UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

SERGUEY MALAQUIAS DE ALMEIDA

**MicroRNAs circulantes como preditores do
resultado cirúrgico da epilepsia do lobo temporal
mesial com esclerose hipocampal**

RIBEIRÃO PRETO
2016

SERGUEY MALAQUIAS DE ALMEIDA

**MicroRNAs circulantes como preditores do
resultado cirúrgico da epilepsia do lobo temporal
mesial com esclerose hipocampal**

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

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto
Carlotti Junior**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

RIBEIRÃO PRETO

2016

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

Almeida, Serguey Malaquias de

MicroRNAs circulantes como preditores do resultado cirúrgico da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal / Serguey Malaquias de Almeida - Orientador: Carlos Gilberto Carlotti Junior. Ribeirão Preto, 2016.

89p.:20il.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal; 2. MicroRNAs; 3. Biomarcadores moleculares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Serguey Malaquias de Almeida

Título: MicroRNAs circulantes como preditores do resultado cirúrgico da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal

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 _____

Resumo

ALMEIDA, S. M. **MicroRNAs circulantes como preditores do resultado cirúrgico da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal**. 2016. 89f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2016.

Alta prevalência, farmacorresistência e bom prognóstico cirúrgico são algumas das características clínicas que tornam a epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal (ELTM-EH) uma das mais importantes formas de epilepsia. Ela é o modelo da epilepsia cirurgicamente curável. Infelizmente, cerca de 10% dos pacientes evoluem com resultado cirúrgico insatisfatório. A ELTM-EH está associada a alterações amplas do perfil de expressão dos microRNAs (miRNAs) do hipocampo. Recentemente, constatou-se 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. Tendo isso em vista, a pesquisa partiu do seguinte questionamento: é possível a identificação, no sangue periférico, de assinaturas moleculares por miRNAs que predigam o resultado do tratamento cirúrgico da ELTM-EH? Por meio de técnicas de biologia molecular, avaliaram-se amostras de sangue e hipocampo de pacientes submetidos à lobectomia temporal anterior em consequência de ELTM-EH farmacorresistente. As amostras eram representativas de indivíduos com resultado cirúrgico favorável (Engel IA) e desfavorável (Engel III e IV). Com a técnica de *microarray* obteve-se o perfil de expressão de miRNAs das amostras triadas e chegou-se a um conjunto de seis miRNAs candidatos a biomarcadores de prognóstico cirúrgico: miR-92b-3p; miR-1238-3p; miR-1181; miR-636; miR-1229-3p e miR-486-5p. Em seguida, com a técnica de PCR em tempo real, quantificou-se a expressão destes seis miRNAs e, a partir da otimização de um ponto de corte na escala de expressão, cada miRNA circulante foi apreciado como preditor de resultado cirúrgico. Assim, constatou-se hiperexpressão sanguínea dos seis miRNAs, sem distinção estatística entre os grupos Engel IA e Engel III-IV, hiperexpressão hipocampal do miR-486-5p no grupo Engel IA e hipoexpressão hipocampal do miR-636 nos grupos Engel IA e Engel III-IV. Na análise dos miRNAs circulantes como preditores de sucesso cirúrgico, o miR-1238-3p exibiu uma sensibilidade de 40,00%, especificidade de 92,86% e acurácia de 65,52%. O conjunto miR-1238/miR-1181 mostrou sensibilidade de 46,67%, especificidade de 85,71% e acurácia de 65,52%. O único miRNA circulante sondado como preditor de insucesso cirúrgico, o miR-636, revelou sensibilidade de 21,43%, especificidade de 93,33% e acurácia de 58,62%.

Palavras-chave: Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal. MicroRNAs. Biomarcadores moleculares.

Abstract

ALMEIDA, S. M. **Circulating microRNAs as surgical outcome predictors of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.** 2016. 89f. Thesis (Doctoral). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2016.

A high prevalence, drug resistance and good surgical prognosis are some of the clinical characteristics that cause mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTLE-HS) to be one of the most important forms of epilepsy. This condition is the model of surgically curable epilepsy, although unfortunately about 10% of the patients exhibit an unsatisfactory surgical outcome. MTLE-HS is associated with extensive changes in the expression profile of hippocampal microRNAs (miRNAs). It has been recently observed that stable miRNAs exist in peripheral blood and in other body fluids which have been proved to be applicable as biomarkers from diagnosis to therapeutic response. On this basis, the present investigation was based on the following question: is it possible to identify molecular signatures by peripheral blood miRNAs that predict the outcome of surgical treatment of MTLE-HS? Molecular biology techniques were used to evaluate blood and hippocampal samples of patients submitted to anterior temporal lobectomy as a consequence of drug-resistant MTLE-HS. The samples were representative of patients with a favorable (Engel IA) and unfavorable (Engel III and IV) surgical outcome. The microarray technique was used to obtain the expression profile of miRNAs in the samples, with a set of six miRNAs being reached as candidate biomarkers for surgical prognosis: miR-92b-3p, miR-1238-3p, miR-1181, miR-636, miR-1229-3p, and miR-486-5p. Next, real-time PCR was used to quantitate the expression of these six miRNAs and, based on the optimization of a cut-off point on the expression scale, each circulating miRNA was evaluated as surgical outcome predictor. We observed blood hyperexpression of the six miRNAs with no significant difference between the Engel IA and Engel III-IV groups, hippocampal hyperexpression of miR-486-5p in the Engel IA group, and hippocampal hypoexpression of miR-636 in the Engel IA and Engel III-IV groups. Analysis of circulating miRNAs as predictors of surgical success revealed that miR-1238-3p exhibited 40.00% sensitivity, 92.86% specificity and 65.52% accuracy. The miR-1238/miR-1181 set showed 46.67% sensitivity, 85.71% specificity and 65.52% accuracy. The only circulating miRNA evaluated as a predictor of surgical failure, miR-636, showed 21.43% sensitivity, 93.33% specificity, and 58.62% accuracy.

Keywords: Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, MicroRNAs, Molecular biomarkers.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Diagrama organizacional da epilepsia divulgado pela ILAE (BERG et al., 2010).....	23
Figura 2 -	Diagrama esquemático do experimento. ELTM-EH, epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal; Eg1, Engel I; Eg3-4, Engel III e IV; PrO, pré-operatório; PCR-TR, PCR em tempo real	48
Figura 3 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-92b-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	58
Figura 4 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-92b-3p; #, fold > 75.000; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão	58
Figura 5 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1238-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	59
Figura 6 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1238-3p; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.....	60
Figura 7 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1181; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	60
Figura 8 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1181; #, fold > 50.000; traço contínuo, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão	61
Figura 9 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-636; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	62
Figura 10 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-636; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.....	62
Figura 11 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1229-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	63

Figura 12 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1229-3p; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.....	64
Figura 13 -	Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-486-5p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	64
Figura 14 -	Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-486-5p; #, fold > 4.000.000; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão	65
Figura 15 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-92b-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	66
Figura 16 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1238-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	67
Figura 17 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1181; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	67
Figura 18 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-636; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	68
Figura 19 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1229-3p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	68
Figura 20 -	Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-486-5p; (A) Grupos Engel IA e Controle; (B) Grupos Engel III-IV e Controle.....	69

Lista de Tabela e Quadros

Tabela 1 -	Escala de Engel	36
Quadro 1 -	Relação de pacientes e amostras utilizadas no <i>microarray</i> ; Data Nascim., data de nascimento; Data Cirurgia, data da cirurgia; Fem., feminino; Masc., masculino	49
Quadro 2 -	Listagem de pacientes e amostras empregadas no PCR-TR; Data Nascim., data de nascimento; Data Cirurgia, data da cirurgia; Fem., feminino; Masc., masculino	50
Quadro 3 -	Conjunto de indivíduos autopsiados; idade em anos; Causa Mortis, causa da morte; Tempo Óbito, tempo decorrido entre o óbito e a retirada do hipocampo; hs., horas; Data Autópsia, data da autópsia.....	51
Quadro 4 -	MiRNAs coexpressos no sangue e hipocampo do grupo Engel IA.....	56
Quadro 5 -	MiRNAs coexpressos no sangue e hipocampo do grupo Engel III-IV.....	56
Quadro 6 -	Confrontação dos miRNAs coexpressos dos grupos Engel IA e Engel III-IV; destacados em amarelo os miRNAs selecionados para validação por PCR-TR.	57
Quadro 7 -	MiRNAs circulantes e respectivos indicadores de predição de sucesso ou insucesso cirúrgico; <i>Cut Off</i> , ponto de corte; Sensib., sensibilidade; Especific., especificidade.....	66

Lista de Abreviaturas

3'UTR	<i>Three prime untranslated region</i>
a.C.	antes de Cristo
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	DNA complementar
CEMEL	Centro de Medicina Legal
CIREP	Centro de Cirurgia de Epilepsia
CT	<i>Cycle threshold</i>
DAE	Droga antiepiléptica
DEPC	Dicarbonato de dietila
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EEG	Eletroencefalograma
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELTM-EH	Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal
EPI	Evento precipitante inicial
ERM	Espectroscopia por ressonância magnética
Exp5	Exportina 5
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GBM	Glioblastoma multiforme
IBE	<i>International Bureau for Epilepsy</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>

let-7	<i>lethal-7</i>
lin-4	<i>lineage-deficient-4</i>
LTA	Lobectomia temporal anterior
miR	miRNA
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-TR	PCR em tempo real
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
pri-miRNA	miRNA primário
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT	Transcrição reversa
SNC	Sistema nervoso central
VL	Ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Aspectos gerais da epilepsia	21
2.2. Hipocampo e formação hipocampal	25
2.3. Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal: algumas considerações.....	30
2.4. MicroRNAs circulantes: uma nova classe de biomarcadores	36
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral	43
3.2. Objetivos específicos.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. Plano geral	45
4.2. Desenho do experimento.....	47
4.3. Pacientes e amostras	48
4.4. Procedimentos de biologia molecular	51
4.5. Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	55
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS.....	79

1- *Introdução*

De acordo com achados arqueológicos, a epilepsia desafia a curiosidade humana há pelo menos 4.000 anos. Os povos da antiguidade, muito distantes do método científico ou de qualquer análise racional, usualmente adotavam explicações sobrenaturais que, ainda hoje, de certa forma, contribuem para o estigma relacionado ao distúrbio. Estima-se que a epilepsia afete cerca de 1% da população mundial, o que a qualifica como uma das mais prevalentes desordens neurológicas (DE BOER, 2010; MAGIORKINIS; SIDIROPOULOU; DIAMANTIS, 2010; NGUGI et al., 2011).

A comissão de classificação e terminologia da *International League Against Epilepsy* (ILAE) promoveu, nos últimos anos, diversas readequações conceituais e estruturais acerca da epilepsia e das crises epiléticas. Dentre elas, a admissão da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal (ELTM-EH) no círculo das síndromes epiléticas específicas (BERG et al., 2010; BERG; SCHEFFER, 2011). A ELTM-EH destaca-se na prática neurológica pela constelação de características singulares, tais como alta prevalência, farmacorresistência e bom prognóstico cirúrgico. Ela é o protótipo da epilepsia cirurgicamente curável (WIESER, 2004).

A intervenção farmacológica habitualmente é eficaz na fase inicial da ELTM-EH. Contudo, a maioria dos pacientes evolui com intratabilidade clínica ainda na adolescência ou início da vida adulta. Assim, tão logo isto ocorra, recomenda-se a ressecção cirúrgica do hipocampo e corpo amigdalóide, restritamente, ou em conjunto com estruturas cerebrais contíguas (BLÜMCKE et al., 2012; CHANG; ENGLLOT; VADERA, 2015). Aproximadamente 10% dos casos operados, infelizmente, seguem com pouca ou nenhuma melhora quanto ao controle das crises (JEONG et al., 2005; SAVITR SASTRI et al., 2014; VALE; POLLOCK; BENBADIS, 2012). A despeito da variedade de fatores que supostamente influenciam negativamente o resultado cirúrgico, não é possível delinear o prognóstico em pacientes individuais (CENDES et al., 2014).

A ELTM-EH está associada a alterações, em larga escala, do perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) do hipocampo. Estudos focados neste sítio, tanto em humanos quanto em modelos animais de epilepsia, demonstram expressões anormais de miRNAs relacionados às vias de inflamação, morte

celular, reorganização sináptica e excitabilidade neuronal. Mecanismos, estes, provavelmente implicados na epileptogênese (DOGINI et al., 2013; HENSHALL, 2014).

MiRNAs são pequenos RNAs não codificadores que regulam a expressão gênica no âmbito pós-transcricional. Desde que foram descobertos na década de 1990, somam-se as pesquisas que indicam seu papel crítico em importantes processos biológicos celulares. Os miRNAs exibem perfis de expressão tecido-específico e doença-específico, duas características especiais que permitem compreender o funcionamento da célula e o desenvolvimento de doenças e propiciam assinaturas moleculares teciduais de real interesse clínico (CHEN; SU; HUNG, 2012; LIANG et al., 2007; LI; KOWDLEY, 2012).

A constatação recente de miRNAs extracelulares estáveis, no sangue periférico e em outros fluidos corporais, despertou a atenção para sua plausível serventia como biomarcadores. É fantástica a ideia de que um *pool* de moléculas do sangue periférico possa exprimir eventos fisiológicos e patológicos de um órgão distante. Desde então, trabalhos empreendidos em diferentes enfermidades, incluindo do sistema nervoso central (SNC), têm revelado assinaturas moleculares por miRNAs circulantes, potencialmente aplicáveis na propedêutica complementar, cujo alcance vai do diagnóstico à resposta terapêutica (JIN et al., 2013; VELU; RAMESH; SRINIVASAN, 2012; WEILAND et al., 2012).

Considerando os tópicos explorados, a presente pesquisa partiu do seguinte questionamento: é possível a identificação, no sangue periférico, de assinaturas moleculares por miRNAs que predigam o resultado do tratamento cirúrgico da ELTM-EH?

No contexto desta temática, o trabalho executado é pioneiro na análise conjunta de sangue e tecido cerebral humanos e traz contribuições inéditas para o emprego dos miRNAs como ferramentas de prognóstico na ELTM-EH.

