miR-181c, miR199a and miR-1183 in the hippocampus and leukocyte fraction of the blood of patients with MTLE and investigate whether they can assist as diagnostic and prognosis biomarkers for epilepsy. **Patients and Methods:** Hippocampus and blood samples of 20 patients with MTLE were used; ten with good postoperative outcome (Engel I) and ten with poor postoperative outcome (Engel III and IV), and for the control group hippocampus of necropsy and blood of healthy individuals were used. The analysis of the expression of miRNAs was performed using RQ-PCR. **Results and Conclusions:** The expression of miRNAs behaved differently in the hippocampus and blood of patients with MTLE when compared with the control groups. This different behavior was most evident in miR-145, which was hypo-expressed in the hippocampus and hyper-expressed in the blood. MiRNAs miR-145, miR-181c, miR199a and miR-1183 were hyper-expressed in the leukocyte fraction from the blood of patients with MTLE, and these can be potential biomarkers to aid in the diagnosis. We found no statistical differences of these miRNAs in blood and hippocampus of patients Engel I versus Engel III and IV, however, miR-1183 was progressively expressed in the blood of patients in the control groups, Engel I and Engel III and IV respectively.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.....50
- Gráfico 2.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia.50
- Gráfico 3.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV..51
- Gráfico 4.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV..51
- Gráfico 5.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia..52
- Gráfico 6.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia.52
- Gráfico 7.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV.53
- Gráfico 8.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV..53
- Gráfico 9.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.54
- Gráfico 10.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia54
- Gráfico 11.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV..55
- Gráfico 12.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV.55
- Gráfico 13.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.56
- Gráfico 14.** Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia...56

Gráfico 15. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV.57

Gráfico 16. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV..57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Engel.....	29
Tabela 2. Dados dos pacientes com ELTM.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Percentagem
°C	Grau Celsius
cm	centímetro
µl	microlitro
ml	mililitro
min	minuto
ng	nanograma
aC	antes de Cristo
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	Corno de Amon
cDNA	DNA complementar
CEMEL	Centro de Medicina Legal
CIREP	Centro de Cirurgia de Epilepsia
CPC	Crise parcial complexa
CT	Cycle Threshold
DAE	Drogas antiepilépticas

DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose hipocampal
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
miRNA	MicroRNA
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDPK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase 1</i>
RISC	<i>RNA induced silence complex</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RQ-PCR	Transcrição reversa quantitativa da PCR
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UTR	Região não traduzida da fita de RNAm (<i>untranslated region</i>)

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de Fold calculados para as amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia e hipocampo de necropsias (controles) 78

Apêndice 2. Valores de Fold calculados para as amostras de sangue de pacientes com epilepsia e sangue de indivíduos saudáveis (controles) 79

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Epilepsia	25
2.2 Epilepsia do lobo temporal mesial	27
2.3 Hipocampo e epilepsia do lobo temporal mesial	30
2.4 Os microRNAs	32
2.5.1 microRNAs como biomarcadores em epilepsia	34
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivos gerais	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. PACIENTES E MÉTODOS	40
4.1 Pacientes	41
4.2 Métodos	42
4.2.1 Extração de RNA	42
4.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA	44
4.2.3 RQ-PCR dos microRNAs: miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183	44
4.2.4 Análise estatística	45
5. RESULTADOS	48
5.1 Dados dos pacientes	48
5.2 Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183	49
5.2.1 miR-145	50
5.2.2 miR-181c	52
5.2.3 miR-199a	54
5.2.4 miR-1183	56
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. APÊNDICES	78

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

A epilepsia acomete aproximadamente 1% da população mundial, sendo uma das mais prevalentes desordens neurológicas (NGUGI et al, 2011). A forma mais frequente de epilepsia parcial é a epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), sendo esta frequentemente associada à farmacoresistência e o bom prognóstico cirúrgico (WIESER, 2004).

Nessa síndrome ocorre perda neuronal e gliose reacional do hipocampo e de outras estruturas da porção média do lobo temporal (WIESER, 2004). Apesar do bom prognóstico cirúrgico, cerca de 10% dos casos seguem com pouca ou nenhuma melhora (SAVITRSASTRI et al., 2014).

O diagnóstico da ELTM-EH requer evidências clínicas, eletroencefalogramas e neuroimagens (WIESER, 2004). No entanto, algumas vezes, as manifestações clínicas e histórias fornecidas pelos pacientes são insuficientes e os exames podem fornecer dados imprecisos e de alto custo. Portanto, um grande desafio para a neurociências na atualidade é desenvolver biomarcadores que contribuam para um diagnóstico clínico simples e preciso (WANG et al., 2015).

Os microRNAs (miRNAs) recentemente têm sido proposto como novos biomarcadores potenciais para várias doenças, incluindo do SNC (SHTILBANS; HENCHCLIFFE, 2012; GANDHI et al, 2013; KUMAR et al, 2013; TAN et al, 2014). MiRNAs são pequenos RNAs de fita simples, não-codificadores de proteínas, que agem como importantes reguladores de expressão gênica a nível pós-

transcricional (HAMMOND, 2006; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). Essas moléculas reúnem as principais características de um biomarcador ideal, tais como propriedades tecido específico, expressão diferencial nas doenças, resistência à degradação, presença em fluidos corporais de simples acesso, facilidade e baixo custo de detecção (WEILAND et al., 2012).

Vários estudos em epilepsia analisaram a expressão dos miRNAs demonstrando desregulação dos mesmos nessa doença (HU et al, 2012; KAN et al, 2012; MCKIERNAN et al, 2012; BOT; DEBSKI; LUKASIUK, 2013; SUN et al, 2013; GORTER et al, 2014; LI et al, 2014). Entretanto, quase todos os estudos basearam-se em amostras de tecido cerebral de modelos animais ou humanos. Os miRNAs podem ser detectados não só a partir de tecidos frescos ou congelados, mas também a partir de fluidos corporais, tais como líquido cefalorraquidiano e sangue (TUMILSON et al., 2014). A detecção de biomarcadores no sangue é interessante por ser um procedimento não-invasivo e de baixo custo de detecção (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; HERMANSEN; KRISTENSEN, 2013; TUMILSON et al., 2014).

O único estudo descrito na literatura que analisou miRNAs circulantes no soro de pacientes com epilepsia foi o de Wang et al (2015), eles encontraram miRNAs potenciais para serem biomarcadores nessa doença. Dessa forma, afim de acrescentar informações nesse campo de estudo, nosso trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR199a e miR-1183 no hipocampo e fração leucocitária do sangue de pacientes com ELTM e investigar se os mesmos podem auxiliar como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para a epilepsia.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epilepsia

A epilepsia é a doença neurológica grave mais comum (BANERJEE; FILIPPI; HAUSER, 2009). Trata-se de uma síndrome caracterizada por crises espontâneas e recorrentes devido à hiperatividade neuronal (LI et al, 2014). A epilepsia é uma importante causa de incapacidade e mortalidade para os indivíduos acometidos por esta doença (NGUGI et al, 2011).

A palavra epilepsia origina-se do verbo grego *epilambanein*, o qual significa "capturar, possuir ou afligir". As primeiras observações sobre epilepsia datam de quase 2.000 anos aC, sendo inicialmente considerada como uma doença divina ou possessão demoníaca, provavelmente devido a impressionante manifestação do ataque epiléptico. Hipócrates foi o primeiro a contestar sua origem divina e a fazer a primeira descrição formal da epilepsia como uma doença atribuída à disfunção cerebral (MAGIORKINIS; SIDIROPOULOU; DIAMANTIS, 2010).

