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

ENRICO SALOMAO IORIATTI

**Análise do perfil MicroRnas circulantes como preditores do
diagnóstico e do prognóstico cirúrgico de pacientes portadores de
Esclerose Mesial Temporal**

**Ribeirão Preto
2019**

ENRICO SALOMAO IORIATTI

Análise do perfil MicroRnas circulantes como preditores do diagnóstico e do prognóstico cirúrgico de pacientes portadores de Esclerose Mesial Temporal

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Medicina

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta Tese, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ioriatti, Enrico Salomão

Análise do perfil MicroRnas circulantes como preditores do diagnóstico e do prognóstico cirúrgico de pacientes portadores de Esclerose Mesial Temporal. Ribeirão Preto 2019. Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

65 p.: il.; 30cm

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Medicina. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

1. Epilepsia; 2. Hipocampo; 3. microRNAs;
4. Amígdalo Hipocampectomia;
5. Biomarcadores. Análise de ROC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Enrico Salomao Ioriatti

Título: Análise do perfil MicroRNAs circulantes como preditores do diagnóstico e do prognóstico cirúrgico de pacientes portadores de Esclerose Mesial Temporal.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Medicina

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais , cuja dedicação, esforço e estímulo aos estudos e pesquisa permitiram minha formação acadêmica.

A minha amada e querida esposa e companheira Fernanda pelo apoio incondicional durante todo o período em que estamos juntos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir ter saúde, força e sobretudo por ter me devolvido o meu bem mais precioso, minha esposa, que passou por um grave problema de saúde na fase final deste projeto.

Aos colegas de profissão, por terem salvado a vida dela.

À minha família, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram a prosperar através dos estudos.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular que deram total apoio e compartilharam valiosos conhecimentos, em especial à Prof. Dra Daniela Tirapelli e aos colegas Mucio Cirinoa; Fermino Neto e Priscila Freitas-Lima, durante toda a execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, pelos ensinamentos durante toda minha formação em Neurocirurgia e pela confiança e oportunidades depositados para execução deste projeto.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Juliana Pischiotin, por toda presteza e eficiência durante toda execução do projeto.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade e por oferecer-me todas as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

RESUMO

IORIATTI, E. S. **Análise do perfil MicroRnas circulantes como preditores do diagnóstico e do prognóstico cirúrgico de pacientes portadores de Esclerose Mesial Temporal.** 2019. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, 2019.

Introdução: A epilepsia é a condição neurológica grave de maior prevalência do mundo em todas as idades, acometendo cerca de 1% da população. A epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal (ELTM-EH) é a forma mais comum e bem definida de epilepsia focal sintomática. O tratamento cirúrgico da ELTM-EH pode obter a longo prazo o controle total de crises em até 83% dos pacientes. Entretanto, cerca de 10% dos pacientes evoluem com resultado cirúrgico insatisfatório. A ELTM-EH está associada as alterações amplas do perfil de expressão dos microRNAs (miRNAs) do hipocampo. Estudos recentes demonstram a existência de miRNAs estáveis no sangue periférico e em outros fluidos corporais, comprovadamente aplicáveis como biomarcadores, cuja abrangência vai do diagnóstico à resposta terapêutica. Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo analisar a expressão de microRNAs circulantes como preditores do resultado cirúrgico em pacientes portadores de esclerose mesial temporal submetidos à amígdalo hipocampectomia. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 28 pacientes submetidos à Lobectomia Temporal Anterior + Amígdalo Hipocampectomia em consequência de ELTM-EH farmacorresistente, com no mínimo 18 meses de seguimento pós-operatório. Quatorze deles com resposta cirúrgica favorável (Engel IA) e quatorze com resposta desfavorável (Engel III e IV). 11 voluntários saudáveis foram utilizados como controle. Amostras de sangue e hipocampo foram coletadas de forma padronizada durante o ato cirúrgico e o diagnóstico histopatológico de esclerose temporal foram confirmados de acordo com os critérios da ILAE. Os níveis de expressão dos **miR27a-3p**, **miR-328-3p** e **miR-654-3p** foram avaliados pela técnica de **RQ-PCR** nas amostras sanguíneas. Análises de Variância (ANOVA), com teste post hoc de Bonferroni e curvas Receiver Operating Characteristic (**ROC**) foram realizadas. **Resultados:** Os níveis de expressão do **miR27a-3p** no soro não foram capazes de discriminar indivíduos doentes de indivíduos saudáveis (AUC= 66,9%, $p = 0,11$), bem como também não foram capazes de discriminar pacientes com prognóstico cirúrgico favorável e desfavorável (AUC= 59,7% $p = 0,38$). Já os níveis de expressão do **miR-328-3p** no soro, apresentou uma incrível capacidade de discriminar indivíduos doentes de controles sadios (AUC = 93,5% $p < 0,001$), porém também não foram capazes de discriminar o prognóstico cirúrgico (AUC = 62,8% $p = 0,25$). Por fim os níveis de expressão do **miR-654-3p** foram capazes de diferenciar indivíduos doentes e saudáveis apenas para os pacientes do grupo com evolução pós operatória favorável (AUC = 74,7% $p = 0,004$). Todavia foi o único marcador capaz de discriminar o prognóstico cirúrgico (AUC = 73,6% $p = 0,04^*$).

Palavras-chave: Epilepsia. Hipocampo. microRNAs. Amígdalo Hipocampectomia. Biomarcadores. Análise de ROC.

ABSTRACT

IORIATTI, E.S. **Expression of circulating microRNAs as predictors of diagnosis and surgical outcome in patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.** 2019. Thesis (PhD). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2019.

Introduction: Epilepsy is the most prevalent severe neurological condition in the world for all ages, and affects about 1% of the global population. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common and well-defined form of symptomatic focal epilepsy. When combined with drug therapy, surgical intervention may provide long-term total seizure control in 62-83% of patients. Unfortunately, about 10% of operated cases have little or no improvement in seizure control. Despite the range of factors that may negatively influence the surgical outcome, it is not possible to delineate the prognosis in patients individually (34). Thus, several researches pursue new paradigms in an attempt to better determine such prognosis. Among them there are studies involving molecular biology. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is associated with alterations in miRNA expression profile, particularly in the hippocampus. Considering the topics explored, the present study aims to evaluate the peripheral blood expression of miRNAs as biomarkers for MTLE-HS diagnosis. **Material and Methods:** Twenty-eight patients who underwent anterior temporal lobectomy+amygdalohippocampectomy as a consequence of drug-resistant MTLE-HS were selected. All patients had at least 18 months of postoperative follow-up, 14 with favorable surgical response (Engel IA) and 14 with unfavorable response (Engel III-IV). The control group was composed by serum samples from 11 healthy volunteers. Analysis of expression profiles from miR-27a-3p, miR-328-3p and miR-654-3p were performed. For miRNA expression analysis, real time PCR technique was performed and **ANOVA** and **ROC curve** analyses were done to discriminate the groups. **Findings:** Serum **miR27a-3p** expression levels were unable to discriminate between sick and healthy subjects (AUC = 66.9%, $p = 0.11$), nor were they able to discriminate between patients with favorable and unfavorable surgical outcomes. (AUC = 59.7% $p = 0.38$). Serum **miR-328-3p** expression levels showed an incredible ability to discriminate sick individuals from healthy controls (AUC = 93.5% $p < 0.001$), but they were also unable to discriminate surgical outcomes (AUC = 62.8% $p = 0.25$). Finally, **miR-654-3p** expression levels were able to differentiate sick and healthy subjects only in the group of patients with favorable postoperative evolution (AUC = 74.7% $p = 0.004$). Nevertheless, it was the only biomarker capable of discriminating the surgical outcomes in the present study (AUC = 73.6% $p = 0.04$ *).

Keywords: Epilepsy, Hippocampus, Amygdalohippocampectomy, microRNA, Biomarkers, ROC analyses

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Escala de Engel	17
Figura 1 - Via de processamento Universal dos miRNAs	19
Figura 2 - miRNA e seus alvos na epileptogênese	20
Tabela 2 - Manipulação de miRNAs em modelos animais	21
Tabela 3 - Sumário de Estudos Funcionais interrogando miRNAs em modelos de epilepsia	21
Figura 3 - Validação de miRNAs 27a-3p , -328-3p e 654-3p como biomarcadores de epilepsia	24
Figura 4 - Localização Celular de miR-27a-3p e miR328-3p no cérebro humano	25
Figura 5 - Análise da correlação entre mecanismos de transporte no plasma e o diagnóstico	26
Tabela 3 - Grupo de Pacientes Selecionados com resposta Clinica Favorável	30
Tabela 4 - Grupo de Pacientes Selecionados com resposta Clinica Desfavorável...	30
Tabela 5 - Estudos Clínicos que avaliam a expressão dos miRNAs no sangue como biomarcadores de Epilepsia	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Three prime untranslated region
Agomirs	oligonucleotídeos agonistas miRNAs alvo específicos
AGO2	Proteína argonauta 2
ANOVA	Análise de Variância
Antagomirs	oligonucleotídeos anti códigos miRNAs alvo específicos
AUC	área sobre a curva
cDNA	DNA complementar
CIREP	Centro de Cirurgia de Epilepsia
cT	Threshold cycle
DBS	Deep Brain Stimulation
DC	Depois de Cristo
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
EDTA	etilenodiaminotetracético
EEG	Eletroencefalograma
ELTM-EH	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial associada à Esclerose Hipocampal
Exp5	exportina-5
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FISH	hibridização in situ
I.C.	Intervalo de Confiança

