# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão dos microRNAs-184, -190a-5p e -493-3p e sua correlação com o controle das crises epilépticas em pacientes operados por Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

Aluna: Renata Nacasaki Silvestre

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

Ribeirão Preto, SP 2016

#### Renata Nacasaki Silvestre

# Avaliação da expressão dos microRNAs-184, -190a-5p e -493-3p e sua correlação com o controle das crises epilépticas em pacientes operados por Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

Versão corrigida. A versão original está disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder Serafini. Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli. Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silvestre, Renata Nacasaki

Avaliação da expressão dos microRNAs-184, -190a-5p e -493-3p e sua correlação com o controle das crises epilépticas em pacientes operados por Epilepsia do Lobo Temporal Mesial. Ribeirão Preto, 2016.

68p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia Experimental

Orientador: Luciano Neder Serafini Coorientadora: Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

1. microRNA 2. expressão gênica 3. miR-184 4.miR-190a-5p 5. miR-493-3p 6. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.

# **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome: Renata Nacasaki Silvestre

Título: Avaliação da expressão dos microRNAs-184, -190a-5p e -493-3p e sua correlação com o controle das crises epilépticas em pacientes operados por

Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Aprovado em:

#### Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	

#### Dedicatória

Em primeiro lugar, dedico esse trabalho a Deus, Criador de todas as coisas, inclusive da ciência e do conhecimento, também a Nossa Senhora, cuja intercessão eu tenho recorrido desde sempre.

Dedico esse trabalho a meus pais, Cacilda Nacasaki e Gilberto Silvestre que foram a base de tudo na minha vida e me ensinaram a lutar pelos meus ideais e me deram total suporte para realizar cada conquista, inclusive essa.

Dedico esse trabalho a meu avô, João Nacasaki, cuja presença representa uma das minhas maiores alegrias.

Dedico esse trabalho a todos os meus amigos, que se tornaram verdadeira família e me ajudaram a superar todas as barreiras e obstáculos.

#### **Agradecimentos**

Agradeço enormemente a Deus, pelo dom da vida, por dar sentido a minha existência e por ter me concedido as maiores alegrias, grandes desafios e a verdadeira felicidade. À Santa Maria, por sua fantástica intercessão e também a todos os santos.

À cada paciente que colaborou com o trabalho, mesmo sem tê-los conhecido. Se a ciência e a pesquisa evoluem, é por causa da colaboração de cada um deles.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Neder Serafini, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por todo conhecimento compartilhado. Obrigada por ter acreditado em mim e colaborado para meu crescimento pessoal e profissional.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Daniela Tirapelli, que deu todo o suporte, tanto profissional quanto pessoal para a realização dessa pesquisa, uma pessoa que passei a admirar muito.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr., por ter gentilmente contribuído com esse trabalho, dando todo o suporte científico necessário.

A técnica do laboratório de Neuropatologia, Deise Lúcia Chesca, cuja ajuda, amizade e carinho foram preciosos nesse tempo.

As técnicas do laboratório de Biologia Molecular, Luana Lourenço e Renata Sicchieri e ao pós-doutorando Fermino Neto, por todo o suporte durante a pesquisa. Sem a ajuda profissional de vocês, esse trabalho não estaria completo. Também a todos os pós-graduandos do laboratório, cuja alegria me motivou a seguir em frente.

Obrigada aos funcionários do departamento de Patologia e Medicina Legal: Camila Zambonini Gimenes, Rosângela Paiva, Rodrigo Miotto, Neide Gonçalves e Felipe Denipotte, que pacientemente me deram toda a atenção e me ajudaram sempre que precisei. Também agradeço imensamente as mulheres que cuidam com carinho e dedicação da limpeza do departamento, em especial a Dona Maria José, pois ver o sorriso delas muitas vezes foi o que mudou o meu dia.

Ao prof. Dr. Geraldo Cássio Reis por ter realizado as análises estatísticas desse trabalho.

À pós-graduanda Amanda Freire de Assis Ricardi, por ter auxiliado nas análises bioinformáticas dessa pesquisa.

Agradeço grandemente a minha família, base fundamental da nossa vida. A minha mãe, Cacilda, por sua paciência, serenidade e suporte em todos os momentos. Agradeço por ela ser uma inspiração para mim, por ter formado meu caráter e me ensinado a enfrentar todas as lutas, sem nunca desistir. Se hoje sou feliz, foi por causa do seu amor, que foi capaz de grandes sacrifícios por mim. A meu pai, Gilberto, por torcer sempre pela minha felicidade e por estar ao meu lado e me animar a seguir adiante. Aos meus irmãos Thaísa, Nathália e Arthurzinho por alegrarem o meu viver e estarem sempre comigo, apesar da distância. Agradeço a meu avô João, meus tios Flávio e Ivanilda e a todos os meus primos, Bianca, Maria Eduarda, Flávio Filho e Bruno Antônio e demais familiares que estiveram presentes em todos os importantes momentos da minha existência, inclusive nesse.

Às amigas do laboratório de Neuropatologia: Niele Mendes, Nathália Schiavotelo, Bruna Zanetti, Camila Foresto e Isabela Martins pelas alegrias compartilhadas, pelas preocupações divididas e por todo apoio e conhecimento trocados. Vocês tornaram tudo mais feliz e divertido e foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço em especial a Niele por ter auxiliado na formatação dessa dissertação, ela é muito profissional (rs)! Também aos amigos Muhammad Nawaz, Farah Fátima e Jean Gonzales pelo aprendizado cultural e por terem me motivado a sempre acreditar na ciência e na pesquisa.

A todas as amigas do departamento de Patologia e aquelas que conheci na pós graduação pela USP, em especial: Andressa Duarte, Monyk Braga, Flávia Turcato, Lívia Valenti, Juliana Zanetti, Daianne Maciely Fantacini e Samara Rodrigues. Agradeço imensamente por todo apoio, pelos almoços, pelos "happyhours" (rs) e por toda amizade e confiança, vocês nem imaginam o quanto tudo foi importante para mim, e ainda é. E a Sam, agradeço também por ter me ajudado a manter tudo organizado (na medida do possível rs) e por ter me presenteado com uma amizade sorridente e sincera, bem sincera (rsrs).

A minha amiga Talita Maia e Silva (*in memoriam*), por ter me dado todo apoio possível (em especial na parte alimentar e nos cuidados do lar! Rsrs) e por toda a amizade que me foi muito preciosa. Ela me ensinou muito, principalmente a cuidar das pequenas coisas, e a fazer tudo com muito carinho. Peço que continue me ajudando lá do Céu.

A família Maia e Silva: a dona Rita, Seu Aires e a querida Alana, por terem se tornado família para mim também.

As amigas distantes que continuam sempre presentes: Natacha Azussa Migita (Kudo), Ana Beatriz Missio (Bibi), Rebeca Serrano (Band), Meire Silva, Alana Maia e Silva (Dig), Elaine Uehara (Ploc), Ana Monetta e Bianca Muniz, muito obrigada, pois serão sempre mais que especiais e importantes. Pude sentir o apoio de cada uma, mesmo quando a saudade apertava e não era possível a presença, sabia que vocês estavam perto de alguma forma.

Agradeço as minhas amigas queridas cuja presença e suporte transformaram o impossível em realidade: Beatriz Willemsens, Karina Julia Carmona, Graziela Viol, Elisa Cimitan Mendes, Samara Rodrigues Duarte, Patrícia Furlan, Nathália Carelli, Regina Célia Gatto, Denise Campos, Gabriela Mendes Rodrigues, Maria Inês Regina, Deborah Bulha, Karina Luiza Sarti, Jacqueline Faustino, Tereza Branco e Maria Lara Iorio Moraes. Tenho um carinho imenso por cada uma, e a amizade de vocês é valiosa demais para mim. Se o riso foi mais solto, os momentos mais alegres e as contrariedades fizeram sentido, foi por causa de cada uma de vocês, muito obrigada.



# **SUMÁRIO**

1. Introdução	14
1.1. Epilepsia: aspectos gerais	14
1.2. Hipocampo e sua importância na Epilepsia	18
1.3. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial	19
1.4. Mecanismos moleculares da Epilepsia	23
1.4.1. Receptores moleculares do Sistema Nervoso Central	23
1.4.2. Aspectos genéticos da Epilepsia	24
1.4.3. microRNAs e Epilepsia	25
1.4.4. microRNAs-184, -493-3p e -190a-5p	28
2. Hipótese Operacional	31
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Materiais e métodos	33
4.1. Amostras utilizadas	33
4.1.1. Casuística	33
4.2. Extração de RNA tecidual	34
4.3. Quantificação e Análise da integridade das amostras de RNA tota	ıl35
4.4. Expressão dos microRNAs	35
4.4.1. cDNA para microRNAs 184, 493-3p e 190a-5p	35
4.4.2. Análise da expressão dos microRNAs pela técnica de PCR que em tempo real	
4.5. Análise estatística	
4.6. Análise por Bioinformática	
5. Resultados	
5.1. Análise das expressões de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p.	
5.1.1. microRNA-184	
5.1.2. microRNA-190a-5p	
5.1.3.microRNA-493-3p	
5.2. Análise por ferramenta de bioinformática	
5.2.1. Alvos de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p	
6. Discussão	49
7. Conclusões	
8. Perspectivas	
9. Referências	58

10.	Anexos	6	, -	2
		v	٠.	,

# Lista de Gráficos

Gráfico 1. Análise de expressão do miR-184 em relação aos três grupos de	
pacientes (controle, Engel I e Engel III ou IV) ( <i>p</i> =0,001)	38
Gráfico 2. Expressão de miR-184 nos grupos Controle e Engel I. Nota-se uma	
evidente diminuição da expressão desse microRNA no grupo Engel I em relação a	O£
grupo Controle ( $p$ =0,001)	39
Gráfico 3. Análise de expressão de miR-184 entre grupos Engel I e Engel III/IV.	
Nota-se um evidente aumento da expressão desse microRNA no grupo com pior	
controle das crises (Engel III/IV) ( <i>p</i> =0,003)	40
Gráfico 4. Curva ROC da análise comparativa entre grupos Controle vs Engel I	
quanto a expressão de miR-184. O eixo das abscissas mostra a especificidade	
enquanto o eixo das ordenadas mostra a sensibilidade do teste	41
Gráfico 5. Curva ROC na análise comparativa entre grupos Engel I vs Engel III/IV	
quanto a expressão de miR-184. O eixo das abscissas mostra a especificidade	
enquanto o eixo das ordenadas mostra a sensibilidade do teste	42
Gráfico 6. Análise de expressão do miR-190a-5p em relação aos três grupos	
(controle, Engel I e Engel III ou IV) (p=0,24)	43
Gráfico 7. Análise de expressão do miR-493-3p em relação aos três grupos	
(controle, Engel I e Engel III ou IV) ( $p$ =0,28)	44

# Lista de Tabelas

ontra a Epilepsia (ILAE)16 abela 2. Classificação sobre o controle de crises epilépticas no pós-cirúrgico de
abela 2. Classificação sobre o controle de crises epilépticas no pós-cirúrgico de
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
acientes operados por epilepsia, segundo Engel17
abela 3. Informações sobre os pacientes com ELTM que foram operados e cujo
agmento de hipocampo foi analisado. São relatados a idade, o sexo e o diagnóstico
stopatológico34
abela 4. Dados das análises estatísticas da expressão do miR-184 para cada grupo
Controle, Engel I e Engel III ou IV)38
abela 5 – Dados da análise estatística da expressão do miR-190a-5p para cada
rupo (controle, Engel I e Engel III ou IV)43
abela 6 - Dados da análise estatística da expressão do miR-493-3p para cada
rupo (controle, Engel I e Engel III ou IV)44
abela 7. Principais genes alvos de miR-184 que participam de processos biológicos
elevantes para epilepsia45
abela 8. Principais genes alvos de miR-190a-5p que participam de processos
ológicos relevantes para a epilepsia46
abela 9. Principais genes alvos de miR-493-3p que participam de processos
ológicos relevantes para a epilepsia47
abela 10 - Valores da valores de <i>fold-change</i> que representam a expressão de
iiR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p, comparando-se os grupos controle, Engel I e
ngel III ou IV63
abela 11 – Identificação dos genes alvos do microRNA-184. A sequência do miR
ga-se na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa
niRWalk, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram
entificados para esse microRNA**. NCBI*: National Center of Biotechnology
formation64
abela 12 - Identificação dos genes alvos do microRNA-190a-5p. A sequência do
iR liga-se na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa
niRWalk, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram
lentificados para esse microRNA**. NCBI*: National Center of Biotechnology
formation65
abela 13 - Identificação dos genes alvos do microRNA-493-3p. A sequência do miR
ga-se na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa
niRWalk, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram
lentificados para esse microRNA**. NCBI*: National Center of Biotechnology
formation66

# Lista de Figuras

Figura 1. Cortes histológicos de hipocampos emblocados em parafina (5µm). A,C e E: Hipocampo preservado de indivíduo sem epilepsia. B, D, F e G: hipocampo com esclerose
Figura 2 –Esquema do processo de síntese da molécula de microRNA retirado do rabalho de Winter J e colaboradores (2009) <sup>49</sup> 20
Figura 3. Validação in silico da interação entre miR-184 e possíveis genes alvos pelo programa <i>RNAHybrid</i> . (A) Gene BCL2-like ( <i>B cell lymphoma 2 like</i> - célula B de
nfoma 2) (B) Gene AKT2 ( <i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2</i> )40 Figura 4. Validação <i>in silico</i> da interação entre miR-190a-5p e possíveis genes alvos pelo programa <i>RNAHybrid</i> . (A) Gene NEUROD1 ( <i>Neuronal differentiation 1</i> ) (B) Gene KCNQ5 ( <i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member</i>
5)4'
Figura 5. Validação <i>in silico</i> da interação entre miR-493-3p e possíveis genes alvos
oelo programa <i>RNAHybrid</i> . (A) PHLPP2 ( <i>PH Domain and leucine rich Repeat proteir</i>
hosphatase 2) e (B) SULF1 ( <i>Endosulfatase 1</i> )49

#### Lista de Abreviações

% - Percentagem

Δ – delta

°C - graus Celsius

µg – micrograma

µL - microlitro

um – micrômetro

mL - mililitro

**AKT2** – Homólogo 2 do oncogene viral v-AKT de Timoma Murino (*v-AKT Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2*)

BCL2L1 - Célula B de linfoma (B cell lymphoma 2 like)

BFNC - convulsão neonatal familial benigna

BHE - Barreira Hematoencefálica

CA - Corno de Amon

CAT-1 – Cationic Aminoacid Transporter 1

cDNA - DNA complementar

CE - Córtex entorrinal

CIREP – Centro de cirurgia de Epilepsia

COX-2 - ciclo-oxigenase 2

Ct - Threshold Cycle

**DAC** – Drogas anticonvulsivantes

**DEPC** - Dimetilpirocarbonato

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

dNTPs - dessoxirribonucleotídeos trifosfato

**EEG** – Eletroencefalograma

**EH** - Esclerose Hipocampal

**ELMT** – Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

GABAr – receptor de ácido y-aminobutírico (*Gamma-Aminobutyric Acid Receptor*)

**GD** – Giro Denteado

GTP - Gruanosina Trifosfato

IC – Intervalo de Confiança

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular 1 (Intracellular Adhesion Molecule 1)

**iGLUrs** – receptores ionotrópicos de glutamato (*Ionotropic Glutamate Receptor*).

**IL-1β** – interleucina 1β

ILAE – Liga Internacional contra a Epilepsia (International League Against Epilepsy).

