NATHÁLIA AMATO KHALED

Estudo temporal integrado de redes de co-expressão gênica e microRNAs em um modelo experimental de convulsão febril induzida por hipertermia

> Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho

São Paulo 2018

NATHÁLIA AMATO KHALED

Estudo temporal integrado de redes de co-expressão gênica e microRNAs em um modelo experimental de convulsão febril induzida por hipertermia

> Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho

São Paulo 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

```
Khaled, Nathália Amato
Estudo temporal integrado de redes de co-
expressão gênica e microRNAs em um modelo
experimental de convulsão febril induzida por
hipertermia / Nathália Amato Khaled. -- São Paulo,
2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientador: Carlos Alberto Moreira Filho.
Descritores: 1.Hipocampo 2.Epilepsia
3.Convulsões febris 4.Redes reguladoras de genes
5.MicroRNAs 6.Biologia computacional
USP/FM/DBD-435/18
```

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Alberto Moreira-Filho, do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda orientação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Genômica Pediátrica – Fernanda Bernardi Bertonha, Hatylas Azevedo, Leandro Rodrigues Ferreira, Lucila Habib Oliveira, Paula Santos, Priscila lamashita e Silvia Yumi Bando – pelas discussões científicas e apoio em técnicas experimentais.

Ao Prof. Dr. Helmut Heinsen, professor visitante do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição científica ao projeto.

Aos Drs. André Fujita, do Instituto de Matemática e Estatística da USP, Débora Romeo Bertola e Patrícia Palmeira Daenekas Jorge, ambas do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas contribuições científicas na qualificação de doutorado.

À minha família por me apoiar em todos os momentos e, apesar das dificuldades, sempre me incentivarem a continuar os estudos.

Aos amigos e, em especial, à Mariana Prado Marmorato, por todo o carinho, companheirismo e incentivo nessa vida acadêmica em busca de contribuições científicas e transformações a partir da educação.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado. Este trabalho foi financiado em parte pelo projeto temático FAPESP 2015/22308-2.

RESUMO

Khaled NA. Estudo temporal integrado de redes de co-expressão gênica e microRNAs em um modelo experimental de convulsão febril induzida por hipertermia [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As convulsões febris complexas durante a infância representam um fator de risco relevante para o desenvolvimento da epilepsia. Apesar desse fato, as alterações moleculares induzidas por essas crises febris, que tornam o cérebro susceptível ao processo de epileptogênese, ainda são pouco conhecidas. Nesse contexto, a utilização de modelos animais de crises febris induzidas por hipertermia (HS) permite o estudo das alterações moleculares a partir de uma análise temporal desse processo. Assim, neste trabalho foram investigadas as alterações temporais nos perfis de microRNAs e de expressão gênica em explantes da região CA3 hipocampal de ratos Wistar obtidas em quatro intervalos de tempo após o insulto hipertérmico no décimo primeiro dia pós-natal (P11). Os intervalos temporais foram selecionados para avaliar as fases aguda (P12), latente (P30 e P60) e crônica (P120). A análise transcriptômica consistiu na construção de redes de co-expressão gênica, permitindo a identificação de módulos de genes e sua relação com os grupos experimentais e intervalos de tempo selecionados. Os genes também foram caracterizados hierarquicamente, identificando-se genes que conferem robustez às redes de co-expressão gênica (hubs). Além disso, foram avaliados o perfil de expressão diferencial de microRNAs e feita a análise integrada da expressão de microRNAs e expressão gênica dos hubs. Os resultados deste trabalho mostraram que: i) o insulto hipertérmico leva a alterações importantes no desenvolvimento e funcionamento cerebral ii) essas alterações estão associadas a uma assinatura temporal, presumivelmente da epileptogênese à readaptação do cérebro frente ao insulto precipitante inicial; iii) isso envolve um mecanismo de regulação das redes de co-expressão gênica por microRNAs. Esses resultados sugerem que as alterações transcricionais desencadeadas pelo insulto febril podem levar à reprogramação neuronal e ao remodelamento da cromatina, tornando o cérebro susceptível ao processo epiléptico crônico. Como nas epilepsias humanas por insulto febril, o modelo em rato reflete um processo que vai da epileptogênese à cronificação na fase adulta. Como muitos dos casos de epilepsia por insulto febril são refratários a drogas anticonvulsivantes, o entendimento temporal dos mecanismos moleculares envolvidos nesse tipo de epilepsia é relevante para se identificar alvos terapêuticos e desenvolver drogas anti-epileptogênicas.