IL1	Interleucina 1
ILAE	Liga Internacional de Epilepsia
IPI	Injúria Precipitante Inicial
LCR	Líquido Céfalorraquidiano
miR	miRNA
miRNA	micro RNA
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
primiRNA	transcrito primário de miRNA
RISC	(RNA induced silence complex)
RM	Ressonância magnética
RNA	ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNS	Responsive Nerve Stimulation
ROC	Receiver Operating Characteristic – Características de Operação Receptor
RQ-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RT	Transcrição reversa
SNC	Sistema nervoso central
USP	Universidade de São Paulo
VNS	Vagal Nerve Stimulation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	27
3 OBJETIVO	28
4 PACIENTES E MÉTODOS	29
4.1 Pacientes.....	29
4.2 Métodos de Biologia Molecular e Processamento das Amostras.....	31
4.2.1 Extração do RNA.....	31
4.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA.....	32
4.2.3 RQ-PCR dos microRNAs	32
4.3 Análise estatística	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Testes de Normalidade	34
5.2 Análises ANOVA com post hoc Bonferroni.....	36
5.3 Analises de curvas ROC	39
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A Epilepsia como doença é contemporânea a existência do homem. (1) Desde os registos mais antigos, que a relatam como sendo de origem sobrenatural, associada a entidades demoníacas e a atos mágicos, passando por Hipócrates, que rejeita veementemente estes conceitos, a História da Epilepsia é marcada, numa fase inicial, pelo conflito entre o sobrenatural e o natural.(2) Esta dicotomia tem acompanhado a doença ao longo da História e ainda se verifica em algumas regiões do planeta, apesar da larga difusão da Ciência e da grande progressão da Medicina na atualidade. Recentemente, Hughlings Jackson e seus predecessores, através de uma Medicina baseada na evidência, abrem caminho para a Epileptologia moderna, na sequência de uma evolução científica profunda e generalizada. (3)

O termo Epilepsia se originou na Grécia antiga (500 AC- 400 DC) do verbo grego *epilambanein* que significa “tomar posse” ou “atacar”. Esta terminologia remonta a um período em que se acreditava que todas as doenças eram consequentes a ataques ou possessões de deuses ou demônios. A primeira descrição formal da Epilepsia como doença foi feita por Hipócrates (séc. V-VI), o “Pai da Medicina”. Hipócrates determinou que sua origem não era sagrada, e sim cerebral. (4)

A epilepsia é a condição neurológica grave de maior prevalência do mundo em todas as idades, acometendo cerca de 1% da população. Estima-se que 50 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras de Epilepsia. (5)

Anualmente milhares de pessoas no mundo são limitadas ou impedidas de exercerem suas profissões, seus estudos e seus projetos em consequência de crises epiléticas que ocorrem em suas vidas. (5)

A despeito de existir tratamento eficaz para a epilepsia, somente 10% a 40% dos pacientes recebem tratamento medicamentoso e a oferta de tratamento cirúrgico ainda está muito aquém da ideal. A ausência de tratamento está associada à maior morbimortalidade. (6)

Estima-se que a mortalidade global dos indivíduos acometidos por epilepsia seja duas ou três vezes superior à da população geral. O óbito em indivíduos acometidos por epilepsia pode ser decorrente de inúmeras causas, relacionadas ou não à doença epilética. Nos pacientes com diagnóstico recente de epilepsia, a doença subjacente (ex. tumor cerebral) é a principal causa de morte. Nas epilepsias

crônicas as principais causas são as relacionadas à própria epilepsia e em muito menor grau ao tratamento da mesma (ex. toxicidade medicamentosa). As causas relacionadas à própria epilepsia são as que podem levar à morte durante uma crise epiléptica, entre as quais se destacam-se: a morte súbita e inexplicável, o estado epiléptico, a pneumonia aspirativa, o trauma e o afogamento acidental.(7)

A incidência e prevalência de epilepsia é maior nos países em desenvolvimento, quando comparadas aos países desenvolvidos. Fatores como doenças endêmicas, infraestrutura do sistema de saúde e acessibilidade aos cuidados médicos influenciam decisivamente nos indicadores epidemiológicos. Neste sentido, considera-se que a prevalência em países com baixa e média renda seja o dobro dos países com alta renda. Nos países em desenvolvimento a prevalência da doença aumenta linearmente conforme a idade, ao passo que nos países desenvolvidos prevalecem as maiores taxas de incidência na adolescência e nos adultos jovens, sendo mundialmente mais prevalente na infância. (5)

No Brasil os dados epidemiológicos da epilepsia são escassos. Entre o período de 1980 a 2003, foram registrados 32.655 óbitos decorrentes de epilepsia.(8) Em média, ocorreram 1.360,6 mortes por ano, com taxas elevadas de 1.236 (no ano de 1990) e 1.586 (no ano de 2003).(8) No estado de São Paulo estima-se uma prevalência de 11.9 por 1000 habitantes.(9). Na América Latina estima-se uma prevalência média de 17.8 por 1000 pessoas e uma incidência de 77.7 a 190 por 100.000 pessoas por ano. (10)

A epilepsia foi definida conceitualmente em 2005 como uma desordem cerebral caracterizada pela predisposição ao surgimento de crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição. (11)

Uma pessoa é considerada como portadora de epilepsia quando apresenta ao menos uma das seguintes condições: (4)

1. Pelo menos duas crises epiléticas espontâneas (i.e., não provocadas) ocorrendo com mais de 24 horas de intervalo.
2. Uma crise não provocada e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência após duas crises espontâneas (cerca de 75% ou mais).
3. Pelo menos duas crises num contexto de epilepsia reflexa.

Por outro lado, considera-se que a epilepsia já não está presente em pessoas que:

1. Tiveram um síndrome epiléptico dependente de idade, tendo ultrapassado a idade em que as crises ocorrem habitualmente nesse síndrome;
2. Permaneceram sem crises por pelo menos 10 anos, sem medicação antiepiléptica, desde que não existam fatores de risco conhecidos associados com uma probabilidade elevada ($\geq 75\%$) de crises futuras. (4)

As crises epiléticas se caracterizam por períodos de excitação neuronal anormal, quando ocorre um desequilíbrio entre a excitação e a inibição, podendo durar de segundos a minutos, com manifestações clínicas variadas, nem sempre acompanhadas de contrações musculares. (12)

Aproximadamente 20 a 30% dos casos novos de epilepsia se tornam refratários ao tratamento medicamentoso ao longo do tempo e a maioria destes casos (cerca de 65%) estão relacionados à epilepsia do lobo temporal mesial associado a esclerose hipocampal (**ELTM-EH**). (13) A epilepsia relacionada a **ELTM-EH** é a forma mais comum e bem definida de epilepsia focal sintomática. Trata-se do tipo de epilepsia mais estudada devido à sua alta prevalência e à relativa refratariedade ao tratamento medicamentoso (14)

Usualmente a epilepsia do lobo temporal mesial tem origem na amígdala e no hipocampo. Clinicamente se caracteriza por crises parciais complexas com semiologia típica, geralmente precedidas de auras epigástricas e ou olfatórias, seguidas de automatismos e perda de consciência. Raramente esta associada a episódios de generalização secundária. (15)

O diagnóstico preciso da **ELTM-EH**, contudo, é sempre um grande desafio na prática clínica. Ele deve ser sempre baseado na história clínica, achados eletrofisiológicos, exames de imagem e vídeo eletroencefalograma. (16)

Entretanto os achados no Eletroencefalograma (EEG) muitas vezes são inespecíficos ou inexistentes. (17) O estudo interictal pode revelar lentificação intermitente nas faixas teta e delta sobre as regiões temporais mesiobasais. A atividade do tipo ponta e onda aguda, seguida ou não de onda lenta, se ocorrer, é registrada com eletronegatividade máxima nos eletrodos T3-F7/T4-F8 e, particularmente, nos eletrodos esfenoidais. O EEG normal no período interictal, todavia, não exclui o diagnóstico. (18) Durante a crise, um padrão típico é a

atividade rítmica na faixa teta, com frequência decrescente e amplitude crescente, máxima sobre os eletrodos zigomáticos ou esfenoidais (18)

A Ressonância Magnética de alta resolução com aquisição de sequências coronais é o exame de imagem de eleição no diagnóstico da ELTM-EH. Os sinais mais comumente associados à ELTM-EH são: redução do volume hipocampo; hipersinal T2 e FLAIR com borramento da arquitetura hipocampal; atrofia do lobo temporal; dilatação do corno temporal; borramento da interface entre substância branca e cinzenta; e redução local da concentração de N-acetil-aspartato na espectroscopia. Entretanto mesmo nos protocolos mais específicos o exame pode ser negativo em 20-30% dos casos. (19)

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) também pode ser útil no diagnóstico de EMT, sobretudo nos casos com RNM negativa. O PET pode evidenciar diminuição metabólica do hipocampo afetado. (19)

Todavia, nenhum critério isoladamente é suficiente para o diagnóstico da ELTM-EH. O diagnóstico deve sempre ser feito através da combinação dos mesmos sendo o padrão semiológico das crises o único critério considerado obrigatório. (18)

A etiopatogênese da epilepsia do lobo temporal ainda não está totalmente compreendida e certamente é multifatorial. Usualmente as crises costumam se iniciar na infância, geralmente antes dos cinco anos de idade, precipitadas por quadro febril ou outro tipo de injúria precipitante inicial (IPI) como traumatismo cranioencefálico, hipóxia, meningoencefalites. Após este início, as crises remitem ou são facilmente controladas por drogas antiepilépticas e voltam a ocorrer em torno da primeira ou segunda década de vida, para então tornarem-se frequentes e refratárias ao tratamento medicamentoso. (18)

Entretanto fatores genéticos e constitucionais também podem estar relacionados a patogênese. Estudos recentes sugerem que a ELTM-EH, com antecedente de convulsão febril, está associada à uma variação do gene SCN1A, no cromossomo 2q24.3, que codifica uma subunidade do canal de sódio dos neurônios cerebrais. Esta associação não foi encontrada na ELTM-EH sem histórico de convulsão febril. (20). Ademais, é bem documentada a ocorrência de formas familiares de epilepsia do lobo temporal mesial que cursam com esclerose hipocampal, cuja evolução se assemelha com a da ELTM-EH esporádica. (21)

A intervenção farmacológica habitualmente é eficaz na fase inicial da Epilepsia do Lobo Temporal Mesial associada a Esclerose Hipocampal (ELTM-EH). Contudo, a maioria dos pacientes evolui com fármaco resistência ainda na adolescência ou início da vida adulta. A fármaco resistência em epilepsia se define através do insucesso terapêutico com duas drogas antiepilépticas, apropriadamente escolhidas e toleradas, em monoterapia ou combinadas, para obtenção do controle sustentado das crises. (22) Em contrapartida, o tratamento inadequado da epilepsia está associado à deterioração cognitiva, disfunção psicossocial e aumento da morbimortalidade. Assim, uma vez identificada a fármaco resistência o tratamento cirúrgico deve ser oferecido o mais precoce possível. (23-25)