K+ - Potássio

**KCNQ** – Canal de Potássio voltagem dependente similar a KQT, subfamília Q (*Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q*).

**LCT** – Lesões Cerebrais Traumáticas

**mGLURs** – Receptores Metabotrópicos de Glutamato (*Metabotropic Glutamate Receptors*)

**mTOR** – proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

**NEUROD1** – Diferenciação Neuronal 1 (*Neuronal Differentiation 1*)

**NF-kB** – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**PHLPP2** – Domínio PH e Proteína Fosfatase rica em repetição de leucina 2 (*PH Domain and Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 2*).

**QKI** – KH domain containing, RNA binding

**RBP** – RNAm Binding Proteins

**RISC** – complexo de indução de silenciamento de RNA (*RNA Induced Silencing Complex*).

RNA – ácido ribinucleico.

**ROC** – Características do Operador Receptor (*Receiver Operator Chraracteristics*)

**rpm** – rotações por minute

**RT-qPCR** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Reverse Transcription Real Time Polymerase Chain Reaction*)

SE – status Epilepticus

**SNC** – Sistema Nervoso Central.

SULF1 - Endosulfatase 1

TLR - Receptor Toll-like

**UTR** – Região não traduzida do RNA mensageiro (*Untranslated Region*)

#### Resumo

Silvestre, RN. Avaliação da expressão dos microRNAs -184, -190a-5p e -493-3p e sua correlação com o controle das crises epilépticas em pacientes operados por Epilepsia do Lobo Temporal Mesial [Dissertação]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: A epilepsia pode ser considerada uma desordem neurológica causada pela anormalidade da transmissão de impulsos nervosos, devido ao aumento da excitação nervosa e/ou diminuição da sua inibição. Dentre as síndromes epilépticas, destaca-se a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) devido a sua alta prevalência e refratariedade ao tratamento medicamentoso. Com intuito de implementar novas possibilidades de tratamento torna-se necessário uma maior compreensão das bases moleculares da ELTM. Dentro desta perspectiva, destacam-se os microRNAs, que possuem papel regulatório nas células, inclusive as do Sistema Nervoso Central. Com base em dados da literatura e num experimento de *microarray*, realizado no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, foram escolhidos 3 microRNAs, cujos alvos preditos estão relacionados à epileptogênese e que se apresentam diferencialmente expressos em hipocampos de pacientes com ELTM. Objetivos: avaliar a expressão diferencial de três microRNAs de interesse em hipocampos de pacientes operados por ELTM refratária ao tratamento clínico a fim de correlacionar os resultados em relação aos controles das crises epilépticas após a cirurgia. *Metodologia:* Foram utilizadas 15 amostras de hipocampo de pacientes com ELTM classificados como Engel I (boa evolução - nenhuma ou poucas crises convulsivas após lobectomia temporal parcial) e 15 amostras de hipocampos de pacientes classificados como Engel III/IV (má evolução - sem melhora evidente após tratamento cirúrgico). Como controles, foram utilizadas 10 amostras de hipocampo de pacientes sem doencas neurológicas, obtidas de necropsias do Servico de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP). Por meio de técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas as avaliações das expressões diferenciais dos seguintes microRNAs: miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p. Resultados: Em relação aos controles, o miR-184 e o miR190a-5p apresentaram-se, respectivamente, com redução significativa (p = 0,001) e com tendência a baixa expressão (p = 0.24) nos hipocampos de pacientes com ELTM. No que se refere ao controle das crises, o miR-184 apresentou-se significativamente mais expresso nos hipocampos de pacientes com pior evolução (Engel III/IV vs Engel I, p = 0.003). A expressão do miR-493-3p não se correlacionou com o controle de crises com significância estatística. Conclusão: Dentro os microRNAs avaliados, a expressão do miR-184, que possui importante papel na regulação de componentes celulares relacionados a morte celular, correlacionou-se inversamente com o controle das crises após cirurgia (sendo mais expresso em pacientes com má evolução) tornando-se potencial alvo molecular e com valor preditivo.

#### **Abstract**

Silvestre, RN. Evaluation of the microRNAs 184, -190a-5p and -493-3p expression and its correlation with epileptic crises control in Mesial Temporal Lobe Epilepsy operated patients [Master thesis]. Ribeirao Preto Medical School. University of Sao Paulo. Ribeirao Preto, 2016.

Introduction: Epilepsy is a neurological disorder caused by nerve impulse transmission abnormalities, by increasing nerve excitation and/or decreasing nerve inhibition. Among the epileptic syndromes, one of the most important ones is Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) due to its high prevalence and resistance to drug treatment. A greater understanding of the epilepsy molecular basis is necessary aiming to implement new treatments possibilities. Within this field of study, it is possible to highlight the microRNA molecules, which have a regulatory role in cell regulation including in the Central Nervous System (CNS). Based on literature data and in an microarray experiment, performed in the Anatomy and Surgery Departament Molecular Biology laboratory of the Ribeirao Preto Medical School, we have chosen three microRNAs, with predicted targets related to epileptogenesis and that presented themselves differencially expressed in patients hippocampus with MTLE. *Objective:* To evaluate three microRNAs of interest which were differentially expressed in the hippocampus of MTLE drug-resistant operated patients in order to correlate the results with the clinical evolution based on the seizures control after surgery. Methodology: Fifteen hippocampus samples from patients with MTLE classified as Engel I (good evolution - without seizures or few seizures after surgical resection) and 15 samples from patients classified as Engel III/IV (bad evolution - no evident improvement after surgery) were used in this study. In the control group, we used ten samples of hippocampus fragments from patients without neurological diseases, that were obtained from the Ribeirao Preto Clinical Hospital Pathology and Legal Medicine Service. The differential expression validation from microRNAs-184, -190a-5p and -493-3p were performed by quantitative real time PCR (RT-qPCR) technique. Results: Regarding the controls, miR-184 and miR-190a-5p showed, respectively, a significant expression reduction (p=0.001) and a decreased expression tendency (p=0,24) in MTLE patients. If we consider seizure control, miR-184 presented itself significantly upregulated in bad evolution hippocampus patients (Engel III/IV vs Engel I, p=0.003). miR-493-3p did not show expression differences with statistical significance. Conclusions: After evaluating the expression of these microRNAs, it was possible to conclude that microRNA-184, which regulates cellular death related components, was the best molecule that could differentiate the patients regarding seizure control after surgery, and that fact makes this microRNA a potential molecular target with predictive value.

# 1. Introdução

#### 1.1. Epilepsia: aspectos gerais

A epilepsia é um grupo de doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) que tem em comum crises epilépticas ocasionadas devido a um desequilíbrio na transmissão de sinais nervosos. O processo epiléptico é mediado por mudanças nos circuitos inibitórios e excitatórios do cérebro, levando a formação de redes neuronais hiperexcitatórias, o que causa convulsões recorrentes ou espontâneas. É uma das desordens neurológicas mais comumente encontradas na prática clínica<sup>1</sup>, que pode levar a uma predisposição duradoura na geração de convulsões epilépticas que por sua vez podem gerar consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais<sup>2,3</sup>.

A doença é caracterizada como uma desordem dinâmica, causada pela sincronização anormal de disparo neuronal em uma grande região da rede de neurônios. Algumas dessas redes neuronais podem desempenhar diferentes tipos de estados dinâmicos, em meio a uma conjuntura anormal de parâmetros de controle no momento da convulsão epiléptica. No entanto, o cérebro epiléptico pode funcionar de maneira normal nos períodos entre as convulsões<sup>4</sup>.

Uma convulsão epiléptica é uma mudança transitória no comportamento cerebral devido ao disparo desordenado e sincrônico de populações de neurônios do SNC. Possui uma manifestação clínica caracterizada por distúrbios do movimento, de função cognitiva, esquecimento súbito e desmaios. No entanto, a sua apresentação depende da localização do foco epiléptico no cérebro, seus padrões de propagação, o processo patológico da doença, além de outros fatores. A convulsão pode afetar a função motora, sensorial e autônoma, consciência, estado emocional, memória, comportamento e cognição<sup>2,5</sup>.

A epileptogênese é o processo fisiológico em que um cérebro normal se torna epiléptico. O processo de epileptogênese ocorre durante o período latente entre uma lesão cerebral, na qual o cérebro é submetido a mudanças moleculares e celulares que geram um aumento de excitabilidade, e a ocorrência das primeiras convulsões espontâneas e recorrentes. As principais lesões relacionadas ao processo de epileptogênese são as Lesões Cerebrais Traumáticas (LCT), as quais causam uma

deformação mecânica do tecido resultando em despolarização difusa neuronal e geram mudanças bioquímicas, metabólicas e fisiológicas como desregulação iônica, disfunção mitocondrial, liberação de neurotransmissores excitatórios e ativação de processos imunes e inflamatórios. Essas alterações patofisiológicas aumentam a susceptibilidade a convulsões e o risco de desenvolvimento de epilepsia<sup>3,6</sup>.

Além desses danos, pode ocorrer lesão da barreira hematoencefálica (BHE), edema cerebral e morte celular resultante da liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato e aumento na expressão de citocinas e quimiocinas tóxicas, contribuindo para o desenvolvimento do dano cerebral até a geração da primeira convulsão<sup>6</sup>.

Na epileptogênese, o tecido nervoso sadio é alterado e torna-se capaz de gerar crises epilépticas e, além dos traumas gerados diretamente no tecido cerebral, a epileptogênese pode ser de origem genética e/ou ambiental. Os mecanismos propostos para esse processo incluem perda seletiva de neurônios, neurogênese, perda de células da glia, gliogênese, plasticidade axônica e dendrítica e disfunção de receptores<sup>3</sup>.

Além das mudanças na estabilidade neuronal, o processo de epileptogênese também envolve mudanças na fisiologia glial e no ambiente homeostático no qual os neurônios precisam estar envolvidos para funcionar apropriadamente<sup>7,8</sup>.

As células gliais patológicas estão associadas com uma série de diferentes doenças neurológicas que resultam em epilepsia<sup>9</sup>. Dentro do foco epiléptico, o achado patológico mais proeminente é a gliose, alteração na substância branca do cérebro, devido à proliferação e hipertrofia de astrócitos reativos<sup>10</sup>.

Uma das ferramentas mais importantes para identificar padrões epileptiformes nas ondas cerebrais é o eletroencefalograma (EEG) ou a vídeo-monitorização eletrencefalográfica. O *paroxismo epileptiforme* é o termo usado no EEG para se designar o foco epiléptico. Esses elementos correspondem aos potenciais elétricos anormais produzidos no córtex cerebral em decorrência da hiperpolarização hipersincrônica dos neurônios envolvidos no circuito elétrico hiperexcitável que caracteriza a epilepsia. Os paroxismos são ondas cerebrais que se destacam por sua morfologia diferenciada, com aspecto mais pontiagudo, amplitude mais elevada e composição variável em relação à linha de base do EEG, sendo acoplados ou seguidos por ondas lentas, diferentes da atividade elétrica normal do indivíduo<sup>11</sup>.

O EEG deve ser realizado rotineiramente para a confirmação do diagnóstico. Além disso, o que também auxilia no diagnóstico da doença são os déficits cognitivos comumente encontrados em pessoas com epilepsia<sup>12</sup>.

A prevalência da epilepsia em países subdesenvolvidos é o dobro em comparação a países desenvolvidos, onde a incidência da doença é em torno de 50 a 100 mil casos por ano 13-15. Existe uma variação na incidência da doença em relação a sua localização geográfica que pode estar associada a fatores genéticos e ambientais. A presença de histórico familiar na epilepsia parece aumentar sua ocorrência, quando associada a outros fatores de risco e isso sugere que a etiologia da epilepsia é multifatorial, ou seja, pode ser determinada por uma série de fatores biológicos e ambientais 15. Em relação a sua ocorrência na população mundial, a epilepsia afeta em torno de 50 milhões de pessoas, ou seja, entre 4-10% dos indivíduos 16.

A classificação mais recente divulgada pela Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) divide as convulsões epilépticas em três categorias: generalizadas, parciais (focais) ou crises não classificáveis<sup>17</sup>. As convulsões generalizadas se originam na rede neuronal estendida pelos dois hemisférios cerebrais, enquanto que as de origem focal estão limitadas a uma parte de um dos hemisférios cerebrais. As convulsões focais também podem ser originadas de áreas subcorticais<sup>17,18</sup>. Na Tabela 1 estão descritas os principais tipos de convulsão.

**Tabela 1.** Classificação dos tipos de convulsões de acordo com a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE).

#### Classificação dos tipos de convulsão

#### Convulsões generalizadas

- Tônica-clônica
- De ausência: típica, atípica e de ausência com características especiais.
- Mioclônicas: mioclônica, mioclônica tônica e atônica.
- Clônica
- Tônica
- Atônica

#### Convulsões focais

#### Não-classificáveis

- Espasmos epilépticos.

Já em relação à classificação etiológica da epilepsia, os termos atualmente propostos pela ILAE são: *genéticas*, quando a causa do distúrbio é diretamente relacionada a um defeito genético; ou *estrutural ou metabólica*, quando há lesão

estrutural ou alguma condição metabólica que favorece o desenvolvimento de epilepsia. As lesões estruturais podem ser originadas de desordens adquiridas como derrame, trauma e infecção, além de poderem possuir causa desconhecida<sup>17</sup>.

Alguns tipos de epilepsias estão agrupados nas denominadas síndromes eletroclínicas, e apresentam um padrão confiável nas suas características. Pacientes epilépticos que não se encaixam nesse grupo são classificados de acordo com alguns fatores clínicos relevantes, como etiologia e tipos de convulsões. No entanto, isso impossibilita um diagnóstico preciso do paciente<sup>17</sup>. Os aspectos clínicos auxiliam na classificação da epilepsia, como tipos de convulsão, presença ou ausência de anormalidades neurológicas e diferentes achados no EEG<sup>18,19</sup>.

Outra classificação em relação às epilepsias é realizada a partir da análise das crises epilépticas (ou ausência dessas crises) nos pacientes após tratamento cirúrgico, denominada *classificação de Engel.* Essa classificação é a mais amplamente utilizada para avaliar o resultado pós-cirúrgico do paciente. É dividido em quatro classes, incluindo classe I (livre de crises incapacitantes), classe II (crises incapacitantes raras), classe III (melhora evidente) e classe IV (sem melhora evidente) (Tabela 2)<sup>20</sup>. No trabalho de Dunford e colaboradores (2011) 76 pacientes foram classificados segundo a classificação de Engel, realizada, em média, após 36 meses de acompanhamento dos pacientes após a amigdalo-hipocampectomia padrão, na qual são removidos parte da amígdala cerebral e os dois terços anteriores do hipocampo<sup>21</sup>. A classificação de Engel também foi utilizada no trabalho de Sun e colaboradores (2015), no qual os pacientes com ELTM foram classificados anualmente após cirurgia, durante 5 anos<sup>22</sup>.

Uma das principais formas de epilepsia é a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM), sendo a formação hipocampal a mais comprometida por esse tipo de doença convulsiva.

**Tabela 2.** Classificação sobre o controle de crises epilépticas no pós-cirúrgico de pacientes operados por epilepsia, segundo Engel.

#### Classificação de Engel

Classe I: Livre de crises incapacitantes

Completamente livre de convulsões após cirurgia.

Convulsões parciais não-incapacitantes simples após cirurgia.

Algumas convulsões incapacitantes após cirurgia, mas livre de convulsões após no máximo 2 anos.

Convulsões generalizadas sem o uso contínuo de drogas anticonvulsivantes (DAC)

Classe II: Crises incapacitantes raras (quase livre de convulsões)

Inicialmente sem convulsões incapacitantes, há presença de convulsões raras.