2- Revisão da Literatura

2.1 Aspectos gerais da epilepsia

Crises epiléticas são descritas desde os primórdios da civilização. O mais antigo relato está talhado em uma tábua de argila datada em 2.000 a.C. procedente da Mesopotâmia. Neste registro, escrito em cuneiforme acadiano, o diagnóstico de *antasubbû* é dado a uma pessoa cujos sintomas são condizentes com uma crise epilética. O papiro de Edwin Smith, um importante manuscrito do Egito Antigo concebido por volta de 1.700 a.C., expõe cinco casos clínicos que são aceitos como as primeiras narrativas de crises epiléticas focais (MAGIORKINIS; SIDIROPOULOU; DIAMANTIS, 2010). Crises epiléticas também são mencionadas nos textos bíblicos e invariavelmente atribuídas à possessão demoníaca, como ilustra o seguinte fragmento do evangelho de Lucas:

[...] 'Mestre, rogo-te, vem ver meu filho. É o único que tenho, e o espírito se apossa dele e de repente solta gritos, agita-o, fazendo espumar, e só o larga depois de deixá-lo ofegante. Pedi a teus discípulos que o expulsassem, mas eles não puderam'.

A palavra epilepsia deriva do verbo grego *epilambanein*, que significa capturar, possuir, afligir. O vocábulo, assim, incorpora toda a natureza mística que os povos da antiguidade conferiam ao distúrbio. Credita-se a Hipócrates, em torno do ano 400 a.C., a ideia de que as crises epiléticas estariam relacionadas a uma disfunção cerebral e não a espíritos malignos ou a outra origem sobrenatural (EADIE, 1995; MAGIORKINIS; SIDIROPOULOU; DIAMANTIS, 2010). À luz dos conhecimentos atuais, vários personagens históricos tinham epilepsia, dentre eles Joana D'Arc, Vincent Van Gogh, Fyodor Dostoiévski e Machado de Assis (DANTAS; RIBEIRO; SILVA, 2008).

Ao longo dos séculos as pessoas com epilepsia têm carregado o fardo da estigmatização. Kale (1997) ousou afirmar que a história da epilepsia pode ser resumida como 4.000 anos de ignorância, superstição e estigma, seguidos por 100 anos de conhecimento, superstição e estigma. O sociólogo Erving Goffman define estigma como a situação na qual o indivíduo é privado da aceitação social plena (DE BOER, 2010). O estigma da epilepsia não se limita apenas aos países em desenvolvimento. Na Europa, por exemplo, a taxa de desemprego das

peessoas com epilepsia é duas a três vezes maior que da população em geral (REYNOLDS, 2000). Uma pesquisa realizada na Alemanha mostrou que cerca de 20% dos entrevistados achavam que a epilepsia era um transtorno mental. Nos Estados Unidos, até o ano de 1956, 17 estados proibiam o casamento de pessoas com epilepsia e, até a década de 1970, tais pessoas eram proibidas de frequentar espaços públicos. No ano de 1997, a partir do esforço conjunto entre a ILAE, o *International Bureau for Epilepsy* (IBE) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), iniciou-se uma campanha ambiciosa intitulada *Bringing Epilepsy "Out of the Shadows"*, literalmente traduzida como "Retirando a Epilepsia das Sombras". Ainda em curso, a campanha tem como missão melhorar a aceitabilidade, tratamento, serviços e prevenção da epilepsia em todos os lugares do mundo (DE BOER et al., 2013; KALE, 1997; REYNOLDS, 2000).

De acordo com a última revisão da comissão de classificação e terminologia da ILAE, crise epiléptica é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devidos à atividade anormal excessiva ou síncrona de neurônios cerebrais. Ao passo que epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado pela predisposição persistente em gerar crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição. A definição de epilepsia requer o histórico clínico de pelo menos uma crise epiléptica (BERG et al., 2010; FISHER et al., 2005).

As crises epilépticas são classificadas conforme o modo de início em focais, generalizadas e desconhecidas. As crises epilépticas focais são as que se originam em algum ponto dentro de redes neurais restritas a um único hemisfério cerebral. Enquanto que as generalizadas se originam em algum ponto dentro de, e rapidamente envolvendo, redes neurais distribuídas a ambos os hemisférios. A insuficiência de dados e falta de consenso acerca dos espasmos epilépticos resultaram na criação de uma categoria própria denominada de crises epilépticas desconhecidas (BERG et al., 2010; BERG; SCHEFFER, 2011).

Por sua vez, a epilepsia é classificada segundo a etiologia em genética, estrutural/metabólica e desconhecida. A epilepsia genética deriva diretamente de um defeito genético conhecido ou presumido, em que a crise epiléptica é o principal sintoma da desordem. Na estrutural/metabólica existe uma condição ou

doença distinta, estrutural ou metabólica, que está associada a um aumento substancial do risco de desenvolver epilepsia. Finalmente, a epilepsia é considerada desconhecida quando a natureza da causa subjacente é incerta (BERG et al., 2010; BERG; SCHEFFER, 2011).

Atualmente a ILAE não adota uma estrutura organizacional para a epilepsia. A comissão de classificação e terminologia esclarece que o diagrama publicado em 2010 (Figura 1) representa apenas uma das possíveis formas de organizá-la e, essencialmente, oferece um ponto de partida para discussões. Percebe-se, ainda assim, que o diagrama traz oportunas informações que se alicerçam em preceitos válidos, como a inclusão da ELTM-EH no corpo do tópico “constelações distintas / síndromes cirúrgicas”. Em síntese, é o reconhecimento da ELTM-EH como uma síndrome epiléptica própria (BERG et al., 2010; BERG; SCHEFFER, 2011).

* Este agrupamento de síndromes eletroclínicas não reflete etiologia

[^] Não tradicionalmente diagnosticadas como epilepsia

+ Algumas vezes referido como Estado de mal epiléptico elétrico durante sono lento

** Formas de epilepsia sem critérios específicos para síndromes ou constelações

Figura 1 - Diagrama organizacional da epilepsia divulgado pela ILAE (BERG et al., 2010).

De grande relevância clínica, o conceito de farmacorresistência em epilepsia foi recentemente revisitado. A comissão de estratégias terapêuticas da ILAE propôs, em consenso, a seguinte definição: insucesso de teste com duas drogas antiepilépticas, apropriadamente escolhidas e toleradas, em monoterapia ou combinadas, para obtenção do controle sustentado das crises (KWAN et al., 2010). O tratamento inadequado da epilepsia está associado à deterioração cognitiva, disfunção psicossocial e aumento da morbimortalidade. Por tais motivos, uma vez reconhecida a farmacorresistência, deve-se logo considerar a viabilidade da abordagem neurocirúrgica (SÀNCHEZ et al., 2014).

Estima-se a prevalência média da epilepsia em 10,0 por mil habitantes, ou 1% da população, o que corresponde a aproximadamente 70 milhões de pessoas em todo o planeta. A sua distribuição, entretanto, não é uniforme. 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 da dos países com alta renda. Na Itália, conforme a pesquisa, a prevalência varia de 2,7 a 3,3 por mil habitantes. Nos estados Unidos, a prevalência é de 5,0 por mil habitantes no Estado de Nova York e 7,1 por mil habitantes no Mississippi. Em contrapartida, países como Bolívia, Paquistão e Tanzânia possuem prevalências de 14,0 por mil habitantes, 9,8 por mil habitantes e 12,5 por mil habitantes, respectivamente (BANERJEE; FILIPPI; HAUSER, 2009; NGUGI et al., 2011). São escassos os dados epidemiológicos da epilepsia no Brasil. A prevalência na cidade de São Paulo é de 11,9 por mil habitantes (MARINO; CUKIERT; PINHO, 1986) e em São José do Rio Preto 18,6 por mil habitantes (BORGES et al., 2004). Em um trabalho realizado na tribo dos índios Bakairi, no estado do Mato Grosso, obteve-se a prevalência de 18,6 por mil habitantes (BORGES et al., 2001).

A incidência média da epilepsia é estimada em 50,4 por cem mil habitantes/ano. Nos países com baixa e média renda fica em 81,7 por 100.000 habitantes/ano, enquanto que naqueles com alta renda em 45,0 por 100.000 habitantes/ano. De um modo geral, a incidência nos países com baixa e média renda é aproximadamente o dobro da dos países com alta renda (NGUGI et al.,

2011). Até o momento não há pesquisas acerca da incidência da epilepsia no Brasil.

2.2 Hipocampo e formação hipocampal

Em 1587, Julius Caesar Arantius descreveu no livro de sua autoria, *De Humano Foetu*, uma estrutura anatômica arqueada situada na porção mesial do lobo temporal, a qual denominou de hipocampo. O termo deriva da fusão de duas palavras gregas: *hippos*, cavalo; *kampos*, monstro do mar. Uma clara referência à semelhança com o cavalo-marinho. Menos de dois séculos depois, em 1742, René Jacques Croissant de Garengot relatou a mesma estrutura cerebral e a nomeou de corno de Amon. Novamente recorreu-se a uma metáfora que, desta vez, remete aos chifres do deus egípcio Amon Kneph. Ambas as designações sobreviveram ao tempo, dentre tantas que caíram em desuso, e são amplamente empregadas na atualidade com razoável preservação da ideia original (DUVERNOY, 2005; PEARCE, 2001; SANO, 1997).

As publicações científicas contemporâneas, sobretudo aquelas relacionadas à epilepsia, assiduamente consideram o hipocampo como o conjunto morfofuncional composto pelo corno de Amon e giro denteado. O presente trabalho segue esta concepção. Já os termos hipocampo próprio e corno de Amon são utilizados como sinônimos e, provavelmente, correspondem às estruturas descritas por Arantius e Garengot. Por fim, a expressão formação hipocampal se refere ao grupo de estruturas funcionalmente integradas que inclui o corno de Amon, o giro denteado, o complexo subicular e o córtex entorrinal.

O hipocampo é uma estrutura anatômica de filogênese antiga pertencente ao sistema límbico. Esta pequena faixa cortical está presente em todos os mamíferos. O crescimento exuberante do neocórtex e do corpo caloso, durante o processo evolucionário destes animais, deslocou o hipocampo, progressivamente, no sentido rostral e medial no lobo temporal. Anfíbios, répteis e aves possuem estruturas homólogas ao hipocampo, porém com aspectos celulares diversos aos encontrados nos mamíferos (EL-FALOUGY; BENUSKA, 2006).

O hipocampo desempenha um papel crítico na elaboração das memórias espacial e episódica e, como integrante do circuito límbico de Papez, participa do processamento das emoções e da regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal em resposta ao *stress* (EL-FALOUGY; BENUSKA, 2006; FANSELOW; DONG, 2010).

Nos seres humanos o hipocampo possui de 4,0 a 4,5 cm de comprimento e repousa, no sentido anteroposterior, no corno temporal e átrio do ventrículo lateral (VL). Ele é dividido em três segmentos: cabeça, corpo e cauda. A cabeça equivale à parte anterior e mais alargada da estrutura. Caracteriza-se por digitações orientadas sagitalmente que lhe dão a aparência de pata de felino. Relaciona-se anteriormente com o recesso uncal, superiormente com a porção posteroinferior do corpo amigdalóide, lateralmente com a ponta anterior do corno temporal do VL e medialmente com a região posterior do uncus. A cabeça é a única porção do hipocampo livre de plexo coroíde. Assim, a emergência do plexo coroíde, fímbria e fissura coroídea marcam o início do corpo do hipocampo. Este segmento não possui as digitações típicas da cabeça. O corpo direciona-se no sentido anteroposterior e inferosuperior pela parte medial do assoalho do corno temporal e estreita-se à medida que avança em direção ao átrio do VL. Relaciona-se lateralmente com a eminência colateral e medialmente com a fissura coroídea. A fímbria situa-se ao longo do seu bordo medial. A mudança do eixo longitudinal do hipocampo, na entrada do átrio, marca o início da cauda. Ao progredir no átrio a cauda do hipocampo torna-se cada vez mais afilada. Ela integra a parte medial do assoalho do átrio e relaciona-se lateralmente com o triângulo colateral e medialmente com o segmento anterior do calcar avis. Macroscopicamente, a cauda do hipocampo termina quando encontra a parede medial do átrio, entretanto, do ponto de vista histológico, seu segmento terminal continua como giro subesplênico. A superfície ventricular do hipocampo é coberta por uma camada de substância branca chamada de alveus, que se espessa ao longo da borda medial do hipocampo para formar a fímbria. O alveus é a substância branca subcortical do allocórtex hipocámpal, enquanto que a fímbria é uma projeção da referida substância branca e configura-se como segmento inicial do fórnix (DESTRIEUX; BOURRY; VELUT, 2013; WEN et al., 1999).

O corno de Amon e o giro denteado compõem o arquicórtex nos seres humanos. Assim, são estruturas histologicamente trilaminadas e com apenas uma lâmina de neurônios principais. No corno de Amon esta lâmina é formada pelas células piramidais e no giro denteado pelas células granulares. Tal simplicidade arquitetural contrasta com as estruturas do neocórtex que exibem um arcabouço com seis lâminas (FÖRSTER; ZHAO; FROTSCHER, 2006).

As três lâminas do corno de Amon englobam, em conjunto, seis camadas ou estratos que se dispõem da superfície ventricular ao giro denteado na seguinte sequência: alveus; estrato oriens; estrato piramidal; estrato radiado; estrato lacunoso e estrato molecular. O alveus reveste a superfície ventricular do hipocampo. Ele contém axônios de neurônios hipocâmpais e subiculares que se dirigem à fímbria e constituem a principal via eferente da formação hipocâmpal. O alveus também acolhe fibras aferentes de neurônios do septo. O estrato oriens possui limites mal definidos, uma vez que se mistura com o estrato piramidal subjacente. Ele contém células nervosas dispersas conhecidas como células em cesto e é atravessado pelos axônios dos neurônios piramidais que se dirigem ao alveus. Alguns destes axônios emitem fibras denominadas de colaterais de Schaffer, que retornam para se conectar com outros neurônios piramidais. O estrato piramidal abriga os corpos dos neurônios piramidais e, por este motivo, é considerada a camada mais importante do corno de Amon. Os corpos estão envolvidos por um denso plexo de arborizações vindas das células em cesto do estrato oriens. Cada neurônio piramidal possui um dendrito apical, que se direciona para o estrato molecular, e dendritos basais que, por vezes, arborizam-se para o estrato oriens. O estrato radiado contém dendritos apicais que trafegam em direção ao estrato molecular. Nesta camada, os dendritos apicais se conectam com fibras do núcleo septal, fibras comissurais e com as já citadas fibras colaterais de Schaffer. O estrato lacunoso contém numerosos fascículos axonais que correm paralelamente à superfície do giro denteado e são formados principalmente por fibras perfurantes e fibras colaterais de Schaffer. O estrato molecular do corno de Amon se mistura com o estrato molecular do giro denteado. Ele contém a arborização final dos dendritos apicais dos neurônios

piramidais e, também, pequena quantidade de interneurônios (DUVERNOY, 2005).