Nesse interim, o tratamento cirúrgico na ELTM-EH é superior ao tratamento medicamentoso isoladamente em relação ao controle das crises, qualidade de vida, taxas de empregabilidade, desempenho cognitivo e risco de morte súbita com nível I de evidência. (6, 25) Quando associado à terapia medicamentosa ele pode obter a longo prazo o controle total de crises em 62-83% dos pacientes. (26)

Diversas técnicas cirúrgicas são empregadas na ELTM-EH. As principais formas são lobectomia temporal anterior associada à amigdaló-hipocampectomia e às amigdaló hipocampectomias seletivas transsilviana, transcortical ou subtemporal. (27) Todavia, a melhor técnica quanto ao controle de crises, alterações neuropsicológicas e taxas de complicação, sobretudo nos pacientes portadores de *dual pathology*, ainda permanece controverso na literatura (28-30). Logo a escolha da abordagem não depende única e exclusivamente da localização do foco epileptogênico, mas também da experiência de cada centro e do cirurgião. (31)

Recentemente, novas técnicas minimamente invasivas tem surgido como alternativas ao tratamento ELTM-H como a Radiocirurgia por *Gamma Knife*, Termo Ablação a Laser por Esteriotaxia e o implante de dispositivos como Estimuladores Cerebrais Profundos (DBS), Estimulador Vagal (VNS) e RNS. Entretanto, os resultados desses procedimentos estão muito aquém do tratamento cirúrgico convencional. (24)

A avaliação do resultado cirúrgico é feita habitualmente com a escala de Engel (Tabela 1). Considera-se resultado cirúrgico favorável a evolução nas classes Engel I e II, enquanto que resultado cirúrgico desfavorável, as classes Engel III e IV.

Infelizmente, cerca de 10% dos casos operados seguem com pouca ou nenhuma melhora quanto ao controle de crises.(32-34) Apesar da variedade de fatores que supostamente influenciam negativamente o resultado cirúrgico, não é

possível delinear o prognóstico em pacientes de forma individualizada (35). Nesse sentido, diversas pesquisas buscam novos paradigmas que permitam delinear tal prognóstico. Dentre eles destacam-se os estudos envolvendo biologia molecular.

Tabela 1 - Escala de Engel.

Classe I - Livre de crises incapacitantes	
A	Completamente livre de crises desde a cirurgia
B	Somente crises parciais simples não incapacitantes desde a cirurgia
C	Algumas crises incapacitantes após a cirurgia, mas livre de crises incapacitantes por pelo menos dois anos
D	Crises generalizadas somente com a descontinuidade da DAE
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 por pelo menos dois anos
D	Somente crises noturnas
Classe III - Melhora evidente	
A	Redução evidente das crises
B	Intervalos prolongados livre de crises somando mais de 50% do período de seguimento, mas não inferior a dois anos
Classe IV - Sem melhora evidente	
A	Redução significativa das crises
B	Nenhuma alteração apreciável
C	Piora das crises

Fonte: Engel et al. (1993).

A ELTM-EH está associada à diversos mecanismos patológicos incluindo morte neuronal, processo inflamatório crônico, reorganização sináptica e alteração do metabolismo neuronal. Alterações nas propriedades dos neurônios e das células da micróglia estão intimamente associadas à hiperexcitabilidade neuronal e consequentemente a patogênese da epilepsia. Mutações em determinados genes incluindo o KCC2 e o HCCN1, podem alterar a atividade neuronal, assim como podem desregular o processo de expressão gênica. Nesse ínterim, qualquer fator de injúria cerebral como infecção, traumatismo crânio encefálico, acidente vascular cerebral, convulsões entre outros, estão fortemente associados ao descontrole global da expressão gênica, tanto no âmbito transcricional, quanto no âmbito pós transcricional. (18, 23, 34)

No âmbito pós transcricional estudos recentes demonstram um importante papel dos micro RNAs (miRNAs). Tratam-se de pequenas moléculas de RNAs não codificadores, compostas por aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam como potentes reguladores da expressão gênica. Atuam predominantemente através da ligação a região UTR (3' untranslated region) de um RNA mensageiro específico, o que resulta na degradação do RNA mensageiro ou na inibição do processo de tradução do mesmo, acarretando em uma diminuição dos níveis de proteínas alvo. Raramente os miRNAs podem estar associados a elevação dos níveis de proteínas alvo. (36-39).

A biogênese do miRNA (Figura 1) inicia-se com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) contendo 60 a 70 nucleotídeos. O pri-miRNA apresenta uma estrutura hairpin em seu arcabouço, que é clivada, ainda no núcleo, pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), gerando uma molécula precursora do MicroRNA maduro, denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado rapidamente ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), que é uma proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como co-fator. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (RNA induced silence complex), que inclui as proteínas argonautas como principais componentes. Depois, uma das fitas de duplex de miRNA é degradada e a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvo. (40)

Um único miRNA, por sua vez, pode atuar em diversos alvos celulares e consequentemente interferir em diversas vias e processos celulares. (36) Acredita-se que a expressão anormal dos microRNAs estão relacionados as vias de inflamação, morte celular, reorganização sináptica e excitabilidade neuronal, estando fortemente associados a epileptogênese. (37, 38)

A presença dos miRNAs no tecido cerebral é bem marcante e bem documentada na literatura. Mais da metade dos miRNAs conhecidos apresentam expressão no tecido cerebral. Ademais muitos deles como por exemplo miRNA 124 é altamente abundante no tecido cerebral e escasso nos demais tecidos. (41)

De forma específica os miRNAs são encontrados marcadamente nas células neuronais (excitatórias e inibitórias), nos astrócitos, nas células da micróglia e nos oligodendrócitos. Nesse contexto os miRNAs desempenham um importante papel na manutenção da homeostase dessas células e consequentemente de todo cérebro. Dessa forma, qualquer falha no processo de biogênese dos miRNAs pode acarretar em severas mudanças na estrutura e função do tecido cerebral. Perdas individuais de miRNAs por sua vez podem acarretar profundas mudanças fenotípicas no sistema nervoso central. (41)

A ELTM-EH está associada a alterações, em larga escala, do perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) no hipocampo. Mais de 20 miRNAs foram

identificados em hipocampos tanto em modelos animais, quanto de espécimes ressecados de pacientes portadores de epilepsia intratável.(42)

O primeiro relato sobre miRNA associado a epilepsia foi publicado em 2010 e reportou altos níveis de expressão de miR-146a em astrócitos de ratos epiléticos e em amostras de pacientes portadores de ELTM-EH submetidos à amigdalotomia hipocampectomia.(16) Astrócitos com hiperexpressão do miR-146a foram correlacionados com áreas de esclerose hipocampal e com fenótipo de astrogliose. Acredita-se que o miR-146a seja a molécula chave na via da Interleucina 1 (IL-1), que por sua vez está intimamente associada à atividades neuroinflamatórias e com atividades neuronais excitatórias. (43) Essas alterações também foram encontradas em crianças portadoras de ELTM-EH. (44)

Os miRNAs também estão intimamente relacionados aos processos de morte celular e degeneração neuronal e muitos deles encontram-se desregulados após eventos epiléticos. Entre eles destacam-se os miRNAs -132, -34a, -184, e -124. Estudos funcionais demonstram que a manipulação desses miRNAs podem levar ao aumento ou diminuição da perda neuronal após estado de mal epilético.(45) Em modelos animais estudos evidenciam que a inibição miR-134 resulta em importante supressão das crises espontâneas e a deleção do miR-128 desenvolve uma epilepsia fatal em ratos. (46)

Esta claro também que os miRNAs contribuem na ativação de células tronco neuronais e interferem nos processos de migração e integração dessas células. Os dois miRNAs mais estudados nesse processo são miR-9 e o miR-124 (**figura 2**). (47)

Figura 2: miRNA e seus alvos na epileptogênese (G.P. Brennan, D.C. Henshall/ Neuroscience Letters 2017)

Recentemente novas técnicas de biologia molecular permitem a manipulação de miRNAs incluindo a injeção de agentes antagonistas (oligonucleotídeos anti códigos miRNAs alvo específicos, chamados antagomirs) e agentes agonistas (agomirs) que aumentam ou diminuem respectivamente os níveis de determinados miRNAs no tecido cerebral em modelos animais de epilepsia.(48) Essas novas técnicas permitem a realização de estudos funcionais através de terapias alvo específicas. Atualmente cerca de 14 miRNAs que aparentemente influenciam nas crises convulsivas e na evolução da patologia hipocampal são objetos de estudos funcionais. Seus alvos incluem fatores de transcrição, componentes de sinalização de neurotransmissores e moduladores da resposta inflamatória (tabelas 2 e 3). (47, 48)

	Antagomir reduced status epilepticus or protected the hippocampus	Agomir reduced status epilepticus or protected the hippocampus	Antagomir reduced spontaneous recurrent seizures	Agomir reduced spontaneous recurrent seizures	Pathways targeted by the miRNAs
Upregulated expression	miR-34, ³² miR-132, ³⁰ miR-134, ^{23,25} miR-181a, ²⁶ miR-199a, ²⁷ miR-210 ²⁸	..	miR-134, ²³ miR-203 ²⁹	miR-22 ³⁰	Apoptosis, ²² neuronal microstructure, ^{33,35} transcriptional regulation, ²⁷ inhibitory neurotransmission, ^{28,29} excitatory neurotransmission ³¹
Downregulated expression	..	miR-128, ³³ miR-219, ³¹ miR-23b, ³² miR-124 ³³	..	..	Transcriptional regulation ³⁴
Targeting of miR-184 increased seizure damage ³⁴ whereas effects of antagomirs against miR-155 were only reported in rodent behaviour. ³⁵ miRNA=microRNA.					
Table: Reported beneficial effects of miRNA manipulation in animal models of epilepsy					

Tabela 2. Fonte Henshall DC, *et al* Lancet Neurol. 2016;15(13):1368-76.