Existem poucos estudos de incidência de epilepsia, mas estima-se que essa doença atinja quase 70 milhões de pessoas no mundo, apresentando-se diferentemente prevalente em países de baixa e média renda em comparação aos países de alta renda, sendo duas vezes maior no primeiro caso. A incidência média de casos de epilepsia é de 50,4 para 100.000 pessoas/ano, sendo 45,0 em países de alta renda e de 81,7 para países de baixa e média renda (NGUGI et al, 2011).

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) reviu conceitos, terminologia e abordagens para a classificação de crises epiléticas e epilepsia. Neste contexto, foi definido como crise epilética uma ocorrência transitória de sinais e sintomas causados por hiperexcitabilidade anormal e/ou descargas neuronais hipersincronas envolvendo o córtex cerebral. Essas crises epiléticas podem ocorrer devido a insultos cerebrais, tais como: trauma de crânio, ingestão excessiva de álcool, alterações metabólicas, entre outros. Já o diagnóstico de epilepsia implica na existência de um distúrbio cerebral permanente que dá origem às crises epiléticas (FISHER et al., 2005; BERG et al, 2010).

A epilepsia é classificada em genética, estrutural/metabólica ou de causa desconhecida. A classificação em epilepsia genética ocorre quando a doença se origina de um defeito genético conhecido ou presumido, no qual as convulsões são o sintoma central da desordem. Por outro lado, é classificada como estrutural/metabólica quando existe uma condição que está associada a um aumento do risco de desenvolver epilepsia, tais como acidente vascular cerebral, trauma e infecção adquirida. E por último, é classificada como desconhecida, como a própria nomenclatura sugere, quando a natureza da desordem é incerta (BERG et al, 2010).

A partir da classificação das epilepsias de 1989 pela ILAE, não há uma estrutura organizacional específica proposta para epilepsia, em vez disso, as diversas formas de epilepsia são organizadas de acordo com as dimensões que são mais relevantes para uma finalidade específica. Cada síndrome e cada paciente poderão ser caracterizados de acordo com um grande número de recursos, tais como idade de início, antecedentes cognitivos e de

desenvolvimento, exames sensoriais e motores, características do eletroencefalograma (EEG), entre outros (BERG et al, 2010). Ainda, no último relatório da ILAE, a epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal foi admitida como uma síndrome epiléptica específica (BERG et al., 2010; BERG; SCHEFFER, 2011).

2.2 Epilepsia do lobo temporal mesial

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia parcial, ocorrendo em 40% dos pacientes e pode ser classificada como neocortical e do lobo temporal mesial, sendo a última mais frequente (HAUSER, 1992). A incidência de epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) não tem predileção por sexo ou hemisfério afetado (BLUMCKE et al., 2012).

Histórias clínicas em pacientes com ELTM muitas vezes se referem a uma "injúria precipitante inicial" antes dos quatro anos de idade. Neste grupo de pacientes, as convulsões febris complexas são os eventos mais frequentes, outras injúrias também relatadas são trauma do nascimento, traumatismo craniano ou meningite. O tempo entre a injúria precipitante inicial e o início das convulsões é o "período latente", de forma que as convulsões geralmente começam no final da primeira década (ENGEL, 2001; BLUMCKE et al., 2012).

Na maioria dos casos, as crises epiléticas são do tipo parcial complexa (CPC) e tendem a seguir uma sequência relativamente fixa de eventos. Em sua grande parte, as crises se iniciam com fenômenos sensoriais conscientes (auras), tais como psíquicos (medo, irritabilidade, raiva), perceptivos (sensação de calor

ou desconforto epigástrico, náuseas, alucinações olfativas e gustativas, palidez, sudorese, taquicardia) ou dismnésticos (*déjà vu* e *jamaís vu*). Outros sintomas como a reação de parada com comprometimento da consciência e capacidade de resposta e fixação do olhar com dilatação pupilar são comuns no início de uma convulsão. As convulsões podem parar nesta fase ou movimentos motores coordenados semi-espontâneos podem seguir (automatismos orais, automatismos manuais e postura distônica das mãos). A apreensão normalmente dura menos de 2 minutos, e o quadro pós-ictal pode durar vários minutos, usualmente incluindo desorientação, déficit de memória recente, amnésia para a crise e disfasia (ENGEL JR, 2001; BLUMCKE et al., 2012).

Epilepsia do lobo temporal mesial é a causa mais frequente das epilepsias focais resistentes aos medicamentos, sendo que a maioria dos pacientes desenvolve resistência aos fármacos durante o curso da doença, principalmente na puberdade ou início da idade adulta (BLUMCKE et al., 2012).

O impacto positivo da cirurgia no controle de crises e função física e psicossocial para pacientes com ELTM é bem documentada, ocorrendo liberdade de apreensão em 70% dos casos na evolução do pós-operatório (AGHAKHANI, 2014, BLUMCKE et al., 2012). De acordo com a resposta das crises do paciente à cirurgia, eles são classificados em Engel I a Engel IV, conforme descrito na tabela 1 (ENGEL; VAN NESS, RASMUSSEN, 1993). No entanto, não é possível prever o prognóstico em pacientes individuais antes da cirurgia (CENDES et al., 2014).

Tabela 1. Classificação de Engel (ENGEL; VAN NESS, RASMUSSEN,1993).

Classe I. Livre de crises incapacitantes

- A. Completamente livre desde a cirurgia;
- B. Crises parciais simples não incapacitantes desde a cirurgia;
- C. Algumas crises incapacitantes após a cirurgia, mas livre de crises incapacitantes por > 2 anos;
- D. Crises generalizadas com descontinuidade de DAE apenas.

Classe II. Crises incapacitantes raras

- A. Inicialmente livre de crises incapacitantes, mas ainda apresenta raras crises;
- B. Raras crises incapacitantes desde a cirurgia;
- C. Crises incapacitantes ocasionais desde a cirurgia, mas crises raras nos últimos 2 anos.

Classe III. Melhora evidente

- A. Redução evidente das crises;
- B. Intervalos prolongados livre de crises somando mais de 50% do período de seguimento, mas inferior há 2 anos.

Classe IV. Sem melhora evidente

- A. Redução significativa das crises;
 - B. Sem alteração evidenciada;
 - C. Piora das crises.
-

Alterações no hipocampo são as causas mais frequentes encontradas em pacientes submetidos a cirurgia por epilepsia intratável com medicamentos (ENGEL, 2001).

2.3 Hipocampo e epilepsia do lobo temporal mesial

A palavra hipocampo deriva de duas palavras gregas: *hippos*, que significa “cavalo”, e *kampos*, que significa “monstro do mar”, fazendo uma referência à sua estrutura anatômica encurvada parecida com um cavalo marinho (PEARCE, 2001; DUVERNOY 2005).

O hipocampo faz parte do sistema límbico e desempenha um papel importante na memória declarativa, ou seja, a memória semântica para fatos e conceitos, memória episódica e memória espacial (FANSELOW; DONG, 2010; BLUMCKE et al., 2012). Outras funções importantes do hipocampo é o seu papel na regulação do comportamento emocional e sexual (EL-FALOUGY; BENUSKA, 2006).

A literatura contemporânea considera o hipocampo como o conjunto morfofuncional composto pelo corno de Amon e giro denteado. Já o termo "formação hipocampal" refere-se ao complexo formado pelas seguintes estruturas: giro denteado, corno de Amon, complexo subicular e córtex entorrinal (EL-FALOUGY; BENUSKA, 2006).

O hipocampo situa-se na porção média do lobo temporal e apresenta 4,0 a 4,5 cm de comprimento, sendo dividido em três segmentos: cabeça, corpo e

cauda. O corno de Amon (CA) está dividido em quatro regiões nomeadas de CA1, CA2, CA3 e CA4 (DUVERNOY 2005).