Lorent de Nó, em 1934, dividiu o corno de Amon em quatro setores de acordo com o grau de resistência à isquemia. Ele os nomeou de CA1, CA2, CA3 e CA4. O CA1 é a região adjacente ao subículo. O CA2 representa o aspecto cranial do corno de Amon antes de curvar-se em direção ao giro denteado. O CA3 corresponde à curva ou joelho do corno de Amon e o CA4 ao hilo do giro denteado. O CA1, ou setor de Sommer, e o CA4, ou endofólio, são os setores mais vulneráveis à isquemia, enquanto que o CA2 e o CA3, ou setor de Spielmeyer, são mais resistentes a esta injúria (DUVERNOY, 2005; TIEN; FELSBURG; CRAIN, 1992).

Cada setor apresenta particularidades em relação aos neurônios piramidais. O CA1 possui o estrato piramidal mais espesso e contém células piramidais triangulares, pequenas e dispersas. O CA2 apresenta o estrato piramidal denso e estreito, com células piramidais ovoides, grandes e compactadas. O CA3 é semelhante ao CA2, porém com células piramidais menos compactadas. O CA4 caracteriza-se por células piramidais ovoides, grandes, pouco numerosas e difusamente dispersas (DUVERNOY, 2005).

O giro denteado, por sua vez, apresenta um arcabouço ainda mais elementar. As três lâminas do arquicórtex correspondem a igual número de estratos ou camadas, que se distribuem a partir do estrato molecular do corno de Amon na seguinte ordem: estrato molecular; estrato granuloso e camada polimórfica. O estrato molecular é a camada mais espessa do giro denteado e contém os dendritos dos neurônios granulares, fibras da via perfurante oriundas do córtex entorrinal, fibras comissurais e fibras septais. O estrato granuloso encerra os corpos dos neurônios granulares, assim, é considerada a camada mais importante do giro denteado. Os corpos são pequenos, arredondados e densamente compactados, e cada um deles emite um único dendrito que se arboriza para o estrato molecular. A camada polimórfica abriga os axônios dos neurônios granulares, mais conhecidos como fibras musgosas, que trafegam em direção aos setores CA4 e CA3 do corno de Amon (DUVERNOY, 2005).

Os principais neurônios da formação hipocampal compõem um circuito polissináptico fechado que envolve o córtex entorrinal, giro denteado, CA3, CA1 e subículo. O córtex entorrinal é o local de convergência de aferências neocorticais e onde se inicia o referido circuito. As fibras dos neurônios do córtex entorrinal, que formam a via perfurante, atravessam o subículo e se conectam com os dendritos dos neurônios granulares do giro denteado. Na próxima etapa, os axônios dos neurônios granulares, ou fibras musgosas, ligam-se aos dendritos apicais dos neurônios piramidais do setor CA3. Estes neurônios, por sua vez, emitem fibras colaterais de Schaffer que fazem sinapses com os dendritos apicais dos neurônios piramidais do setor CA1. Na sequência, os axônios dos neurônios piramidais do setor CA1 projetam-se para o subículo e se conectam com neurônios piramidais locais. Finalmente, do subículo a via regressa ao córtex entorrinal. Todas as sinapses do circuito são excitatórias e utilizam o glutamato como neurotransmissor (DUVERNOY, 2005; SONG et al., 2012; STAFSTROM, 2005).

Há, também, um circuito neural mais simples, conhecido como via direta, em que as fibras dos neurônios do córtex entorrinal se conectam, sem intermediários, aos dendritos apicais dos neurônios piramidais do setor CA1. O circuito não utiliza fibras da via perfurante. Do setor CA1 a via caminha para o subículo e, finalmente, retorna ao córtex entorrinal. Todas as sinapses da via direta são excitatórias e empregam o neurotransmissor glutamato (DUVERNOY, 2005).

Ambos os circuitos, polissináptico e via direta, são fundamentais na elaboração da memória. O circuito polissináptico está envolvido, especialmente, com as memórias espacial e episódica, enquanto que a via direta com a memória semântica (DUVERNOY, 2005). Vale acrescentar que cabe ao córtex entorrinal, e não ao hipocampo, o protagonismo na formação da memória semântica.

As principais conexões externas do hipocampo, aferentes e eferentes, ocorrem com as estruturas do sistema límbico que integram o circuito de Papez. Assim, a aferência dominante é dada pelas fibras procedentes do córtex entorrinal, ao passo que a principal eferência é composta pelas fibras dos neurônios piramidais que seguem para a fimbria e fórnix. Como já mencionado,

as interações do hipocampo no circuito de Papez permitem sua colaboração no processamento das emoções e na regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal em resposta ao *stress*.

O hipocampo é modulado internamente por um sistema de interneurônios inibitórios geralmente gabaérgicos, que atuam por retroalimentação, dos quais se destacam as células em cesto. Também há modulação externa por fibras aferentes vindas de estruturas distantes que operam com os mais variados neurotransmissores. Os núcleos septais mediais e a banda diagonal de Broca liberam acetilcolina e GABA, a área supramamilar, glutamato, o *locus coeruleus*, noradrenalina, os núcleos dorsais da rafe, serotonina e a área tegmental ventral, dopamina (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007; DUVERNOY, 2005; TONI; SULTAN, 2011).

Os circuitos intra-hipocampais são altamente plástico. Os contatos sinápticos modificam-se em número e intensidade segundo um padrão atividade-dependente. Outro aspecto singular é a alteração estrutural dos circuitos, em larga escala, pela adição contínua de novos neurônios granulares do giro denteado (SONG et al., 2012). O processo conhecido como neurogênese adulta inicia-se com a proliferação de células tronco neurais maduras e segue com a diferenciação, maturação, migração e, por fim, incorporação ao circuito neural pré-existente. Nos mamíferos, apenas dois tipos de neurônios cerebrais, em condições fisiológicas, são capazes de se renovarem a partir deste processo: os neurônios do bulbo olfatório e os neurônios granulares do giro denteado. As evidências indicam que a neurogênese adulta é essencial para a integridade funcional do hipocampo (GE et al., 2008; MONGIAT; SCHINDER, 2011).

2.3 Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal: algumas considerações

A associação entre distorções anatômicas do hipocampo e epilepsia é conhecida desde o século XIX. O primeiro estudo remonta a 1825, quando Bouchet e Cazauvielh relataram hipocampus endurecidos e atróficos em cérebros autopsiados de pacientes com epilepsia. Wilhelm Sommer, em 1880, foi o

primeiro a descrever aspectos microscópicos da esclerose hipocampal a partir da autópsia de um paciente com epilepsia do lobo temporal. Ele constatou a perda de neurônios piramidais no hilo do giro denteado e em uma região particular do corno de Amon, denominada posteriormente de setor de Sommer, que corresponde ao setor CA1. Bratz, em 1899, divulgou um estudo microscópico minucioso de uma esclerose hipocampal unilateral. Ele verificou grave perda de neurônios piramidais e gliose do setor CA1, perda neuronal menos grave do hilo do giro denteado e CA3 e preservação das demais regiões do hipocampo (BLÜMCKE et al., 2012).

Após o advento da eletroencefalografia, Herbert Jasper, em 1941, demonstrou a correlação entre crises psicomotoras e descargas eletrográficas do lobo temporal (ENGEL, 2008). Entretanto, somente em 1953, com a publicação dos estudos de Murray Falconer, surgiram as primeiras evidências da relação causal entre esclerose hipocampal e epilepsia do lobo temporal. Falconer realizou lobectomia temporal anterior em 14 pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária à medicação. A admissão da esclerose hipocampal como possível lesão epileptogênica resultou do seu frequente achado na histopatologia dos espécimes cirúrgicos e do ótimo controle das crises após sua ressecção. Tal ideia se contrapôs à visão corrente, que a considerava um mero produto dos insultos crônicos da epilepsia (HILL et al., 1953).

A ELTM-EH possui um elenco de atributos clínicos e laboratoriais que a caracteriza como uma síndrome epiléptica específica. A história clínica assiduamente revela um evento precipitante inicial (EPI), geralmente antes dos cinco anos de idade, como convulsão febril, trauma, hipóxia ou infecção intracraniana. Estima-se que 6% dos pacientes com convulsão febril única desenvolvam ELTM-EH tardiamente. O início das crises da ELTM-EH habitualmente ocorre entre os quatro e dezesseis anos. Os pacientes classicamente apresentam um período latente entre o EPI e o início das crises, porém em alguns casos o EPI não é identificado e em outros as crises se iniciam logo após o EPI. O lapso de tempo entre a primeira crise e o início da intratabilidade clínica é denominado de período silente. As crises, que no início são facilmente controladas, paulatinamente tornam-se rebeldes à terapêutica

medicamentosa. Assim, o período silente é um indício do caráter progressivo da ELTM-EH (BLÜMCKE et al., 2012; WIESER, 2004).

Há sinais de uma provável predisposição genética para a ELTM-EH. Recentemente verificou-se que a ELTM-EH, com antecedente de convulsão febril, está associada a 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 (KASPERAVICIUTE et al., 2013). Ademais, é bem documentada a ocorrência de formas familiares de epilepsia do lobo temporal mesial que cursam com esclerose hipocampal e cuja evolução pode assemelhar-se com a da ELTM-EH esporádica (GAMBARDELLA et al., 2009).

As crises da ELTM-EH expressam o envolvimento primário de estruturas mesiais do lobo temporal. Uma manifestação típica compreende os seguintes aspectos chave: aura característica; sintomas motores negativos; alteração da consciência e automatismos. As crises costumeiramente cessam em menos de dois minutos e são seguidas por sinais e sintomas pós-ictais (BLÜMCKE et al., 2012; WIESER, 2004).

As sensações epigástricas e subesternais são as auras mais frequentes. Na sequência vêm as auras inespecíficas, como sensações de formigamento na linha média ou em todo corpo, as auras emocionais, como sensações de medo e ansiedade, as ilusões de familiaridade e estranheza, como reminiscências e *déjà vu* e as auras autonômico-vegetativas, como pupilas dilatadas e palpitações. As auras olfativo-gustatórias são raras e correspondem a menos de 5% dos casos (WIESER, 2004).

Os sintomas motores negativos, também conhecidos como *arrest*, são observados com assiduidade e estão relacionados ao aumento do tônus muscular. A alteração da consciência é outro sintoma habitual durante as crises. Uma tarefa fundamental é verificar se há preservação da orientação reflexa. Em termos gerais, quanto maior a área cerebral envolvida na crise, mais grave é a deterioração da consciência. Os automatismos também são elementos de suma importância. Destacam-se, aqui, os automatismos oroalimentares, seguidos pelos gestuais e manuais.

Afasia ou anomia são vistas nas crises que comprometem o hemisfério dominante para linguagem. O alastramento da crise para áreas cerebrais suprasylvianas pode acarretar sintomas motores positivos contralaterais, como versão clônica da cabeça e dos olhos, clônus braquiofacial ou postura distônica do membro superior. A eventual progressão bilateral gera crises generalizadas do tipo clônica-tônico-clônica e outras variações. Sempre se espera alguma disfunção mental transitória após uma crise. O rebaixamento intelectual, déficit de memória, mudança de humor e distúrbio de linguagem são as manifestações pós-ictais mais comuns. Nesta fase, o distúrbio de linguagem é um bom indicador de lateralidade (WIESER, 2004).

A ELTM-EH está associada a uma gama de disfunções cognitivas interictais. O déficit de memória episódica é o transtorno mais bem documentado. Testes neuropsicológicos material-específico demonstram o declínio da memória verbal em pacientes com ELTM-EH no hemisfério dominante para linguagem. Curiosamente, a memória visual, atribuída a estruturas mesiais do lobo temporal no hemisfério não dominante, é menos afetada pela ELTM-EH ipsilateral. A memória semântica raramente está comprometida. O rebaixamento intelectual, quando presente, deve-se a danos cerebrais precoces que prejudicam o desenvolvimento cognitivo e não propriamente à ELTM-EH. Transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão, ainda que fartamente citados, carecem de dados que os liguem diretamente à síndrome (ALESSIO et al., 2013; WIESER, 2004).

O eletroencefalograma (EEG) na ELTM-EH exhibe anormalidades nos estados interictal e ictal. O estudo interictal com eletrodos no couro cabeludo 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 não exclui o diagnóstico da ELTM-EH. 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 (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; WIESER, 2004).

Prosseguindo a propedêutica armada, o exame estrutural com ressonância magnética (RM) demonstra diminuição volumétrica e deformidade arquitetural do hipocampo na sequência ponderada em T1 e aumento da intensidade de sinal nas sequências em T2 e FLAIR. O exame funcional com tomografia por emissão de pósitrons (PET) revela diminuição metabólica do hipocampo afetado, enquanto que a espectroscopia por ressonância magnética (ERM) exhibe redução local da concentração de N-acetil-aspartato (MALMGREN; THOM, 2012).

Nenhum critério isolado é suficiente para o diagnóstico da ELTM-EH. É necessário o somatório das evidências clínicas, eletroencefalográficas e radiológicas para sua composição. De acordo com a ILAE, o padrão semiológico das crises é o único critério considerado essencial. Em outras palavras, sua ausência afasta a possibilidade de ELTM-EH (WIESER, 2004).

A ILAE estabeleceu, em 2004, como requisitos mínimos para o diagnóstico histopatológico de esclerose hipocampal, a perda neuronal e gliose dos setores CA1 e CA4 e a relativa preservação do córtex transicional (WIESER, 2004). Obviamente, o exame histopatológico restringe-se àqueles pacientes operados ou autopsiados. Alterações adicionais, rotineiramente verificadas, incluem a perda neuronal e gliose dos demais setores do corno de Amón, brotamento axonal, reorganização sináptica e dispersão das células granulares do giro dentado. Estruturas anatómicas adjacentes ao hipocampo, como amígdala e giro parahipocampal, estão frequentemente acometidas (WIESER, 2004).