miRNA	Expression	Effects/targets
miR-128	Downregulated	Governs neuronal excitability
miR-134	Upregulated	Regulates neuronal migration via Phf6
miR-124	Downregulated in whole hippocampus	Reduces spine density and alters epileptogenesis
	Upregulated in dentate gyrus	Regulates pro-epileptogenic NRSF and modulates inflammatory responses.
		Functions co-ordinately with miR-137 to regulate early neurogenic response following seizures through regulation of BCL2L13
miR-146a	Upregulated	Regulates astrocytic inflammatory response
miR-137	Upregulated	Regulates early neurogenic response with miR-124
miR-139-5p	Upregulated	Regulates NR2A
miR-23b-3p	Downregulated	Neuroprotective in the mouse KA model
miR-203	Upregulated	Regulates GLRB, inhibition reduced spontaneous seizures in pilocarpine model
miR-199a-5p	Upregulated	Regulates SIRT1-p53 axis and protects against seizures in rat pilocarpine model
miR-22	Upregulated in contralateral hippocampus in intra-amygdala KA model	Regulates P2×7 receptor expression, inhibition of miR-22 increased seizures
miR-132	Upregulated	Regulates CREB following SE
		Inhibition is neuroprotective in intra-amygdala KA model
miR-324-5p	Increased association with RISC following SE	Regulates Kv4.2 and contributes to seizure onset
miR-34a	Upregulated	Activated by status epilepticus, role unknown
miR-184	Upregulated in an epilepsy preconditioning	Modulator of seizure-induced neuronal death

Tabela 3: Sumário de Estudos Funcionais interrogando miRNAs em modelos de epilepsia (G.P. Brennan, D.C. Henshall / Neuroscience Letters 2017)

A constatação recente de miRNAs extracelulares estáveis no sangue periférico e líquido céfalo raquidiano (LCR) despertou a atenção para sua utilização como biomarcadores de injúria cerebral. Desde então, trabalhos têm revelado assinaturas moleculares por miRNAs circulantes, potencialmente aplicáveis na propedêutica complementar, cujo alcance vai do diagnóstico à resposta terapêutica. Esse pool de moléculas no sangue e no LCR têm origem a partir da liberação controlada de exossomos ou através da lesão e ou ruptura da barreira hematoencefálica. Esses miRNAs permanecem por um tempo na circulação associados à proteínas carreadoras ou encapsulados em vesículas extracelulares.(49) Em pacientes epiléticos pode-se notar níveis séricos elevados de miR-146a.(50) Existe também diferença nos níveis séricos de miRNAs entre pacientes com crises controladas versus crises refratárias, o que avança a possibilidade de sua utilização como preditor de fármaco-resistência. (51)

Alguns estudos demonstram desregulação da expressão de miRNAs em pacientes epiléticos após um evento ictal. (42, 52, 53) Durante uma crise epilética ocorre a liberação de diversos miRNAs na circulação, tanto por mecanismos ativos quanto passivos. Esses miRNAs podem ser liberados na circulação tanto por células cérebro específicas (neurônios, células da glia ou células da cerebrovasculatura), quanto por outras células sistêmicas decorrentes do processo da convulsão. (54) Dessa forma, diversos fatores podem influenciar os níveis de expressão sanguínea de miRNAs no sangue tais como fenômenos motores, uso de drogas anti epiléticas, síndromes epiléticas específicos, entre outros, o que dificulta a identificação de um biomarcador patologia específico.(55) Logo, devido ao grande número de desenhos experimentais empregados, os dados na literatura ainda são bastante conflitantes, e existem poucos estudos que correlacionam miRNA e a ELTM-EH (42, 55).

Levando em consideração todos esses fatores, um estudo recente avaliou o perfil de miRNAs circulantes em pacientes portadores de ELTM_EH. Esse estudo usou duas diferentes plataformas de triagem genômica e utilizou amostras de dois países diferentes.(55)

Na primeira etapa do estudo foram coletadas amostras de 32 pacientes portadores de epilepsia refratária, com fármaco resistência comprovada, admitidos em duas unidades de vídeo monitorização de 2 países diferentes. Amostras precoces de plasma sanguíneo foram coletadas no momento da admissão e

amostras tardias foram colhidas 24 horas após a primeira crise. Essas amostras foram analisadas através de duas plataformas genômicas distintas: um array aberto e à um sequenciamento de RNA. 32 voluntários saudáveis foram usados como pacientes controle.

A partir dos resultados da primeira etapa 15 miRNAs foram selecionados (5 a partir do método do array e 10 a partir do sequenciamento). O miRNA 122-5p foi excluído devido a sua conhecida e clara relação com tecido hepático. Dessa maneira os 14 miRNAs que obtiveram a maior performance na primeira etapa foram validados através da técnica de **RQ-PCR**. Análises de **ROC** (Receiver Operating Characteristics) foram utilizadas para selecionar os miRNAs com melhor performance e a Área Sob a Curva calculada (**AUC**). O melhor marcador para distinguir amostras precoces dos controles foi **miR-654-3p** (AUC 0,87). Já os melhores marcadores para distinção entre amostras precoces e amostras tardias foram **miR-328-3p** (AUC 0.90) e o **miR-27a-3p** (AUC 0.88).

Em uma terceira etapa do estudo os 3 miRNAs com melhor performance foram revalidados através de **RQ-PCR** em uma grande coorte de pacientes contendo: 110 pacientes saudáveis (grupo controle), 102 pacientes portadores ELTM , 23 portadores de crises generalizadas, 10 portadores de epilepsia do lobo frontal, 6 em estado de mal epilético e 12 com crises de origem psicogênica. Nessa etapa foi confirmada a desregulação dos **miR-27a-3p** e **miR-328-3p** em pacientes portadores ELTM em relação ao grupo controle. Ademais os **miR-27a-3p** e **miR-654-3p** foram significativamente diferentes nos pacientes portadores de crises generalizadas em relação aos controles; nenhum deles entretanto apresentaram diferença estatística em pacientes portadores de crises psicogênicas quando comparados aos controles. Nos pacientes portadores de epilepsia do lobo frontal e nos portadores de mal epilético também não houve diferença na expressão com significância estatística (**figura 3**).

A análise de **ROC** da coorte completa também evidenciou que os níveis dos **miR-27a-3p**, **miR-328-3p** e o **miR-654-3p** foram capazes de discriminar pacientes portadores de ELTM-EH dos portadores de epilepsia generalizada. A análise combinada dos 3 miRNAs apresentou uma performance estatística superior que as análises individuais (**Figura 3**)

O mesmo estudo também avaliou o perfil de expressão dos **miR-27a-3p**, **miR-328-3p** e o **miR-654-3p** em roedores portadores de epilepsia do lobo temporal induzida por injeção de Ácido Caínico no interior da amígdala.⁽⁵⁵⁾ A interferência de drogas anticonvulsivas (Carbamazepina e Diazepam) na expressão desses miRNAs no plasma foi testada nesse modelo.

Os resultados desse modelo experimental demonstraram perfis semelhantes de expressão aos encontrados nos ensaios clínicos dos **miRNAs 27a-3p e 328-3p**. Nem o diazepam nem a carbamazepina tiveram um efeito significativo sobre níveis plasmáticos dos três miRNAs em ratos epiléticos.

O mesmo estudo também demonstrou através do método de hibridização in situ (FISH) que os **miR27a-3p**, **miR-328-3p** estão presentes em hipocampus de pacientes portadores da ELTM – EH (**figura 4**). (55)

Os níveis de expressão no sangue dos **miR27a-3p**, **miR654-3p** ligados à proteína **AGO2** e presentes nos **exossomos** foram avaliados. (55). As análises de **ROC** dos níveis de expressão nessas frações evidenciaram um alto poder discriminatório entre as amostras precoces e os controles. Esses níveis foram mais altos para as frações relacionadas aos exossomos com **AUC 0,83** para **miR27a-3p** e **AUC 0,85** para **miR-328p**. Análises de regressão logística binomial mostraram que a combinação dos 3 miRNAs resultou em uma **AUC 0,93** para as frações relacionadas aos exossomos. Para as frações ligadas à proteína **AGO2** as análises de regressão logística binomial demonstrou uma **AUC 0,82**. (Figura 5) (55)

Figura 5 Análise da correlação entre mecanismos de transporte no plasma e o diagnóstico

Curvas ROC mostrando dados da fração ligada aos exossomos de pacientes com ELT comparada aos controles. A análise combinada dos miRNAs resultaram em uma melhor performance diagnóstica

R. Raoof et al. / EBioMedicine 38 (2018) 127–141

Considerando os tópicos explorados, a presente pesquisa tem por objetivo de avaliar a expressão no sangue periférico dos **miR27a-3p**, **miR-328-3p** e **miR-654-3p** em uma coorte diferente da apresentada pela literatura, assim como avaliar se existe correlação entre os miRNAs estudados e o prognóstico pós-operatório dos pacientes submetidos a lobectomia temporal + amigdalotomia.

Nesse contexto, a identificação de microRNAs circulantes no sangue periférico como potenciais biomarcadores na resposta clínica pós-operatória de pacientes com ELTM_EH poderá colaborar com a melhor precisão diagnóstica e terapêutica de pacientes com epilepsia e, eventualmente, alterar o prognóstico dessa doença.

2 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que existam diferentes perfis de expressão de miRNAs no sangue que sejam capazes de prever tanto o diagnóstico como o resultado cirúrgico (favorável ou desfavorável) dos pacientes com ELTM-EH submetidos à amigdalotomia.

3 OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo analisar a expressão de microRNAs no sangue periférico como preditores do diagnóstico e do resultado cirúrgico em pacientes portadores de esclerose mesial temporal submetidos à amigdalohipocampectomia.

4 PACIENTES E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e no Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) da FMRP-USP.

O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Seu processo está registrado com o número 8728/08.

4.1 Pacientes

Foram selecionados 28 pacientes submetidos à Lobectomia Temporal Anterior + Amigdalotomia Hipocampectomia em consequência de ELTM-EH farmacorresistente, com no mínimo 18 meses de seguimento pós-operatório. Quatorze deles com resposta cirúrgica favorável e quatorze com resposta desfavorável.

O grupo com resposta cirúrgica favorável é caracterizado exclusivamente por pacientes com classe Engel IA (Tabela 3). Já o grupo com resposta desfavorável por pacientes com classes Engel III e IV (tabela 4). Os pacientes foram incluídos no estudo somente após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os pacientes incluídos no presente estudo apresentam extensa investigação clínica pré-operatória, confirmação histopatológica de esclerose hipocampal e amostras de sangue e hipocampo armazenadas em banco biológico.