Descritores: hipocampo; epilepsia; convulsões febris; redes reguladoras de genes; microRNAs; biologia computacional.

ABSTRACT

Khaled NA. Integrated temporal study of gene co-expression networks and microRNAs in an experimental model of febrile seizure induced by hyperthermia [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Complex febrile seizures during childhood represent a relevant risk factor for the development of epilepsy. Despite this fact, the molecular alterations induced by febrile seizures that make the brain susceptible to the process of epileptogenesis are still poorly understood. In this context, the animal models of febrile seizures induced by hyperthermia (HS) allow the study of the molecular alterations from a temporal perspective. Thus, we investigated the temporal alterations in the profiles of gene expression and microRNAs in explants of the hippocampal CA3 region of Wistar rats, here obtained at four-time intervals after the hyperthermal insult on the eleventh postnatal day (P11). Time intervals were selected to evaluate the acute (P12), latent (P30 and P60) and chronic (P120) phases. Transcriptomic analysis consisted of constructing gene co-expression networks, allowing the identification of gene modules related to selected time intervals. Genes were also characterized hierarchically identifying those that control the robustness of gene coexpression networks (hubs). In addition, the differential expression profile of microRNA and the integrated analysis of microRNA expression and hub's gene expression were evaluated. The results of this work showed that: i) hyperthermic insults lead to important changes in cerebral development and functioning related to febrile seizures; ii) each time interval shows a transcriptomic signature, probably reflecting the process from epileptogenesis to brain readaptation after the initial precipitating insult; iii) this process involves a mechanism of regulation of gene co-expression networks by microRNAs. These results suggest that transcriptional changes triggered by febrile insults may lead to neuronal reprogramming and chromatin remodeling, making the brain susceptible to the chronic epileptic process. Human epilepsy triggered by febrile insults in childhood is related to resistance to antiepileptic drugs and no anti-epileptogenic drug was developed so far. Therefore, a better understanding of the temporal mechanisms involved in the development of chronic epilepsy is mandatory in order to discover new therapeutic targets and, eventually, anti-epileptogenic drugs.

Descriptors: hippocampus; epilepsy; seizures, febrile; regulatory networks; microRNAs; computational biology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Epilepsia	9
1.2 Epilepsia do lobo temporal mesial	9
1.3 Crises febris e ELTM	10
1.4 Modelo experimental de indução de convulsão febril por hiperte	ermia 12
 1.5 Genômica e epilepsia 1.5.1 Redes de co-expressão gênica 1.5.2 Estudo de GCNs na epilepsia 1.5.3 Epilepsia e Epigenética 1.5.5 microRNAs e GCNs 	15 15 17 19 20
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Protocolos Experimentais	22
3.1.1 Animais	
3.1.2 Modelo Experimental de Convulsão Febril	22
3.1.3 Grupos experimentais	
3.1.4 Microdissecção do hipocampo	
3.2 Obtenção de microRNA	
3.2.1 Extração do RNA total	
3.2.2 Amplificação e marcação fluorescente do RNA	
3.2.3 Microarrays de mRNA e microRNA	
3.2.4 Hibridização das lâminas de microarrays e aquisição dos dados	25
3.3 Bioinformática	26
3.3.1 Análise das redes de co-expressão gênica (WGCNA)	26
3.3.2 Análise do perfil de microRNAs nas redes de co-expressão	

4. RESULTADOS	30
4.1 Análise comparativa de miRNAs	30
4.2 Análise das redes de co-expressão gênica por WGCNA	
4.2.1 Rede CTL	
4.2.2 Rede HS	
4.2.3 Análise do consenso do grupo HS	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia caracteriza-se pela recorrência crônica de crises convulsivas, constituindo um grupo de desordens neurológicas que acomete, em seu conjunto, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo [Meyer et al., 2010]. Essas crises derivam de episódios transientes de atividade neuronal sincrônica ou excessiva [Steinlein et al., 2004; Fisher et al., 2005]. As crises epilépticas podem ser generalizadas, envolvendo amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais, ou focais, envolvendo apenas uma parte do cérebro [Blair, 2012]. A epileptogênese consiste em uma sequência de eventos que converte o cérebro normal em um cérebro com populações neuronais hiperexcitáveis, portanto propensas a descargas sincrônicas e excessivas [Scharfman, 2007].