Em 2013, de modo complementar, a comissão de métodos diagnósticos da ILAE classificou a esclerose hipocampal em três tipos histopatológicos de acordo com o predomínio setorial da perda neuronal. No tipo I há perda neuronal grave ($\geq 80\%$) e gliose dos setores CA1 e CA4. No tipo II ocorre perda neuronal grave ($\geq 80\%$) e gliose do setor CA1. E no tipo III predomina a perda neuronal ($\geq 50\%$) e gliose do setor CA4. Há um quarto padrão histopatológico, não caracterizado como esclerose hipocampal, em que se observa gliose reacional, sem perda neuronal significativa do hipocampo (BLÜMCKE et al., 2012; BLÜMCKE et al., 2013).

A intervenção neurocirúrgica nos pacientes com ELTM-EH é uma possibilidade concreta, haja vista a elevada incidência de falha do tratamento

farmacológico. Em suma, os procedimentos visam a exérese da amígdala e do hipocampo, isoladamente, ou compreendendo, em diferentes graus, estruturas cerebrais circunvizinhas. A técnica mais empregada é a lobectomia temporal anterior (LTA), na qual se ressecam até 5,5 cm da porção rostral do lobo temporal, com inclusão da amígdala, hipocampo, giro parahipocampal e áreas neocorticais. Conforme evidências atuais, abordagens seletivas não são superiores à LTA no tocante à preservação cognitiva e controle das crises (CENDES et al., 2014; CHANG; ENGLLOT; VADERA, 2015).

A avaliação do resultado cirúrgico é feita habitualmente com a escala de Engel (Tabela 1). Considera-se sucesso cirúrgico, ou resultado cirúrgico favorável, a evolução nas classes Engel I e II, enquanto que insucesso cirúrgico, ou resultado cirúrgico desfavorável, classes Engel III e IV. As principais razões para o insucesso cirúrgico são: ressecção incompleta do foco epileptogênico; localização imprecisa do foco epileptogênico; geração de um novo foco epileptogênico e emergência de uma área epileptogênica oculta (VALE; POLLOCK; BENBADIS, 2012).

Diversos estudos retrospectivos tentam associar fatores clínicos, radiológicos e eletroencefalográficos ao prognóstico cirúrgico. Por exemplo, histórico de crise focal com progressão bilateral, postura distônica ictal, idade avançada e longa duração da epilepsia estão supostamente relacionados a resultado desfavorável (JANSZKY et al., 2005). Ao passo que, antecedente de convulsão febril, assimetria dos hipocampos, descarga eletroencefalográfica interictal unilateral e baixa frequência das crises são citados por impactarem positivamente a resposta cirúrgica (AULL-WATSCHINGER et al., 2008; WIESHMANN et al., 2008). No entanto, devido a grande heterogeneidade desses trabalhos, não é possível prognosticar o desfecho cirúrgico em pacientes individuais (CENDES et al., 2014).

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 variedade e complexidade dos dados que permeiam a ELTM-EH tornam sua condução um grande desafio médico. Sem dúvida, é imperiosa a busca por novas ferramentas que simplifiquem esta tarefa. Neste sentido, pesquisas atualmente empreendidas apontam para um caminho muito promissor: biomarcadores moleculares da epilepsia.

2.4 MicroRNAs circulantes: uma nova classe de biomarcadores

Um estudo publicado em 1993, liderado pelo pesquisador Victor Ambros, revelou que um pequeno RNA não codificador regulava negativamente a

expressão gênica da proteína LIN-14 e, assim, exercia uma importante função no desenvolvimento larval do nematoide *Caenorhabditis elegans* (C. elegans). Este pequeno RNA composto por 22 nucleotídeos recebeu a denominação de lin-4, uma abreviação do termo *lineage-deficient-4*, em referência a seu gene codificador, homônimo, previamente conhecido (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). A descoberta, na época, não atraiu grande interesse da comunidade científica mundial, que a via como uma mera idiosincrasia de um animal rudimentar. Esta concepção mudou somente no ano de 2000, quando se constatou que o let-7, outro miRNA presente no C. elegans, exibia alta conservação entre as espécies, com envolvimento de diferentes níveis da escala filogenética (PASQUINELLI et al., 2000; SIOMI; SIOMI, 2010).

MiRNAs são RNAs endógenos fita simples não codificadores de proteínas, com 19 a 25 nucleotídeos, que atuam como potentes silenciadores pós-transcricionais da expressão gênica. Estima-se que cerca de dois terços dos genes humanos codificadores de proteínas sejam modulados por miRNAs. A sequência da sua biogênese é bem conhecida. Inicialmente ocorre a transcrição do gene, pela enzima RNA polimerase II, em uma molécula longa chamada de miRNA primário ou pri-miRNA. Este transcrito apresenta uma ou mais estruturas em forma de grampo, as quais são clivadas do resto da molécula, ainda no núcleo da célula, pela RNase III, Drosha, e seu cofator, DGCR8. Forma-se, desse modo, o precursor do miRNA maduro, denominado de pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela enzima Exportina-5 (Exp5), onde é processado pela RNase III, Dicer, em um miRNA maduro fita dupla com aproximadamente 22 pares de nucleotídeos. A fita com emparelhamento mais fraco na extremidade 5' liga-se ao conjunto enzimático RISC, *RNA-induced silence complex*, constituído, principalmente, por proteínas Argonautas. Por fim, a estrutura resultante se acopla à região 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo. O pareamento imperfeito entre miRNA e mRNA gera a supressão da tradução, enquanto que o pareamento perfeito promove a degradação do mRNA. No homem, o pareamento imperfeito permite que um único tipo de miRNA interaja com mais de 200 mRNAs distintos e vice-versa (DI

LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014; FRIEDMAN et al., 2009; IORIO; CROCE, 2009).

Os miRNAs regulam importantes processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose. Por exemplo, eles são essenciais no desenvolvimento embrionário do córtex cerebral, que compreende as etapas de proliferação, diferenciação, migração e organização celular. A proliferação e diferenciação ocorrem entre a 5ª e 20ª semana de gestação. O miR-9, miR-124, miR-137, miR-184 e let-7b atuam na proliferação das células progenitoras e o miR-34a, miR-153, miR-324 e miR-181a na diferenciação das células progenitoras em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Na etapa de migração neuronal, entre a 6ª e 24ª semana, participam o miR-9, miR-134 e miR-137. E na organização neuronal, entre a 16ª e 40ª semana, contribuem o miR-125b e miR-137 (DOGINI et al, 2013).

Um aspecto peculiar dos miRNAs é o padrão de expressão tecido-específico. Isto foi bem documentado por Liang et al. (2007) ao estudarem a expressão de 345 miRNAs humanos em 40 amostras de tecidos normais, representativas dos sistemas nervoso, muscular, circulatório, respiratório, linfóide, gastrointestinal, urinário, reprodutivo e endócrino. A especificidade tissular indica um vínculo entre os miRNAs diferencialmente expressos e a função biológica do tecido.

Há evidências de que a expressão aberrante de miRNAs esteja diretamente relacionada à gênese de enfermidades. Dentre estas, a mais bem estudada é o câncer. Os miRNAs podem operar como oncogenes, ou como supressores tumorais, conforme o alvo a ser silenciado. Desse modo, tanto a expressão aumentada de miRNAs oncogênicos, como a expressão diminuída de miRNAs supressores tumorais, promovem a carcinogênese (PALMERO et al., 2011).

Para ilustrar, cerca de 70% dos pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B exibem deleção do cromossomo 13q14, o qual contém os genes codificadores dos miR-15a e miR-16-1. Estes miRNAs, que estão ausentes ou substancialmente hipoexpressos, possuem como alvo o *BCL2*, um conhecido oncogene anti-apoptótico que, sem inibição, mostra-se hiperexpresso (CALIN et

al., 2002; IORIO; CROCE, 2009). Outro exemplo, nos pacientes com carcinoma de pulmão de pequenas células verifica-se hiperexpressão do *cluster* miR-17-92 promovida pela regulação amplificada do gene *MYC*. O *cluster* miR-17-92 tem como alvos os genes supressores tumorais *PTEN* e *RB2* que, excessivamente inibidos, apresentam-se hipoexpressos (ZHANG et al., 2007). No primeiro caso, os miR-15a e miR-16-1 são supressores tumorais, enquanto que no segundo, o *cluster* miR-17-92 é um oncogene.

Perfis de expressão desregulados, mesmo quando não ligados à gênese de doenças, acenam para o mau funcionamento do órgão e, portanto, são peças valiosas para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes. A partir de perfis aberrantes também é possível a discriminação de assinaturas moleculares com ampla aplicabilidade clínica, como diagnóstico e prognóstico de doenças. Díaz-Prado et al. (2012), em uma pesquisa que avaliou a expressão de 723 miRNAs em condrócitos de pacientes com osteoartrite, identificaram uma assinatura molecular composta por sete miRNAs diferencialmente expressos. Estavam hipoexpressos os miR-149, miR-582-3p, miR-1227, miR-634, miR-576-5p e miR-641 e hiperexpresso o miR-483-5p. Verificou-se, através de ferramentas de bioinformática, que estes miRNAs atuavam nas vias de sinalização das proteínas TGFB, WNT, MAPK e MTOR, da adesão focal e da regulação do citoesqueleto de actina. Todas elas importantes indutoras e reguladoras do desenvolvimento articular e da formação do osso, cartilagem e sinóvia.

O primeiro indício de miRNAs no espaço extracelular surgiu quando Valadi et al. (2007) notaram que exossomas secretados por células da linhagem dos mastócitos continham mRNAs e miRNAs. Pouco tempo depois, Lawrie et al. (2008) detectaram níveis elevados de miRNAs relacionados a tumores, especificamente os miR-155, miR-210 e miR-21, no soro de pacientes com linfoma difuso de grandes células B. Eles observaram, além disso, que a hiperexpressão do miR-21 estava associada a maior tempo de sobrevida livre de recidiva. Outros dois estudos desta época merecem destaque. Mitchell et al. (2008) evidenciaram altos níveis do miR-141 no soro de pacientes com câncer de próstata, cuja expressão no tecido prostático neoplásico era sabidamente aumentada, e quantificaram a sensibilidade em 60% e especificidade em 100%

para o diagnóstico da doença. Chen et al. (2008) constataram a presença de miRNAs no soro e plasma de diversos animais, incluindo o homem, e que seus níveis eram estáveis, reprodutíveis e consistentes entre indivíduos da mesma espécie. Adicionalmente, identificaram perfis de expressão específicos no soro de pacientes com câncer de pulmão, câncer colorretal e diabetes. Ficou claro, já no início, o grande potencial dos miRNAs como biomarcadores sanguíneos.

A partir de então, inúmeros trabalhos com as mais variadas moléstias têm confirmado a expectativa original. Recentemente, Liu et al. (2013) definiram uma assinatura molecular no plasma de pacientes com carcinoma nasofaríngeo, que incluía os miR-16, miR-21, miR-24, miR-155 e miR-378, cuja sensibilidade e especificidade diagnósticas eram de 87,7% e 82,0% respectivamente. Ge et al. (2013) identificaram cinco miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes com coqueluche, os miR-202, miR-342-5p, miR-206, miR-487b e miR-576-5p, que, em conjunto, conferiam uma sensibilidade de 97,4% e especificidade de 94,3% para o referido diagnóstico.

Os miRNAs extracelulares do sangue são protegidos da degradação das RNases por meio da encapsulação, seja nos exossomas, microvesículas ou corpos apoptóticos. Quando não estão encapsulados, formam complexos com proteínas, tais como AGO2, NPM1 e HDL, que também os resguardam da destruição (HOY; BUCK, 2012). Além dos miRNAs extracelulares, o sangue contém miRNAs intracelulares, particularmente nos leucócitos mononucleares, que são alvos de importantes estudos para caracterização de biomarcadores. Wang et al. (2013), em uma pesquisa com leucócitos mononucleares do sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas, descobriram que a presença isolada do miR-27a-3b era capaz de distinguir o câncer, de doenças pancreáticas benignas, com uma sensibilidade de 82,2% e especificidade de 76,7%. A análise combinada com o nível sérico de CA19-9 aumentava a sensibilidade para 85,3% e a especificidade para 81,6%.

Um trabalho, em especial, trouxe grande respaldo à busca por biomarcadores nas doenças do SNC a partir de leucócitos mononucleares do sangue periférico. Rollins et al. (2010) conduziram uma extensa avaliação da expressão gênica em amostras de sangue e tecido encefálico procedentes de

ratos e humanos autopsiados. Eles constataram que 22,9% do transcriptoma encefálico humano estava coexpresso em leucócitos mononucleares do sangue periférico. O resultado foi análogo ao encontrado no rato, cuja coexpressão ficou em 19%.

A dificuldade de acesso ao tecido cerebral humano, *in vivo*, é um empecilho real para o estudo da coexpressão encéfalo-sangue nas doenças do SNC. Ainda assim, muitas pesquisas têm identificado assinaturas por miRNAs com a utilização apenas do sangue periférico. Por exemplo, Kumar et al. (2013) caracterizaram uma assinatura por miRNAs no plasma de pacientes com diagnóstico presuntivo de doença de Alzheimer, composta pelos let-7d-5p, let-7g-5p, miR-15b-5p, miR-142-3p, miR-191-5p, miR-301a-3p e miR-545-3p, e que possuía uma acurácia diagnóstica superior a 95%. Roth et al. (2011), ao estudarem o perfil de expressão da fração celular do sangue de pacientes com glioblastoma multiforme (GBM), observaram hiperexpressão do miR-128 e hipoexpressão do miR-342-3p. A assinatura molecular, assim constituída, mostrou-se capaz de discriminar a doença com uma especificidade de 79%, sensibilidade de 83% e acurácia de 81%. Em outro trabalho, desta vez com a fração leucocitária do sangue de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA), De Felice et al. (2012) identificaram oito miRNAs diferencialmente expressos: miR-338-3p, miR-451, miR-1275, miR-328-5p, miR-638, miR-149, miR-665 e miR-583. Destes, o miR-338-3p, o único hiperexpresso e previamente descrito como desregulado nos cérebros com ELA, foi aventado como possível biomarcador da doença.

Pode-se afirmar que os miRNAs reúnem as principais características de um biomarcador ideal: especificidade tissular, expressão diferencial nas doenças, resistência à degradação, presença em fluidos corporais de simples acesso e facilidade de detecção (ETHERIDGE et al., 2011). Sabe-se hoje que, além do sangue, os miRNAs são encontrados nos mais variados fluidos corporais, como saliva, lágrima, sêmen, urina, líquido amniótico, leite materno e líquido (WEBER et al., 2010).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar os perfis de expressão de miRNAs, no sangue e hipocampo, de pacientes com diagnóstico de ELTM-EH que evoluíram com resposta cirúrgica favorável e desfavorável.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a coexpressão de miRNAs, sangue-hipocampo, em pacientes com diagnóstico de ELTM-EH que evoluíram com resposta cirúrgica favorável e desfavorável.
2. Caracterizar assinaturas de miRNAs circulantes que predigam o resultado do tratamento cirúrgico da ELTM-EH.