O corno de Amon e o giro denteado apresentam estruturas trilaminadas e com apenas uma lâmina de neurônios principal. No corno de Amon esta lâmina é constituída pelas células piramidais e no giro denteado pelas células granulares (FÖRSTER; ZHAO; FROTSCHER, 2006).

O achado anatomopatológico mais comum na ELTM é a esclerose hipocampal (EH), podendo ser encontrada em cerca de 45 a 85% dos casos. O critério mínimo para a definição histopatológica da esclerose hipocampal é a perda neuronal e gliose dos setores CA1 e CA4. Outras alterações incluem a perda neuronal e gliose dos demais setores do corno de Amon, brotamento axonal, reorganização sináptica e dispersão das células granulares do giro denteado. Há diferentes graus de comprometimento de estruturas anatômicas circunvizinhas ao hipocampo, como corpo amigdalóide e giro parahipocampal (WIESER, 2004; NELSON et al., 2013).

O diagnóstico da ELTM-EH requer um conjunto de evidências clínicas, eletroencefalográficas e radiológicas (WIESER, 2004). Embora eletroencefalogramas (EEG) e neuroimagens sejam utilizadas na prática clínica, o diagnóstico de epilepsia é baseado principalmente em exames das manifestações das crises e uma história clínica detalhada. No entanto, muitas vezes manifestação clínica e história fornecidas pelos pacientes ou seus familiares não são suficientes. Dessa forma, até à data, um grande desafio para a neurociência é desenvolver biomarcadores que contribuam para o diagnóstico clínico preciso, facilitando o tratamento adequado para a epilepsia (WANG et al, 2015).

Emergentes evidências demonstram que a epilepsia é controlada por fatores epigenéticos, dessa forma, os microRNAs (miRNAs) podem ter um papel-chave na patogênese dessa desordem neurológica e serem bons biomarcadores diagnósticos (LI et al, 2014).

2.4 Os microRNAs

Os miRNAs fazem parte do grupo de pequenos RNAs, não-codificantes de proteínas, que apresentam fita simples, constituídos por aproximadamente 22 nucleotídeos e que tem como alvo os RNAs mensageiros (mRNAs) (HAMMOND, 2006; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). De acordo com o banco de dados da miRBase Versão 21 (www.mirbase.org/), mais de 28 mil miRNAs foram descobertos até o momento.

Os miRNAs agem como importantes reguladores da expressão gênica, atuando a nível pós-transcricional, por meio da indução da degradação do mRNA ou bloqueio da síntese da proteína (HAMMOND, 2006; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; COWLAND; HOTHER; GRONBAEK, 2007).

A biogênese do miRNA é bem conhecida. Inicialmente, no núcleo, inicia-se a transcrição do gene pela enzima RNA polimerase II, originando um microRNA primário (pri-miRNA) que é clivado pela Drosha, gerando um microRNA maduro (pré-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos. Em seguida, essa estrutura é enviada ao citoplasma por meio da *exportina-5*, onde é processado pela Dicer, gerando um microRNA de fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos. O microRNA de fita dupla é acoplado ao complexo de silenciamento induzido por

RNA (RISC), cujos principais componentes são as proteínas Argonautas, e as duas fitas são separadas. Uma dessas fitas permanece associada ao RISC, formando o microRNA maduro (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3'UTR não traduzida do mRNA alvo. Quando há complementariedade perfeita entre miRNA e seu mRNA alvo, ocorre a degradação do mRNA. Quando a complementariedade é imperfeita, a produção da proteína final é bloqueada (BARTEL, 2009). Visto que, a sequência do miRNA maduro é curta e complementariedade exata não é necessária para o silenciamento, um grande número de diferentes mRNAs pode ser regulado por uma única espécie de miRNA (HAMMOND, 2006) e ainda, os miRNAs podem agir de forma cooperativa (KRETH; THON; KRETH, 2014).

Os miRNAs têm sido relacionados com importantes processos celulares, como diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo celular (KULSHRESHTLA et al., 2007). Pesquisas demonstraram que eles são essenciais no desenvolvimento embrionário do córtex cerebral, que compreende as etapas de proliferação, diferenciação, migração e organização celular (DOGINI et al, 2013). Na epilepsia, os miRNAs se apresentam como prováveis reguladores de genes alvos associados a microestrutura neuronal, morte celular, gliose, inflamação e resposta imune. Dessa forma, um melhor entendimento desses miRNAs nos permitiria entender a patogênese da epilepsia (JIMENEZ-MATEOS; HENSHALL, 2013).

2.5.1 microRNAs como biomarcadores em epilepsia

Biomarcadores são características biológicas objetivamente mensuráveis que são utilizadas como indicadores de um estado patológico (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; SCHILSKY et al., 2012; ENGEL et al., 2013; TUMILSON et al., 2014). Com o avanço da biologia molecular e consequente conceito de doença decorrente de alterações de todos os biosistemas, os potenciais biomarcadores incluem perfil genômico, transcriptoma e análise proteômica (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010).

O interesse no uso dos miRNAs como biomarcadores vem aumentando nos últimos anos. Seu papel na regulação de uma grande variedade de alvos torna estes pequenos RNAs uma ferramenta promissora no auxílio da detecção precoce de doenças, podendo ser explorada no diagnóstico, prognóstico e novos alvos terapêuticos. Outra vantagem em seu uso é que os miRNAs apresentam maior estabilidade quando comparados aos mRNAs, sendo menos susceptíveis à modificação química e degradação por RNase (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010). Outras características importantes dos miRNAs é a especificidade tecidual, expressão diferencial nas doenças e facilidade de detecção (WEILAND et al., 2012).

No entanto, a utilização de um único miRNA como biomarcador é limitada devido à falta de especificidade e sensibilidade. Faz-se necessário uma análise da expressão alterada de um conjunto de miRNAs para a utilização destes pequenos RNAs como biomarcadores (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; TUMILSON et al., 2014).

MicroRNAs (miRNAs) podem ter um papel essencial na patogênese de distúrbios neurológicos. Estudos em epilepsia sugerem que numerosos miRNAs específicos estão desregulados nessa síndrome, podendo ter implicações para a causa e tratamento da epilepsia (JIMENEZ-MATEOS; HENSHALL, 2013; LI et al, 2014).

Vários miRNAs apresentaram-se diferencialmente expressos no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal. Mais de um estudo demonstrou um subconjunto de mais de 20 miRNAs especificamente alterados no hipocampo de pacientes com epilepsia, tais como miR-146a, miR-34a, miR-134, miR-132 e miR-21, que foram validados independentemente em dois ou mais estudos (JIMENEZ-MATEOS; HENSHALL, 2013; LI et al, 2014).

Pouco menos de 20% dos miRNAs normalmente expressos no cérebro são alterados na epilepsia, de forma que pode-se especular que uma parte significativa das proteínas no tecido lesionado seriam afetadas por estas alterações de miRNAs (JIMENEZ-MATEOS; HENSHALL, 2013). Em resposta à lesão cerebral após convulsões, vários miRNAs se expressam de forma alterada, podendo contribuir para alterações na expressão da proteína durante o desenvolvimento da epilepsia (LIU et al., 2010). Além disso, McKiernan et al., 2012 demonstraram que os níveis de expressão da proteína Dicer são significativamente mais baixos em certos pacientes com ELTM-EH, ocasionando a diminuição da expressão de muitos miRNAs maduros.