Convulsões incapacitantes são raras desde cirurgia.

Apresenta ocasionalmente convulsões incapacitantes desde cirurgia, mas raras nos últimos dois anos.

Apenas convulsões noturnas.

Classe III: Melhora evidente

Redução significativa das convulsões.

Intervalos prolongados sem convulsões.

Classe IV: Sem melhora evidente

Redução das convulsões.

Sem mudanças significativas.

Piora no quadro de convulsivo.

#### 1.2. Hipocampo e sua importância na Epilepsia

O hipocampo ou formação hipocampal tem uma estrutura em forma da letra "C" e está situado na parte caudal do cérebro, mais especificamente na porção medial dos lobos temporais. Existem duas sub-regiões denominadas giro denteado (GD) e hipocampo propriamente dito, também conhecido como Corno de Amon (CA), estratificado em quatro regiões (CA1, CA2, CA3 e CA4). Além disso, o córtex hipocampal é dividido em três camadas conforme sua histologia. A primeira camada compreende uma mistura de fibras aferentes e eferentes, juntamente com interneurônios. No GD essa camada é chamada hilo. Acima dessa camada polimórfica, encontra-se a camada celular, composta por células principais e interneurônios; chamada no GD de camada granular e na região do CA é conhecida como camada de células piramidais (estrato piramidal). A camada mais superficial é denominada molecular (estrato molecular) tanto no GD quanto no CA<sup>23</sup>.

A região CA1 do hipocampo tem uma ligação direta com o giro parahipocampal através do córtex entorrinal (CE), sendo essa interação necessária para a formação da memória, informação espacial e sincronização temporal do disparo neuronal entre áreas cerebrais<sup>23</sup>.

A principal função do hipocampo está relacionada tanto à memória episódica (experiências pessoais) quanto à semântica (conhecimento comum), e está criticamente envolvido na regulação das emoções, medo, ansiedade e estresse <sup>24,25</sup>. Ficou estabelecida uma função dicotômica dessa estrutura, sendo a região posterior mais ligada à memória e a anterior relacionada ao controle de comportamentos relacionados à ansiedade. No entanto, alguns estudos genéticos mostraram domínios multifuncionais ao longo de todo eixo hipocampal. Por exemplo, o

comportamento é influenciado tanto pela área anterior quanto posterior desse órgão<sup>26</sup>.

A estrutura hipocampal sofre mudanças patológicas no envelhecimento, em várias doenças metabólicas, como a diabetes, e principalmente em doenças neurológicas, como esclerose múltipla, encefalite límbica e a epilepsia<sup>24</sup>.

Um dos achados patológicos mais comumente encontrados na ELTM é a esclerose hipocampal, caracterizada por um padrão específico de perda neuronal, principalmente de neurônios piramidais, e gliose, predominantemente na região CA1 do hipocampo, seguida pelas áreas do hilo e CA3. Dentro do hipocampo, outra área danificada esta localizada entre as células granulares. Há presença de sinaptogênese reativa, ou seja, uma reorganização sináptica na rede neuronal<sup>27</sup>.

Além disso, ocorre atrofia bilateral do hipocampo causada pela perda de células piramidais das áreas CA1 e CA3 e de neurônios hilares, desenvolvimento de uma neuropatologia aguda, com presença tanto no hipocampo anterior como posterior, dispersão de células granulares, espalhamento de fibras musgosas no hipocampo dorsal e perda de células musgosas da área do hilo do giro denteado<sup>28,29</sup>.

Em suma, é possível dizer que o hipocampo é a estrutura do SNC mais afetada pela ELTM, sendo o conhecimento dessa estrutura imprescindível para a compreensão mais abrangente da doença.

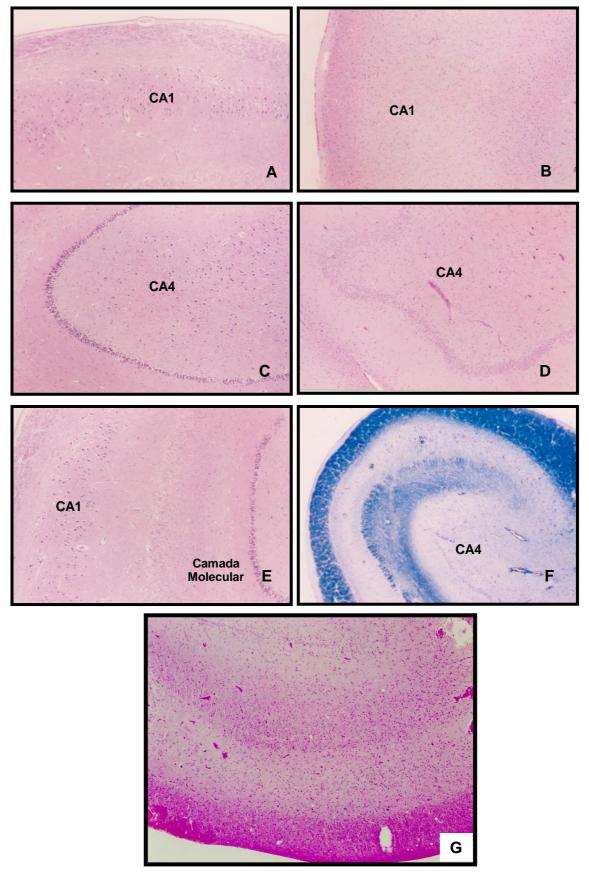
#### 1.3. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

Dentre as formas de epilepsia em humanos, a mais comum é a do lobo temporal mesial (ELTM), a qual afeta estruturas como hipocampo, amígdala e córtex parahipocampal adjacente. As ELTM são mais comuns em indivíduos adultos, no entanto pode se desenvolver também na a infância, resultando de uma lesão cerebral por traumatismo craniano, tumores cerebrais ou meningite<sup>30,31</sup>.

A lesão mais encontrada em pacientes com ELTM é a esclerose hipocampal (EH) (Figura 1), na qual há perda seletiva dos neurônios no hilo do giro denteado, neurogênese e reorganização estrutural<sup>32</sup>. Os achados histopatológicos da esclerose hipocampal são perda de células piramidais, associada a um padrão grave de astrogliose, encontrado principalmente na região CA1<sup>33</sup>. Além disso, há perda de

neurônios que se estende por todo o hipocampo, reorganização sináptica e células granulares com corpo celular aumentado.

Outras estruturas adjacentes ao hipocampo também são afetadas, como a amígdala, que sofre gliose na região latero-basal (esclerose da amígdala), e a matéria branca do lobo temporal, onde se encontram neurônios ectópicos e infiltrados de oligodrendócitos. Também ocorrem prejuízos cognitivos principalmente na memória episódica<sup>34</sup>.



**Figura 1.** Cortes histológicos de hipocampos emblocados em parafina ( $5\mu$ m). **A,C** e **E**: Hipocampo preservado de indivíduo sem epilepsia. **B, D, F** e **G**: hipocampo com esclerose.

Observa-se a acentuada perda neuronal e gliose nas regiões CA1 e CA4 na esclerose hipocampal. Em **G**, observa-se com mais detalhes a gliose e perda neuronal em CA1<sup>35</sup>.

No que se refere ao sistema imune e resposta inflamatória, ativação de células imunes por meio de detecção de CD45 foi evidenciada em pacientes com ELTM, com presença de células microgliais ativadas e leucócitos imunoreativos. Além disso, esses resultados se reproduziram em modelos experimentais de ratos epilépticos induzidos por ácido caínico<sup>36</sup>.

Os casos mais comuns de ELTM estão associados à EH, e foram classificadas pela ILAE em diferentes tipos, de acordo com a região mais atingida. A ELTM-EH tipo 1 possui o tipo mais comum de lesão hipocampal, sendo o segmento CA1 severamente afetado (80% de perda celular), além de afetar outras áreas em menor proporção, como 30-50% das células piramidais em CA2 e 50-60% das células granulares no GD. A ELTM-EH tipo 2 apresenta perda neuronal em CA1 também, afetando as células piramidais. Já na tipo 3, há perda celular e gliose predominante na região CA4 do hipocampo<sup>33</sup>.

As convulsões geradas por essas síndromes são geralmente resistentes a drogas antiepilépticas, portanto o tratamento por ressecção cirúrgica é o mais recomendado. Os resultados pós-operatórios de pacientes operados para a área afetada na ELTM demonstraram que a ressecção total do hipocampo gera melhor evolução no controle de crises epilépticas após a cirurgia quando comparada a ressecção parcial apenas (69 vs 38% livre de convulsões)<sup>34</sup>. Então, mesmo que o tratamento cirúrgico seja efetivo em alguns casos, existe uma alta parcela em que esse tipo de tratamento não é efetivo e o paciente volta a ter as crises convulsivas após a cirurgia<sup>30</sup>.

Por esse motivo, é importante buscar, além dos tratamentos convencionais por cirurgia de ressecção da região do foco epiléptico, terapias alternativas como as que envolvem mecanismos celulares e moleculares encontrados na epilepsia, dentre esses podem ser citados os neurorreceptores, os canais iônicos voltagem dependentes e as moléculas regulatórias.

#### 1.4. Mecanismos moleculares da Epilepsia

#### 1.4.1. Receptores moleculares do Sistema Nervoso Central

A redução da funcionalidade do receptor inibitório pós-sináptico mediado por ácido *y*-aminobutírico (GABAr), bem como de outros receptores, comumente é encontrada na epilepsia. Esse tipo de receptor desencadeia um potencial inibitório na rede neuronal, provocando o estabelecimento do potencial de repouso, diminuindo a excitabilidade dos neurônios<sup>37</sup>.

Os receptores de GABA pertencem a uma superfamília de canais de íon pentamérica conhecida como receptores do "circuito-cis". Estruturalmente é formada por pentâmeros de várias subunidades, mais precisamente duas subunidades  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma  $\gamma$ , as quais constroem uma estrutura de domínio extracelular e uma parte transmembrana. Os neurotransmissores se ligam ao domínio extracelular e ao induzir uma mudança conformacional no receptor que cruza a região transmembrana e ocasiona a abertura de canais iônicos $^{37}$ .

A desregulação da função GABAérgica contribui para o desenvolvimento de algumas formas de epilepsia, e pode resultar da participação do receptor normal em circuitos neuronais hiperexcitatórios anormais, onde ocorre morte celular associada a convulsão e plasticidade sináptica. A expressão reduzida do GABAR pode gerar um aumento na excitabilidade neuronal, desencadeando a predisposição a convulsão<sup>38,39</sup>.

Outro neurotransmissor importante é o L-glutamato, localizado na região hipocampal, o qual atua via receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos de glutamato (*ionotropic glutamate receptor – iGLuRs*) estão envolvidos em sua maioria na rede excitatória de neurotransmissão, e são essenciais para a funcionalidade normal do SNC. Cada um dos receptores pertencentes a essa família desempenha um papel específico<sup>31,40</sup>.

Por outro lado, a ativação dos receptores excitatórios metabotrópicos de glutamato classe I (*metabotropic glutamate receptor – mGLuR1*) leva a uma despolarização excitatória da membrana seguida pela liberação de cálcio (Ca<sup>+2</sup>) do meio intracelular. Alguns subtipos específicos de mGLuRs desempenham um papel importante na propagação da atividade epileptiforme em cérebros de mamíferos. A

expressão de mGLuR1 é aumentada na região do giro denteado em casos de epilepsia humana e também no hipocampo de ratos epilépticos<sup>40</sup>.

Além dos receptores moleculares, é possível destacar alguns aspectos genéticos como determinantes para a maior compreensão da epilepsia no que se refere a sua origem.

#### 1.4.2. Aspectos genéticos da Epilepsia

Outro elemento que deve ser considerado para a compreensão da epilepsia é seu aspecto genético. A possível influência da herança genética na epilepsia foi estudada por diversos anos, no entanto é notável que exista uma combinação complexa de fatores genéticos e não-genéticos para o desenvolvimento dessa doença<sup>41</sup>.

Dentre as causas genéticas da epilepsia, podemos encontrar: anormalidades no número de cópias dos cromossomos, assim como microdeleção e duplicação de pequenas regiões cromossômicas; rearranjos genômicos; alterações de nucleotídeo único que geram mutações *missense* e *nonssense*. Essas anormalidades genômicas podem ser herdadas de um ou ambos os pais ou podem ser mutações *de novo* (que aconteceram pela primeira vez). Por exemplo, quando ocorrem mutações somáticas nas células progenitoras do SNC, existe uma desregulação da rede neuronal e potencialização da epileptogênese. A herança dominante também pode influenciar no desenvolvimento da epilepsia, como no caso da mutação do gene Scn8a que codifica um canal de sódio voltagem dependente. Essa mutação tem uma interação genética com Scn1A e auxilia no desenvolvimento da epilepsia severa mioclônica da infância<sup>41-43</sup>.

A epilepsia genética generalizada, comumente conhecida como idiopática, representa o grupo mais comum de epilepsias geneticamente determinadas e herdadas, caracterizada por convulsões generalizadas relacionadas à idade, sem lesões cerebrais aparentes, como a epilepsia mioclônica juvenil<sup>44</sup>.

Além das epilepsias genéticas, as epilepsias comuns, as quais possuem outras causas, inclusive lesões cerebrais, também são influenciadas por fatores genéticos. Essas doenças tem uma herança complexa, poligênica (determinada por vários genes) com influências ambientais. As mutações *de novo* são as mais comumente encontradas em epilepsias comuns<sup>41</sup>.

Apesar da maioria das epilepsias possuírem um padrão de herança genética complexo, algumas síndromes epilépticas apresentam um padrão de herança mendeliana, sendo que quase todas essas mudanças foram relacionadas a genes que regulavam proteínas de canais de íons. As deficiências nos canais íon dependentes foram relacionadas a algumas desordens epilépticas, como por exemplo, a epilepsia generalizada com convulsão febril 19,45.

Os neurônios estocam e convertem informações na forma de impulsos elétricos gerados por canais iônicos. A excitabilidade neuronal pode ser controlada pela atividade intrínseca dos canais de potássio (K<sup>+</sup>) e os receptores que modulam essa atividade. Um aumento na atividade dos canais de potássio pode resultar no aumento da excitabilidade celular. Logo, esses canais controlam o potencial de repouso da membrana, além de possibilitar uma rápida repolarização. Vários tipos de epilepsia foram associados com deficiência em canais de potássio, resultado de mudanças em genes codificadores desses canais. As modificações que ocorrem uma nesses canais gerando atividade desregulada pode aumentar susceptibilidade a convulsões<sup>46</sup>.

Outro exemplo de desregulação nos canais de potássio é na convulsão neonatal familial benigna (*Benign familial neonatal seizures* – BFNC), uma desordem epiléptica autossômica dominante herdada. O gene KCNQ2 (Canal de Potássio voltagem dependente similar a KQT, subfamília Q - *Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 2*), que codifica canais potássio dependentes, sofre uma mutação nessa doença e perde sua função<sup>47</sup>.