4. Materiais e Métodos

4.1 Plano geral

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. Contou, ainda, com a parceria do Laboratório de Bioinformática do Departamento de Genética da FMRP-USP e do Centro de Medicina Legal (CEMEL) 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.

Durante o primeiro semestre de 2012, no ambulatório do CIREP, foram selecionados 31 pacientes submetidos à LTA em consequência de ELTM-EH farmacorresistente. Os pacientes tinham no mínimo 18 meses de seguimento pós-operatório. Dezesseis evoluíram com resposta cirúrgica favorável e quinze com desfavorável. O grupo com resposta cirúrgica favorável era constituído exclusivamente por pacientes com classe Engel IA. Já o grupo com resposta desfavorável era formado por pacientes com classes Engel III e IV. A admissão na pesquisa ocorreu após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os pacientes tinham extensa investigação clínica pré-operatória, confirmação histopatológica de esclerose hipocampal e amostras de tecido armazenadas em banco biológico, no caso, hipocampo (peça cirúrgica) e sangue periférico pré-operatório. Estas amostras foram separadas, processadas, e analisadas por técnicas de biologia molecular.

O trabalho assumiu dois grupos controles. Para composição do grupo controle das peças cirúrgicas foram utilizados quinze hipocampus de indivíduos autopsiados no CEMEL, sem histórico médico de doença neurológica ou psiquiátrica, extraídos em até 15 horas após o óbito. Os espécimes anatômicos derivados das autópsias foram obtidos de maneira padronizada, com ressecção em bloco da porção anteromesial do lobo temporal, semelhante à exérese neurocirúrgica. Quanto ao grupo controle das amostras sanguíneas, foram empregadas quinze amostras procedentes de indivíduos saudáveis integrantes do

corpo discente da FMRP-USP. O transporte ao banco biológico foi efetuado em nitrogênio líquido, a -196°C , onde os controles foram acondicionados em *freezer*, a -80°C , respeitando as mesmas condições de transporte e armazenamento conferidas às peças cirúrgicas e amostras sanguíneas dos pacientes.

Conforme revisão dos prontuários, o diagnóstico de ELTM-EH, a caracterização da farmacorresistência e a definição histopatológica de esclerose hipocampal seguiram as diretrizes preconizadas pela ILAE (KWAN et al., 2010; WIESER, 2004). A investigação clínica que precedeu a cirurgia compreendeu exame neuropsicológico, avaliação social, EEG, Vídeo EEG e RM encefálica. O procedimento neurocirúrgico foi realizado de maneira padronizada, com a mesma equipe cirúrgica, através de craniotomia frontotemporal e lobectomia temporal anterior.

A primeira etapa experimental consistiu na análise qualitativa global da expressão dos miRNAs, pela técnica de *microarray*, aplicada às amostras triadas do banco biológico. Avaliou-se a expressão de 723 miRNAs humanos e 76 virais humanos em amostras de sangue e hipocampo, provenientes de pacientes e controles, de acordo com a seguinte distribuição:

- Hipocampus extraídos de pacientes com evolução Engel IA (n: 8);
- Hipocampus extraídos de pacientes com evolução Engel III-IV (n: 8);
- Grupo controle com hipocampus procedentes de autópsias (n: 8);
- Amostras de sangue pré-operatório de pacientes com evolução Engel IA (n: 8);
- Amostras de sangue pré-operatório de pacientes com evolução Engel III-IV (n: 8);
- Grupo controle com amostras de sangue de pessoas saudáveis (n: 8).

Obteve-se, assim, um panorama da expressão dos miRNAs, no sangue e hipocampo, tanto de pacientes com resposta cirúrgica favorável quanto com resposta desfavorável. Para fins práticos, o trabalho considerou como critério de hiperexpressão o *fold change* > 2 e de hipoexpressão o *fold change* $< 0,5$.

No grupo com resposta cirúrgica favorável, identificaram-se os miRNAs hiperexpressos que exibiam coexpressão sangue-hipocampo. O mesmo foi realizado no grupo com resposta desfavorável. Ao confrontar-se os dois conjuntos de miRNAs coexpressos, chegou-se a seis miRNAs candidatos a biomarcadores

de prognóstico: miR-92b-3p; miR-1238-3p; miR-1181; miR-636; miR-1229-3p e miR-486-5p ($p < 0,05$).

A técnica de PCR em tempo real (PCR-TR) foi empregada para validação dos seis miRNAs indicados pelo *microarray*. Programou-se, desse modo, a quantificação da expressão dos citados miRNAs em amostras de sangue e hipocampo, provenientes de um quadro ampliado de pacientes e controles, segundo a disposição abaixo:

- Hipocampus extraídos de pacientes com evolução Engel IA (n: 15);
- Hipocampus extraídos de pacientes com evolução Engel III-IV (n: 15);
- Grupo controle com hipocampus procedentes de autópsias (n: 15);
- Amostras de sangue pré-operatório de pacientes com evolução Engel IA (n: 15);
- Amostras de sangue pré-operatório de pacientes com evolução Engel III-IV (n: 15);
- Grupo controle com amostras de sangue de pessoas saudáveis (n: 15).

Durante a realização do PCR-TR, verificou-se ausência de amplificação do controle endógeno de uma amostra sanguínea do grupo Engel III-IV. Por tal motivo, o grupo passou de 15 para 14 amostras. No grupo controle constituído por hipocampus autopsiados, não foi possível a obtenção das 15 amostras inicialmente programadas. Integralizou-se o grupo com a soma de 13 amostras. Concluído o PCR-TR, optou-se, ainda, pela exclusão de uma amostra deste grupo, por apresentar valores de expressão incongruentes com o restante das amostras controle. Encerrou-se, desse modo, com 12 amostras.

Os dados produzidos foram, finalmente, tabulados e refinados por testes estatísticos específicos.

4.2 Desenho do experimento

Demonstra-se, na figura 2, o desenho final do experimento.

Figura 2 - Diagrama esquemático do experimento. ELTM-EH, epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal; Eg1A, Engel IA; Eg3-4, Engel III e IV; PrO, pré-operatório; PCR-TR, PCR em tempo real.

4.3. Pacientes e amostras

O Quadro 1 contém a relação de pacientes que forneceram amostras de sangue e/ou hipocampo para a análise por *microarray*. Houve dificuldade técnica na extração do RNA total de algumas amostras, o que exigiu a utilização de pacientes adicionais. Completaram-se, conforme planejado, dezesseis amostras de sangue e dezesseis de hipocampo, com representação equitativa dos grupos Engel IA e Engel III-IV.

Paciente	Sexo	Data Nascim.	Data Cirurgia	Classe Engel	Amostras	
					Sangue	Hipocampo
SRS	Fem.	10/02/1980	04/10/2007	IA	X	
EMS	Masc.	05/08/1972	10/01/2008	IA	X	X
JGS	Fem.	03/06/1979	07/02/2008	IA		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	
MAPS	Fem.	20/08/1969	07/08/2008	IA	X	X
AJBJ	Fem.	27/04/1983	06/11/2008	IA	X	
LBB	Fem.	27/02/1973	18/01/2010	IA		X
CSSS	Fem.	29/10/1967	21/01/2010	IA		X
EMA	Fem.	24/11/1957	10/03/2010	IA	X	X
CAGZ	Masc.	31/07/1953	29/10/2007	III		X
FAR	Fem.	27/11/1980	06/11/2007	III		X
SAS	Masc.	30/06/1966	22/11/2007	III		X
CS	Masc.	07/02/1968	17/01/2008	III		X
MROA	Fem.	13/03/1971	03/07/2008	IV	X	
ZF	Fem.	23/07/1963	14/07/2008	III	X	X
MR	Masc.	20/04/1969	25/09/2008	III	X	
SAWM	Fem.	13/04/1975	12/02/2009	III	X	
SMS	Fem.	14/11/1975	26/02/2009	III	X	X
ICM	Fem.	19/11/1980	14/05/2009	III		X
LNSR	Fem.	18/10/1966	06/05/2010	IV	X	
RGS	Fem.	17/01/1982	17/05/2010	III	X	
HFC	Fem.	17/10/1970	19/08/2010	III	X	X

Quadro 1 - Relação de pacientes e amostras utilizadas no *microarray*; Data Nascim., data de nascimento; Data Cirurgia, data da cirurgia; Fem., feminino; Masc., masculino.

O Quadro 2 expõe a listagem de pacientes que cederam amostras de sangue e/ou hipocampo para o estudo por PCR-TR. Foram obtidas 30 amostras de sangue e 30 de hipocampo, constituídas, meio a meio, pelos grupos Engel IA e Engel III-IV. Observa-se que, para esta etapa do experimento, foi ampliado

consideravelmente o número de amostras. Na amostra sanguínea do paciente NMH ocorreu falha de amplificação do controle endógeno.

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
AJB	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
EMA	Fem.	24/11/1957	10/03/2010	IA	X	X
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
HFC	Fem.	17/10/1970	19/08/2010	III	X	X

Quadro 2 - Listagem de pacientes e amostras empregadas no PCR-TR; Data Nascim., data de nascimento; Data Cirurgia, data da cirurgia; Fem., feminino; Masc., masculino.

O Quadro 3 exibe o conjunto de indivíduos autopsiados que proveram amostras de hipocampo para o grupo controle. Excluiu-se da pesquisa a amostra de hipocampo do indivíduo 4, por manifestar valores de expressão incompatíveis com o restante das amostras do grupo.

	Idade	Causa Mortis	Tempo de Óbito	Data Autópsia
1	58	Pancreatite Aguda	07 hs.	16/04/2007
2	39	Edema Agudo de Pulmão	09 hs.	29/04/2007
3	20	Infarto Agudo do Miocárdio	05 hs.	29/04/2007
4	52	Pulmão de Choque	12 hs.	14/05/2007
5	41	Cardiopatia Isquêmica	06 hs.	14/05/2007
6	77	Infarto Agudo do Miocárdio	09 hs.	27/08/2007
7	61	Infarto Agudo do Miocárdio	05 hs.	03/06/2013
8	62	Tromboembolismo Pulmonar	04 hs.	03/06/2013
9	51	Infarto Agudo do Miocárdio	09 hs.	27/08/2013
10	68	Causa Indeterminada	04 hs.	26/02/2015
11	64	Causa Indeterminada	04 hs.	24/03/2015
12	48	Edema Agudo de Pulmão	05 hs.	30/03/2015
13	46	Edema Agudo de Pulmão	06 hs.	30/03/2015

Quadro 3 - Conjunto de indivíduos autopsiados; idade em anos; Causa Mortis, causa da morte; Tempo Óbito, tempo decorrido entre o óbito e a retirada do hipocampo; hs., horas; Data Autópsia, data da autópsia.

4.4 Procedimentos de biologia molecular

Extração do RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA das amostras selecionadas foi efetuada pelo método do Trizol. Às amostras de sangue (soro) e hipocampo, foram adicionados 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). Os fragmentos de tecido foram homogeneizados com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl de Clorofórmio e seguiu-se agitação vigorosa por 15 segundos. A mistura final foi centrifugada a 13.200 rpm, a 4°C, por 15 minutos e a fase aquosa de cada frasco transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado

com 500µl de Álcool Isopropílico a 100% e permaneceu em *freezer*, a -80°C, por pelo menos 12 horas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm, 4°C, por 20 minutos, com exclusão, ao final, do sobrenadante. Foram, então, acrescentados 1.000µl de Etanol a 75%, em cada tubo, com nova centrifugação refrigerada a 13.200 rpm, por 5 minutos. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido em água tratada com DEPC. O material foi aliquotado, identificado e armazenado em *freezer*, a -80°C. A integridade do RNA de cada amostra foi aferida, ao final do processo, por espectrofotometria e eletroforese em agarose gel a 1%.

Para a síntese do cDNA dos miRNAs das amostras, realizou-se a transcrição reversa com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) conforme as normatizações do fabricante. Para cada 5µg de RNA, foram adicionados 0,75µl de RT Buffer, 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de *Primers* específicos, 0,5µl da enzima MultiScribe™ e 0,094µl de RNase out. Completou-se, esta mistura, com água DEPC até o volume final de 7,5µl. As amostras foram colocadas no termociclador por 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e, por fim, mantidas a 4°C.

Microarray

A análise do perfil de expressão de miRNAs, nas amostras de sangue e hipocampo, foi executada com a plataforma comercial Agilent de *microarrays* de oligonucleotídeos, precisamente com o *Human miRNA Microarray Kit* (V3) (Agilent, G4470C), que contém a seqüência de 723 miRNAs humanos e 76 virais humanos. Após a obtenção e quantificação do RNA total, separaram-se 100ng de cada amostra e, por meio do *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent, 5190-0456), gerou-se o RNA marcado com fluorocromo. Seguiu-se, para isto, o protocolo recomendado pelo fabricante. Em resumo, o RNA foi inicialmente defosforilado com a aplicação de uma *Calf Intestine Alkaline* (GE Healthcare, E2250Y) e, na seqüência, ligado a um nucleotídeo fosforilado marcado com Cianina 3 (Cyanine 3-pCp), por intermédio da enzima *T4 RNA Ligase* (GE Healthcare, E2050Y). O RNA marcado foi então purificado através de colunas *MicroBioSpin 6* (Bio-Rad, 732-6221) e hibridizado às lâminas com a utilização do *Hybridization Gasket Slide Kit* (Agilent, G2534-60014) e câmaras de hibridização

SureHyb (Agilent, G2534A). As lâminas foram incubadas por 20 horas, a 55°C e a 20 RPM em forno de hibridização. Concluído o processo, as lâminas passaram por lavagem em recipientes especiais e tampões específicos do *Wash Buffers 1 and 2 Kit* (Agilent, 5188-5327). Após a secagem, foram finalmente escaneadas e analisadas com o aplicativo *Agilent Feature Extraction (version 10)* para a quantificação dos *spots*.

PCR em tempo real

Uma vez que a técnica de *microarray* é um método amplo de análise qualitativa, posteriormente às suas análises seriais, aconselha-se a utilização de métodos quantitativos complementares.