Ao longo dos últimos 5 anos, vários estudos em epilepsia analisaram a expressão dos miRNAs de todo o genoma demonstrando que os miRNAs estão desregulados nessa doença (HU et al, 2012; KAN et al, 2012; MCKIERNAN et al,

2012; BOT; DEBSKI; LUKASIUK, 2013; SUN et al, 2013; GORTER et al, 2014; LI et al, 2014), no entanto, quase todos os estudos basearam-se em amostras de tecido cerebral de modelos animais ou humanos.

Os miRNAs podem ser detectados não só a partir de tecidos frescos ou congelados, mas também a partir de fluidos corporais, tais como líquido cefalorraquidiano e sangue (TUMILSON et al., 2014). A detecção de biomarcadores no sangue é interessante por ser um procedimento não-invasivo (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; HERMANSEN; KRISTENSEN, 2013; TUMILSON et al., 2014).

MiRNAs circulantes foram propostos como biomarcadores de grande precisão em doenças neurológicas, tais como a doença de Alzheimer (KUMAR et al, 2013; TAN et al, 2014), esclerose múltipla (GANDHI et al, 2013) e Parkinson (SHTILBANS; HENCHCLIFFE, 2012).

Os níveis de expressão de miRNAs no sangue foram reprodutíveis e demonstrativo do estado da doença em epilepsia. Liu et al. 2010 demonstraram assinaturas únicas de miRNA no sangue de ratos após convulsões provocadas por ácido caínico, sendo essas assinaturas diferentes daquelas de acidente vascular cerebral, hemorragia e trauma.

Wang et al (2015) foram os pioneiros em apresentar evidências de miRNAs circulantes no soro de pacientes com epilepsia como possíveis biomarcadores. Foram encontrados quatro miRNAs hiperexpressos (Let-7d-5p, miR-106b-5p, miR-130-3p e miR-146a-5p) e dois hipoexpressos (miR-15a-5p e miR-194-5p) em pacientes com epilepsia em comparação com controles saudáveis. Entre estes miRNAs, miR-106b-5p teve o melhor valor diagnóstico para a epilepsia com

sensibilidade de 80,3% e especificidade de 81,2%, sendo este um possível biomarcador não invasivo com potencial para melhorar o diagnóstico atual de epilepsia (WANG et al, 2015).

A análise de miRNAs circulantes em doenças neurológicas foram feitas em maior número utilizando soro e plasma (TUMILSON et al., 2014). Entretanto, a partir do trabalho de Rollins et al. (2010) que comprovaram que cerca de 23% do transcriptoma encefálico humano apresentam-se coexpresso em leucócitos mononucleares do sangue periférico, esse material foi considerado importante para a busca de biomarcadores nas doenças do SNC.

De Felice et al. (2012) utilizaram a fração leucocitária do sangue de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA), identificando oito miRNAs diferencialmente expressos, sendo sete hipoexpresso (miR-451, miR-1275, miR-328-5p, miR-638, miR-149, miR-665 e miR-583) e um hiperexpresso (miR-338-3p).

O uso de leucócitos mononucleares em estudo da epilepsia torna-se ainda mais interessante dada a estreita relação entre o sistema imune e a epilepsia (ANDRZEJCZAK, 2011; MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2013; DKUZNETSOVA; VETRILÉ; KARPOVA, 2014).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

A proposta desse trabalho foi investigar a expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 no hipocampo e na fração leucocitária do sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial e avaliar o possível papel diferencial desses miRNAs como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico e prognóstico dessa doença.

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificar a expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 no hipocampo e na fração leucocitária do sangue de pacientes com ELTM por PCR em tempo real.

2. Avaliar a coexpressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 no hipocampo e na fração leucocitária do sangue de pacientes com ELTM.

3. Avaliar as diferenças de expressão desses microRNAs nos grupos Engel I e Engel III e IV, afim de verificar seus potenciais como biomarcadores de resultado do tratamento cirúrgico da ELTM.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram utilizadas amostras de hipocampo e sangue coletadas de 20 pacientes submetidos à amigdalohipocampectomia devido à ELTM-EH farmacorresistente, nos quais houve a confirmação anatomopatológica do diagnóstico de esclerose hipocampal. A coleta foi realizada em nitrogênio líquido durante o tratamento cirúrgico pela Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). As amostras encontravam-se armazenadas em freezer - 80°C e catalogadas no Banco da Neurocirurgia alocado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram abordados para a obtenção de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Esses pacientes foram acompanhados pelo Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) e avaliados quanto à evolução pós-operatória, dividindo-se em dois grupos: um constituído por 10 pacientes com boa evolução pós-operatória (Engel I) e o outro constituído por 10 pacientes com má evolução (Engel III e IV).

Para amostras controles das peças cirúrgicas, foram utilizados nove hipocampos provenientes de indivíduos autopsiados pelo Centro de Medicina Legal (CEMEL) da FMRP-USP, sem histórico médico de doença neurológica ou

psiquiátrica, extraídas em até 15 horas após o óbito. Já para amostras controles de sangue, foram utilizadas 10 amostras coletadas de indivíduos saudáveis integrantes do corpo de alunos e funcionários da FMRP-USP.

4.2 Métodos

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP. Para análise da expressão dos miRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 foram realizadas as seguintes etapas: extração de RNA, síntese de cDNA e RQ-PCR.

4.2.1 Extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA em quantidade aproximada de 4 mL e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. O precipitado (hemácias e *buffy coat*) foi transferido para tubo falcon estéril e livre de RNase de 50 mL e a esse foi acrescentado 20 mL de tampão para lise de glóbulos vermelhos. Após manter 15 min em gelo, centrifugou-se novamente por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, obtendo-se o *pellet* que foi ressuspensionado em 250 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750 mL de Trizol (*Invitrogen*, EUA) e transferido para um tubo *ependorf* de 1,5 mL.

As amostras de hipocampo de todos os grupos do estudo foram adicionadas a 1000µl de *Trizol Reagent*® (*Invitrogen*, EUA). Os fragmentos foram

homogeneizados com a utilização de um aparelho Politron® e posteriormente transferidos para um tubo *ependorf* de 1,5mL.

A partir de então, sangue e tecido foram processados da mesma forma: acrescentou-se 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada *ependorf* foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -80°C por pelo menos 12 horas.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 70% seguido de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm, novamente desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* foi seco por inversão e permanência em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir a amostra foi ressuspensa com água tratada com DEPC com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquoteado, identificado e armazenado a - 80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido, as amostras foram analisadas em *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)* com RNA 6000 Pico chip. Também utilizamos um equipamento *Thermo Scientific NanoDrop 2000*, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

4.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA

Foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para a síntese do cDNA do miRNA para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de *RT Buffer*, 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima *MultiScribe™*, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC para um volume final de 7,5µl. As amostras foram levadas para um termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e resfriadas a 4°C, posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -20°C. Antes de utilizar o cDNA sintetizado na reação de PCR em tempo real, diluí-o 1:4 em água DEPC.

4.2.3 RQ-PCR dos microRNAs: miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos miRNAs. Para a análise quantitativa da expressão, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, compostos por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de *Threshold cycle* (Ct) determinados para as diferentes amostras, foram normatizados. O Ct determinado para uma amostra (para um determinado miRNA) foi subtraído do Ct determinado para um *house-keeping* (neste caso o U6) na mesma amostra, originando o chamado ΔCt .

Assim, o número de ciclos que separa o C_t de uma amostra do C_t do calibrador, neste caso utilizou a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado C_t . Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula 2^{-C_t} .

As reações de amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR) foram realizadas em duplicata numa placa de 96 poços, utilizando o reagente *Taqman Master Mix* (*Applied Biosystems*, EUA). A reação teve um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA diluído. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 *Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) foi utilizado juntamente com o *software 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) para a obtenção dos valores de C_t .