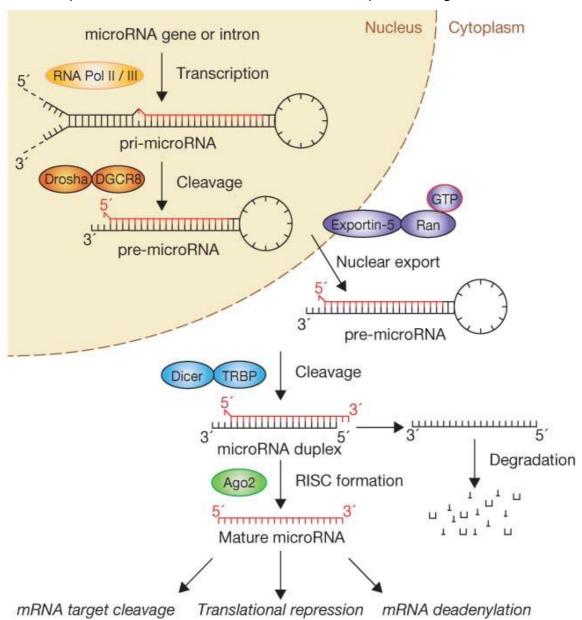
#### 1.4.3. microRNAs e Epilepsia

Uma das mais novas descobertas para o entendimento do controle da informação genética foram os microRNAs, pequenas moléculas não codificantes, com cerca de 22 nucleotídeos de tamanho, que regulam a maioria dos genes e são críticas para a repressão ou ativação da produção de proteínas nas células<sup>48</sup>.

A primeira estrutura sintetizada pela enzima polimerase II é o pri-microRNA, o qual é clivado em seguida pela endonuclease *Drosha RNAIII* numa estrutura intermediária de 60-70 nucleotídeos conhecida como o precursor do microRNA (pre-microRNA). Essa estrutura é ativamente transportada do núcleo para o citoplasma pela RNA-GTP e *Exportina* – 5. Em seguida, o pré-microRNA é processado pela

DICER, a qual irá reconhecer a sua dupla fita e clivar o pré-microRNA determinando as bases terminais da sequência, a qual é separada em duas fitas simples pela enzima *helicase*. Em seguida, uma fita do microRNA maduro é incorporado a um complexo de indução do silenciamento de RNA (*RNA-induced silencing complex* – RISC), enquanto a fita complementar é degradada<sup>48</sup>.

O processo de síntese do microRNA está exposto na figura 2.



**Figura 2** –Esquema do processo de síntese da molécula de microRNA retirado do trabalho de Winter J e colaboradores (2009)<sup>49</sup>.

Dentre os vários processos regulados pelos microRNAs, destaca-se a diferenciação celular. Essas moléculas estabelecem e mantêm o fenótipo e isso é particularmente evidente no cérebro onde os microRNAs são conhecidos por regular a diferenciação e a morfologia neuronal<sup>50</sup>.

Em relação ao papel central do microRNA na neurogênese e desenvolvimento cerebral, essa molécula pode regular pós-transcricionalmente as células tronco do tecido nervoso. O miR-124 e miR-9 são microRNAs específicos do cérebro, e portanto os mais bem estudados nesse tecido. Em experimentos *in vitro*, tanto miR-124 quanto miR-9 tem sua expressão aumentada no período de transformação dos precursores neuronais para neurônios na diferenciação de células tronco embrionárias<sup>51</sup>.

Uma série de estudos em epilepsia humana e experimental demonstrou que os níveis de cerca de cem diferentes microRNAs estavam superexpressos ou hipoexpressos no hipocampo, como miR-23a, miR-34a, miR-132 e miR-146a, os quais estariam hiperexpressos. Além disso, níveis alterados de expressão de enzimas envolvidas na síntese dos microRNAs, incluindo a Dicer e Argonauta 2, também foram encontrados em tecido cerebral epiléptico. Os microRNAs também influenciam no controle da morte celular, estrutura sináptica e neurotransmissão excitatória e inibitória<sup>52</sup>.

Os microRNAs alterados durante a epilepsia causam importantes efeitos biológicos no tecido nervoso. O miR-34a, por exemplo, é hiperexpresso depois do *status epilepticus* (SE) e está pode estar relacionado a morte celular dependente de caspase-3 no início das crises epilépticas. Ao diminuir a expressão de miR-34a por meio de antagomiRs, a expressão da proteína caspase-3 também é inibida e pode resultar num efeito neuroprotetor, ou seja, diminuição da morte celular<sup>53,54</sup>.

Outro microRNA que tem um papel neuroprotetor após indução de SE é o miR-132, que está hiperexpresso no hipocampo de ratos epilépticos. Um estudo de Jimenez-Mateos e colaboradores (2011) demonstrou que a inibição de miR-132 diminuiu o nível de morte celular neuronal no hipocampo desses animais<sup>55</sup>.

O miR-146a é um microRNA relacionado a inflamação, um potencial regulador endógeno da sinalização que envolve receptor *Toll-like* (TLR) e receptores de citocinas. Está hiperexpresso em diversas doenças associadas com a ativação da resposta inflamatória, como artrite reumatoide<sup>56</sup> e doença de Alzheimer<sup>57</sup>. Na ELTM, houve uma hiperexpressão de miR-146a durante a epileptogênese e a fase crônica da epilepsia no hipocampo de ratos, tanto em células neuronais como em células gliais. Os experimentos anteriores foram confirmados através da análise de hipocampo de pacientes submetidos a cirurgia para ELTM fármacorresistente, onde

houve aumento de expressão do miR-146a, principalmente em regiões de astrogliose<sup>58</sup>.

Ainda relacionado à inflamação, uma análise das assinaturas de microRNAs em pacientes com ELTM realizada por Kan e colaboradores (2012) demonstrou que há diferentes níveis de desregulação dos microRNAs (em sua expressão e distribuição subcelular), e a maioria desses miRs está relacionada ao controle de componentes do sistema imune. Os microRNAs miR-221 e miR-222 apresentaram expressão diminuída em pacientes com ELTM e esclerose hipocampal. Esses microRNAs regulam a expressão da molécula de adesão intracelular 1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1-* ICAM-1), a qual apresenta hiperexpressão em pacientes com ELTM, fato que pode contribuir para a liberação de outros mediadores inflamatórios e recrutamento de células imunes<sup>59</sup>.

Devido à importância biológica dessas pequenas moléculas, e como a terapia com RNAs vem evoluindo nos últimos anos, é interessante pensar que os microRNAs possam funcionar como alvos moleculares na epilepsia e também como possíveis agentes terapêuticos.

#### 1.4.4. microRNAs-184, -493-3p e -190a-5p

Os microRNAs podem controlar a produção de proteínas antes ou depois das crises epilépticas, influenciando respostas de excitabilidade, lesão e reparo do tecido nervoso<sup>60</sup>. Um experimento de *microarray* realizado no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia (dados não publicados) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), avaliou microRNAs em larga escala, dos quais alguns se mostraram diferencialmente expressos em hipocampo de pacientes com ELTM e que apresentaram diferentes níveis de controle de crises, segundo a classificação de Engel. Desses, foram escolhidos os três microRNAs com maior expressão diferencial: miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p, cujas expressões foram avaliadas por RT-qPCR em amostras de hipocampo de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico da ELTM.

Em relação ao miR-184, já foram observados dados na literatura que relataram sua expressão em outras doenças, como no câncer de pulmão, no qual é hipoexpresso<sup>61</sup>. Além disso, miR-184 é hipoexpresso também em gliomas onde inibe

proliferação e invasão celular<sup>62</sup> e tem papel supressor tumoral também em carcinoma renal<sup>63</sup>.

Em relação ao papel desse microRNA na epilepsia, um estudo de McKiernan e colaboradores (2012) demonstrou que 25 miRs estavam hiperexpressos no estado de pré-condicionamento convulsivo (exposição do cérebro a estímulo ou estresse até o limiar para causar uma lesão). Dentre os microRNAs diferencialmente expressos no pré-condicionamento, o miR-184 apresentou maior nível de hiperrexpressão, além de se relacionar com o controle da apoptose <sup>64</sup>.

Já o miR-493-3p tem sua expressão reduzida em linhagens celulares derivadas de tecido de câncer de pulmão, contribuindo para o desenvolvimento da doença<sup>65</sup>, além de possuir um papel supressor tumoral em câncer de cólon ao prevenir metástase por meio de indução de morte celular<sup>66,67</sup>. Ainda não foi estabelecido na literatura nenhum estudo sobre o papel desse microRNA na epilepsia. No entanto, análises de regulação positiva entre microRNA e RNAm envolvidos na infecção do vírus da hepatite C demonstraram que esse miR regula diretamente o gene QKI (*KH domain containing, RNA binding* – QKI) que codifica uma proteína ligante de RNA envolvida no processo de mielinização e diferenciação de oligodendrócitos, dentre outros processos no SNC, além de estar envolvida em outras doenças neurodegenerativas como a esquizofrenia<sup>68</sup>. Esses dados juntamente com os resultados obtidos no experimento de microarray realizado no laboratório de Biologia Molecular descrito anteriormente, fazem o estudo desse microRNA necessário na epilepsia.

A expressão de miR-190a-5p foi analisada em diversas doenças, como por exemplo nos neuroblastomas de fenótipo mais agressivo, nos quais foi encontrada uma baixa expressão dessa molécula<sup>69</sup>. Por outro lado, Almog e colaboradores (2013) demonstraram que miR-190a-5p é hiperexpresso no estado de dormência tumoral em glioblastomas e osteossarcomas, nos quais realiza uma reprogramação transcricional. Isso gera uma diminuição da progressão tumoral, tendo miR-190 um possível papel supressor tumoral<sup>70</sup>. Além disso, miR-190b, apresenta uma expressão aumentada em carcinoma hepatocelular e tem efeitos antiapoptóticos<sup>71</sup>.

Já em epilepsia, o papel dessa molécula não está claramente descrito, mas existem dados na literatura que mostram que esse microRNA está envolvido na regulação de canais de potássio, os quais estão relacionados ao desenvolvimento dessa doença.

Shan-Li e colaboradores (2014) descreveram que o gene KCNQ5, que codifica o canal de potássio voltagem dependente, é regulado diretamente por miR-190 em células musculares lisas da artéria. Houve uma regulação inversa entre a expressão de miR-190 e o gene KCNQ5, ou seja, enquanto havia hiperexpressão de miR-190, a proteína codificada pelo gene do canal de potássio estava suprimida<sup>72</sup>.

O canal KCNQ5 está localizado na porção pós-sináptica da sinapse inibitória nas células piramidais ou interneurônios, principalmente na região CA3 do hipocampo. Foi evidenciado que a desregulação da funcionalidade de canais KCNQ5 causa uma excitabilidade aumentada em diferentes classes de interneurônios, além de levar a redução de oscilações hipocampais rápidas<sup>73</sup>.

As mutações em outros dois canais de potássio, KCNQ2 e 3, estão ligadas ao desenvolvimento das convulsões neonatais benignas familiais, enquanto o canal KCNQ5 ainda não foi associado a nenhuma doença. Apesar disso, no hipocampo normal, existe uma alta expressão de KCNQ5, tanto nas células principais quanto nos interneurônios. No hipocampo epiléptico, há redução considerável da expressão de KCNQ5 no giro denteado quando comparado ao tecido normal. Logo, podemos concluir que possivelmente alterações na expressão do KCNQ5 estão relacionadas ao desenvolvimento da epilepsia, e o estudo do miR-190, potencial regulador desse gene, faz-se necessário<sup>74</sup>.

Com base nessas informações, é de suma importância avaliar a expressão dos microRNAs na epilepsia pois essas moléculas são importantes reguladores de proteínas envolvidas no desenvolvimento dessa doença.

# 2. Hipótese Operacional

Os microRNAs-184, -190a-5p e 493-3p apresentaram expressão diferencial entre pacientes com ELTM segundo a classificação de Engel, de acordo com um experimento de *microarray* realizado pelo laboratório de Biologia Celular da FMRP. Logo, esses microRNAs podem apresentar diferentes níveis de expressão e estar relacionados com o melhor controle das crises epilépticas nos pacientes com ELTM. Além disso, esses microRNAs estão possivelmente envolvidos no controle de morte neuronal e neuroproteção, expressão de canais de potássio e regulação de componentes do sistema imune, o que torna seu estudo particularmente interessante na epilepsia.

# 3. Objetivos

# 3.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão dos microRNAs miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p no hipocampo de pacientes com ELTM com diferentes níveis de controle das crises após a cirurgia, segundo a classificação de Engel.

# 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p, por meio da técnica de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) em amostras de hipocampo de pacientes com ELTM.
- Correlacionar a expressão de tais microRNAs de acordo com o controle pós-operatório das crises, segundo a classificação de Engel.

# 4. Materiais e métodos

#### 4.1. Amostras utilizadas

As amostras de tecido utilizadas foram fragmentos de hipocampo congelados, oriundos de pacientes submetidos à cirurgia de ressecção de parte do hipocampo e amígdala devido à ELTM e que fazem parte de um Banco de Tecidos da Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Esses pacientes foram acompanhados pelo Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) e avaliados quanto à evolução pós-operatória, sendo classificados em dois grupos: 15 amostras de hipocampo de pacientes com boa evolução pós-operatória (*Engel I*) e 15 amostras de hipocampo de pacientes com má evolução (*Engel III ou IV*).

Foram utilizados 10 controles de hipocampo de pacientes sem doenças neurológicas, obtidas de necropsias do Serviço de Patologia e Medicina Legal do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP), cujos encéfalos foram retirados para esclarecimento da causa *mortis*.

Essa pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, segundo processo HCRP n. 14148/2015.

#### 4.1.1. Casuística

Foram utilizados fragmentos hipocampais congelados em nitrogênio e obtidos imediatamente após remoção cirúrgica como forma de tratamento da ELTM farmacorresistente. Os hipocampos dos pacientes incluídos no estudo foram classificados, quanto ao controle de crises, dentro do grupo Engel I ou grupo Engel III/IV. Os dados dos pacientes estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3**. Informações sobre os pacientes com ELTM que foram operados e cujo fragmento de hipocampo foi analisado. São relatados a idade, o sexo e o diagnóstico histopatológico.

	Casos	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico Histopatológico
	1	27	Fem	Esclerose Hipocampal
	2	25	Fem	Esclerose Hipocampal
	3	36	Masc	Esclerose Hipocampal
	4	29	Fem	Esclerose Hipocampal
	5	40	Masc	Esclerose Hipocampal
	6	41	Masc	Esclerose Hipocampal
_	7	37	Fem	Esclerose Hipocampal
ij	8	39	Fem	Esclerose Hipocampal
ENGEL	9	25	Fem	Esclerose Hipocampal
Ξ	10	44	Masc	Esclerose Hipocampal
	11	40	Fem	Esclerose hipocampal e astrogliose em córtex
	12	25	Masc	Esclerose Hipocampal
	13	26	Fem	Esclerose Hipocampal
	14	37	Fem	Esclerose Hipocampal
	15	53	Fem	Esclerose Hipocampal
	16	32	Fem	Esclerose Hipocampal
	17	54	Masc	Esclerose Hipocampal
	18	27	Fem	Esclerose Hipocampal
	19	41	Masc	Esclerose Hipocampal
>	20	40	Masc	Esclerose Hipocampal
<u>~</u>	21	45	Fem	Neocórtex com astrogliose*
Ĕ	22	37	Fem	Esclerose Hipocampal
긢	23	39	Masc	Esclerose Hipocampal
GE	24	34	Fem	Esclerose Hipocampal
ENGEL III e IV	25	34	Fem	Esclerose Hipocampal
ш	26	29	Fem	Esclerose Hipocampal
	27	44	Fem	Esclerose Hipocampal
	28	28	Fem	Esclerose Hipocampal
	29	42	Fem	Esclerose Hipocampal
	30	40	Fem	Esclerose Hipocampal

<sup>\*</sup>o hipocampo desse caso não foi avaliado em exame histopatológico.