As formas mais comuns de epilepsia são multifatoriais: seu patomecanismo usualmente envolve susceptibilidade individual a fatores ambientais precipitantes, como febre ou trauma, que levam à liberação de mediadores de inflamação, perda celular e alterações na circuitaria neuronal [Marchi et al., 2014]. Esses processos são dirigidos por alterações coordenadas na expressão de centenas de genes em determinadas áreas do cérebro [Bando et al., 2011; Bando et al., 2013]. As formas genéticas e monogênicas de epilepsia são raras, representando cerca de 1-2% dos casos [Pandolfo et al., 2011].

Mesmo com o desenvolvimento de diferentes drogas antiepilépticas (anticonvulsivantes), diversos estudos mostram que cerca de 30% dos indivíduos com epilepsia são resistentes às drogas atualmente disponíveis, o que representa 80% dos custos relacionados à doença [Meyer et al., 2010].

1.2 Epilepsia do lobo temporal mesial

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), na qual as crises se originam de estruturas mesiais do lobo temporal - como hipocampo, amígdala ou giro hipocampal - é a forma mais comum de epilepsia focal na população adulta [Téllez-Zenteno e Hernandez-Ronquillo, 2012]. Na ELTM é comum a esclerose hipocampal, caracterizada pela perda neuronal nas regiões CA1 e CA3, com

perda e dispersão das células granulares do giro denteado (GD) [Bae et al., 2010]. Em caso mais graves, além da esclerose do hipocampo ocorre perda neuronal em outras regiões, como o córtex entorrinal, amígdala e cerebelo [Guedes et al., 2006].

Estudos retrospectivos mostram que 13% dos pacientes com epilepsia e 25-30% dos casos de ELTM têm como insulto precipitante inicial (IPI) crises febris convulsivas prolongadas (CFs) no início da infância [Baulac et al., 2004; Ahmad e Marsh, 2010] e cerca de 40% dos pacientes com ELTM e histórico de CF apresentam epilepsia resistente ao tratamento farmacológico [Chungath e Shorvon, 2008]. Nesses pacientes com ELTM e refratários às drogas anticonvulsivantes a melhor abordagem terapêutica atualmente disponível é a cirúrgica, com ressecção da área cerebral que está produzindo as crises. No entanto, em todo o mundo apenas uma minoria dos pacientes chega a ser encaminhada para cirurgia de epilepsia - cerca de 1% nos Estados Unidos - e, muitas vezes, tardiamente para prevenir as incapacitações derivadas da doença [Engel et al., 2012]. Isso demonstra claramente a necessidade de: i) melhor conhecimento do mecanismo molecular da epilepsia refratária e do papel do IPI febril na refratariedade; ii) desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com base nesses conhecimentos.

1.3 Crises febris e ELTM

Aproximadamente 80% dos casos de crises convulsivas infantis, que correspondem a 1% das emergências pediátricas, têm como agente precipitante a febre [Jones e Jacobsen, 2007].

As crises febris prolongadas no início da infância estão associadas à ELTM e à esclerose hipocampal, mas a relação causal entre elas foi estabelecida apenas recentemente, com base em dados epidemiológicos e de imagem (principalmente MRI), bem como em estudos com modelos animais [Patterson et al., 2014]. As CFs podem causar danos ao hipocampo: a febre aumenta o disparo neuronal e causa o aumento da produção de moléculas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , levando à excitabilidade neuronal e à epileptogênese [Vezzani, 2014]. Estudos em modelos animais demonstram que apenas um episódio de crise convulsiva (induzida por cainato) em ratos neonatos leva a

alterações permanentes – histológicas e funcionais - na região CA1 do hipocampo [Cornejo et al., 2007]. Por outro lado, estudos prospectivos e sequenciais de MRI em crianças que tiveram um episódio de CF prolongada entre seis e 72 meses de vida - estudo FEBSTAT - mostraram alterações persistentes no hipocampo: detectou-se aumento de volume logo após insulto e posterior redução do crescimento hipocampal [Lewis et al., 2014].