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de 2^{-C_t} . Foi estabelecido um *threshold* de 0,1 para o endógeno e também para os miRs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5.

4.2.4 Análise estatística

As amostras independentes, submetidas ao teste de normalidade, não projetaram populações normais. Portanto, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* na

comparação do grupo Controle x Epilepsia e o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns* na comparação entre Controle x Engel I x Engel III. O software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Prism*, Inc, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a análise estatística e para gerar os gráficos. Consideramos significativo um $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Dados dos pacientes

Na Tabela 2 estão apresentadas as informações a respeito dos pacientes selecionados para esse trabalho.

Tabela 1. Dados dos pacientes com ELTM.

PACIENTE	INICIAIS	SEXO	IDADE	ENGEL
SNC392	J.G.S.	FEM	29 ANOS	I
SNC398	A.R.R.	MASC	40 ANOS	I
SNC440	L.F.M.	MASC	41 ANOS	I
SNC454	E.H.G.G.	FEM	37 ANOS	I
SNC460	M.A.P.S.	FEM	39 ANOS	I
SNC500	A.J.B. J.	FEM	25 ANOS	I
SNC666	G.T.C.	MASC	25 ANOS	I
SNC683	N.C.S.	FEM	26 ANOS	I
SNC690	L.B.B.	FEM	37 ANOS	I
SNC710	E.M.A.	FEM	53 ANOS	I
SNC346	N.M.H.	FEM	32 ANOS	III ou IV
SNC355	C.A.G.Z.	MASC	54 ANOS	III ou IV
SNC358	F.A.R.	FEM	27 ANOS	III ou IV
SNC363	S.A.S.	MASC	41 ANOS	III ou IV
SNC385	C.S.	MASC	40 ANOS	III ou IV
SNC443	M.R.O.A.	FEM	45 ANOS	III ou IV
SNC574	I.C.M.	FEM	29 ANOS	III ou IV
SNC741	L.N.S.R.	FEM	44 ANOS	III ou IV
SNC744	R.G.S.	FEM	28 ANOS	III ou IV
SNC764	V.R.V.	FEM	42 ANOS	III ou IV

Os dois grupos, Engel I e Engel III e IV, se assemelham quanto à distribuição de sexo e a idade média dos grupos. Ambos apresentam 7 mulheres e 3 homens e a idade média do grupo Engel I é de 35,2 e Engel III e IV é de 38,2.

5.2 Expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183

O *fold* dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 foi calculado em todas as amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia, hipocampo de necropsia (controles), amostras de sangue dos pacientes e controles saudáveis (Apêndice 1 e 2) .

Os gráficos e resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão dos microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 quando comparados hipocampo de necropsia (controle) com hipocampo de pacientes com epilepsia estão demonstrados nos gráficos 1, 5 ,9 e 13. A comparação entre hipocampo de necropsia (controle) com hipocampo de pacientes Engel I com hipocampo de pacientes Engel III e IV estão apresentados nos gráficos 3, 7, 11 e 15.

Para o sangue, os gráficos 2, 6, 10 e 14 demonstram sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes com epilepsia Já a comparação entre sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I com sangue de pacientes Engel III e IV estão nos gráficos 4, 8, 12 e 16.

5.2.1 miR-145

Gráfico 1. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. O miRNA-145 apresentou-se hipoexpresso no hipocampo de pacientes com epilepsia ($p=0,0222$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 2. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. O miRNA-145 apresentou-se estatisticamente hiperexpresso no sangue de pacientes com epilepsia ($p=0,0052$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 3. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0628$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 4. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-145 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV. O miRNA-145 apresentou-se estatisticamente hiperexpresso no sangue de Engel I em comparação ao controle ($p=0,0158$, teste *Kruskal-Wallis*).

5.2.2 miR-181c

Gráfico 5. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,4423$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 6. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. O miRNA-181c apresentou-se estatisticamente hiperexpresso no sangue de pacientes com epilepsia ($p= 0,0297$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 7. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,7173$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 8. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-181c no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,0779$, teste *Kruskal-Wallis*).

5.2.3 miR-199a

Gráfico 9. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa ($p= 0,4650$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 10. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. O miRNA-199a teve sua expressão significativamente aumentada no sangue de pacientes com epilepsia ($p= 0,0089$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 11. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,4334$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 12. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-199a no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV. O miRNA-199a apresentou-se estatisticamente hiperexpresso no sangue de Engel I em comparação ao controle ($p= 0,0211$, teste *Kruskal-Wallis*).

5.2.4 miR-1183

Gráfico 13. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística entre os grupos (0,2481, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 14. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. O miRNA-1183 teve sua expressão significativamente aumentada no sangue de pacientes com epilepsia (0,0012, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 15. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no hipocampo de necropsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel I x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística ($p=0,4711$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 16. Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1183 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I x sangue de pacientes Engel III e IV. O miRNA-1183 teve sua expressão significativamente aumentada no sangue de Engel I em comparação ao controle e Engel III e IV em comparação ao controle ($p=0,0026$, teste *Kruskal-Wallis*).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Atualmente o diagnóstico da epilepsia é baseado principalmente em um conjunto de evidências clínicas, eletroencefalográficas e radiológicas (WIESER, 2004). Entretanto, estes não fornecem dados precisos e tem custo elevado (WANG et al, 2015). Portanto, o desenvolvimento de novos métodos para aperfeiçoar e simplificar esta etapa se faz necessário.

Apesar da cirurgia no controle de crises para pacientes com ELTM apresentar um bom resultado, aproximadamente 10% dos casos seguem com pouca ou nenhuma melhora no controle das crises no pós-operatório (SAVITRSASTRI et al., 2014). Sendo atualmente impossível prever o prognóstico em pacientes individuais antes da cirurgia (CENDES et al., 2014). Dessa forma, a identificação de biomarcadores que possam prever o resultado do tratamento cirúrgico da ELTM seria de grande importância.

Recentemente, os miRNAs têm sido propostos como novos biomarcadores para várias doenças, incluindo do SNC (SHTILBANS; HENCHCLIFFE, 2012; GANDHI et al, 2013; KUMAR et al, 2013; TAN et al, 2014). Trata-se de um método não invasivo, de fácil detecção e de baixo custo que poderia auxiliar no diagnóstico e prognóstico da epilepsia.

Neste trabalho utilizamos os microRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183 selecionados previamente, pela metodologia de microarrays em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, por apresentarem-se diferencialmente expressos no hipocampo e sangue de pacientes com epilepsia.

Rollins et al. (2010) encontraram coexpressão em encéfalos humanos e leucócitos mononucleares do sangue periférico. Entretanto, em nosso estudo não observamos esta coexpressão dos miRNAs no hipocampo e na fração leucocitária do sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial. Uma hipótese para essa diferença na expressão entre os dois tecidos talvez seja a expressão tecido-específico (SLEZAK-PROCHAZKA et al., 2010). Também podemos sugerir a expressão diferencial periférica associada a diversas condições que envolvem a doença, como por exemplo fatores psíquicos, visto que muitos estudos demonstram o papel dos miRNAs em doenças que acometem o sistema límbico, como por exemplo, a ansiedade e a depressão (GEAGHAN; CAIRNS, 2014; DWIVEDI, 2015).

O miR-145 apresentou-se hipoexpresso no hipocampo e hiperexpresso nas amostras de sangue de pacientes com epilepsia quando comparada com a suas respectivas amostras controles. Em ambos os casos, tecido e sangue, Engel I e Engel III e IV não apresentaram diferença na expressão de miR-145. Resultado semelhante ao nosso foi encontrado em ratos após crise epiléptica, onde miR-145 também apresentou-se hipoexpresso no hipocampo (RISBUD; PORTER, 2013).