A idade média dos pacientes no grupo Engel I é de 35 anos ( $\pm$  8,44 DP) com variância de 25 a 53 anos; sendo cinco homens e dez mulheres. A idade média dos pacientes do grupo Engel III/IV é de 38 anos ( $\pm$  7,29 DP), com variância de 27 a 54 anos sendo constituído por quatro homens e onze mulheres. Os pacientes foram classificados como boa ou má evolução e o tempo médio de seguimento foi de 2 anos após cirurgia.

# 4.2. Extração de RNA tecidual

Foram adicionados 1000µl de Trizol® (*Invitrogen, CarsIbald, CA, USA*) às amostras e os fragmentos foram homogeneizados com uso do aparelho *Politron*.

Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid* – RNA) foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -80°C por pelo menos 12 horas.

Na próxima etapa, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Acrescentou-se então 1000µl de etanol 70% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetilpirocarbonato). Após este passo, está finalizada a extração do RNA.

# 4.3. Quantificação e Análise da integridade das amostras de RNA total

Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria com NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Além da concentração de ácidos nucleicos presente na amostra, foi obtido um valor da razão referente à pureza das amostras (razão 260/280).

#### 4.4. Expressão dos microRNAs

#### 4.4.1. cDNA para microRNAs 184, 493-3p e 190a-5p

A transcrição reversa foi desenvolvida utilizando-se o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA. Para cada 5ng de RNA, adicionou-se 0,75μl de *RT Buffer*; seguido de 0,075 μl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (*Deoxyribonucleotide Triphosphate* - dNTP); 1,5μl dos *primers* específicos (microRNA ou controle endógeno), 0,5μl da enzima *MultiScribe*<sup>TM</sup> e 0,094μl de *RNAse out*, completando com água DEPC para um volume final de 7,5μl. Em seguida, o material foi transferido ao termociclador nas condições padrão (30 minutos a 16 °C para efetuar a desnaturação do DNA, 30 minutos a 42°C para a

extensão da cadeia, 5 minutos a 85 °C para a desativação da enzima e, em seguida a 4 °C). Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

# 4.4.2. Análise da expressão dos microRNAs pela técnica de PCR quantitativo em tempo real

A partir do cDNA obtido, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-qPCR), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*. Para a análise quantitativa da expressão, foram usadas sondas específicas para detecção de microRNAs (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores do *Threshold Cycle* (Ct) determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O Ct determinado para a amostra (para os miRs-184, -190a-5p e -493-3p) foi subtraído do Ct determinado para o gene *house-keeping* (neste caso U6 snRNA) da mesma amostra, originando o chamado  $\Delta$ Ct. Assim, o número de ciclos que separa o  $\Delta$ Ct de uma amostra do  $\Delta$ Ct do calibrador (neste caso foi utilizada a média das amostras do grupo controle) é o  $\Delta\Delta$ Ct. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ Ct 75</sup>.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata, utilizando-se 5µl do reagente específico *TaqMan Master Mix*, 0,5µl de cada sonda específica para cada microRNA e 4,5µl do cDNA diluído (diluição 1:4 em água DEPC). Os valores de Ct foram obtidos através do aparelho *7500 Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) e do software *7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

As condições padrão para amplificação foram as seguintes: 95°C por 10 minutos e depois 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi estabelecido um *threshold* de 0,1 para U6 snRNA, miR-184 e miR-190a-5p e de 0,02 para miR-493-3p.

#### 4.5. Análise estatística

As amostras foram submetidas a teste de normalidade e nenhuma variável apresentou distribuição normal, por isso utilizamos testes não paramétricos para análise. A comparação entre os três grupos (controle, Engel I e Engel III ou IV) foi realizada através de teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. O software GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA*) foi utilizado para a análise estatística e foi considerado significante um p< 0.05, além de confirmação da análise estatística realizada por um profissional da área (GCR).

# 4.6. Análise por Bioinformática

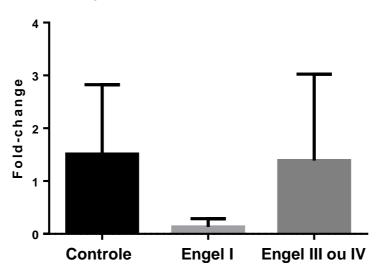
Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, avaliamos os microRNAs por algoritmos bioinformáticos. Potenciais alvos destes miRs foram preditos por meio de base de dados de predição de alvos de microRNAs, o *miRWalk* 2.0, que compila dados de diferentes bases. Nesse trabalho selecionamos dados das bases *RNAHybrid*, *TargetScan*, *MiRanda*, *miRDB*, *PICTAR2* e *RNA22*. Após esta análise, avaliamos os genes alvos em relação a vias de sinalização que estavam envolvidos e importância em processos biológicos por meio da ferramenta *DAVID Bioinformatics Resources* 6.7. Após definir quais seriam os genes mais relevantes para estudo, realizamos uma validação *in silico* com a ferramenta *RNAHybrid*, a qual avalia a energia livre na interação entre microRNA e gene alvo.

#### 5.1. Análise das expressões de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p

#### 5.1.1. microRNA-184

A análise da expressão do microRNA-184 por RT-qPCR demonstrou um fold-change médio de 1,51 nas amostras controle, 0,13 nas amostras do grupo Engel I e 1,40 nas amostras do grupo Engel III/IV (Gráfico 1). O relatório estatístico referente aos grupos está exposto na Tabela 4.

#### Expressão do microRNA-184



**Gráfico 1**. Análise de expressão do miR-184 em relação aos três grupos de pacientes (controle, Engel I e Engel III ou IV) (*p*=0,001).

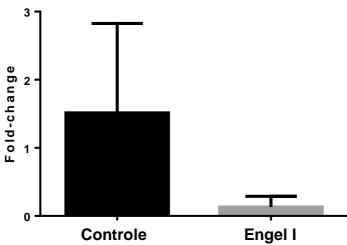
**Tabela 4**. Dados das análises estatísticas da expressão do miR-184 para cada grupo (Controle, Engel I e Engel III ou IV).

Grupos	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle	10	1,17	0,178	3,90	1,51	1,31
Engel I	13	0,07	0,004	0,59	0,16	0,19
Engel III/IV	13	0,76	0,122	4,65	1,45	1,68
Total	36	0,35	0,004	4,65	0,97	1,33

Pode-se notar que miR-184 tem sua expressão diminuída nos pacientes com epilepsia em relação ao grupo-controle e há diferenças com significância estatística entre os grupos (p=0,001). Entre os pacientes com ELTM, no entanto,

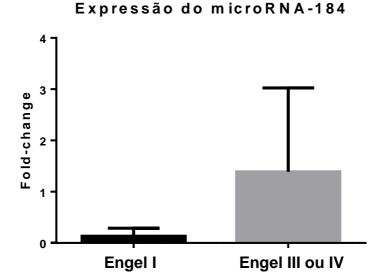
ocorre o aumento da expressão de miR-184 no grupo Engel III/IV em relação ao grupo Engel I. Pela execução do pós teste *pos hoc de* Dunn, observamos que o grupo Engel I apresentou menor expressão de miR-184 que o grupo controle (p=0,001, Gráfico 2), mas não houve diferenças com significância estatística quando comparamos as expressões dos controles com a dos hipocampos do grupo Engel III/IV (p=0,51).

# Expressão do microRNA-184



**Gráfico 2.** Expressão de miR-184 nos grupos Controle e Engel I. Nota-se uma evidente diminuição da expressão desse microRNA no grupo Engel I em relação ao grupo Controle (p=0,001).

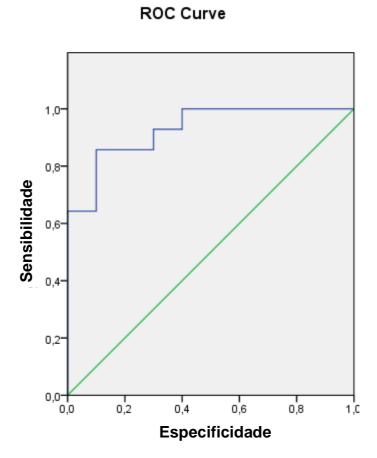
Enfim, ao comparamos o grupo Engel I ao grupo Engel III/IV, notamos um aumento significativo de expressão do miR-184 no grupo Engel III/IV (*p*=0,003) (Gráfico 3). Dessa forma, é possível detectar uma expressão diferencial desse microRNA entre pacientes com diferentes níveis de controle de crises após cirurgia, segundo classificação de Engel.



# **Gráfico 3.** Análise de expressão de miR-184 entre grupos Engel I e Engel III/IV. Nota-se um evidente aumento da expressão desse microRNA no grupo com pior controle das crises (Engel III/IV) (*p*=0,003).

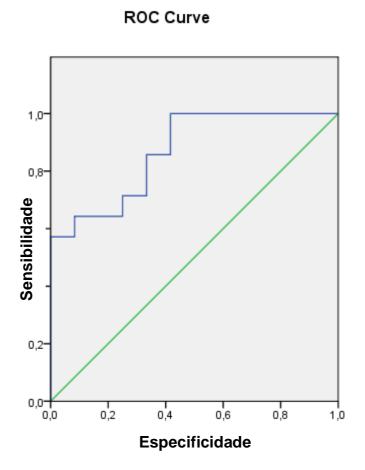
Esses dados revelam uma expressão diferencial do miR-184 entre os grupos, destacando-se que, apesar de estar hipoexpresso nos pacientes com epilepsia (Engel I) em relação ao controle, está hiperexpresso no grupo Engel III/IV em relação ao grupo Engel I.

A análise da curva das Características do Operador Receptor (*Receiver Operator Chraracteristics* – ROC) para grupo controle *versus* Engel I resultou numa área sob a curva de 92,9%, com p = 0,001 e intervalo de confiança (IC) de 95% (82,8% - 100,0%). O ponto de máximo é 0,3461 e se for convencionado que quem estiver abaixo deste valor é Engel I e acima Controle temos uma sensibilidade de 85,7% e uma especificidade de 90,0% (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Curva ROC da análise comparativa entre grupos Controle *vs* Engel I quanto a expressão de miR-184. O eixo das abscissas mostra a especificidade enquanto o eixo das ordenadas mostra a sensibilidade do teste.

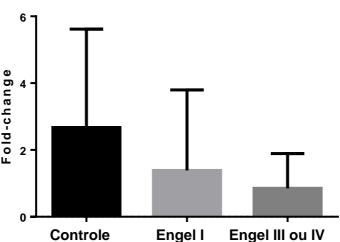
A curva ROC para grupo Engel I *versus* Engel III/IV gerou uma área sob a curva de 86,9%, com p = 0,001 e IC de 95% (72,5% - 99,9%). O ponto de máximo foi de 0,1617 e se convencionarmos que quem for abaixo deste valor é Engel I e acima Engel III/IV, temos uma sensibilidade de 64,3% e uma especificidade de 91,4% (Gráfico 5). Dessa forma, é possível que esse microRNA seja um alvo molecular para diferenciar pacientes quanto ao controle de crises classificados como Engel I e Engel III/IV.



**Gráfico 5.** Curva ROC na análise comparativa entre grupos Engel I vs Engel III/IV quanto a expressão de miR-184. O eixo das abscissas mostra a especificidade enquanto o eixo das ordenadas mostra a sensibilidade do teste.

#### 5.1.2. microRNA-190a-5p

A análise da expressão de miR-190a-5p demonstrou um *fold change* médio de 2,67 nas amostras controle, 1,40 nas amostras do grupo Engel I e 0,85 nas amostras do grupo Engel III/IV (Gráfico 6). No entanto, após a análise estatística (Tabela 5), observou-se que não há diferenças significativas na expressão do miR-190a-5p entre os grupos (*p*=0,24). Apesar disso, notamos uma tendência de diminuição da expressão desse microRNA, de forma progressiva, estando mais expresso no controle e menos expresso no grupo Engel III/IV.



Fold-change

Expressão do microRNA-190a-5p

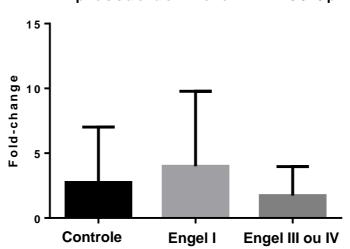
Gráfico 6. Análise de expressão do miR-190a-5p em relação aos três grupos (controle, Engel I e Engel III ou IV) (p=0,24).

Tabela 5 - Dados da análise estatística da expressão do miR-190a-5p para cada grupo (controle, Engel II e Engel III ou IV).

Grupos	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Controle	10	1,48	0,02	9,34	2,67	2,94
Engel I	13	0,21	0,03	8,89	1,38	2,41
Engel III/IV	13	0,47	0,17	4,13	0,85	1,041
Total	36	0,71	0,02	9,34	1,55	2,27

#### 5.1.3.microRNA-493-3p

Por fim, a análise da expressão de miR-493-3p demonstrou um fold-change médio de 2,75 para grupo controle, 4,00 para Engel I e 1,74 para Engel III ou IV (Gráfico 7). No entanto, a análise estatística não detectou diferenças significativas na expressão deste microRNA entre os grupos controle, Engel I e Engel III/IV (p=0,28) (Tabela 6).



#### Expressão do microRNA-493-3p

**Gráfico 7.** Análise de expressão do miR-493-3p em relação aos três grupos (controle, Engel I e Engel III ou IV) (p=0,28).

Tabela 6 - Dados da análise estatística da expressão do miR-493-3p para cada grupo

(controle, Engel I e Engel III ou IV).

1 ,	<u> </u>					
Grupos	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Controle	10	0,97	0,038	13,64	2,75	4,27
Engel I	13	2,19	0,043	20,92	3,99	5,79
Engel III ou IV	13	0,36	0,037	6,57	1,76	2,23
Total	36	0,84	0,037	20,92	2,83	4,34

# 5.2. Análise por ferramenta de bioinformática

Os microRNAs foram analisados pela ferramenta de banco de dados *miRWalk*, a qual envolve vários bancos de dados para predição de genes alvos de determinados microRNAs. Os critérios para análise foram genes alvos em cujos microRNAs se ligam na região 3'UTR.

#### 5.2.1. Alvos de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p

Os genes alvos preditos dos microRNAs foram analisados na ferramenta *in silico miRWalk* e estão todos descritos nas tabelas em anexo (Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13). Em seguida foi feita uma análise das vias de sinalização importantes em processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares dos quais

esses genes preditos participam ou regulam, pelo programa *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*.

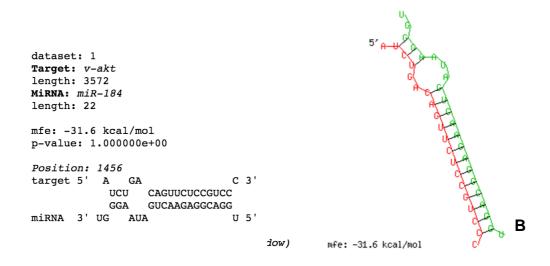
Posteriormente, os genes foram agrupados segundo suas principais funções biológicas, vias de sinalização das quais participam e funções moleculares. A Tabela 7 a seguir contém os principais genes alvos de interesse do miR-184, segundo suas funções:

**Tabela 7.** Principais genes alvos de miR-184 que participam de processos biológicos relevantes para epilepsia.

Genes alvos de miR-184	Processos biológicos desenvolvidos
DOI OLA	Regulação da proliferação celular, processo homeostático,
BCL2L1	regulação negativa da expressão gênica e homeostase
	iônica.
AKT2	Resposta a estímulo hormonal e regulação positiva de processo biossintético.