A coleta de sangue ocorreu de forma padronizada no momento da admissão do paciente no centro cirúrgico e foram transportadas ao banco biológico em nitrogênio líquido a -196°C, e a seguir acondicionadas em freezer, a -80°C.

O diagnóstico de ELTM-EH, a caracterização da farmacorresistência e a definição histopatológica de esclerose hipocampal seguiram as diretrizes preconizadas pela ILAE (18, 22). A investigação clínica pré-operatória compreendeu exame neuropsicológico, avaliação social, eletroencefalograma (EEG), Vídeo EEG e Ressonância Magnética Encefálica de alta resolução 3 Tesla com protocolo específico para Epilepsia.

O procedimento neurocirúrgico foi realizado de forma padrão em todos os casos e através da mesma equipe cirúrgica. A técnica cirúrgica realizada consiste em uma craniotomia temporal, seguida da ressecção parcial dos giros temporais

médio e inferior, numa extensão de 4 cm a partir do polo temporal. A seguir, o sulco colateral é identificado como referência para o acesso ao corno temporal do ventrículo lateral. Após a abertura do epêndima Cabeça e Corpo do hipocampo, Fimbria, Plexo Coróide e o Ponto Coroideo Inferior são devidamente identificados. A seguir a Fimbria é seccionada da porção superior do Hipocampo e cabeça e corpo são retirados em bloco com aproximadamente 2,5 cm de extensão. Na sequência identifica-se a porção medial do núcleo amigdalóide lateral na parte inferior do revestimento endimário, sendo este dissecado e também retirado “em bloco”.

Estes fragmentos foram imediatamente transportados em nitrogênio líquido a – 196° C para o laboratório a fim de se realizarem análises posteriores.

Paciente	Sexo	Data Nascim.	Data Cirurgia	Classe Engel	Amostras	
					Sangue	Hipocampo
SRS	Fem.	10/02/1980	04/10/2007	IA	X	X
JVTA	Fem.	09/12/1982	20/12/2007	IA	X	X
EMS	Masc.	05/08/1972	10/01/2008	IA	X	X
JGS	Fem.	03/06/1979	07/02/2008	IA	X	X
ARR	Masc.	29/04/1968	21/02/2008	IA	X	X
LFM	Masc.	26/07/1967	26/06/2008	IA	X	X
EHGG	Fem.	29/08/1971	24/07/2008	IA	X	X
MAPS	Fem.	20/08/1969	07/08/2008	IA	X	X
AJBJ	Fem.	27/04/1983	06/11/2008	IA	X	X
ETV	Masc.	28/08/1965	16/04/2009	IA	X	X
MNM	Fem.	06/10/1969	22/10/2009	IA	X	X
GTC	Masc.	10/01/1984	19/11/2009	IA	X	X
NCS	Fem.	21/12/1984	17/01/2010	IA	X	X
LBB	Fem.	27/02/1973	18/01/2010	IA	X	X

Tabela 3: Grupo de pacientes selecionados com resposta clínica favorável

NMH	Fem.	28/06/1975	27/09/2007	III	X	X
CAGZ	Masc.	31/07/1953	29/10/2007	III	X	X
FAR	Fem.	27/11/1980	06/11/2007	III	X	X
SAS	Masc.	30/06/1966	22/11/2007	III	X	X
CS	Masc.	07/02/1968	17/01/2008	III	X	X
MROA	Fem.	13/03/1971	03/07/2008	IV	X	X
ZF	Fem.	23/07/1963	14/07/2008	III	X	X
MR	Masc.	20/04/1969	25/09/2008	III	X	X
SAWM	Fem.	13/04/1975	12/02/2009	III	X	X
SMS	Fem.	14/11/1975	26/02/2009	III	X	X
ICM	Fem.	19/11/1980	14/05/2009	III	X	X
LNSR	Fem.	18/10/1966	06/05/2010	IV	X	X
RGS	Fem.	17/01/1982	17/05/2010	III	X	X
VRV	Fem.	11/09/1968	01/07/2010	III	X	X

Tabela 4: Grupo de Pacientes selecionados com resposta clínica desfavorável

O grupo controle foi obtido a partir de dosagens séricas de voluntários saudáveis. Amostras sanguíneas de 11 indivíduos saudáveis integrantes do corpo discente da FMRP-USP foram coletadas. As amostras foram transportadas ao banco biológico em nitrogênio líquido a -196°C, e a seguir acondicionadas em freezer, a -80°C, respeitando as mesmas condições de transporte e armazenamento conferidas à amostras sanguíneas dos pacientes.

4.2 Métodos de Biologia Molecular e Processamento das Amostras

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 foi utilizada a técnica PCR em tempo real.

4.2.1 Extração do 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 ressuspendido em 250 mL de PBS (phosphate-buffered saline) e 750 mL de Trizol® (Invitrogen, EUA) e transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

A partir de então, as amostras de sangue foram processados da mesma maneira, e foi acrescentado 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 13.200 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico 100% e permanecendo a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000 µL 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, permanecendo em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir a amostra foi ressuspendida com

água tratada com DEPC com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a - 80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido das amostras foi utilizado 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, foi realizada uma diluição 1:4 em água DEPC.

4.2.3 RQ-PCR dos microRNAs

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 normalizados. 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 ΔCt de uma amostra do ΔCt do calibrador, neste caso utilizará a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta Ct$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

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 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl 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 Ct.

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi estabelecido um threshold de 0,1 para o endógeno e também para os miRNAs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5.

4.3 Análise estatística

Os dados das amostras de sangue foram tabulados e analisados estatisticamente. As amostras independentes foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro Wilks, com e sem transformação logarítmica e não projetaram populações normais. Na comparação entre os grupos o método da Análise de Variância (ANOVA), com teste post hoc de Bonferroni foram utilizados. Na análise de poder discriminativo entre os grupos foram utilizadas curvas Receiver Operating Characteristic (ROC). Foram considerados significantes os resultados com $p < 0,05$.

Utilizou-se, para este propósito, o programa estatístico O IBM® SPSS® Statistics Base V22.0.0.

5 RESULTADOS

5.1 Testes de Normalidade

Inicialmente testamos a hipótese das variáveis possuírem distribuição Normal através do teste de Shapiro-Wilks:

Testes de Normalidade

Grupo		Shapiro-Wilk		
		Estatística	n	p
mir27a 3-p	Controles	,899	11	,178
	Engel I	,755	14	,001
	Engel III+IV	,402	14	,000
mir328a-3p	Controles	,851	11	,044
	Engel I	,653	14	,000
	Engel III+IV	,484	14	,000
mir654a-3p	Controles	,867	11	,071
	Engel I	,760	14	,002
	Engel III+IV	,509	13	,000

Constatamos dessa forma que nenhum dos 3 miRNAs estudados possuem distribuição normal. Podemos verificar também a grande diferença entre médias e medianas, atestando a assimetria dos dados.

Aplicamos então uma transformação logarítmica (log10) nas variáveis e testamos novamente a normalidade:

Grupo		Shapiro-Wilk		
		Estatística	N	p.
mir27a-3p	Controles	,863	11	,063
	Engel I	,955	14	,640
	Engel III+IV	,949	14	,550
mir328a-3p	Controles	,945	11	,583
	Engel I	,953	14	,606
	Engel III+IV	,873	14	,085
mir654a-3p	Controles	,924	11	,357
	Engel I	,898	14	,107
	Engel III+IV	,935	13	,391

Temos que todas as variáveis em todos os grupos não rejeitam a hipótese de normalidade, portanto utilizamos o método da Análise de Variância (**ANOVA**), com teste *post hoc* de **Bonferroni** na comparação dos grupos.

5.2 Análises ANOVA com post hoc Bonferroni

- **Log(mir27a-3p):** $F(2;38) = 1,49$ **p = 0,24**

Não houve diferença significativa entre os grupos.

	N	Média	Desvio Padrão
mir27a-3p Controles	11	,000000	,4520627
Engel I	14	,434526	,6376053
Engel III+IV	14	,227536	,7191450
Total	39	,237663	,6328125

Agrupando os grupos Engel I + Engel III e IV temos:

- **Log(mir27a-3p):** $F(1;37) = 2,23$ **p = 0,14**

Não houve diferença significativa entre os grupos.

	N	Média	Desvio Padrão
mir27a-3p Controles	11	,000000	,4520627
Engel I + III+IV	28	,331031	,6751720
Total	39	,237663	,6328125

- Log(mir328a-3p): $F(2;38) = 14,66$ $p < 0,001^{**}$

Há diferença significativa entre os grupos, pelo teste *post hoc* de **Bonferroni** temos que o grupo controle possui média significativamente inferior aos grupos 1 e 2 com $p < 0,001$ para ambos.

	N	Média	Desvio Padrão
mir328a-3p Controles	11	,000000	,5917317
Engel I	14	1,353845	,7866850
Engel III+IV	14	1,111310	,5327929
Total	39	,884928	,8529675

Agrupando os grupos Engel I + Engel III e IV temos:

- Log(mir328): $F(1;37) = 28,37$ $p < 0,001^*$ Houve diferença significativa entre os grupos, o grupo controle possui média significativamente inferior aos grupos Engel I + Engel III e IV.

	N	Média	Desvio Padrão
mir328a-3p Controles	11	,000000	,5917317
Engel I, III e IV	28	1,232578	,6707487
Total	39	,884928	,8529675

- **Log(mir654a-3p):** $F(2;37) = 4,34$ **p = 0,02***

Houve diferença significativa entre os grupos. Pelo teste *post hoc* de Bonferroni temos que o grupo controle possui média significativamente inferior ao Engel I com $p = 0,03$, porém não houve diferença entre os grupos controle e Engel III +IV.

	N	Média	Desvio Padrão
mir654a-3p Controles	11	,000000	,5071754
Engel I	14	,611508	,6276633
Engel III+IV	14	,101835	,5466784
Total	39	,260130	,6168505

Agrupando os grupos Engel I + Engel III e IV temos:

- **Log(mir654a-3p):** $F(1;36) = 2,89$ $p = 0,09$

Não houve diferença significativa entre os grupos.