Assim, a técnica de PCR-TR foi aplicada para confirmação da expressão diferencial dos miRNAs nas amostras de sangue e hipocampo. O método permite a quantificação dos produtos de PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação, o que contrasta totalmente com o PCR clássico, no qual se tem apenas uma quantificação final. A amplificação por reação em cadeia polimerase em tempo real foi implementada com o reagente *TaqMan Master Mix Universal* (Applied Biosystems), já a análise quantitativa da expressão dos miRNAs, com o sistema *TaqMan Assays-on-Demand* (Applied Biosystems) composto por oligonucleotídeos e sondas.

A reação de PCR amplifica o cDNA das amostras de forma exponencial com a duplicação do número de moléculas a cada ciclo. A técnica em tempo real consiste em acompanhar o número de cópias formadas a cada ciclo, que é proporcional à fluorescência emitida pelas sondas. A leitura pelo aparelho da reação de PCR-TR é fornecida na forma de número de ciclos a partir de um ponto no qual o nível de fluorescência torna-se detectável. O ciclo correspondente a tal ponto é conhecido como *cycle threshold* (CT) e foi fixado no início da fase exponencial da reação. Para cada miRNA determinou-se um *threshold* próprio e todas as leituras das amostras foram realizadas com este *threshold* individualizado.

As reações foram feitas em duplicata de amostras. Efetivou-se a amplificação em um volume final de 10 µl, constituído por 5µl do reagente *TaqMan Master Mix Universal*, 0,5 µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA

diluído. Utilizaram-se o aparelho *7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) e o *software package ABI-7500 FSDS* para a mensuração dos valores do CT. As condições padrão de amplificação foram de 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).

Tendo em conta as quantidades distintas de cDNA envolvidas nas reações, os valores de CT das amostras passam por normalização. Assim, o CT médio de cada duplicata de amostra, em um determinado miRNA, é subtraído do CT médio do controle endógeno, neste caso os genes RNU24 e RNU48, para dar origem ao Δ CT. Os valores de Δ CT, para um mesmo miRNA, podem ser comparados nas diferentes amostras e, desta forma, mensurar-se sua expressão relativa. O número de cópias dobra a cada ciclo em uma reação de PCR. Em vista disto, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra, do Δ CT médio das amostras controle, ou $\Delta\Delta$ CT, reflete a diferença entre ambas e pode ser dimensionada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.5 Análise estatística

Os dados das amostras de sangue e hipocampo foram tabulados e analisados estatisticamente, tendo como foco a comparação dos grupos Engel IA vs. Controle, Engel III-IV vs. Controle e Engel IA vs. Engel III-IV. Utilizou-se, para este propósito, o programa estatístico GraphPad Prism 6. Foram aplicados os testes D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk para verificação da distribuição gaussiana dos grupos. O desenho experimental foi de amostras não pareadas. Na avaliação dos grupos não paramétricos, empregou-se o teste Mann-Whitney, enquanto que nos paramétricos, o *unpaired t-test*. Foram considerados significantes os resultados com $p < 0,05$.

Para cada miRNA sanguíneo estipulou-se um ponto de corte ótimo na escala de expressão. A partir desta referência, foram calculadas a sensibilidade, especificidade e acurácia na predição do resultado cirúrgico. Quantificaram-se, ainda, estes mesmos indicadores em associações de miRNAs circulantes.

5. *Resultados*

Microarray

O Quadro 4 apresenta os miRNAs hiperexpressos do grupo Engel IA, que exibiram coexpressão sangue-hipocampo ($p < 0,05$).

	Engel IA			
	Sangue		Hipocampo	
	<i>fold change</i>	<i>p-value</i>	<i>fold change</i>	<i>p-value</i>
miR-663a	7,95510	0,000016194	3,01496	0,010667283
miR-501-3p	7,40533	0,000024360	3,21530	0,040233982
miR-135a-3p	7,27190	0,001039834	3,43959	0,028614460
miR-92b-3p	6,32144	0,000021816	3,34256	0,009521750
miR-198	5,91547	0,000857646	3,77208	0,004858562
miR-1238-3p	5,33615	0,008340098	4,40336	0,047473960

Quadro 4 - MiRNAs coexpressos no sangue e hipocampo do grupo Engel IA.

O Quadro 5 revela os miRNAs hiperexpressos do grupo Engel III-IV, que manifestaram coexpressão sangue-hipocampo ($p < 0,05$).

	Engel III-IV			
	Sangue		Hipocampo	
	<i>fold change</i>	<i>p-value</i>	<i>fold change</i>	<i>p-value</i>
miR-135a-3p	7,25772	0,001543587	4,87280	0,026232734
miR-501-3p	6,85106	0,000328866	2,50389	0,007237555
miR-198	6,08645	0,001482779	3,74707	0,013223980
miR-1181	5,49482	0,001673838	4,03505	0,048907298
miR-636	5,26547	0,000535738	2,76333	0,001695732
miR-1229-3p	4,50761	0,001507066	3,03286	0,022797070
miR-486-5p	4,05374	2,154320e-10	3,21267	0,042612407

Quadro 5 - MiRNAs coexpressos no sangue e hipocampo do grupo Engel III-IV.

No Quadro 6 confrontam-se os miRNAs coexpressos no sangue e hipocampo, dos grupos Engel IA e Engel III-IV (*fold change* > 2 e $p < 0,05$). Enfatiza-se, aqui, os miRNAs escolhidos para validação por PCR-TR.

	Engel IA		Engel III-IV	
	Sangue	Hipocampo	Sangue	Hipocampo
miR-663a	X	X	X	
miR-501-3p	X	X	X	X
miR-135a-3p	X	X	X	X
miR-92b-3p	X	X		X
miR-198	X	X	X	X
miR-1238-3p	X	X		
miR-1181			X	X
miR-636			X	X
miR-1229-3p		X	X	X
miR-486-5p		X	X	X

Quadro 6 - Confrontação dos miRNAs coexpressos dos grupos Engel IA e Engel III-IV; destacados em amarelo os miRNAs selecionados para validação por PCR-TR.

PCR em tempo real em amostras de sangue

Na figura 3 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no que se refere à expressão sanguínea do miR-92b-3p. Os resultados revelam aumento significativo do miR-92b-3p circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-92b-3p no grupo controle é praticamente nula.

Figura 3 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-92b-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 4 evidencia-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-92b-3p como preditor de sucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 15.000 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* acima deste número. Assim, o miR-92b-3p revelou uma sensibilidade de 26,66%, especificidade de 92,86% e acurácia de 58,62% na predição de sucesso cirúrgico.

Figura 4 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-92b-3p; #, *fold* > 75.000; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

Na figura 5 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, quanto à expressão sanguínea do miR-1238-3p. Os resultados indicam aumento significativo do miR-1238-3p circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-1238-3p no grupo controle é praticamente nula.

Figura 5 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1238-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 6 observa-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-1238-3p como preditor de sucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 11.500 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* acima deste parâmetro. Por conseguinte, o miR-1238-3p mostrou uma sensibilidade de 40,00%, especificidade de 92,86% e acurácia de 65,52% na predição de sucesso cirúrgico.

Figura 6 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1238-3p; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

Na figura 7 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no tocante à expressão sanguínea do miR-1181. Verifica-se aumento significativo do miR-1181 circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-1181 no grupo controle é praticamente nula.

Figura 7 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1181. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 8 contempla-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-1181 como preditor de sucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 3.500 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* superiores a esta referência. Desse modo, o miR-1181 exibiu uma sensibilidade de 40,00%, especificidade de 85,71% e acurácia de 62,07% na predição de sucesso cirúrgico.

Figura 8 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1181; #, *fold* > 50.000; traço contínuo, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

Na figura 9 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no que se refere à expressão sanguínea do miR-636. Os resultados demonstram aumento significativo do miR-636 circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-636 no grupo controle é praticamente nula.

Figura 9 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-636. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 10 evidencia-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-636 como preditor de insucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 80.000.000 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* acima deste número. Assim, o miR-636 revelou uma sensibilidade de 21,43%, especificidade de 93,33% e acurácia de 58,62% na predição de insucesso cirúrgico.

Figura 10 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-636; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

Na figura 11 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, quanto à expressão sanguínea do miR-1229-3p. Os resultados revelam aumento significativo do miR-1229-3p circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-1229-3p no grupo controle é praticamente nula.

Figura 11 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-1229-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 12 verifica-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-1229-3p como preditor de sucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 2.300 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* acima deste parâmetro. Por conseguinte, o miR-1229-3p mostrou uma sensibilidade de 20,00%, especificidade de 92,86% e acurácia de 55,17% na predição de sucesso cirúrgico.

Figura 12 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-1229-3p; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

Na figura 13 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no tocante à expressão sanguínea do miR-486-5p. Verifica-se aumento significativo do miR-486-5p circulante ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV. A expressão do miR-486-5p no grupo controle é praticamente nula.

Figura 13 - Representação gráfica da expressão sanguínea do miR-486-5p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 14 observa-se a dispersão das amostras dos grupos Engel IA e Engel III-IV. Não há diferença estatística entre os grupos. Para avaliação do miR-486-5p como preditor de sucesso cirúrgico, fixou-se um ponto de corte em 300.000 na escala de expressão e atribuiu-se positividade aos *folds* superiores a esta referência. Desse modo, o miR-486-5p exibiu uma sensibilidade de 33,33%, especificidade de 92,86% e acurácia de 62,07% na predição de sucesso cirúrgico.

Figura 14 - Representação gráfica da dispersão das amostras para a expressão sanguínea do miR-486-5p; #, *fold* > 4.000.000; traço horizontal, média do grupo; linha horizontal pontilhada, ponto de corte na escala de expressão.

O Quadro 7 sintetiza a avaliação dos miRNAs circulantes como preditores de sucesso ou insucesso cirúrgico. Também inclui a análise da associação do miR-1238-3p com os demais miRNAs de mesmo propósito.

	Predição	Cut Off	Sensib.	Especific.	Acurácia
miR-92b-3p	Sucesso	15.000	26,66%	92,86%	58,62%
miR-1238-3p	Sucesso	11.500	40,00%	92,86%	65,52%
miR-1181	Sucesso	3.500	40,00%	85,71%	62,07%
miR-636	Insucesso	80.000.000	21,43%	93,33%	58,62%
miR-1229-3p	Sucesso	2.300	20,00%	92,86%	55,17%
miR-486-5p	Sucesso	300.000	33,33%	92,86%	62,07%
miR-1238 / miR-1181	Sucesso	11.500 / 3.500	46,67%	85,71%	65,52%
miR-1238 / miR-92b	Sucesso	11.500 / 15.000	40,00%	92,86%	65,52%
miR-1238 / miR-1229	Sucesso	11.500 / 2.300	40,00%	92,86%	65,52%
miR-1238 / miR-486	Sucesso	11.500 / 300.000	40,00%	92,86%	65,52%

Quadro 7 - MiRNAs circulantes e respectivos indicadores de predição de sucesso ou insucesso cirúrgico; *Cut Off*, ponto de corte; Sensib., sensibilidade; Especific., especificidade.

PCR em tempo real em amostras de hipocampo

Na figura 15 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no que se refere à expressão hipocampal do miR-92b-3p. Não há diferença estatística entre os grupos.

Figura 15 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-92b-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 16 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, quanto à expressão hipocampal do miR-1238-3p. Não há diferença estatística entre os grupos.

Figura 16 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1238-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 17 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no tocante à expressão hipocampal do miR-1181. Não há diferença estatística entre os grupos.

Figura 17 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1181. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 18 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no que se refere à expressão hipocampal do miR-636. Verifica-se diminuição significativa do miR-636 hipocampal ($p < 0,05$) nos grupos Engel IA e Engel III-IV.

Figura 18 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-636. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 19 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, quanto à expressão hipocampal do miR-1229-3p. Não há diferença estatística entre os grupos.

Figura 19 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-1229-3p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

Na figura 20 comparam-se os grupos Engel IA/Controle e Engel III-IV/Controle, no tocante à expressão hipocampal do miR-486-5p. Os resultados demonstram aumento significativo do miR-486-5p hipocampal ($p < 0,05$) no grupo Engel IA.

Figura 20 - Representação gráfica da expressão hipocampal do miR-486-5p. **(A)** Grupos Engel IA e Controle. **(B)** Grupos Engel III-IV e Controle.

6. DISCUSSÃO

Microarray

Na primeira fase do experimento realizou-se o estudo qualitativo global da expressão de miRNAs em amostras do sangue e hipocampo de pacientes com evolução Engel IA e Engel III-IV. Pela técnica de *microarray*, sondou-se a expressão de 723 miRNAs humanos e 76 virais humanos, totalizando, desse modo, 799 miRNAs.

No grupo Engel IA, verificou-se hipoexpressão (*fold change* < 0,5), ou não detecção, em 90,59% dos miRNAs humanos prospectados nas amostras de sangue e 88,66% do hipocampo. Ao passo que no grupo Engel III-IV, o percentual atingiu 87,83% nas amostras de sangue e 92,53% do hipocampo.

Esta redução em larga escala da expressão de miRNAs assemelha-se ao encontrado na literatura. McKiernan et al. (2012), ao apreciarem a expressão de 380 miRNAs humanos em hipocampos ressecados de pacientes com ELTM-EH, constataram que 101 (26,58%) estavam hipoexpressos e 230 (60,53%) indetectáveis. O estudo revelou, ainda, que tal achado era decorrente dos níveis reduzidos da proteína Dicer, uma RNAase III fundamental na maturação dos miRNAs.

Assim, visando o êxito do presente trabalho, a busca por potenciais biomarcadores da ELTM-EH centrou-se no conjunto de miRNAs hiperexpressos. Adotando-se como critério de hiperexpressão o *fold change* > 2, foi observado que, do grupo Engel IA, apenas 63 miRNAs estavam hiperexpressos no sangue e 60 no hipocampo. Enquanto que, do grupo Engel III-IV, 69 miRNAs estavam hiperexpressos no sangue e 43 no hipocampo ($p < 0,05$).

No grupo Engel IA, quando se compararam os miRNAs hiperexpressos do sangue, com os hiperexpressos do hipocampo, verificou-se a coexpressão dos seguintes miRNAs: miR-663a; miR-501-3p; miR-135a-3p; miR-92b-3p; miR-198 e miR-1238-3p ($p < 0,05$). Já no grupo Engel III-IV, identificaram-se os seguintes miRNAs coexpressos: miR-135a-3p; miR-501-3p; miR-198; miR-1181; miR-636; miR-1229-3p e miR-486-5p ($p < 0,05$) (Quadros 4 e 5).