Uma análise no *RNAHybrid* revelou a complementaridade entre a sequência do microRNA e seu correspondente gene alvo por meio da medição da energia livre mínima de hibridização, a qual mede a interação entre as sequências e pode ser considerada uma ferramenta de validação *in silico*. Usando um *cut-off* de -19 kcal/mol (foram considerados apenas valores menores que esse) podemos identificar a interação entre o miR-184 e seus respectivos genes alvos (Figura 3A e 2B). Para BCL2L1, a ligação apresentou uma energia livre de -26,8 kcal/mol; e para AKT2 foi de -31,6 kcal/mol.

```
dataset: 1
Target: BCL2-like
length: 1503
MiRNA: miR-184
length: 22
mfe: -26.8 kcal/mol
p-value: 1.000000e+00
Position: 33
               C U C CACCACAUCC
target 5' C
                                         G 3'
          CCCUU UC G UC
                                UCCGUCCA
          GGGAA AG C AG
                                 AGGCAGGU
                                                  mfe: -26.8 kcal/mol
miRNA 3' U
               UUA
```

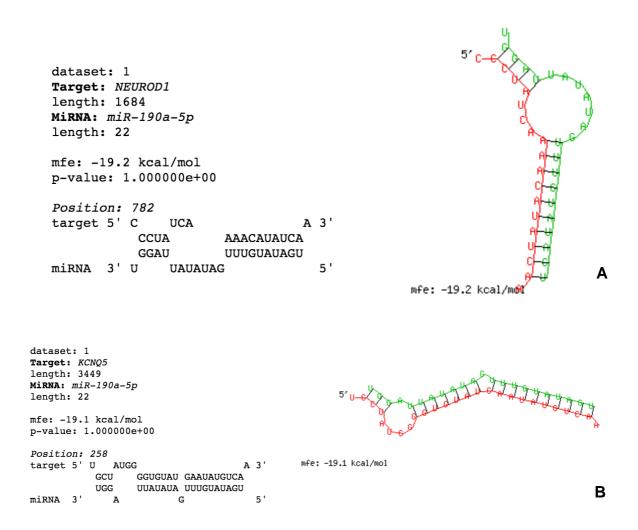


**Figura 3.** Validação in silico da interação entre miR-184 e possíveis genes alvos pelo programa *RNAHybrid*. (A) Gene BCL2-like (*B cell lymphoma 2 like* - célula B de linfoma 2) (B) Gene AKT2 (*V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2*).

Em seguida, foram feitos os mesmos procedimentos para o miR-190a-5p e listamos os dois principais genes alvos desse microRNA (Tabela 8), além da validação *in silico* pelo programa *RNAHybrid* (Figura 4A e 3B). Os principais genes encontrados foram gene da diferenciação neuronal 1 (*neuronal differentiation 1* - NEUROD1) e KCNQ5, com energia livre de -19,2 kcal/mol e -19.1 kcal/mol, respectivamente.

**Tabela 8.** Principais genes alvos de miR-190a-5p que participam de processos biológicos relevantes para a epilepsia.

Principais genes alvos de miR-190a-5p	Processos biológicos desenvolvidos
NEUROD1	Regulação da diferenciação neuronal,
NEORODI	neurogênese e desenvolvimento do SNC.
	Percepção sensorial, cognição e processos
KCNQ5	sistêmicos neurológicos e homeostasia
	celular e iônica.

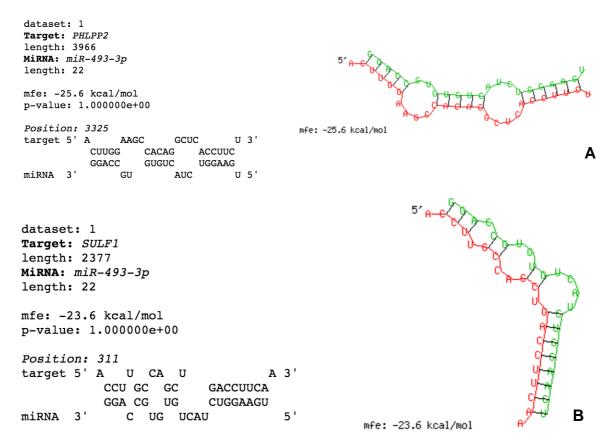


**Figura 4.** Validação *in silico* da interação entre miR-190a-5p e possíveis genes alvos pelo programa *RNAHybrid*. (A) Gene NEUROD1 (*Neuronal differentiation 1*) (B) Gene KCNQ5 (*Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 5*).

Por fim, para o miR-493-3p foram listados os dois principais genes alvos desse microRNA (Tabela 9), além da validação *in silico* pelo programa *RNAHybrid* (Figura 5A e 4B), apresentando uma energia livre de -25,6 kcal/mol para PHLPP2 e -23,6 kcal/mol para SULF1.

**Tabela 9.** Principais genes alvos de miR-493-3p que participam de processos biológicos relevantes para a epilepsia.

Principais genes alvos de miR-493-3p	Processos biológicos desenvolvidos
PHLPP2	Regulação da transcrição e ligação iônica.
SULF1	Apoptose e morte celular.



**Figura 5.** Validação *in silico* da interação entre miR-493-3p e possíveis genes alvos pelo programa *RNAHybrid.* (A) PHLPP2 (*PH Domain and leucine rich Repeat protein phosphatase 2*) e (B) SULF1 (*Endosulfatase 1*).

# 6. Discussão

A epilepsia deve ser detalhadamente estudada por ser uma doença do SNC, apesar de atingir apenas de 0,6% a 1% da população geral<sup>15</sup>. Uma utilização importante para os microRNAs estudados é a possibilidade de se tornarem alvos moleculares na epilepsia e alternativas de tratamento para a doença. Um biomarcador ou alvo molecular é definido como uma molécula ou outro dado que caracteriza um processo biológico em estado normal e patológico, sendo que sua expressão se diferencia ou só é estabelecida em estado patológico. Identificar e validar apropriadamente biomarcadores da epileptogênese pode auxiliar na predição do estabelecimento da doença neurológica<sup>76</sup>.

Em teoria, os biomarcadores podem facilitar o desenvolvimento de intervenções para prevenir a epilepsia e a ocorrência de convulsões epilépticas, reverter à progressão da epilepsia e até mesmo curar a doença<sup>77</sup>. Alguns biomarcadores são componentes de diferentes sistemas de neurotransmissão, canais iônicos, vias inflamatórias, fatores de transcrição ou moléculas envolvidas em importantes vias de sinalização de processos imunes<sup>77</sup>. No trabalho de Vezzani e colaboradores (2011), a inflamação cerebral foi caracterizada como um biomarcador na epileptogênese, mais especificamente o aumento da expressão de interleucina 1β (IL-1β), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e proteína alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* – mTOR)<sup>78</sup>.

Algumas características e o perfil de expressão dos microRNAs fazem dessas moléculas importantes na busca por biomarcadores em algumas doenças, especialmente no câncer. Um marcador ideal possui um perfil de expressão único na doença quando comparado com o indivíduo saudável. Os microRNAs são moléculas estáveis, mesmo em fluídos corporais, como plasma, soro, urina e saliva e são expressos em tecidos específicos. Os perfis de expressão dos microRNAs permitem a classificação dos cânceres humanos<sup>79</sup>. Por exemplo, em carcinoma hepatocelular, os microRNAs tem sido investigados como biomarcadores para diagnosticar a doença. microRNAs da família miR-200 estão desregulados durante o desenvolvimento do hepatocarcinoma e em fibrose hepática. Um painel de sete microRNAs foram identificados como desregulados nesse carcinoma (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a e miR-801)<sup>80</sup>.

Discussão 50

Assim, é evidente que os microRNAs são extremamente importantes e podem ser utilizados como alvos moleculares, inclusive na epilepsia. Um trabalho desenvolvido por Henshall e colaboradores (2013) buscou na literatura dados que pudessem caracterizar os microRNAs como alvos moleculares em epilepsia. Após uma análise de estudos que buscavam traçar perfis de expressão de microRNA após o SE, foi feito um cruzamento de dados que identificou, em pelo menos dois estudos diferentes, aproximadamente 6 microRNAs que apresentaram aumento de expressão na doença (miRs-21, -30c, -125b, 132, 199a e 375), e 9 que foram hipoexpressos, dentre os quais destacaram-se os miRs- 10b, 29a, -98, -181b,c, -374, -450a, -497<sup>60</sup>. Os microRNAs têm a capacidade de serem biomarcadores não-invasivos, pois algumas dessas moléculas estão localizadas no sangue e outros fluidos corporais.

O miR-184 já havia demonstrado uma expressão diferenciada em estado de pré-condicionamento epiléptico, sendo identificada uma hiperexpressão 8 horas após indução de SE. No entanto, foi notada uma redução nos níveis de miR-184 72 horas após o pré-condicionamento epiléptico<sup>64</sup>. Isso demonstra uma resposta bidirecional desse microRNA, confirmada pelos resultados do estudo em tela que demonstraram uma redução de expressão desse microRNA em pacientes com ELTM em relação aos controles, significativa entre os grupos controle e Engel I. No entanto, entre os grupos Engel I e Engel III/IV houve aumento de expressão de miR-184 em pacientes classificados como Engel III/IV (Gráfico 1 e Gráfico 3). Dessa forma, miR-184 pode ser um possível alvo molecular que diferencia pacientes Engel III/IV de Engel I. Esse fato é reforçado por análise de curva ROC, na qual obtemos uma sensibilidade de 64,3% e especificidade de 91,4% para esse microRNA (Gráfico 5).

Devido ao fato dessas classificações se relacionarem ao controle das crises epilépticas após a cirurgia de ressecção do foco epiléptico, sendo Engel I sem crises ou com poucas crises após cirurgia e Engel III/IV com pouca ou nenhuma melhora nas crises convulsivas, a identificação de tais alvos moleculares pode facilitar o tratamento dos pacientes.

Dentre as moléculas alvo de miR-184 encontradas no estudo *in silico*, destacam-se o AKT2 e BCL2L1 (Tabela 7 e Figura 3A e 2B). A interação entre miR-184 e a proteína AKT2 foi demonstrada pelo trabalho de McKiernan e colaboradores (2012) mencionado anteriormente<sup>64</sup>. Além disso, Foley e colaboradores (2010)

Piscussão 51

demonstraram que a proteína AKT2 é regulada pelo miR-184 em sua porção 3'UTR. O experimento foi realizado em linhagem celular de neuroblastoma e demonstrou que a expressão aumentada de miR-184 através do uso de miR-mimics (microRNAs que mimetizam o miR original) regula expressão de AKT2, proteína responsável pela proliferação celular e inibição de processos apoptóticos, e causa uma diminuição no número de células e aumento de apoptose<sup>81</sup>, diferentemente do que foi demonstrado no estudo de McKiernan e colaboradores (2012), no qual miR-184 apresentou efeito anti-apoptótico<sup>64</sup>.

Esses trabalhos levam a crer que miR-184 pode desempenhar tanto um papel anti-apoptótico como pró-apoptótico, e esse fato pode ser explicado pela competição de alvos entre os microRNAs.

Os microRNAs podem competir pela ligação na molécula de RNAm, principalmente nas regiões ricas em adenilato e uridilato, com proteínas ligantes de RNAm, como a proteína HuD. Uma análise genômica demonstrou que os domínios 3'UTR reconhecidos por proteínas ligantes de RNAm (*RNAm Binding Proteins* – RBP) e pelos microRNAs se encontram no mesmo transcrito e podem se sobrepor. Um exemplo dessa competição é a RBP HuR, que se liga a região 3'UTR do RNAm do transportador catiônico de aminoácido 1 (*Cationic Aminoacid Transporter 1* - CAT-1), sendo essa região também alvo do miR-122. Assim ambos competem pela regulação de CAT-1<sup>82,83</sup>.

Outro exemplo da competição de microRNAs com proteínas ligantes de RNAm, é no controle da expressão do canal iônico Kv1.1. Foi demonstrado que miR-129 se liga a região 3'UTR do RNAm de Kv1.1, reduzindo a expressão dessa proteína. No entanto, quando há presença da proteína HuD, nota-se um aumento da expressão da proteína Kv1.1, revertendo a supressão causada pelo miR-129<sup>84</sup>.

Esses dados fazem necessários mais estudos relacionados à influência da competitividade entre microRNAs e proteínas ligantes, fato do qual dependem os possíveis efeitos biológicos da expressão aumentada ou diminuída do microRNA nas doenças.

BCL2L1 tem uma função anti-apoptótica<sup>85</sup>, logo, é possível que miR-184 regule a expressão de BCL2L1, já que está envolvido em processos relacionados a apoptose. Em um trabalho de Zhen e colaboradores (2013), percebeu-se que esse microRNA regula diretamente expressão de BCL2 em Carcinoma Nasofaríngeo,

Discussão 52

suprimindo proliferação celular e estimulando apoptose, destacando o papel próapoptótico do miR-184<sup>86</sup>.

Os mecanismos moleculares relacionados a apoptose exercem um controle sobre a morte celular neuronal ligada ao processo de epileptogênese. A morte neuronal é uma consequência das convulsões epilépticas e pode desencadear efeitos pró-epileptogênicos, através de mecanismos indiretos, gliose reativa e inflamação, levando a hiperexcitabilidade<sup>87</sup>. Os genes reguladores da apoptose são comumente encontrados em processos epileptogênicos<sup>88</sup>. Múltiplos membros da família BCL-2 são regulados após o SE, sendo alguns membros pró-apoptóticos negativamente regulados, como Puma, e há aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, como Bcl-w<sup>87</sup>.

Esses dados confirmam a relevância do estudo de miR-184, pois esse microRNA é um possível regulador de moléculas da família Bcl-2 em epilepsia. Além disso, o fato das proteínas anti-apoptóticas serem hiperexpressas em alguns casos de ELTM sugere que essa possa ser uma maneira de neuroproteção do SNC<sup>89</sup>.

Já em relação à expressão de miR-190a-5p, pode-se notar uma considerável diminuição da expressão desse microRNA nos pacientes com ELTM, pois a sua menor expressão foi encontrada em pacientes classificados como Engel III/IV, apesar dessa diferença não ter sido significativa (Gráfico 6). Esse microRNA pode estar relacionado a epilepsia devido ao fato de regular a expressão de genes que codificam canais de potássio, mais especificamente a proteína expressa pelo gene KCNQ5<sup>72</sup>, fato também demonstrado pela análise *in silico* (Tabela 8 e Figura 4A).

Outros canais de potássio já foram relacionados com diferentes tipos de epilepsia, como KCNQ2 e KCNQ3, os quais estão mutados na BFNC, uma desordem epiléptica autossômica dominante<sup>47</sup>. A expressão de KCNQ5 no cérebro é mais evidente no hipocampo, com altos níveis na porção CA3, e esse canal de potássio é responsável pelo aumento de correntes pós-hiperpolarização e excitação neuronal<sup>90</sup>. Dessa forma, é possível que a expressão de genes que codificam os canais de potássio seja desregulada em ELTM, podendo ser controlada pelo miR-190a-5p.

Os resultados encontrados pelo nosso trabalho, no qual a expressão de miR-190a-5p tende a diminuir em pacientes com epilepsia e é ainda menor em pacientes classificados como Engel III/IV, corrobora para a possibilidade desse microRNA regular negativamente a expressão de KCNQ5, pois os canais de potássio tendem a

Discussão 53

ser hiperexpressos em tecido epiléptico. Assim, a diminuição da expressão do microRNA acarretaria num aumento da expressão de KCNQ5, favorecendo o quadro epiléptico.