	N	Média	Desvio Padrão
mir654a-3p Controles	11	,000000	,5071754
Engel I+III+IV	28	,366110	,6342409
Total	39	,260130	,6168505

5.3 Análises de curvas ROC

Curva ROC miRNA 27a-3p(Controle x Engel I)

AUC = 72,1% p = 0,06 I.C. 95% (51,2% – 92,9%)

Ponto ótimo = 0,4432 que fornece uma sensibilidade de 57,10% e uma especificidade de 100,00%

Portanto se adotássemos como ponto de corte 0,4432 e decidíssemos que quem for abaixo é normal e quem for acima deste valor é doente teremos as sensibilidades e especificidades acima.

Considerando que não houve diferença entre estes grupos na ANOVA e área sob a curva não foi significativa ($p > 0,05$) este resultado não deve ser visto como bom.

Curva ROC miRNA 328a-3p (Controle x Engel I)

AUC = 90,3% $p = 0,001^{**}$ I.C. 95% (78,5% – 100,0%)

Ponto ótimo = 0,8662 que fornece uma sensibilidade de 78,60% e uma especificidade de 100,00%

Portanto se adotássemos como ponte de corte 0,8662 e decidíssemos que quem for abaixo é normal e quem for acima deste valor é doente teremos as sensibilidades e especificidades acima.

Considerando que houve diferença entre estes grupos na ANOVA e área sob a curva foi significativa ($p < 0,05$) este resultado deve ser como muito bom.

Curva ROC miRNA 654a-3p (Controle x Engel I)

AUC = 74,7% p = 0,004 * I.C. 95% (54,9% – 94,5%)

Ponto ótimo = 0,5923 que fornece uma sensibilidade de 57,10% e uma especificidade de 100,00%

Portanto se adotássemos como ponte de corte 0,5923 e decidíssemos que quem for abaixo é normal e quem for acima deste valor é doente teremos as sensibilidades e especificidades acima.

Curva ROC miRNA 27a-3p(Controle x Engel III E IV)

Área sob a curva = 61,7% $p = 0,32$ I.C. 95% (39,2% – 84,2%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 328a-3p (Controle x Engel III E IV)

AUC= 96,8% $p < 0,001^{**}$ I.C. 95% (88,8% – 100,0%)

Ponto ótimo = 0,5649 que fornece uma sensibilidade de 100,0% e uma especificidade de 90,9%

Portanto se adotássemos como ponto de corte 0,5649 e decidíssemos que quem for abaixo é normal e quem for acima deste valor é doente teremos as sensibilidades e especificidades acima.

Considerando que houve diferença entre estes grupos na ANOVA e área sob a curva foi significativa ($p < 0,05$) este resultado deve ser visto como excelente.

Curva ROC miRNA 654a-3p (Controle x Engel III e IV)

AUC = 51,7% **p = 0,89** I.C. 95% (27,6% – 75,9%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 27a-3p(Controle x Engel I + III E IV)

AUC= 66,9% $p = 0,11$ I.C. 95% (50,1% – 83,7%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 328a-3p (Controle x Engel I + III E IV)

AUC = 93,5% $p < 0,001$ I.C. 95% (83,9% – 100,0%)

Ponto ótimo = 0,5649 que fornece uma sensibilidade de 89,30% e uma especificidade de 90,90%

Portanto se adotássemos como ponte de corte 0,5649 e decidíssemos que quem for abaixo é normal e quem for acima deste valor é doente teremos as sensibilidades e especificidades acima.

Curva ROC miRNA 654a-3p (Controle x Engel I + III e IV)

Área sob a curva = 63,6% $p = 0,19$ I.C. 95% (44,7% – 82,6%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 27a-3p (Engel I x III E IV)

Área sob a curva = 59,7% $p = 0,38$ I.C. 95% (37,9% – 81,4%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 328a-3p (Engel I x + III E IV)

AUC = 62,8% $p = 0,25$ I.C. 95% (40,7% – 84,9%)

Área sob a curva não significativa, poder discriminatório não relevante.

Curva ROC miRNA 654a-3p (Controle x Engel I + III e IV)

AUC = 73,6% p = 0,04* I.C. 95% (54,6% – 92,6%)

Ponto ótimo = 0,5440 que fornece uma sensibilidade de 57,10% e uma especificidade de 84,60%

Portanto se adotássemos como ponto de corte 0,5440 e decidíssemos que quem for acima é grupo 1 e quem for abaixo é grupo 2 teremos as sensibilidades e especificidades acima.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avalia um conjunto de miRNAs que representam potenciais biomarcadores no diagnóstico e no prognóstico da Epilepsia do Lobo Temporal associado à Esclerose Hipocampal.

Na prática clínica atual não existe ainda nenhum biomarcador capaz de prever com exatidão o diagnóstico da ELTM-EH.(56) Atualmente o diagnóstico depende de uma combinação de achados clínicos, semiológicos e de propedêutica complementar, que envolvem com frequência uma estrutura médico hospitalar complexa e de alto custo. Entretanto, mesmo com todos os recursos disponíveis o diagnóstico é sempre um grande desafio, especialmente na diferenciação entre outras formas de epilepsia e crises psicogênicas que não apresentam alteração nos exames de imagem, que podem corresponder até 30% dos casos. Nesse contexto muitos pacientes seguem negligenciados, sem diagnóstico preciso e consequentemente, sem tratamento adequado, o que está intimamente associado ao aumento da morbimortalidade. Ademais muitos pacientes com crises de origem psicogênicas seguem fazendo uso de drogas anti epilépticas de forma inadvertida. (18)

Infelizmente a grande maioria dos pacientes portadores da ELTM-EH evoluem com fármaco resistência ainda na adolescência ou no início da idade adulta. O descontrole de crises, entretanto, está associado à deterioração cognitiva, disfunção psicossocial e aumento da morbimortalidade. Nesse contexto o tratamento cirúrgico na ELTM-EH é superior ao tratamento medicamentoso isolado, com nível I de evidência científica (6, 25). O tratamento combinado pode obter o controle total de crises em até 83% dos casos. (26).

Nesse ínterim além do sub diagnóstico e da baixa oferta do tratamento cirúrgico, o insucesso do tratamento cirúrgico está associado entre outros fatores ao diagnóstico impreciso dessa patologia. Por outro lado poucas patologias na literatura possuem indicação de tratamento cirúrgico com nível tão alto de evidência, o que se compara ao uso de drogas anti hipertensivas para prevenção de fatores de risco cardiovasculares. Logo grandes esforços devem ser feitos para aumentar a precisão diagnóstica dessa patologia e a precisa indicação do tratamento cirúrgico.

Nesse contexto a identificação de um ou mais biomarcadores moleculares que possam ser detectados com segurança em um biofluido conveniente, como o

sangue, pode revolucionar o manejo da EMTM-EH (54). Os miRNAs figuram nas pesquisas atuais entre os principais candidatos para desempenharem esse papel. Estudos recentes relatam miRNAs como potenciais biomarcadores da epilepsia no soro, no plasma e no líquido cefalorraquidiano (54). O presente estudo representa uma importante contribuição no avanço dessas pesquisas e apoia o uso miRNAs como potenciais biomarcadores na corrente sanguínea, bem como oferece oportunidades para maiores progressos.

Mais da metade de todos os miRNAs conhecidos apresentam expressão no cérebro. A perda individual de um único miRNA pode levar a profundas alterações fenotípicas no encéfalo. A perda de miR-9, por exemplo, resulta em defeitos no desenvolvimento cerebral, enquanto a perda de miR-124 pode acarretar na degeneração do hipocampo. (41)

A despeito da grande expectativa e resultados obtidos até o momento, ainda existem muitas dúvidas e vieses na literatura a respeito dos miRNAs na epilepsia. Os poucos estudos disponíveis sobre o assunto divergem sobremaneira nos aspectos metodológicos. Não está claro ainda qual fração do sangue é mais fidedigna para avaliação dos miRNAs, assim como também não está claro a melhor metodologia de coleta e processamento das amostras. Alguns estudos também carecem de informações clínicas precisas e não exploraram fatores como a síndrome epilética envolvida, aspectos etiológicos, sexo, variáveis clínicas relacionadas à atividade ictal ou uso de drogas anti epiléticas. (35).

Outro ponto importante a ser levado em consideração se refere a divergência na metodologia estatística para análise dos dados. Em recente revisão da literatura o uso de curvas ROC para análise de biomarcadores em epilepsia foi revista.(57) Trata-se de um teste estatístico intuitivo e simples. A área sob a curva (AUC) representa a acurácia ou performance global do teste, pois leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade para cada valor da variável do teste. Quanto maior o poder do teste em discriminar os indivíduos doentes e não doentes, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo, no ponto que representa a sensibilidade e 1-especificidade do melhor valor de corte. Quanto melhor o teste, mais a área sob a curva ROC se aproxima de 1. Um teste com pequeno poder diagnóstico tem curvas mais retilíneas. Um teste que represente simplesmente o acaso (como jogar uma moeda para alto e obter resultados binários aleatórios) teria cerca de 50% de chance de positivo e 50% de chance de negativo,

independente do grupo em que esteja, tem área sob a curva bem próxima de 0,50. Dessa forma a análise de ROC apresenta um alto poder discriminativo entre dois grupos distintos e uma área sob a curva superior a 80%, evidencia um excelente biomarcador. (42)

Na literatura encontramos 9 estudos clínicos que avaliaram miRNAs no sangue como biomarcadores de epilepsia e que utilizaram em sua metodologia curvas discriminativas de ROC (**Tabela 5**). (50, 51, 55, 58-62)

Como podemos observar na tabela, os estudos clínicos para miRNAs e epilepsia ainda são escassos. Dos nove estudos listados, seis estudaram síndromes epiléticas específicas e três avaliaram pacientes epiléticos de forma indistinta. Em quatro deles foi utilizado soro para avaliação e em cinco foram utilizados plasma. Apenas um estudo avaliou a fração ligada aos exossomos. Houve validação em coortes maiores em cinco dos nove estudos. Em quatro deles o foco do estudo foi epilepsia do lobo temporal mesial.