Três miRNAs (miR-501-3p, miR-135a-3p e miR-198) figuraram tanto no grupo Engel IA, quanto no Engel III-IV e, por este motivo, foram excluídos como candidatos a marcadores séricos de prognóstico cirúrgico da ELTM-EH.

Evidentemente, tais miRNAs suscitam questões que serão estudadas em pesquisas vindouras. Optou-se, também, pela exclusão do miR-663a, que embora coexpresso somente no grupo Engel IA, teve hiperexpressão sanguínea no grupo Engel III-IV ($p < 0,05$) (Quadro 6).

Seis miRNAs, portanto, revelaram-se promissores para o propósito da pesquisa e, conseqüentemente, validação por PCR-TR: miR-92b-3p; miR-1238-3p; miR-1181; miR-636; miR-1229-3p e miR-486-5p. Os miR-92b-3p e miR-1238-3p foram presumidamente relacionados a bom resultado cirúrgico e os demais a mau resultado.

PCR em tempo real

Os seis miRNAs avaliados mostraram-se hiperexpressos ($p < 0,05$) no sangue de pacientes com ELTM-EH, sem distinção estatística entre os grupos Engel IA e Engel III-IV. Nos indivíduos do grupo controle, os níveis de expressão sanguínea foram próximos de zero. É plausível, com tais resultados, a conexão destes miRNAs com a enfermidade estudada, quiçá com a própria epileptogênese.

Cada miRNA circulante foi apreciado como preditor de resultado cirúrgico, tendo como parâmetro um ponto de corte ótimo na escala de expressão. Conforme os gráficos de dispersão das amostras, os miR-92b-3p, miR-1238-3p, miR-1181, miR-1229-3p e miR-486-5p foram testados como preditores de sucesso cirúrgico, enquanto o miR-636 como preditor de insucesso.

Neste panorama, o miR-1238-3p revelou os melhores indicadores na predição de sucesso cirúrgico, com sensibilidade de 40,00%, especificidade de 92,86% e acurácia de 65,52%. O único miRNA avaliado como preditor de insucesso, o miR-636, exibiu sensibilidade de 21,43%, especificidade de 93,33% e acurácia de 58,62%. Examinou-se, também, a associação do miR-1238-3p com os outros quatro miRNAs de mesma finalidade. O conjunto miR-1238/miR-1181 produziu uma sensibilidade de 46,67%, especificidade de 85,71% e acurácia de 65,52% na predição de sucesso cirúrgico. Já os conjuntos miR-1238/miR-92b, miR-1238/miR-1229 e miR-1238/miR-486 externaram indicadores iguais ao do miR-1238-3p isolado (Quadro 7).

Considerando uma prevalência de 85,00% de resultados cirúrgicos favoráveis entre os pacientes com ELTM-EH, o miR-1238-3p demonstra um valor preditivo positivo de 96,95% e valor preditivo negativo de 21,45%. Em outras palavras, se um candidato ao tratamento cirúrgico apresentar *fold* > 11.500 à expressão sanguínea do miR-1238-3p, terá uma probabilidade de sucesso de 96,95%, e se *fold* ≤ 11.500, uma probabilidade de insucesso de 21,45%. O conjunto miR-1238/miR-1181, por sua vez, possui um valor preditivo positivo de 94,87% e valor preditivo negativo de 22,10%. Atribuindo uma prevalência de 15,00% de resultados cirúrgicos desfavoráveis, o miR-636 assume um valor preditivo positivo de 36,18% e valor preditivo negativo de 87,07%.

Na avaliação da expressão dos miRNAs no hipocampo, evidenciou-se hiperexpressão do miR-486-5p no grupo Engel IA e hipoexpressão do miR-636 nos grupos Engel IA e Engel III-IV ($p < 0,05$).

A hiperexpressão do miR-486-5p no sangue e hipocampo do grupo Engel IA representa, portanto, a única coexpressão detectada no experimento. Com isto, reforça-se a ligação do miR-486-5p com a ELTM-EH, sobretudo naqueles pacientes que evoluem com resposta cirúrgica favorável. A hipoexpressão hipocampal do miR-636 nos grupos Engel IA e Engel III-IV contrasta com sua hiperexpressão sanguínea nestes mesmos grupos. É possível que áreas epileptogênicas ocultas, muitas vezes implicadas no insucesso cirúrgico, estejam na origem da hiperexpressão sanguínea do miR-636. A mesma conjectura soa menos razoável para os miR-92b-3p, miR-1238-3p, miR-1181 e miR-1229-3p, que estão normoexpressos no hipocampo e hiperexpressos no sangue, em ambos os grupos de resultado cirúrgico.

A pesquisa empreendida é pioneira não só na avaliação de miRNAs circulantes como ferramentas de prognóstico na ELTM-EH, como na análise da expressão de miRNAs no sangue e hipocampo em humanos com epilepsia. São poucos os trabalhos com alguma relação com o assunto em questão.

Há apenas dois trabalhos, em modelos animais de epilepsia, que estudaram a expressão de miRNAs, simultaneamente, no sangue e hipocampo. Liu et al. (2010) avaliaram por *microarray* o perfil de expressão de 381 miRNAs, no sangue e cérebro de ratos, 24 horas após isquemia cerebral, hemorragia

cerebral e convulsões por cainato. Eles constataram padrões específicos de expressão de miRNAs para cada um dos tipos de injúria. Nos animais com convulsões, identificaram-se 104 miRNAs hiperexpressos e 179 hipoexpressos no hipocampo e 47 hiperexpressos e 105 hipoexpressos no sangue (*fold change* > 1,5). Dentre os miRNAs hiperexpressos, o miR-298 foi o único coexpresso no sangue e hipocampo, ao passo que dentre os hipoexpressos, verificou-se a coexpressão dos miR-155, miR-29c, miR-34b-3p, miR-98, miR-122, miR-203 e miR-450a. A pesquisa concluiu que é factível o uso de miRNAs sanguíneos como biomarcadores de injúrias cerebrais. Hu et al. (2011) investigaram por *microarray* o perfil de expressão de 113 miRNAs em hipocampus de ratos, 24 horas após a indução de estado epiléptico por lítio-pilocarpina. Foram identificados 26 miRNAs desregulados, dos quais 19 estavam hiperexpressos (*fold change* > 2) e 7 hipoexpressos (*fold change* < 0,5). Destes, selecionaram-se randomicamente os hiperexpressos miR-34a, miR-22 e miR-125a e o hipoexpresso miR-21, para serem quantificados no sangue e hipocampo por PCR-TR. Confirmou-se, então, a coexpressão sangue-hipocampo dos quatro miRNAs testados. A análise por bioinformática, que incluiu 16 miRNAs hiperexpressos e 7 hipoexpressos, constatou o envolvimento da via de sinalização da MAP quinase e da via de potencialização de longo prazo, ambas possivelmente envolvidas nos mecanismos moleculares de morte neuronal, inflamação e epileptogênese.

Os demais estudos abordam, unicamente, a expressão de miRNAs no hipocampo, seja em humanos, seja em modelos animais de epilepsia. Na sequência, alguns trabalhos ilustrativos.

Aronica et al. (2010) quantificaram a expressão do miR-146a, por PCR-TR, em hipocampus de pacientes com ELTM-EH e em hipocampus de ratos, 24 horas, 7 dias e 3 a 4 meses após a indução do estado epiléptico por estimulação elétrica hipocampal. A escolha do miR-146a baseou-se em sua prévia associação com processos imunes e inflamatórios. Eles notaram pronunciada hiperexpressão do miR-146a nos hipocampus de ratos, nas fases aguda e crônica do estado epiléptico, e também nos hipocampus de pacientes com ELTM-EH, em especial nas regiões hipocampais de maior perda neuronal e gliose. Concluiu-se que o aumento da expressão do miR-146a poderia indicar seu envolvimento na

modulação da resposta inflamatória da ELTM-EH, o que o tornaria um candidato a alvo terapêutico.

Song et al. (2011) analisaram por *microarray* o perfil de expressão de 349 miRNAs em hipocampus de ratos, 60 dias após a indução de estado epiléptico por lítio-pilocarpina. Eles encontraram 23 miRNAs desregulados, compreendendo 18 hiperexpressos e 5 hipoexpressos. Em seguida, escolheram um hiperexpresso, o miR-23a/b, e um hipoexpresso, o let-7e, para serem mensurados no hipocampo, por PCR-TR, em diferentes momentos após a indução do estado epiléptico. Comprovou-se, assim, que a expressão de tais miRNAs estava consistentemente alterada, ora positivamente, ora negativamente, do momento zero até 50 dias após a indução do estado epiléptico.

Hu et al. (2012) apreciaram por *microarray* o perfil de expressão de 350 miRNAs em hipocampus de ratos, dois meses após a indução de estado epiléptico por lítio-pilocarpina. Foram detectados 24 miRNAs diferencialmente expressos, compostos por 9 hiperexpressos e 15 hipoexpressos (*fold change* > 1,5). Os hiperexpressos miR-146a, miR-210 e miR-27a e os hipoexpressos miR-135b e miR-33 foram validados por PCR-TR. Outro miRNA hiperexpresso, o miR-34a, previamente conhecido como pró-apoptótico, foi validado por PCR-TR em quatro momentos após a indução da epilepsia: um dia; sete dias; duas semanas e dois meses. Eles observaram, ainda, que a administração do antagomir específico do miR-34a, no ventrículo lateral dos ratos com epilepsia, reduzia a expressão hipocampal do miR-34a e a atividade da proteína Caspase-3.

Kaalund et al. (2014) examinaram por *microarray* o perfil de expressão de miRNAs em hipocampus de pacientes com ELTM-EH. Eles identificaram 30 miRNAs desregulados, constituídos por 25 hiperexpressos e 5 hipoexpressos (*fold change* > 2). Na sequência, avaliaram o perfil de expressão dos 30 miRNAs em hipocampus de porcos domésticos, durante cinco estágios do desenvolvimento embrionário. Observou-se que 14 miRNAs estavam diferencialmente expressos (*fold change* > 2) e, a partir da sondagem por bioinformática, reconheceram os miR-204, miR-218 e miR-338-5p como os mais associados à regulação da orientação axonal. A quantificação dos três miRNAs, por PCR-TR, em hipocampus de pacientes com ELTM-EH, evidenciou a

hipoexpressão dos miR-204 e miR-218. Por fim, os estudos *in silico* e *luciferase reporter assays* esclareceram que o miR-218 regulava negativamente quatro genes implicados na orientação axonal e/ou plasticidade sináptica, o *ROBO1*, *GRM1*, *SLC1A2* e *GNAI2*, enquanto o miR-204 regulava negativamente o gene *GRM1*.

Os seis miRNAs aqui abordados foram analisados por ferramentas de bioinformática. Revelou-se que o miR-92b-3p modula os genes *PRMT5* e *CDKN1C* e participa de vias do ciclo celular e do transporte de RNA. Já o miR-486-5p atua no gene *CD40* e está relacionado a doenças autoimunes ou processos que envolvem o sistema imunológico, como lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite de Hashimoto, rede imunológica intestinal para a produção de IgA, imunodeficiência primária, asma e rejeição de aloenxertos. Pesquisas futuras deverão elucidar a real colaboração destes miRNAs na ELTM-EH.

7. CONCLUSÕES

1. Os miR-92b-3p, miR-1238-3p, miR-1181, miR-636, miR-1229-3p e miR-486-5p mostraram-se hiperexpressos no sangue de pacientes com ELTM-EH, sem diferença estatística entre os grupos Engel IA e Engel III-IV. A coexpressão sangue-hipocampo foi constatada, apenas, para o miR-486-5p no grupo Engel IA. A hipoexpressão hipocampal do miR-636 contrasta com sua hiperexpressão sanguínea, em ambos os grupos de resultado cirúrgico.
2. Na avaliação dos miRNAs circulantes como preditores de sucesso cirúrgico, o miR-1238-3p exibiu uma sensibilidade de 40,00%, especificidade de 92,86% e acurácia de 65,52%. O conjunto miR-1238/miR-1181 externou uma sensibilidade de 46,67%, especificidade de 85,71% e acurácia de 65,52%. O único miRNA circulante apreciado como preditor de insucesso cirúrgico, o miR-636, revelou uma sensibilidade de 21,43%, especificidade de 93,33% e acurácia de 58,62%.

8. REFERÊNCIAS

ALESSIO, A., PEREIRA, F. R. S., SERCHELI, M. S., RONDINA, J. M., OZELO, H. B., BILEVICIUS, E., PEDRO, T., COVOLAN, R. J. M., DAMASCENO, B. P., CENDES, F. Brain plasticity for verbal and visual memories in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: an fMRI study. *Human Brain Mapping*, v. 34, n. 1, p. 186-199, 2013.

AMARAL, D. G., SCHARFMAN, H. E., LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, v. 163, p. 3-22, 2007.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., VALENÇA, M. M., VELASCO, T. R., LEITE, J. P. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006.

ARONICA, E., FLUITER, K., IYER, A., ZUROLO, E., VREIJLING, J., VAN VLIET, E. A., BAAYEN, J. C., GORTER, J. A. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *European Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 6, p. 1100-1107, 2010.

AULL-WATSCHINGER, S., PATARAIA, E., CZECH, T., BAUMGARTNER, C. Outcome predictors for surgical treatment of temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, v. 49, n. 8, p. 1308-1316, 2008.

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

BERG, A. T., BERKOVIC, S. F., BRODIE, M. J., BUCHHALTER, J., CROSS, J. H., VAN EMDE BOAS, W., ENGEL, J., FRENCH, J., GLAUSER, T. A., MATHERN, G. W., MOSHÉ, S. L., NORDLI, D., PLOUIN, P., SCHEFFER, I. E. 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 21 st century. *Epilepsia*, v. 52, n. 6, p. 1058-1062, 2011.

BLÜMCKE, I., CORAS, R., MIYATA, H., ÖZKARA, C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathology*, v. 22, n. 3, p. 402-411, 2012.

BLÜMCKE, I., THOM, M., ARONICA, E., ARMSTRONG, D. D., BARTOLOMEI, F., BERNASCONI, A., BERNASCONI, N., BIEN, C. G., CENDES, F., CORAS, R., CROSS, H., JACQUES, T. S., KAHANE, P., MATHERN, G. W., MIYATA, H., MOSHÉ, S. L., OZ, B., ÖZKARA, Ç., PERUCCA, E., SISODIYA, S., WIEBE, S., SPREAFIGO, R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, v. 54, n. 7, p. 1315-1329, 2013.