Outro gene possivelmente controlado por miR-190a-5p é o NEUROD1 (Figura 4 e Tabela 8), um importante fator de transcrição neuronal que é essencial para o desenvolvimento do SNC, além de possuir a habilidade de reprogramar outros tipos celulares, como células somáticas, para se transformarem em neurônios e influenciar na expressão de diversos fatores de transcrição no SNC<sup>91</sup>. Guo e colaboradores (2014) descreveram que as células gliais do córtex lesionado de ratos modelos para doença de Alzheimer podem ser diretamente reprogramadas para se transformarem em neurônios funcionais usando expressão retroviral do fator de transcrição NeuroD1<sup>92</sup>.

Foi demonstrado que astrócitos se reprogramaram e se tranformaram em neurônios glutamatérgicos após indução de expressão de NeuroD1 também em cultura de células humanas. Além disso, células NG2 (ou polidendrócitos) foram reprogramadas em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos<sup>92</sup>. Tal processo biológico é de suma importância também em epilepsia, onde ocorre alta taxa de morte celular neuronal. Logo a expressão aumentada de NeuroD1 através da regulação de miR-190a-5p pode ser um possível tratamento para recuperação da perda neuronal.

No trabalho de Zheng e colaboradores (2010), foi demonstrado que miR-190 regula a expressão do mRNA de NeuroD1 na região 3'UTR, através da diminuição da expressão desse microRNA pelo uso de um agonista de um receptor opióide, chamado fentanil. Observou-se um aumento da expressão protéica de NeuroD1, e é possível concluir que esse fator de transcrição é regulado por miR-190<sup>93</sup>, dado semelhante ao encontrado na validação *in silico* realizada pelo programa *RNAHybrid* (Figura 4A).

Em relação à expressão de miR-493-3p, nota-se que existe uma expressão aumentada em pacientes classificados como Engel I em relação aos controles, mas o nível de expressão desse microRNA é menor em pacientes Engel III ou IV quando comparado aos outros dois grupos. No entanto, esses resultados não apresentaram relevância estatística (p=0,81) (Gráfico 7).

Os genes alvos da análise *in silico* apresentaram genes relacionados a apoptose e ligação iônica, sendo os mais relevantes o PHLPP2 e SULF1 (Tabela 9 e Figura 5).

O gene PHLPP2 (*PH Domain and leucine rich repeat Protein phosphatase 2*) expressa um fator de transcrição que regula negativamente a via de sinalização do NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) através da interação e inibição de IKKB. NF-kB desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária a infecção<sup>94</sup>, processos envolvidos na epilepsia, que podem até mesmo desencadear convulsões epilépticas<sup>95</sup>.

Já o gene SULF1 esta envolvido na via de sinalização que leva a inibição do crescimento de axônios ou dendritos e pode regular plasticidade estrutural dos neurônios e regeneração do SNC<sup>96</sup>. Dessa forma, o uso dessa endosulfatase pode levar a regeneração cerebral após danos causado pela epilepsia.

Uma das limitações do nosso trabalho foi o fato de avaliar a expressão dos microRNAs apenas no fragmento do hipocampo e não no sangue, dado que seria interessante para validar o microRNA como alvo molecular e poder realizar mais facilmente uma predição do possível quadro do paciente após cirurgia.

No estudo de Wang e colaboradores (2015), o perfil de expressão de microRNAs que estão diferencialmente expressos no sangue periférico em paciente com epilepsia foi descrito com o intuito de descobrir biomarcadores para o diagnóstico da doença<sup>97</sup>. Como resultado, foram encontrados 6 microRNAs hipoexpressos (miR-144-5p, -15a-5p, -181c-5p, -194-5p, 889-3p e miR-96) e 4 hiperexpressos (let-7d-5p, miR-106b-5p, -130a-3p e -146a-5p) em pacientes com epilepsia quando comparados aos controles<sup>97</sup>.

Dentre esses microRNAs, o que possuiu maior relevância diagnóstica foi o miR-106b-5p que apresentou a maior acurácia (88,2%) e com sensibilidade e especificidade de 80,3% e 81,2%, respectivamente<sup>97</sup>. Em comparação a expressão de miR-184 entre controle e indivíduos Engel I, obteve-se nesse trabalho uma maior sensibilidade (85,7%) e especificidade (90,0%) para considerá-lo como um possível alvo molecular para epilepsia. No entanto, não houve diferença estatística na comparação do grupo controle com grupo Engel III ou IV.

Porém, o dado mais significativo foi o aumento de expressão do miR-184 encontrada em indivíduos classificados como Engel III/IV em relação aos do grupo Engel I. Esse microRNA também apresentou uma sensibilidade de 64,3% e

Piscussão 55

especificidade de 91,4%, o que pode caracterizar o miR-184 como um potencial alvo molecular para os diferentes níveis de controle de crises epilépticas dos pacientes após cirurgia.

Os resultados de miR-184 foram os mais promissores dentre os microRNAs avaliados, por apresentar um padrão de expressão diferente entre pacientes epilépticos operados com diferentes níveis de controle de crises. Além disso, o miR-184 possivelmente regula genes relacionados a apoptose e morte neuronal, o que abre uma perspectiva para possíveis tratamentos envolvendo esse microRNA, visando a neuroproteção do tecido nervoso lesionado pelas convulsões epilépticas. No entanto, os genes regulados por miR-190a-5p também são de extrema relevância por participarem de processos biológicos do SNC. Em relação ao padrão de expressão desse microRNA, houve uma tendência a diminuir a expressão conforme aumentava a gravidade do quadro clínico do paciente após cirurgia.

Dessa forma, mais estudos relacionados a esses microRNAs são necessários, além da análise da expressão dos RNAs de seus genes alvos, para que possamos ter um panorama completo de expressão gênica em relação as diferentes classificações de pacientes com ELTM (Engel I e Engel III/IV).

Conclusões 56

# 7. Conclusões

 A expressão do miR-184 nos hipocampos correlacionou-se, de forma inversa, ao controle das crises nos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico da ELTM.

- Em relação ao miR-190a-5p, apesar da tendência à diminuição de sua expressão nos hipocampos de pacientes com ELTM, essa diferença não foi significativa.
- A expressão do miR-493-3p nos hipocampos não gerou dados significativos e/ou padrões de expressão gênica que fossem correlacionáveis com o controle das crises no pós-operatório tardio.
- Dentre os microRNAs avaliados, o microRNA-184 pode ser um potencial alvo molecular quanto ao controle de crises no tratamento cirúrgico nos pacientes com ELTM.

# 8. Perspectivas

- Por apresentar expressão no hipocampo significativamente distinta entre os pacientes que tiveram controle satisfatório das crises (Engel I, com menor expressão) e os com controle insatisfatório (Engel III/IV, com maior expressão), a avaliação da expressão sérica do miR-184 pode servir de auxílio no delineamento do tratamento dos pacientes candidatos à cirurgia para o tratamento da ELTM. Desta forma, estudos adicionais que visem a mensuração sérica do miR-184 serão necessários.
- Embora o miR-190a-5p e o miR-493-3p não tenham se correlacionado, de forma significativa, com os controles das crises, por participarem na regulação de genes que regulam canais de potássio e a outros processos relacionados à epilepsia, respectivamente, fazem-se necessários estudos mais aprofundados com estes microRNAs.

# 9. Referências

- 1. Schachter SC. Seizure disorders. Med Clin North Am. 2009 Mar;93(2):343-51, viii.
- 2. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia. 2005 Apr;46(4):470-2.
- 3. Badawy RAB, Freestone DR, Lai A, Cook MJ. Epilepsy: Ever-changing states of cortical excitability. Neuroscience. 2012;222:89-99.
- 4. Lopes da Silva F, Blanes W, Kalitzin SN, Parra J, Suffczynski P, Velis DN. Epilepsies as dynamical diseases of brain systems: basic models of the transition between normal and epileptic activity. Epilepsia. 2003;44 Suppl 12:72-83.
- 5. McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. Sci STKE. 2006 Oct 10;2006(356):re12.
- 6. Chandel S, Gupta SK, Medhi B. Epileptogenesis following experimentally induced traumatic brain injury a systematic review. Rev Neurosci. 2015 Nov 18.
- 7. Boison D, Sandau US, Ruskin DN, Kawamura M, Masino SA. Homeostatic control of brain function new approaches to understand epileptogenesis. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013;7.
- 8. McAllister TW. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. Dialogues Clin Neurosci. 2011;13(3):287-300.
- 9. Sosunov AA, Wu X, Weiner HL, Mikell CB, Goodman RR, Crino PD, et al. Tuberous sclerosis: a primary pathology of astrocytes? Epilepsia. 2008;49 Suppl 2:53-62.
- 10. Kallioinen MJ, Heikkinen ER, Nystrom S. Histopathological and immunohistochemical changes in neurosurgically resected epileptic foci. Acta Neurochir (Wien). 1987;89(3-4):122-9.
- 11. Fanella M, Morano A, Fattouch J, Albini M, Manfredi M, Giallonardo AT, et al. Ictal epileptic headache in adult life: Electroclinical patterns and spectrum of related syndromes. Epilepsy Behav. 2015 Dec;53:161-5.
- 12. Binnie CD. Cognitive performance, subtle seizures, and the EEG. Epilepsia. 2001;42 Suppl 1:16-8; discussion 9-20.
- 13. Ngugi AK, Kariuki SM, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. Neurology. 2011 Sep 6;77(10):1005-12.
- 14. Kotsopoulos IA, van Merode T, Kessels FG, de Krom MC, Knottnerus JA. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. Epilepsia. 2002 Nov;43(11):1402-9.
- 15. Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. Curr Opin Neurol. 2003 Apr;16(2):165-70.
- 16. World Health Organization. Epilepsy. (2015) Available at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html. (Accessed: January 2016).
- 17. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. 2010 Apr;51(4):676-85.
- 18. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2015;5(6):a022426-a.
- 19. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. N Engl J Med. 2003 Sep 25;349(13):1257-66.
- 20. Engel J, Cascino GD, Ness PCV, Rasmussesn TB, Ojemann LM. Outcome with respect to epileptic seizures. Engel J Editor. Surgical treatment of epilepsy. NY: Raven Press; 1993. APUD Durnford AJ, Rodgers W, Kirkham FJ, Mullee MA, Whitney A, Prevett M, et al. Very good inter-rater reliability of Engel and ILAE epilepsy surgery outcome classifications in a series of 76 patients. Seizure. 2011 Dec;20(10):809-12.

- 21. Durnford AJ, Rodgers W, Kirkham FJ, Mullee MA, Whitney A, Prevett M, et al. Very good inter-rater reliability of Engel and ILAE epilepsy surgery outcome classifications in a series of 76 patients. Seizure. 2011 Dec;20(10):809-12.
- 22. Sun Z, Zuo H, Yuan D, Sun Y, Zhang K, Cui Z, et al. Predictors of prognosis in patients with temporal lobe epilepsy after anterior temporal lobectomy. Exp Ther Med. 2015 Nov;10(5):1896-902.
- 23. van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. Nat Rev Neurosci. 2009 Apr;10(4):272-82.
- 24. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. Neuroscience. 2015 Nov 19;309:1-16.
- 25. Strange BA, Fletcher PC, Henson RN, Friston KJ, Dolan RJ. Segregating the functions of human hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):4034-9.
- 26. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat Rev Neurosci. 2014 Oct;15(10):655-69.
- 27. Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. Epilepsy Res. 1996 Dec;26(1):151-61.
- 28. Kienzler F, Norwood BA, Sloviter RS. Hippocampal injury, atrophy, synaptic reorganization, and epileptogenesis after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in the mouse. J Comp Neurol. 2009 Jul 10;515(2):181-96.
- 29. Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. Brain. 2004 Jan;127(Pt 1):45-64.
- 30. Engel J, Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? Neuroscientist. 2001 Aug;7(4):340-52.
- 31. Bowie D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008 Apr;7(2):129-43.
- 32. Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. Epilepsia. 2012 Sep;53 Suppl 4:19-33.
- 33. Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. Epilepsia. 2013 Jul;54(7):1315-29.
- 34. Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. Epilepsia. 2004 Jun;45(6):695-714.
- 35. Neder, L. Patologia ultraestrutural e molecular da epilepsia do lobo temporal [tese]. São Paulo: Universaidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2002.
- 36. Zattoni M, Mura ML, Deprez F, Schwendener RA, Engelhardt B, Frei K, et al. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. J Neurosci. 2011 Mar 16;31(11):4037-50.
- 37. Miller PS, Aricescu AR. Crystal structure of a human GABAA receptor. Nature. 2014 Aug 21;512(7514):270-5.
- 38. Evans MS, Cady CJ, Disney KE, Yang L, LaGuardia JJ. Three Brief Epileptic Seizures Reduce Inhibitory Synaptic Currents, GABAACurrents, and GABAA-Receptor Subunits. Epilepsia. 2006;47(10):1655-64.
- 39. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. Nat Med. 1998 Oct;4(10):1166-72.
- 40. Blumcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, et al. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. J Neuropathol Exp Neurol. 2000 Jan;59(1):1-10.

- 41. Hildebrand MS, Dahl HHM, Damiano JA, Smith RJH, Scheffer IE, Berkovic SF. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. Journal of Medical Genetics. 2013;50(5):271-9.
- 42. El Achkar CM, Olson HE, Poduri A, Pearl PL. The Genetics of the Epilepsies. Current Neurology and Neuroscience Reports. 2015;15(7).
- 43. Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. Hum Mol Genet. 2007 Dec 1;16(23):2892-9.
- 44. Steffens M, Leu C, Ruppert AK, Zara F, Striano P, Robbiano A, et al. Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. Human Molecular Genetics. 2012;21(24):5359-72.
- 45. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr., Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na+-channel beta1 subunit gene SCN1B. Nat Genet. 1998 Aug;19(4):366-70.
- 46. D'Adamo MC, Catacuzzeno L, Di Giovanni G, Franciolini F, Pessia M. K+channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013;7.
- 47. Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. Brain. 2003 Dec;126(Pt 12):2726-37.
- 48. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
- 49. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009 Mar;11(3):228-34.
- 50. Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. Epilepsy and microRNA. Neuroscience. 2013 May 15;238:218-29.
- 51. Liu C, Zhao X. MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis. Neuromolecular Med. 2009;11(3):141-52.
- 52. Henshall DC. MicroRNA and epilepsy. Current Opinion in Neurology. 2014;27(2):199-205.
- 53. Sano T, Reynolds JP, Jimenez-Mateos EM, Matsushima S, Taki W, Henshall DC. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. Cell Death Dis. 2012;3:e287.
- 54. Hu K, Xie YY, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. BMC Neurosci. 2012;13:115.
- 55. Jimenez-Mateos EM, Bray I, Sanz-Rodriguez A, Engel T, McKiernan RC, Mouri G, et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. Am J Pathol. 2011 Nov;179(5):2519-32.
- 56. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res Ther. 2008;10(4):R101.
- 57. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. J Biol Chem. 2008 Nov 14;283(46):31315-22.
- 58. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, Zurolo E, Vreijling J, van Vliet EA, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. Eur J Neurosci. 2010 Mar;31(6):1100-7.
- 59. Kan AA, van Erp S, Derijck AA, de Wit M, Hessel EV, O'Duibhir E, et al. Genomewide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. Cell Mol Life Sci. 2012 Sep;69(18):3127-45.
- 60. Henshall DC. MicroRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2013;6.