O miR-145 é um supressor tumoral que tem sido recentemente relacionado na regulação das vias de apoptose (DI et al, 2014). Este miRNA se apresentou hiperexpresso no cérebro de rato após isquemia (JEYASEELAN et al, 2008; DHARAP et al, 2009; WITWER et al, 2010; KOUTSIS; SIASOS; SPENGOS, 2013; DI et al, 2014). Entretanto, em nosso estudo observamos uma hipoexpressão deste miRNA no hipocampo dos pacientes com epilepsia.

Jiang et al (2013) observaram hipoexpressão do miR-145 em estudo de pacientes com diagnóstico de aneurisma intracraniano quando comparado ao controle. O trabalho ainda avaliou as possíveis funções desse miRNA no processo de inflamação e encontraram significativa associações com migração de fagócitos, proliferação de leucócitos mononucleares, estimulação de linfócitos T, movimentação das células mononucleares de leucócitos e diferenciação de macrófagos (JIANG et al, 2013). Também encontramos esse miRNA hipoexpresso no hipocampo de pacientes com ELTM, achado esse muito interessante uma vez que é conhecida a estreita relação entre o sistema imune e a epilepsia (ANDRZEJCZAK, 2011; MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2013; DKUZNETSOVA; VETRILÉ; KARPOVA, 2014).

Dois trabalhos que utilizaram sangue total para análise miRNAs alterados em doenças neurológicas também encontraram o miRNA-145 hiperexpresso no sangue destes pacientes em comparação ao controle. Em um dos estudos foi demonstrado que níveis elevados de miR-145 no sangue podem discriminar pacientes com esclerose múltipla de controles saudáveis, com uma especificidade de 89,5% e uma sensibilidade de 90,0% (KELLER et al, 2009). A expressão de miR-145 circulante também foi avaliada em amostras de sangue de pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) comparados com controles normais e o mesmo apresentou níveis de expressão significativamente elevados. Os autores sugerem que o miR-145 no sangue total pode atuar como um biomarcador potencial de AVC (GAN; WANG; TAN, 2012). Em outro trabalho, Tsai et al (2013) avaliou os níveis de expressão do miR-145 no soro de pacientes com AVC, sendo

que os autores não encontraram diferenças na expressão entre o grupo de pacientes com AVC e o grupo de indivíduos controles (TSAI et al, 2013).

Em nosso trabalho, a expressão de miR-181c não apresentou diferença estatística significativa tanto nas avaliações das amostras de hipocampo quanto nas avaliações das amostras de sangue entre os três grupos estudados: controle, Engel I, Engel III e IV. Entretanto, quando comparada a expressão de miR-181c no grupo controle *versus* epilepsia, foi encontrada diferença estatística significativa nas amostras de sangue, sendo este miRNA hiperexpresso no grupo de pacientes com epilepsia. Já no hipocampo, o grupo controle e epilepsia não apresentaram diferença estatística significativa, onde observamos o aumento da expressão do miR-181c no grupo de pacientes com diagnóstico de epilepsia. Em estudo experimental, utilizando ratos, Risbud e Porter (2013) observaram que o miR-181c apresentou-se hiperexpresso no hipocampo dos animais após crise epilética. Em outro estudo experimental realizado com ratos expostos a cocaína, Chen, Liu e Guan (2013) também constataram a hiperexpressão do MiR-181c em hipocampo dos animais avaliados. Neste trabalho ainda os autores demonstraram que o miR-181c apresenta como alvos genes envolvidos na sinapses com dopamina e serotonina. (CHEN; LIU; GUAN, 2013).

A hipoexpressão de miR-181c foi observada no cérebro de rato após isquemia (OUYANG et al, 2012). Ainda, miR-181c estava hipoexpresso em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (MARTINELLI-BONESCHI et al, 2012) e em amostras de lesões de substância branca do cérebro (JUNKER et al, 2009) de pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla, sendo que estes

resultados diferem do que encontramos nos nossos resultados em pacientes com epilepsia, onde encontramos aumento de expressão deste miRNA.

As crises epilépticas incluem uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso e o sistema imune. Dois distintos processos inflamatórios têm sido associados as convulsões, a neuroinflamação e a inflamação sistêmica. Os efeitos da inflamação sistêmica são mediados ou facilitados pela perda da função da barreira hematoencefálica (BHE). A ruptura na BHE pode ser desencadeada por um insulto direto ao endotélio ou por fatores sistêmicos, incluindo ação dos leucócitos e liberação de moléculas mediadoras que aumentam a permeabilidade vascular (MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2014). Tominaga et al (2015) avaliaram a função do miR-181c na ruptura da barreira hematoencefálica em metástase cerebral de câncer de mama. Eles demonstraram que vesículas extracelulares derivadas do câncer de mama desencadearam colapso da BHE principalmente através do miR-181c que regulou negativamente o seu gene alvo PDPK1, resultando em localização anormais de fibras de actina na barreira. Em nosso estudo, o miR-181c apresentou-se hiperexpresso na fração leucocitária dos pacientes com epilepsia, sendo uma hipótese a atuação desse miRNA na perda de função da BHE.

O miR-199a foi achado especificamente expressos no tecido neural de rato, tais como no bulbo olfatório, córtex, hipotálamo, tronco cerebral, gânglios da raiz dorsal e hipocampo (HUA et al, 2009). Em nosso estudo, o miR-199a apresentou-se expresso de forma uniforme no hipocampo dos três grupos (Controle, Engel I e Engel III e IV). Já no sangue, o miR-199a apresentou-se mais

expresso no grupo da epilepsia comparado ao controle, mas não apresentou diferença entre Engel I e Engel III e IV.

Em outros estudos, o miR-199a apresentou-se alterado no tecido cerebral doente. Em comparação com o grupo controle, a expressão de miR-199a foi significativamente menor nos tecidos cerebrais epiléticos de humanos (JIANG et al, 2014). Entretanto, esse miRNA apresentou-se hiperexpresso em hipocampo de ratos exposto a cocaína (CHEN; LIU; GUAN, 2013) e nas lesões da substância branca do cérebro de pacientes com esclerose múltipla (JUNKER et al, 2009). Em estudo recente, Ma et al (2014), observaram que a expressão de miR-199a diminuiu dramaticamente nas PBMCs de pacientes com esclerose múltipla em comparação com indivíduos controles (MA et al, 2014).

O miR-1183 apresentou-se hiperexpresso tanto no sangue quanto no tecido de pacientes com epilepsia, com diferença estatística significativa apenas no sangue. Nas amostras de sangue, houve diferença entre o grupo controle quando comparado ao grupo Engel I e no grupo controle quando comparado ao grupo Engel III e IV. Em nossos resultados observamos um aumento progressivo nos níveis de expressão do miR-1183 no sangue entre os grupos estudados apesar de não apresentar diferença significativa. Podemos sugerir uma relação do miR-1183 com o aumento do grau da classificação de Engel, podendo, portanto, o miR-1183 sugerir um possível potencial como biomarcador prognóstico de cirurgia para pacientes com ELTM.

O miR-1183 ainda é muito pouco estudado, sendo escassos os artigos encontrados na literatura, poucos estudos com tumores que utilizaram microarray como metodologia identificaram um perfil de expressão diferenciada desse

miRNA. Foi observado perda da função do miR-1183 em alguns casos de tumores de mama (JIANG et al., 2011) e ele apresentou-se hipoexpresso em biópsia de sarcoma de Kaposi quando comparado com amostras de tecido saudável (WU et al., 2015). O miR-1183 também apresentou-se hiperexpresso em pacientes com tumor colorretal que não tiveram resposta ao tratamento neoadjuvante quando comparado aos pacientes que tiveram resposta ao tratamento (SCARPATI et al., 2012).