BORGES, M. A., BARROS, E. P., ZANETTA, D. M. T., BORGES, A. P. P. Prevalence of epilepsy in Bakairi indians from Mato Grosso state, Brazil. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 60, n. 1, p. 80-85, 2001.

BORGES, M. A., MIN, L. L., GUERREIRO, C. A. M., YACUBIAN, E. M. T., CORDEIRO, J. A., TOGNOLA, W. A., BORGES, A. P. P., ZANETTA, D. M. T. Urban prevalence of epilepsy: populational study in São José do Rio preto, a medium-sized city in Brazil. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 62, n. 2-A, p. 199-205, 2004.

CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F., CROCE, C. M. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CENDES, F., SAKAMOTO, A. C., SPREAFIGO, R., BINGAMAN, W., BECKER, A. J. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, v. 128, n. 1, p. 21-37, 2014.

CHANG, E. F., ENGLLOT, D. J., VADERA, S. Minimally invasive surgical approaches for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, v. 47, p. 24-33, 2015.

CHEN, P., SU, J., HUNG, M. Dysregulation of microRNAs in cancer. *Journal of Biomedical Science*, v. 19, n. 1, p. 90-97, 2012.

CHEN, X., BA, Y., MA, L., CAI, X., YIN, Y., WANG, K., GUO, J., ZHANG, Y., CHEN, J., GUO, X., LI, Q., LI, X., WANG, W., ZHANG, Y., WANG, J., JIANG, X., XIANG, Y., XU, C., ZHENG, P., ZHANG, J., LI, R., ZHANG, H., SHANG, X., GONG, T., NING, G., WANG, J., ZEN, K., ZHANG, J., ZHANG, C. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, v. 18, n. 10, p. 997-1006, 2008.

DANTAS, F. G., RIBEIRO, C. D., SILVA, W. R. JR. Epilepsia em celebridades. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 14, n. 2, p. 71-75, 2008.

DE BOER, H. M. Epilepsy stigma: moving from a global problem to global solutions. *Seizure*, v. 19, n. 10, p. 630-636, 2010.

DE BOER, H. M., MOSHÉ, S. L., KOREY, S. R., PURPURA, D. P. ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy: a partnership that works. *Current Opinion in Neurology*, v. 26, n. 2, p. 219-225, 2013.

DE FELICE, B., GUIDA, M., GUIDA, M., COPPOLA, C., DE MIERI, G., COTRUFO, R. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, v. 508, n. 1, p. 35-40, 2012.

DESTRIEUX, C., BOURRY, D., VELUT, S. Surgical anatomy of the hippocampus. *Neurochirurgie*, v. 59, n. 4-5, p. 149-158, 2013.

DÍAZ-PRADO, S., CICIONE, C., MUIÑOS-LÓPEZ, E., HERMIDA-GÓMEZ, T., OREIRO, N., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C., BLANCO, F. J. Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 13, n. 144, 2012.

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., AVANSINI, S. H., VIEIRA, A. S., LOPES-CENDES, I. 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.

EADIE, M. J. Epilepsy - from the Sakikku to Hughlings Jackson. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 2, n. 2, p. 156-162, 1995.

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., OJEMANN, L. M. Outcome with respect to epileptic seizures. In: Engel, J. JR. (Ed.). Surgical treatment of the epilepsies. 2nd ed. New York: Raven Press, 1993. p. 609-621.

ENGEL, J. JR. More on the history of temporal lobe surgery. *Epilepsia*, v. 49, n. 8, p. 1481-1482, 2008.

ETHERIDGE, A., LEE, I., HOOD, L., GALAS, D., WANG, K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation Research*, v. 717, n. 1-2, p. 85-90, 2011.

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., VAN EMDE BOAS, W., BLUME, W., ELGER, C., GENTON, P., LEE, P., ENGEL, J. JR. 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.

FRIEDMAN, R. C., FARH, K. K., BURGE, C. B., BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009.

GAMBARDELLA, A., LABATE, A., GIALLONARDO, A. T., AGUGLIA, U. Familial mesial temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia*, v. 50, p. 55-57, 2009. Supplement 5.

GE, S., SAILOR, K. A., MING, G., SONG, H. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Physiology*, v. 586, n. 16, p. 3759-3765, 2008.

GE, Y., ZHAO, K., QI, Y., MIN, X., SHI, Z., QI, X., SHAN, Y., CUI, L., ZHOU, M., WANG, Y., WANG, H., CUI, L. Serum microRNA expression profile as a biomarker for the diagnosis of *pertussis*. *Molecular Biology Reports*, v. 40, n. 2, p. 1325-1332, 2013.

HENSHALL, D. C. MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications. *Current Opinion in Neurology*, v. 27, n. 2, p. 199-205, 2014.

HILL, D., FALCONER, M. A., PAMPIGLIONE, G., LIDDELL, D. W. Discussion on the surgery of temporal lobe epilepsy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, v. 46, n. 11, p. 965-976, 1953.

HOY, A. M., BUCK, A. H. Extracellular small RNAs: what, where, why? *Biochemical Society Transactions*, v. 40, n. 4, p. 886-890, 2012.

HU, K., ZHANG, C., LONG, L., LONG, X., FENG, L., LI, Y., XIAO, B. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience Letters*, v. 488, n. 3, p. 252-257, 2011.

HU, K., XIE, Y. Y., ZHANG, C., OUYANG, D. S., LONG, H. Y., SUN, D. N., LONG, L. L., FENG, L., LI, Y., XIAO, B. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neuroscience*, v. 13, n.115, 2012.

IORIO, M. V., CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 34, p. 5848-5856, 2009.

JANSZKY, J., JANSZKY, I., SCHULZ, R., HOPPE, M., BEHNE, F., PANNEK, H. W., EBNER, A. Temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: predictors for long-term surgical outcome. *Brain*, v. 128, pt. 2, p. 395-404, 2005.

JEONG, S. W., LEE, S. K., HONG, K. S., KIM, K. K., CHUNG, C. K., KIM, H. Prognostic factors for the surgery for mesial temporal lobe epilepsy: longitudinal analysis. *Epilepsia*, v. 46, n. 8, p. 1273-1279, 2005.

JIN, X. F., WU, N., WANG, L., LI, J. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 33, n. 5, p. 601-613, 2013.

KAALUND, S. S., VENO, M. T., BAK, M., MOLLER, R. S., LAURSEN, H., MADSEN, F., BROHOLM, H., QUISTORFF, B., ULDALL, P., TOMMERUP, N., KAUPPINEN, S., SABERS, A., FLUITER, K., MOLLER, L. B., NOSSENT, A. Y., SILAHTAROGLU, A., KJEMS, J., ARONICA, E., TÜMER, Z. Aberrant expression

of miR-218 and miR-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis – convergence on axonal guidance. *Epilepsia*, v. 55, n. 12, p. 2017-2027, 2014.

KALE, R. Bringing epilepsy out of the shadows. *BMJ*, v. 315, n. 7099, p. 2-3, 1997.

KASPERAVICIUTE, D., CATARINO, C. B., MATARIN, M., LEU, C., NOVY, J, et al. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain*, v. 136, n. 10, p. 3140-3150, 2013.

KUMAR, P. DEZSO, Z., MACKENZIE, C., OESTREICHER, J., AGOULNIK, S., BYRNE, M., BERNIER, F., YANAGIMACHI, M., AOSHIMA, K., ODA, Y. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *Plos One*, v. 8, n. 7, e69807, 2013.

KWAN, P., ARZIMANOGLU, A., BERG, A. T., BRODIE, M. J., HAUSER, W. A., MATHERN, G., MOSHÉ, S. L., PERUCCA, E., WIEBE, S., FRENCH, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010.

LAWRIE, C. H., GAL, S., DUNLOP, H. M., PUSHKARAN, B., LIGGINS, A. P., PULFORD, K., BANHAM, A. H., PEZZELLA, F., BOULTWOOD, J., WAINSCOAT, J. S., HATTON, C. S., HARRIS, A. L. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, v. 141, n. 5, p. 672-675, 2008.

LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LI, Y., KOWDLEY, K. V. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, v. 10, n. 5, p. 246-253, 2012.

LIANG, Y., RIDZON, D., WONG, L., CHEN, C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, v. 8, n. 166, 2007.

LIU, D., TIAN, Y., ANDER, B. P., XU, H., STAMOVA, B. S., ZHAN, X., TURNER, R. J., JICKLING, G., SHARP, F. R. 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.

LIU, X., LUO, H. N., TIAN, W. D., LU, J., LI, G., WANG, L., ZHANG, B., LIANG, B. J., PENG, X. H., LIN, S. X., PENG, Y., LI, X. P. Diagnostic and prognostic value of plasma microRNA deregulation in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, v. 14, n. 12, 2013.

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.

MALMGREN, K., THOM, M. Hippocampal sclerosis - origins and imaging. *Epilepsia*, v. 53, p. 19-33, 2012. Supplement 4.

MARINO, R. JR., CUKIERT, A., PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo da prevalência. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 44, n. 3, p. 243-254, 1986.

MCKIERNAN, R. C., JIMENEZ-MATEOS, E. M., BRAY, I., ENGEL, T., BRENNAN, G. P., SANO, T., MICHALAK, Z., MORAN, C., DELANTY, N., FARRELL, M., O'BRIEN, D., MELLER, R., SIMON, R. P., STALLINGS, R. L., HENSHALL, D. C. Reduced mature microRNA levels in association with Dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Plos One*, v. 7, n. 5, e35921, 2012.

MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIAN, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S., STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B., TEWARI, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 30, p. 10513-10518, 2008.

MONGIAT, L. A., SCHINDER, A. F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 6, p. 1055-1061, 2011.

NGUGI, A. K., KARIUKI, S. M., BOTTOMLEY, C., KLEINSCHMIDT, I., SANDER, J. W., NEWTON, C. R. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, v. 77, n. 10, p. 1005-1012, 2011.

NOVO testamento. Tradução Fr. Mateus Hoepers. 11. ed. Petrópolis: Vozes, 1997.

PALMERO, E. I., de CAMPOS, S. G. P., CAMPOS, M., de SOUZA, N. C. N., GUERREIRO, I. D. C., CARVALHO, A. L., MARQUES, M. M. C. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, n. 3, p. 363-370, 2011.

PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MÜLLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E., RUVKUN, G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, v. 408, n. 6808, p. 86-89, 2000.

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

REYNOLDS, E. H. The ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy: bringing epilepsy "out of the shadows". *Epilepsy & Behavior*, v. 1, n. 4, p. S3-S8, 2000.

ROLLINS, B., MARTIN, M. V., MORGAN, L., VAWTER, M. P. 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.

ROTH, P., WISCHHUSEN, J., HAPPOLD, C., CHANDRAN, P. A., HOFER, S., EISELE, G., WELLER, M., KELLER, A. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Journal of Neurochemistry*, v. 118, n. 3, p. 449-457, 2011.

SÀNCHEZ, J., CENTANARO, M., SOLÍS, J., DELGADO, F., YÉPEZ, L. Factors predicting the outcome following medical treatment of mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. *Seizure*, v. 23, n. 6, p. 448-453, 2014.

SANO, K. Hippocampus and epilepsy surgery. *Epilepsia*, v. 38, p. 4-10, 1997. Supplement 6.

SAVITR SASTRI, B. V., ARIVAZHAGAN, A., SINHA, S., MAHADEVAN, A., BHARATH, R. D., SAINI, J., JAMUNA, R., KUMAR, J. K., RAO, S. L., CHANDRAMOULI, B. A., SHANKAR, S. K., SATISHCHANDRA, P. Clinico-pathological factors influencing surgical outcome in drug resistant epilepsy secondary to mesial temporal sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 340, n. 1-2, p. 183-190, 2014.

SIOMI, H., SIOMI, M. C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular Cell*, v. 38, n. 3, p. 323-332, 2010.

SONG, J., CHRISTIAN, K. M., MING, G., SONG, H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Developmental Neurobiology*, v. 72, n. 7, p. 1032-1043, 2012.

SONG, Y. J., TIAN, X. B., ZHANG, S., ZHANG, Y. X., LI, X., LI, D., CHENG, Y., ZHANG, J. N., KANG, C. S., ZHAO, W. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Research*, v. 1387, p. 134-140, 2011.

STAFSTROM, C. E. The role of the subiculum in epilepsy and epileptogenesis. *Epilepsy Currents*, v. 5, n. 4, p. 121-129, 2005.

TIEN, R. D., FELSBERG, G. J., CRAIN, B. Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *American Journal of Roentgenology*, v. 159, n. 6, p. 1309-1313, 1992.

TONI, N., SULTAN, S. Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 6, p. 1062-1068, 2011.

VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., SJÖSTRAND, M., LEE, J. J., LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VALE, F. L., POLLOCK, G., BENBADIS, S. R. Failed epilepsy surgery for mesial temporal lobe sclerosis: a review of the pathophysiology. *Neurosurgical Focus*, v. 32, n. 3, p. E9, 2012.

VELU, V. K., RAMESH, R., SRINIVASAN, A. R. Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 6, n. 10, p. 1791-1795, 2012.

WANG, W. S., LIU, L. X., LI, G. P., CHEN, Y., LI, C. Y., JIN, D. Y., WANG, X. L. Combined serum CA19-9 and miR-27a-3p in peripheral blood mononuclear cells to diagnose pancreatic cancer. *Cancer Prevention Research*, v. 6, n. 4, p. 331-338, 2013.

WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZHANG, S., HUANG, D. Y., HUANG, K. W., LEE, M. J., GALAS, D. J., WANG, K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, v. 56, n. 11, p. 1733-1741, 2010.

WEN, H. T., RHOTON, A. L. JR., de OLIVEIRA, E., CARDOSO, A. C., TEDESCHI, H., BACCANELLI, M., MARINO, R. JR. Microsurgical anatomy of the temporal lobe: part 1: mesial temporal lobe anatomy and its vascular relationships as applied to amygdalohippocampectomy. *Neurosurgery*, v. 45, n. 3, p. 549-592, 1999.

WEILAND, M., GAO, X., ZHOU, L., MI, Q. 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.

WIESHMANN, U. C., LARKIN, D., VARMA, T., ELDRIDGE, P. Predictors of outcome after temporal lobectomy for refractory temporal lobe epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 118, n. 5, p. 306-312, 2008.

ZHANG, B., PAN, X., COBB, G. P., ANDERSON, T. A. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2007.