- 61. Lin TC, Lin PL, Cheng YW, Wu TC, Chou MC, Chen CY, et al. MicroRNA-184 Deregulated by the MicroRNA-21 Promotes Tumor Malignancy and Poor Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer via Targeting CDC25A and c-Myc. Ann Surg Oncol. 2015 May 20.
- 62. Cheng Z, Wang HZ, Li X, Wu Z, Han Y, Li Y, et al. MicroRNA-184 inhibits cell proliferation and invasion, and specifically targets TNFAIP2 in Glioma. J Exp Clin Cancer Res. 2015;34:27.
- 63. Su Z, Chen D, Li Y, Zhang E, Yu Z, Chen T, et al. microRNA-184 functions as tumor suppressor in renal cell carcinoma. Exp Ther Med. 2015 Mar;9(3):961-6.
- 64. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T, Bray I, Stallings RL, Simon RP, et al. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. Experimental Neurology. 2012;237(2):346-54.
- 65. Gu Y, Cheng Y, Song Y, Zhang Z, Deng M, Wang C, et al. MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1. PLoS One. 2014;9(8):e102602.
- 66. Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, et al. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. EMBO J. 2012 Apr 4;31(7):1752-63.
- 67. Sakai H, Sato A, Aihara Y, Ikarashi Y, Midorikawa Y, Kracht M, et al. MKK7 mediates miR-493-dependent suppression of liver metastasis of colon cancer cells. Cancer Sci. 2014 Apr;105(4):425-30.
- 68. Song R, Liu Q, Liu T, Li J. Connecting rules from paired miRNA and mRNA expression data sets of HCV patients to detect both inverse and positive regulatory relationships. BMC Genomics. 2015;16(Suppl 2):S11.
- 69. Slaby O. MiR-190 leads to aggressive phenotype of neuroblastoma through indirect activation of TrkB pathway. Med Hypotheses. 2013 Mar;80(3):325-6.
- 70. Almog N, Briggs C, Beheshti A, Ma L, Wilkie KP, Rietman E, et al. Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated microRNA-190. Transcription. 2013 Jul-Aug;4(4):177-91.
- 71. Hung TM, Ho CM, Liu YC, Lee JL, Liao YR, Wu YM, et al. Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased IGF-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2014;9(2):e89446.
- 72. Li S-S, Ran Y-J, Zhang D-D, Li S-Z, Zhu D. MicroRNA-190 Regulates Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction by Targeting a Voltage-Gated K+Channel in Arterial Smooth Muscle Cells. Journal of Cellular Biochemistry. 2014;115(6):1196-205.
- 73. Fidzinski P, Korotkova T, Heidenreich M, Maier N, Schuetze S, Kobler O, et al. KCNQ5 K(+) channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. Nat Commun. 2015;6:6254.
- 74. Yus-nájera E, Muñoz A, Salvador N, Jensen BS, Rasmussen HB, Defelipe J, et al. Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. Neuroscience. 2003;120(2):353-64.
- 75. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.
- 76. Engel J, Jr., Pitkanen A, Loeb JA, Dudek FE, Bertram EH, 3rd, Cole AJ, et al. Epilepsy biomarkers. Epilepsia. 2013 Aug;54 Suppl 4:61-9.
- 77. Galanopoulou AS, Moshe SL. In search of epilepsy biomarkers in the immature brain: goals, challenges and strategies. Biomark Med. 2011 Oct;5(5):615-28.
- 78. Vezzani A, Friedman A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. Biomark Med. 2011 Oct;5(5):607-14.
- 79. Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. CA Cancer J Clin. 2014 Sep-Oct;64(5):311-36.
- 80. Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2015 Oct 7;21(37):10573-83.

- 81. Foley NH, Bray IM, Tivnan A, Bryan K, Murphy DM, Buckley PG, et al. MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2. Mol Cancer. 2010;9:83.
- 82. Gardiner AS, Twiss JL, Perrone-Bizzozero NI. Competing Interactions of RNA-Binding Proteins, MicroRNAs, and Their Targets Control Neuronal Development and Function. Biomolecules. 2015;5(4):2903-18.
- 83. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell. 2006 Jun 16;125(6):1111-24.
- 84. Sosanya NM, Huang PP, Cacheaux LP, Chen CJ, Nguyen K, Perrone-Bizzozero NI, et al. Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. J Cell Biol. 2013 Jul 8;202(1):53-69.
- 85. Straten P, Andersen MH. The anti-apoptotic members of the Bcl-2 family are attractive tumor-associated antigens. Oncotarget. 2010 Aug;1(4):239-45.
- 86. Zhen Y, Liu Z, Yang H, Yu X, Wu Q, Hua S, et al. Tumor suppressor PDCD4 modulates miR-184-mediated direct suppression of C-MYC and BCL2 blocking cell growth and survival in nasopharyngeal carcinoma. Cell Death Dis. 2013;4:e872.
- 87. Henshall DC, Engel T. Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. Front Cell Neurosci. 2013;7:110.
- 88. Okamoto OK, Janjoppi L, Bonone FM, Pansani AP, da Silva AV, Scorza FA, et al. Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. BMC Genomics. 2010;11:230.
- 89. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2009;1(2):97-115.
- 90. Tzingounis AV, Heidenreich M, Kharkovets T, Spitzmaul G, Jensen HS, Nicoll RA, et al. The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 1;107(22):10232-7.
- 91. Pataskar A, Jung J, Smialowski P, Noack F, Calegari F, Straub T, et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. EMBO J. 2016 Jan 4;35(1):24-45.
- 92. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. Cell Stem Cell. 2014 Feb 6;14(2):188-202.
- 93. Zheng H, Zeng Y, Zhang X, Chu J, Loh HH, Law PY. mu-Opioid receptor agonists differentially regulate the expression of miR-190 and NeuroD. Mol Pharmacol. 2010 Jan:77(1):102-9.
- 94. Agarwal NK, Zhu X, Gagea M, White CL, 3rd, Cote G, Georgescu MM. PHLPP2 suppresses the NF-kappaB pathway by inactivating IKKbeta kinase. Oncotarget. 2014 Feb 15;5(3):815-23.
- 95. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux PM, Blumcke I, Sander JW, et al. Infections, inflammation and epilepsy. Acta Neuropathol. 2016 Feb;131(2):211-34.
- 96. Joy MT, Vrbova G, Dhoot GK, Anderson PN. Sulf1 and Sulf2 expression in the nervous system and its role in limiting neurite outgrowth in vitro. Exp Neurol. 2015 Jan;263:150-60.
- 97. Wang J, Yu JT, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. Sci Rep. 2015;5:9522.

Anexos 63

# 10. Anexos

**Tabela 10 -** Valores da valores de *fold-change* que representam a expressão de miR-184, miR-190a-5p e miR-493-3p, comparando-se os grupos controle, Engel I e Engel III ou IV.

	Amostras	Valores de Fold-change de miR-184	Valores de Fold-change de miR-190a-5p	Valores de <i>Fold-</i> <i>change</i> de miR-493- 3p
	A63	3,458623775	3,827817518	1,574521205
	A281/08	0,534207486	1,592388871	0,555736068
	A166/08	2,038657082	3,401364943	13,64308472
က္သ	A451/13	0,406432779	5,446600078	2,376875918
Controles	A866/07	3,905450971	1,372891621	0,868482756
ont	A448/13	1,900110508	9,345892086	6,557550163
S	A303	1,363036159	1,294514657	1,073182601
	A256	0,178193818	0,352123299	0,494639592
	A178	0,977990212	0,020065672	0,037631765
	HC146/15	0,370569125	0,075458552	0,309773245
	SNC 349	0,101280079	1,885994788	0,798299152
	SNC375	0,034074126	0,05485664	0,385818685
	SNC380	0,021644081	0,053844905	3,402241268
	SNC 392	0,033154793	0,037518596	0,213123884
	SNC 398	0,150926601	2,395002988	0,809323937
	SNC 440	0,227458291	1,128479982	0,344832705
=	SNC 454	0,007277132	1,683067964	2,193064373
Engel	SNC 460	0,015375771	1,420971353	4,35205764
ш	SNC 500	0,321658865	0,207273438	6,135143715
	SNC 563			
	SNC 650			
	SNC 666	0,254862459	0,041302335	0,042659704
	SNC 683	0,031028284	8,894094999	9,430439138
	SNC 690	0,004662041	0,047357625	2,896224125
	SNC 710	0,514900576	0,194296407	20,91703495
	SNC346	0,593943494	0,472414672	0,359647763
	SNC355	3,616521116	0,802407474	0,074744204
	SNC358	0,184440034	0,621813886	0,246782507
>	SNC363	0,702621531	0,17068578	2,119653155
no	SNC385	1,550211569	0,205689458	0,144434068
<b>=</b>	SNC443	4,185386296	0,968162438	0,234021644
Engel III ou IV	SNC 446	0,251484243	1,253590838	2,554405435
ш	SNC 484	0,122073744	0,407944363	0,037138588
	SNC 532	0,875247452	0,345606152	4,590892264
	SNC 539	4,650694227	0,349309977	0,732990201
	SNC574	0,824675695	4,134535475	6,572722081

SNC741	0,172607763	0,978621581	4,760336587
SNC 744			
SNC 764			
SNC 787	0,329669307	0,34105894	0,127378382

**Tabela 11** – Identificação dos genes alvos do microRNA-184. A sequência do miR liga-se na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa *miRWalk*, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram identificados para esse microRNA\*\*. NCBI\*: *National Center of Biotechnology information*.

Genes alvos	Identificação no NCBI*	Quantidade de bancos de dados**
GNB1	NM_002074	6
SF1	NM_001178030	6
CES2	NM_003869	6
ZFPM2	NM_012082	6
CLIC5	NM_001114086	6
EPB41L5	NM_01184937	6
ADO	NM_032804	6
FAM169B	NM_182562	6
AMPD2	NM_001257360	5
CSF1	NM_000757	5
DAG1	NM_001165928	5
FOSB	NM_006732	5
LASP1	NM_006148	5
LMO1	NM_002315	5
SF1	NM_005274236	5
FZD1	NM_003505	5
PPAP2B	NM_003713	5
ALDH4A1	NM_003738	5
NCOR2	XM_005253638	5
SMG7	XM_005245647	5
HUWE1	NM_031407	5
LIMCH1	XM_005248065	5
TNRC6B	XM_005261393	5
FBXO28	NM_015176	5
CRTC1	NM_001098482	5
AGO02	NM_012154	5
DESI2	NM_016076	5
SIDT2	XM_005271587	5
PLXNA3	NM_017514	5
EPB41L5	XM_005263721	5
SLC25A22	NM_001191060	5
MFRP	NM_031433	5

ZIC4	NM_032153	5
CREB3L1	NM_052824	5
C2ORF112	XM_005260283	5
SIRPA	XM_005260669	5
AKT2	NM_001626	5
KIF1A	NM_001244008	5
BAI2	NM_001703	5
BCL2L1	NM_138578	5
BDKRB2	XM_005267980	5
CAMK2B	NM_001220	5
CDC25A	XM_005265629	5
DDX11	XM_005253331	5

**Tabela 12 -** Identificação dos genes alvos do microRNA-190a-5p. A sequência do miR ligase na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa *miRWalk*, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram identificados para esse microRNA\*\*. NCBI\*: *National Center of Biotechnology information*.

Genes alvos	Identificação no <i>NCBI*</i>	Quantidade de bancos de dados**
MEF2C	NM_002397	7
NEUROD1	NM_002500	7
TCF4	NM_001083962	7
WDFY3	NM_014991	7
CELF4	NM_020180	7
BACH2	NM_0218113	7
BCL11A	NM_022893	7
ACTG1	NM_001199954	6
CALCR	NM_001164737	6
CEBPA	NM_004364	6
DAG1	NM_001165928	6
GUCY1B3	NM_000857	6
KCNA4	NM_002233	6
MAP1B	NM_005909	6
MYO5A	NM_000259	6
PAX6	NM_000280	6
PCDH9	NM_203487	6
PGR	NM_000926	6
PRKG1	NM_001098512	6
PRPS2	NM_001039091	6
PTPRS	NM_002850	6
ROCK1	NM_005406	6
ZIC3	NM_003413	6

Anexos 66

STK24	NM 001032296	6
SYNJ1	NM 203446	6
NOLC1	NM_004741	6
AMMECR1	NM 001171689	6
TSHZ1	NM_005786	6
GPHN	NM_020806	6
ATG7	NM_006395	6
ZNF652	NM_001145365	6
PHLPP1	NM_194449	6
KIAA1033	NM_015275	6
CADM1	NM_014333	6
NBEA	NM_015678	6
ASAP1	NM_001247996	6
PHF20L1	NM_016018	6
RLIM	NM_183353	6
TRIM33	NM_015906	6
EPB41L4B	NM_019114	6
LPCAT2	NM_017839	6
TRIM36	NM_18700	6
KCNQ5	NM_001160133	6
MRS2	NM_020662	6
TNRC6C	NM_01142640	6
CSMD1	NM_033225	6
PARP8	NM_001178055	6
CSRNP3	NM_001172173	6
MEX3B	NM_032246	6
FOXP2	NM_148898	6

**Tabela 13 -** Identificação dos genes alvos do microRNA-493-3p. A sequência do miR liga-se na região 3'UTR do gene e essa análise foi realizada pelo programa *miRWalk*, o qual mostrou em quantos bancos de dados esses genes alvos foram identificados para esse microRNA\*\*. NCBI\*: *National Center of Biotechnology information*.

Genes alvos	Identificação no <i>NCBI</i> *	Quantidade de bancos de dados**	
UPF2	NM_080599		7
GIGYF2	NM_015575		7
GABBR2	NM_005458		6
PEG10	NM_001184962		6
RAC1	NM_018890		6
DMRT2	NM_006557		6
CCT2	NM_001198842		6
XPO4	NM_022459		6

Anexos 67

SULF1	NM 001128205	6
CDC27	NM_001114091	6
GATAD2B	NM_020699	6
FOXP2	NM_148898	6
MAB21L2	NM_006439	6
GIGYF2	NM_001103148	6
SPEG	NM_005876	6
SLC13A1	NM_022444	6
GIGYF2	NM_001103146	6
GIGYF2	NM_001103147	6
NCKAP1L	NM_001184976	6
MBTPS1	NM_003791	6
DENND1B	NM_001195215	6
C1orf21	NM_030806	6
fgf13	nm_0041114	6
PEG10	NM_001040152	6
CELF5	NM_001172673	6
EMC1	NM_01547	6
UPF2	NM_015542	6
sostdc1	XM_005249695	5
RPS23	NM_001025	5
ABCB5	NM_001163941	5
GAREML	NM_001191033	5
KDM2B	NM_032590	5
ANKRD1	NM_014391	5
FGF13	NM_001139502	5
SEPT6	NM_145799	5
ANKRD29	NM_173505	5
MRVI1	NM_001098579	5
SYN1	NM_006950	5
PHLPP2	XM_005255852	5
SOSTDC1	NM_015464	5
NKX2-2	NM_002509	5
MXD1	NM_002357	5
MYF6	NM_002469	5
H2AFY	NM_004893	5
MRVI1	NM_130385	5
RAB1A	NM_004161	5
SLC7A4	NM_005261717	5
PLA2R1	NM_007366	5
RALGDS	NM_006266	5
FGF13	NM_001139498	5



#### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 13 de janeiro de 2016.

Oficio nº 144/2016 CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14148/2015

Prezados Senhores.

O trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS microRNAs 184, 493-3p E 190a E SUA CORRELAÇÃO COM O CONTROLE DAS CRISES EPILÉPTICAS EM PACIENTES OPERADOS POR EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL", foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Biorrepositório e a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução  $n^{\rm o}$  466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em

Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROF. DR. LUCIANO NEDER SERAFINI

RENATA NACASAKI SILVESTRE (Orientanda) Depto. de Patologia e Medicina Legal

Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440 (016) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br