Dessa maneira muito se discute na literatura que deve haver uma tentativa por parte dos pesquisadores de padronizar certas metodologias. Estudos envolvendo síndromes epiléticas específicas deve ser preconizado, assim como deve haver um grande esforço para que estudos multicêntricos sejam realizados e resultados preliminares sejam validados em coortes maiores. Modelos estatísticos padronizados como análises de curva ROC também devem ser preconizados. (41)

Tabela 5: Estudos Clínicos que avaliam a expressão dos miRNAs no sangue como biomarcadores de Epilepsia

miRNA	Biofluido	Tipo de Paciente	Numero de Pacientes	Cohort de Validação	Curva Roc	Outros achados	Referências
let-7d-5p miR-106b-5p miR-130a-3p miR-146a-5p miR-15a-3p miR-194-5p	Soro	Não selecionado	n=147	Sim	AUC = 0.79 AUC = 0.88 AUC = 0.78 AUC = 0.78 AUC = 0.84 AUC = 0.81	Não foi encontrado correlação entre as variáveis incluindo a frequência de crises	Wang, Yu et al. (2015)
miR-301a-3p miR-30b-5p miR-342-5p miR-4446-3p miR-194-5p	Soro	Não selecionado	n= 218	Sim	AUC = 0.89 AUC = 0.68 AUC = 0.72 AUC = 0.70 AUC = 0.74	miR301a-3p no soro correlacionado com a frequência de crises	Wang, Tan et al. (2015)
miR-106b miR-146a	Soro	Não selecionado	n=90	Não	AUC = 0.79	Correlação com a severidade das crises	An et al. (2016)
miR-129-2-3p	Plasma	Epilepsia do Lobo Temporal	n=25	Não	AUC=0,78		Sun et al. (2016)
miR-134-5p	Plasma	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial	n=65	Sim	AUC = 0.67	Níveis de expressão mostraram diferenças entre os pacientes responsivos a medicação e farmacoresistentes, porem não houve correlação com a frequência de crises	Avansini et al. (2017)
miR-323a-5p	Plasma	Displasia Cortical Focal	n=30	Não	AUC=0,74	Correlação com a duração da epilepsia e frequência de crises	Che et al. (2017)
miR-4521	Soro	Displasia Cortical Focal	n=30	Não	AUC=0,72		Wang et al. (2016)
miR-4521 miR-4668-5p miR-8071 miR-197-5p	Plasma (Exossomos)	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTm)	n=43	Sim	AUC= 0.84 AUC = 0.79 AUC = 0.80 AUC = 0.93		Yan et al. (2017)
miR-27a-3p miR-328-3p miR-654- 3p Analise Combinada	Plasma (Exossomos)	ELTm ELF EG EOP SE	n=156	Sim	AUC= 0.83 AUC = 0.85 P < 0,05 AUC = 0.93		Henshall DC (2018)

ELF, Epilepsia do Lobo Frontal; EG, Epilepsia Generalizada; EOP, Epilepsia Origem Psicogênica; SE, Status Epilepticus

Nesse contexto no presente estudo selecionamos três miRNAs estudados previamente por outros autores em portadores de Epilepsia do Lobo Temporal Mesial. Nesse estudo prévio, foram utilizados na fase de descoberta duas plataformas genômicas distintas, colhidas de pacientes com ELTM de 2 países diferentes. Os dados foram validados em uma grande coorte de pacientes, que continham outras formas de epilepsia e crises de origem psicogênica. Trata-se do maior e mais complexo estudo na literatura para avaliação de biomarcadores em epilepsia até o presente momento. (55)

Dessa maneira, no presente estudo os níveis de expressão dos **miR27a-3p**, **miR-328-3p** e **miR-654-3p** no soro foram avaliados. Foi selecionada uma coorte de 39 indivíduos, dos quais 11 eram indivíduos saudáveis (grupo controle) e 28 eram portadores ELTM que foram submetidos a lobectomia temporal + amigdalotomia. Foram selecionados apenas pacientes com confirmação histopatológica de esclerose do hipocampo. Todos os pacientes incluídos no estudo tiveram seguimento mínimo pós operatório de 18 meses. Dos 28 indivíduos selecionados, 14 pacientes obtiveram evolução clínica favorável ao tratamento cirúrgico (Engel I), e outros 14 pacientes obtiveram resposta desfavorável (Engel III e IV). A expressão dos microRNAs foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real e os dados estatísticos foram analisados através de Análises de Variância e Curvas ROC, conforme as evidências atuais da literatura.

Diferentemente do esperado, o **miRNA 27a-3p** não foi capaz de diferenciar pacientes portadores de ELTM-EH de voluntários saudáveis na coorte estudada. Também esse biomarcador não obteve poder discriminatório prognóstico entre os grupos com resposta pós operatória favorável e desfavorável. Esses achados vão de encontro aos descritos na literatura. Estudo prévio demonstra que seus níveis de expressão no plasma e nos exossomos são capazes de discriminar pacientes portadores de Epilepsia Temporal de controles saudáveis (AUC 0,63 e 0,83 respectivamente). (40) Logo, para esse miRNA especificamente, pode haver influência da fração do sangue estudada, visto que no presente estudo foram avaliadas amostras de soro, e no estudo anterior foram avaliadas amostras no plasma e exossomos. Dessa maneira novos estudos em coortes maiores devem ser realizados para o **miRNA 27a-3p** e amostras de soro e plasma devem ser confrontadas.

Ao contrário do panorama obtido para o **miRNA 27a-3p**, os níveis de expressão do **miRNA-328-3p** apresentaram um significativo poder discriminatório entre indivíduos saudáveis e indivíduos doentes. No grupo com resposta clínica favorável (Engel I), em relação ao grupo controle, obtivemos **AUC 90,3%** - $p = 0,001$ e I.C. 95% (78,5% – 100,0%) – o que fornece em seu ponto ótimo (0,8662) uma **sensibilidade** de **78,60%** para uma especificidade de **100,00%** ($p < 0,05$). No grupo com resposta clínica desfavorável (Engel III e IV), em relação aos controles, obtivemos a incrível **AUC** de **96,8%** - $p < 0,001$ I.C. 95% (88,8% – 100,0%) o que fornece em seu ponto ótimo (0,5649) uma **sensibilidade** de 100,0% e uma especificidade de **90,9%** ($p < 0,05$). Na comparação entre todos os indivíduos doentes (Engel I e III +IV) com indivíduos saudáveis a **AUC** foi **93,5%** - $p < 0,001$ I.C. 95% (83,9% – 100,0%)- o que gera em seu ponto ótimo (0,5649) uma **sensibilidade** de **89,30%** e uma **especificidade** de **90,90%** ($p < 0,05$). Entretanto a despeito do alto poder diagnóstico desse biomarcador, não encontramos poder discriminativo no prognóstico quando comparamos os grupos Engel I e Engel III e IV. Os dados encontrados reforçam os dados encontrados na literatura.

Outros autores demonstraram que análises plasmáticas do **miRNA328a-3p** foram capazes de diferenciar pacientes portadores de ELTM de indivíduos saudáveis (**AUC** = 0,63). Ao se avaliar amostras ligadas aos exossomos eles obtiveram uma **AUC** de 0,85. Outro dado interessante observado por esses autores foi que as frações relativas do **miRNA328a-3p** ligadas a AGO2 foram mais elevadas em pacientes pós crise, o que pode indicar que ele seja um potencial biomarcador de crises convulsivas. Em nossos achados também observamos que os níveis de expressão também foram maiores no grupo de pior prognóstico (Engel III e IV). Outro fato a ser considerado é a positividade neuronal **miRNA-328-3p** nas avaliações de hibridização in situ pelo método de **FISH**, o que reforça a hipótese de que durante o processo de convulsão, o processo de injúria tecidual pode levar à liberação de marcadores na circulação. (55)

Conforme demonstrado os resultados encontrados no presente estudo para o **miRNA-328-3p** foram superiores aos previamente descritos na literatura para discriminar indivíduos portadores de ELTM-EH de indivíduos saudáveis. Tais achados sugerem que avaliação desse biomarcador possa ter um maior poder diagnóstico no soro, em relação à sua avaliação no plasma. Ademais a análise

desse biomarcador no soro pode ter correlação com a gravidade das crises, com consequente elevação dos seus níveis na corrente sanguínea.

Nesse ínterim, os dados encontrados para o **miRNA-328-3p**, no presente estudo, obtiveram o maior poder discriminativo que qualquer outro biomarcador já descrito na literatura. (Tabela 5). (50, 51, 55, 58-62).

Esses dados, entretanto, devem ser confirmados em coortes maiores e caso haja confirmação, esse biomarcador pode ser responsável por uma verdadeira revolução no diagnóstico e consequentemente no tratamento da ELTM-EH.

O terceiro e último miRNA estudado foi **miR-654-3p**. Na comparação entre pacientes doentes Engel I com indivíduos saudáveis a **AUC** obtida foi de **74,7%** - **p = 0,004** I.C. 95% (54,9% – 94,5%)- o que gera em seu ponto ótimo (0,5923) uma **sensibilidade** de **57,10%** e uma **especificidade** de **100,00%** (**p < 0,05**). Ao se comparar indivíduos doentes com mau prognóstico cirúrgico (Engel III e IV) com indivíduos saudáveis, não encontramos poder discriminativo significativo. Entretanto na comparação entre os grupos de bom e mau prognóstico cirúrgico, obtivemos certo poder de discriminação com significância estatística: **AUC 73,6%** **p = 0,04** I.C. 95% (54,6% – 92,6%) o que gera em seu ponto ótimo (0,5440) **sensibilidade** de **57,10%** e uma **especificidade** de **84,60%** (**p < 0,05**). Dessa maneira o **miR-654-3p** pode representar um possível marcador do prognóstico cirúrgico da ELTM-EH. Dados prévios também demonstram que o **miR-654-3p** apresenta um baixo poder discriminatório entre pacientes saudáveis e pacientes portadores de ELTM. Entretanto esses dados mostram que esse biomarcador apresenta uma melhor performance na distinção entre portadores de crise generalizada e epilepsia temporal. (55)

Análises de bioinformática dos alvos dos três miRNAs identificados, demonstram correlação com vias ligadas à excitabilidade neuronal e epilepsia.(55) Houve também correlação com vias de sinalização de fatores de crescimento e apoptose, como por exemplo o p53.(55) Dados da literatura evidenciam que o p53 tem altos níveis de expressão em hipocampus com esclerose. (63) Em modelos animais a manipulação do p53 influencia tanto a suscetibilidade a convulsão, quanto ao desenvolvimento de eventos neuropatológicos.(64) Outras vias conhecidamente associadas à epilepsia não foram associados a esses três miRNAs, o que sugere que nem todos os processos fisiopatológicos associados à epilepsia no cérebro estão representados na circulação. (55)

Apesar dos achados no presente estudo serem bastante animadores e promissores, existem um grande numero de limitações na interpretação dos dados encontrados até o presente momento. Muitos fatores podem influenciar esses dados, desde fatores metodológicos, como características individuais da coorte em questão. O uso de medicação anti-convulsiva é um fator de confusão considerável e difícil de ser controlado em ensaios clínicos. Não podemos afirmar, contudo, que os miRNAs aqui estudados são patognomônicos da ELT-EH, pois outras formas de epilepsia não foram analisadas e comparadas. Antecedentes etiológicos como trauma ou convulsões febris por exemplo também não foram avaliados no presente estudo.