Apesar do grande potencial dos miRNAs na circulação sanguínea como biomarcadores de doenças ser reconhecido (WEILAND et al., 2012), poucos são os estudos de biomarcadores no sangue de pacientes com epilepsia. O único trabalho encontrado em humanos foi o estudo de Wang et al (2015), que foram os pioneiros em apresentar evidências de miRNAs circulantes no soro de pacientes com epilepsia como possíveis biomarcadores, com destaque ao miR-106b-5p que teve o melhor valor diagnóstico para a epilepsia. Nosso estudo ainda adiciona como outros possíveis biomarcadores no sangue de pacientes com epilepsia os miRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a e miR-1183, todos hiperexpressos na fração leucocitária desses pacientes. O miR-1183 apresentou aumento nos níveis de expressão progressivamente entre os grupos controle, Engel I e Engel III e IV respectivamente, podendo representar um potencial biomarcador de prognóstico cirúrgico entre Engel I e Engel III e IV.

Embora os miRNAs atuem como biomarcadores extremamente promissores, até agora não existem miRNAs sendo clinicamente utilizados nas doenças neurológicas (TUMILSON et al., 2014). Ainda há a necessidade de uma considerável quantidade de dados para validar os miRNAs como biomarcadores

para doenças do SNC. Para tanto, se faz necessário aumentar o número de amostras analisadas, assim como melhorar a padronização dos métodos (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; HERMANSEN; KRISTENSEN, 2013; TUMILSON et al., 2014). A comparação da expressão dos miRNAs com estudos de transcriptoma e proteoma representa o maior desafio para a compreensão clínica e gestão de doenças (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. O miR-145 apresentou-se hipoexpresso no hipocampo e hiperexpresso no sangue de pacientes com ELTM quando comparado aos respectivos grupos controles.
2. Todos os miRNAs avaliados, miR-145, miR-181c, miR-199a, miR-1183, apresentaram-se hiperexpresso no sangue de pacientes com ELTM comparado ao controle.
3. O miR-1183 apresentou-se aumento nos níveis de expressão progressivamente entre os grupos controle, Engel I e Engel III e IV respectivamente.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGHAKHANI, Y. et al. Epilepsy surgery in patients with bilateral temporal lobe seizures: a systematic review. **Epilepsia**, v. 55, n.12, p. 1892-901, 2014

BANERJEE, P.N., FILIPPI D., HAUSER W.A. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. **Epilepsy**, v. 85, n. 1 p. 31-45, 2009.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215–233, 2009.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERG, A.T., SCHEFFER, I.E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n.6, p.1058-62, 2011.

BLÜMCKE, I. et al. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Pathology**, v. 22, n. 3, p. 402-411, 2012.

BOT, A.M., DEBSKI, K.J.; LUKASIUK, K. Alterations in miRNA levels in the dentate gyrus in epileptic rats. **PLoS One**, v. 8, e76051, 2013.

CENDES, F. et al. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 1, p. 21-37, 2014.

CHEN, C.L.; LIU, H.; GUAN, X. Changes in microRNA expression profile in hippocampus during the acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference in rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, p. 96, 2013.

COWLAND, J. B.; HOTHER, C.; GRONBAEK, K. MicroRNAs and cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1090-2106, 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

DE FELICE, B. et al. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Gene**, v. 508, n. 1, p. 35-40, 2012.

DHARAP, A. et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 29, p. 675–687, 2009.

DI, Y. et al. MicroRNAs Expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury. **J Mol Neurosci**, v. 53, p. 242–250, 2014.

DI LEVA, G., GAROFALO, M., CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 287-314, 2014.

DOGINI, D. B. et al. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 172, 2013.

DUVERNOY, H. M. The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2005.

DWIVEDI, Y. Pathogenetic and therapeutic applications of microRNAs in major depressive disorder. **Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.003>, 2015.

EL-FALOUGY, H., BENUSKA, J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. **Bratislavské Lekárske Listy**, v. 107, n. 4, p. 103-106, 2006.

ENGEL, J.Jr, VAN NESS, P.C., RASMUSSEN, T.B. Outcome with respect to epileptic seizures. In Engel J Jr (ed). Surgical treatment of the epilepsies, 2nd Ed. New York: Raven Press, p. 609-621, 1993.

ENGEL JR, J. Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? **The Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-352, 2001.

ENGEL J.Jr. et al. Epilepsy biomarkers. **Epilepsia**, v. 54, n. 4, p. 61–69, 2013

FANSELOW, M. S.; DONG, H. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FÖRSTER, E.; ZHAO, S.; FROTSCHER, M. Laminating the hippocampus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 259-267, 2006.

GAN, C.S.; WANG, C.W.; TAN, K.S. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n.1, p. 147-152, 2012.

GANDHI, R. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 73, p. 729–740, 2013.

GEAGHAN, M.; CAIRNS, M.J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Biological Psychiatry, www.sobp.org/journal, 2014.

GORTER, J.A. et al. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 62, p. 508–520, 2014.

HAMMOND, S. MicroRNAs as oncogenes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 16, p. 4-9, 2006.

HAUSER, W. A. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. **Epilepsy Res Suppl**, v.5, p.25-28, 1992.

HERMANSEN, S.K.; KRISTENSEN, B.W. MicroRNA biomarkers in glioblastoma. **J Neurooncol**, v. 114, p. 13–23, 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 Neurosci**, v. 13, p. 115, 2012.

HUA, Y.J. et al. Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue. **BMC Genomics**, v. 10, n. 214, 2009.

JEYASEELAN, K.; LIM, K.; ARMUGAM, A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 39, p.959–966, 2008.

JIANG, G. et al. Expression levels of microRNA-199 and hypoxia-inducible factor-1 alpha in brain tissue of patients with intractable epilepsy. **Int J Neurosci**, v. 24, p.1-29, 2014.

JIANG, L. et al. A non-synonymous polymorphism Thr115Met in the EpCAM gene is associated with an increased risk of breast cancer in Chinese population. **Breast Cancer Res Treat**, v. 126, p.487–495, 2011.

JIANG Y. et al. MicroRNA/mRNA profiling and regulatory network of intracranial aneurysm. **BMC Medical Genomics**, v. 6, n. 36, 2013.

JIMENEZ-MATEOS, E.M.; HENSHALL. D.C. Epilepsy and microRNA. **Neuroscience**, v. 238, p. 218–229, 2013.

JUNKER, A. et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. **Brain**, v.132, p. 3342-52, 2009.

KAN, A.A. et al. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, p. 3127–3145, 2012.

KELLER, A. et al. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing–remitting disease from healthy controls. **PLoS One**, v. 4, e7440, 2009.

KOUTSIS, G.; SIASOS, G.; SPENGOS, K. The Emerging Role of microRNA in Stroke. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1573-1588, 2013.

KRETH, S.; THON, N.; KRETH, F.W. Epigenetics in human gliomas. **Cancer Letters**, v. 342, n 2, p. 185-192, 2014.

KULSHRESHTLA, R. et al. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1426-1431, 2007.

KUMAR, P., et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. **Plos One**, v. 8, n. 7, e69807, 2013.

LI, M.M. et al. MicroRNAs dysregulation in epilepsy. **Brain Research**, v. 1584, p.94-104, 2014.

LIU, D. et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 92-101, 2010.