Dessa maneira novos estudos devem ser realizados e os dados aqui observados devem ser validados em coortes de pacientes maiores. Estudos contendo outras formas de epilepsia devem ser realizados para se comparar tanto o prognóstico quanto o diagnóstico de ELTM-EH.

7 CONCLUSÕES

1- Diferentemente do esperado, o **miRNA 27a-3p** não foi capaz de prever nem o diagnóstico e nem o prognóstico de pacientes portadores de ELTM-EH na coorte estudada.

2- Os níveis de expressão do **miRNA-328-3p** apresentaram um significativo poder discriminatório entre indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de ELTM-EH em todos os grupos estudados. Entretanto esse biomarcador não foi capaz de prever o prognóstico cirúrgico na coorte estudada. Esses achados contemplam o maior desempenho já descrito na literatura para um biomarcador no diagnóstico da ELTM-EH.

3- O **miR-654-3p** apresentou poder discriminatório para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes Engel I, porém não obteve poder discriminatório entre indivíduos saudáveis e pacientes Engel III e IV. Todavia ele foi o único biomarcador com poder estatístico para diferenciar os grupos de bom e mau prognóstico cirúrgico. Dessa maneira o **miR-654-3p** pode representar um possível marcador do prognóstico cirúrgico da ELTM-EH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav.* 2010;17(1):103-8.
2. Fatović-Ferencić S, Dürrigl MA. The sacred disease and its patron saint. *Epilepsy Behav.* 2001;2(4):370-3.
3. Shorvon S. The evolution of epilepsy theory and practice at the National Hospital for the Relief and Cure of Epilepsy, Queen Square between 1860 and 1910. *Epilepsy Behav.* 2014;31:228-42.
4. Chaudhary UJ, Duncan JS, Lemieux L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: persistent beliefs. *Epilepsy Behav.* 2011;21(2):109-14.
5. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res.* 2009;85(1):31-45.
6. Engel J, McDermott MP, Wiebe S, Langfitt JT, Stern JM, Dewar S, et al. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA.* 2012;307(9):922-30.
7. Rufo-Campos M. [Mortality in epilepsies]. *Rev Neurol.* 2000;30 Suppl 1:S110-4.
8. Ferreira leL, Tabosa e Silva TP. [Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003]. *Cien Saude Colet.* 2009;14(1):89-94.
9. Marino Júnior R, Cukiert A, Pinho E. [Epidemiological aspects of epilepsy in São Paulo: a prevalence study]. *Arq Neuropsiquiatr.* 1986;44(3):243-54.
10. Escalaya AL, Tellez-Zenteno JF, Steven DA, Burneo JG. Epilepsy and mortality in Latin America. *Seizure.* 2015;25:99-103.
11. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470-2.

12. Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7(4):348-54.
13. Cascino GD. Surgical treatment for epilepsy. *Epilepsy Res.* 2004;60(2-3):179-86.
14. Engel J. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res.* 2006;70 Suppl 1:S5-10.
15. Vale FL, Effio E, Arredondo N, Bozorg A, Wong K, Martinez C, et al. Efficacy of temporal lobe surgery for epilepsy in patients with negative MRI for mesial temporal lobe sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2012;19(1):101-6.
16. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, Zurolo E, Vreijling J, van Vliet EA, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2010;31(6):1100-7.
17. Engel J, Pitkänen A, Loeb JA, Dudek FE, Bertram EH, Cole AJ, et al. Epilepsy biomarkers. *Epilepsia.* 2013;54 Suppl 4:61-9.
18. Wieser HG, Epilepsy ICoNo. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2004;45(6):695-714.
19. Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia.* 2012;53 Suppl 4:19-33.
20. Kasperaviciute D, Catarino CB, Matarin M, Leu C, Novy J, Tostevin A, et al. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain.* 2013;136(Pt 10):3140-50.
21. Gambardella A, Labate A, Giallonardo A, Aguglia U. Familial mesial temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia.* 2009;50 Suppl 5:55-7.
22. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 2010;51(6):1069-77.
23. Blümcke I, Coras R, Miyata H, Ozkara C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol.* 2012;22(3):402-11.

24. Chang EF, Englot DJ, Vadera S. Minimally invasive surgical approaches for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2015;47:24-33.
25. Wiebe S. Randomized controlled trials of epilepsy surgery. *Epilepsia.* 2003;44 Suppl 7:38-43.
26. Mathon B, Bédos Ulvin L, Adam C, Baulac M, Dupont S, Navarro V, et al. Surgical treatment for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2015;171(3):315-25.
27. Alonso Vanegas MA, Lew SM, Morino M, Sarmento SA. Microsurgical techniques in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2017;58 Suppl 1:10-8.
28. Chabardès S, Kahane P, Minotti L, Tassi L, Grand S, Hoffmann D, et al. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. *Brain.* 2005;128(Pt 8):1818-31.
29. Di Gennaro G, Casciato S, Quarato PP, Mascia A, D'Aniello A, Grammaldo LG, et al. Acute postoperative seizures and long-term seizure outcome after surgery for hippocampal sclerosis. *Seizure.* 2015;24:59-62.
30. Naves PV, Caboclo LO, Carrete H, Kelmann BV, Gaça LB, Sandim GB, et al. Temporopolar blurring in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and long-term prognosis after epilepsy surgery. *Epilepsy Res.* 2015;112:76-83.
31. Schmeiser B, Wagner K, Schulze-Bonhage A, Mader I, Wendling AS, Steinhoff BJ, et al. Surgical Treatment of Mesiotemporal Lobe Epilepsy: Which Approach is Favorable? *Neurosurgery.* 2017.
32. Jeong SW, Lee SK, Hong KS, Kim KK, Chung CK, Kim H. Prognostic factors for the surgery for mesial temporal lobe epilepsy: longitudinal analysis. *Epilepsia.* 2005;46(8):1273-9.
33. Savitr Sastri BV, Arivazhagan A, Sinha S, Mahadevan A, Bharath RD, Saini J, et al. Clinico-pathological factors influencing surgical outcome in drug resistant epilepsy secondary to mesial temporal sclerosis. *J Neurol Sci.* 2014;340(1-2):183-90.
34. Vale FL, Pollock G, Benbadis SR. Failed epilepsy surgery for mesial temporal lobe sclerosis: a review of the pathophysiology. *Neurosurg Focus.* 2012;32(3):E9.
35. Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2014;128(1):21-37.

36. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.
37. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006.
38. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-8.
39. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173(1):20-51.
40. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228-34.
41. Enright N, Simonato M, Henshall DC. Discovery and validation of blood microRNAs as molecular biomarkers of epilepsy: Ways to close current knowledge gaps. *Epilepsia Open.* 2018;3(4):427-36.
42. Korotkov A, Mills JD, Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Systematic review and meta-analysis of differentially expressed miRNAs in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Sci Rep.* 2017;7(1):11592.
43. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:172.
44. Omran A, Peng J, Zhang C, Xiang QL, Xue J, Gan N, et al. Interleukin-1 β and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2012;53(7):1215-24.
45. Brennan GP, Henshall DC. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. *Neurosci Lett.* 2018;667:47-52.
46. 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(6163):1254-8.
47. Brennan GP, Henshall DC. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. *Neurosci Lett.* 2017.

48. Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, Goldstein DB, Kjems J, Prehn JH, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *Lancet Neurol.* 2016;15(13):1368-76.
49. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(11):460-5.
50. Wang J, Yu JT, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:9522.
51. Wang J, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, Wang HF, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:10201.
52. Mooney C, Becker BA, Raoof R, Henshall DC. EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics.* 2016;32(9):1436-8.
53. Henshall DC. Epigenetic changes in status epilepticus. *Epilepsia.* 2018;59 Suppl 2:82-6.
54. Rao P, Benito E, Fischer A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Front Mol Neurosci.* 2013;6:39.
55. Raoof R, Bauer S, El Naggari H, Connolly NMC, Brennan GP, Brindley E, et al. Dual-center, dual-platform microRNA profiling identifies potential plasma biomarkers of adult temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine.* 2018;38:127-41.
56. Oto MM. The misdiagnosis of epilepsy: Appraising risks and managing uncertainty. *Seizure.* 2017;44:143-6.
57. Pitkänen A, Ekollé Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers - Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis.* 2019;123:42-58.
58. Wang X, Sun Y, Tan Z, Che N, Ji A, Luo X, et al. Serum MicroRNA-4521 is a Potential Biomarker for Focal Cortical Dysplasia with Refractory Epilepsy. *Neurochem Res.* 2016;41(4):905-12.
59. An N, Zhao W, Liu Y, Yang X, Chen P. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 2016;127:311-6.

60. Avansini SH, de Sousa Lima BP, Secolin R, Santos ML, Coan AC, Vieira AS, et al. MicroRNA hsa-miR-134 is a circulating biomarker for mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2017;12(4):e0173060.
61. Che N, Zu G, Zhou T, Wang X, Sun Y, Tan Z, et al. Aberrant Expression of miR-323a-5p in Patients with Refractory Epilepsy Caused by Focal Cortical Dysplasia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017;21(1):3-9.
62. Yan S, Zhang H, Xie W, Meng F, Zhang K, Jiang Y, et al. Altered microRNA profiles in plasma exosomes from mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Oncotarget*. 2017;8(3):4136-46.
63. Engel T, Murphy BM, Schindler CK, Henshall DC. Elevated p53 and lower MDM2 expression in hippocampus from patients with intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2007;77(2-3):151-6.
64. Engel T, Tanaka K, Jimenez-Mateos EM, Caballero-Caballero A, Prehn JH, Henshall DC. Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. *Cell Death Dis*. 2010;1:e79.