MA, X. et al. Expression, Regulation and Function of microRNAs in Multiple Sclerosis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n.8, p. 810-818, 2014.

MAGIORKINIS, E., SIDIROPOULOU, K., DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. **Epilepsy & Behavior**, v. 17, n. 1, p. 103-108, 2010.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 2, 2014.

MARTINELLI-BONESCHI, F. et al. MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. **Neurosci Lett.**, v. 508, p. 4-8, 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, e35921, 2012.

NELSON, P.T. et al. Hippocampal sclerosis of aging, a prevalent and high-morbidity brain disease. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 2, p. 161-177, 2013.

NGUGI, A. K. et al. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 77, n. 10, p. 1005-1012, 2011.

OUYANG, Y. et al. MiR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo. **Neurobiol Dis**, v. 45, p. 555–563, 2012.

PEARCE, J. M. Ammon's horn and the hippocampus. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 71, n. 3, p. 351, 2001.

RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab**; v. 50, p. 1102-1107, 2006.

RISBUD, R.M.; PORTER, B.E. Changes in MicroRNA expression in the whole hippocampus and Hippocampal synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. **PLoS One**, v. 8, e53464, 2013.

ROLLINS, B. et al. Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 153B, n. 4, p. 919-936, 2010.

SAVITR SASTRI, B.V et al. Clinico-pathological factors influencing surgical outcome in drug resistant epilepsy secondary to mesial temporal sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 340, n. 1, p. 183-190, 2014.

SCARPATI, G.D.V. et al. A Specific miRNA Signature Correlates With Complete Pathological Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. **Int J Radiation Oncol Biol Phys**, v. 83, n. 4, p. 1113-1119, 2012.

SCHILSKY, R.L. et al. Development and use of integral assays in clinical trials. **Clin Cancer Res**, v.18, p.1540-1546, 2012.

SHTILBANS, A.; HENCHCLIFFE, C. Biomarkers in Parkinson's disease: an update. **Curr Opin Neurol**, v. 25, p. 460-465, 2012.

SLEZAK-PROCHAZKA, I., et al. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. **RNA**, v. 16, n. 6, p. 1087-1095, 2010.

SMAELE; E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain Research**, v. 1338, p. 100-111, 2010.

SUN, Z. et al. Genome-wide microRNA profiling of rat hippocampus after status epilepticus induced by amygdala stimulation identifies modulators of neuronal apoptosis. **PLoS One**, v. 8, e78375, 2013.

TAN, L. et al. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 40, p. 1017–1027, 2014.

TOMINAGA, N. et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood–brain barrier. **Nature communications**, v. 6, p.6716.

TSAI, P.C. et al. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as Potential Biomarkers for Cerebrovascular Disease. **J Vasc Res**, v.50, p. 346–354, 2013.

TUMILSON, C.A. et al. Circulating MicroRNA Biomarkers for Glioma and Predicting Response to Therapy. **Mol Neurobiol**, 2014.

WANG, J. et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

WEILAND, M. et al. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 850-859, 2012.

WIESER, H. ILAE commission report: mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, 2004.

WITWER, K. et al. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. **J Immunol**, v. 184, p.2369-2376, 2010.

WU, X.J. et al. The expression profiles of microRNAs in Kaposi's sarcoma. **Tumor Biol**. v.36, p. 437–446, 2015.

APÊNDICES

9. APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de Fold calculados para as amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia e hipocampo de necropsias (controles).

	Amostra	miR-145	miR-181c	miR-199a	miR-1183
Controle	A63	1,019212	1,067772	0,6004261	0,9330812
	HC146	0,8835306	1,342724	0,9119815	0,9311673
	HC205	3,4154	1,527491	3,519132	1,493854
	A256	0,7867506	0,8257599	0,9338679	0,903317
	A257	1,067572	0,4147587	1,483775	0,3559755
	A281	0,7105911	1,03272	0,9266866	0,5093718
	A303	1,424312	1,290994	1,946618	2,673805
	A448	0,334731	-	0,2500508	0,2028328
	A451	1,14266	-	0,8302779	8,673244
Engel I	SNC392T	0,0930046	0,0545895	0,1225666	0,1735782
	SNC398T	0,9170477	7,74233	1,573705	32,50168
	SNC440T	0,6537082	0,3724391	1,45607	1,351371
	SNC454T	1,007073	0,9015268	1,292478	1,384296
	SNC460T	0,9951584	0,4841285	1,048543	0,3814647
	SNC500T	0,6595235	2,416946	3,519234	5,960251
	SNC683T	0,2538266	1,209055	1,657202	1,683818
	SNC666T	0,4680188	0,6665006	0,9241748	3,059037
	SNC690T	0,5075285	-	1,943195	2,259215
	SNC710T	1,70943	-	1,34979	1,224694
Engel III e IV	SNC346T	0,3996612	1,38666	1,621649	1,226595
	SNC355T	0,5067896	0,4964954	1,098806	0,6768156
	SNC358T	0,8782654	0,9784333	1,971226	3,444737
	SNC363T	0,4936334	2,70308	1,092291	5,02438
	SNC385T	0,8671202	1,082249	1,58775	3,464224
	SNC443T	0,6463118	0,766739	0,5126251	0,8025087
	SNC574T	0,9877043	0,6321222	1,041436	3,366634
	SNC741T	0,7018158	0,3485511	0,9116921	0,530064
	SNC744T	0,625324	-	0,7176358	0,5297515
	SNC764T	0,5089388	-	0,6919639	0,9874238

Apêndice 2. Valores de Fold calculados para as amostras de sangue de pacientes com epilepsia e sangue de indivíduos saudáveis (controles).

	Amostra	miR-145	miR-181c	miR-199a	miR-1183
Controle	C3S	2,982331	-	1,678792	5,992177
	C6S	2,658281	-	2,347692	3,224086
	C7S	0,4854912	2,419204	0,661408	0,1610056
	C9S	1,751144	2,094354	1,924502	2,530493
	C10S	0,5571497	1,331373	0,8909169	4,370926
	C11S	1,066783	0,1178918	0,4362788	0,1220745
	C12S	0,5997176	0,2506321	0,313443	0,4888586
	C13S	0,624652	6,53812	1,604413	15,80072
	C14S	0,1614864	0,0155011	0,236549	0,0308251
	C15	4,126399	49,50425	4,31099	3,635685
Engel I	SNC392S	9,506324	64,33731	16,00669	87,65114
	SNC398S	6,034286	13,47328	3,67153	34,93488
	SNC440S	10,50459	22,56519	8,310392	56,59883
	SNC454S	2,90903	26,06129	6,041609	35,43006
	SNC460S	5,706768	21,30219	6,971238	25,94903
	SNC500S	2,920217	34,82974	6,115639	101,5541
	SNC683S	2,249403	2,463945	1,462891	3,059517
	SNC666S	1,972861	0,0325393	0,4129348	0,1729
	SNC690S	2,492409	-	3,934139	41,89317
	SNC710S	12,40185	-	10,92655	276,3563
Engel III e IV	SNC346S	6,123727	7,374658	0,8233937	32,63476
	SNC355S	0,3251559	1,72704	0,7044392	3,859867
	SNC358S	12,616	34,2678	23,07562	8,14498
	SNC363S	0,625208	0,8050728	0,415596	0,6707864
	SNC385S	1,956463	13,65996	5,708997	26,55053
	SNC443S	6,017428	6,949575	1,848783	6,901605
	SNC574S	16,52942	666,7529	14,9914	1649,759
	SNC741S	1,937344	11,71696	4,981941	49,73049
	SNC744S	2,949749	-	2,036068	24,0751
	SNC764S	3,263734	-	4,694857	9,789822