Para melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ELTM, nosso laboratório realizou diversos estudos comparativos entre pacientes com ELTM refratária (ELTMR) que tinham histórico de CFs na infância (pacientes FS) e aqueles que não sofreram esse insulto precipitante (pacientes NFS). Esses trabalhos envolveram análises por MRI de alta resolução e estudos de genômica funcional e foram realizados em material do hipocampo obtido de cirurgia de epilepsia. Os estudos de MRI, envolvendo análise de textura, mostraram que os pacientes FS possuíam alterações distintivas no giro denteado (perda celular aumentada, p ex.) em relação aos NFS [Alegro et al., 2012]. Mais ainda, a assinatura transcricional da região CA3 do hipocampo de pacientes FS era diferente da observada nos pacientes NFS [Bando et al., 2011]. Posteriormente, análises de redes de co-expressão, tanto para genes diferencialmente expressos como para o transcriptoma total de CA3, mostraram mais detalhadamente que a ELTMR com insulto febril representava um fenótipo molecular distinto [Bando et al., 2013; Moreira-Filho et al. 2015], o que permitiu identificar genes importantes tanto para a hiperexcitabilidade neuronal como para os mecanismos compensatórios decorrentes da ELTM no hipocampo. Esses dados sugerem, em tela com estudos como o FEBSTAT, que na ELTM alterações epigenéticas podem ser determinadas pelo insulto precipitante inicial.

Entretanto, o estudo com explantes do hipocampo humano obtidos em cirurgia de epilepsia tem limitações para a investigação do mecanismo molecular da ELTM. Por exemplo: o processo de epileptogênese ocorre muito antes da cirurgia (a maioria das cirurgias é realizada ao final da adolescência e na vida adulta, como última alternativa de tratamento). Mais ainda, o estudo de explantes do hipocampo de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia não permite comparativo com controles que não apresentam a doença.

Para possibilitar a investigação experimental dos mecanismos envolvidos nas crises convulsivas e na epileptogênese, diversos modelos animais foram

Introdução

desenvolvidos. Alguns desses modelos são baseados no uso de drogas promotoras de hiperexcitabilidade neuronal, como a pilocarpina [Scorza et al., 2009] e o cainato [Lévesque et al., 2013]. Nesses modelos, a administração sistêmica ou intracerebral da droga promove, além de crises convulsivas espontâneas parciais, esclerose do hipocampo e perda neuronal em CA3 e no giro denteado, num quadro similar ao encontrado em pacientes com ELTM. Para o estudo da epilepsia associada ao IPI febril, o modelo animal de convulsão febril induzida por hipertermia tem sido amplamente utilizado [Dubé et al., 2006; Dubé et al., 2010]. Esse modelo, descrito a seguir, já permitiu diversos avanços na compreensão dos mecanismos de epileptogênese associada à febre [Dubé et al., 2012].

1.4 Modelo experimental de indução de convulsão febril por hipertermia

O modelo animal de indução de convulsão febril por hipertermia foi proposto pela pesquisadora Tallie Z. Baram e seus objetivos iniciais eram determinar a melhor idade para o insulto e o tempo adequado de hipertermia (exposição a ar aquecido), necessários para induzir crises convulsivas em ratos neonatos e lactentes, evitando a mortalidade desses animais para permitir um estudo prospectivo pós-insulto [Baram et al., 1997].

Esse estudo pioneiro mostrou que 90% dos ratos submetidos à hipertermia no décimo dia de vida - idade na qual o desenvolvimento do hipocampo de ratos é semelhante aos de crianças lactentes [Avishai-Eliner et al., 2002] - apresentam crises convulsivas no período de uma hora pós-indução. Após 30 minutos de hipertermia, com temperatura corporal de 42.8° ± 0.7°C, esses animais de 10 dias de vida apresentavam crises convulsivas (apenas 10% não sobreviviam ao insulto hipertérmico). A avaliação das crises nesses animais foi realizada por EEG e análise comportamental. No EEG, feito a partir da implantação por estereotaxia de eletrodos na amígdala e na região do hipocampo, constatou-se uma atividade neuronal sincrônica e excessiva, como na epilepsia. Pela análise comportamental, os animais apresentavam movimentos estereotipados semelhantes às crises convulsivas, como extensão do dorso e clonia de patas e cabeça [Baram et al. 1997; Dubé et al. 2006].

12

Esses movimentos associados à convulsão podem ser quantificados de acordo com a escala de Racine (Tabela 1) [Racine et al., 1969]. São considerados com crise convulsiva apenas os animais que apresentam os comportamentos entre os estágios 2 e 5 dessa escala [Baram et al., 1997; Dubé et al., 2006].

	Estágio	Comportamento	
	1	Movimentos oromastigatórios	
Escala de	2	Clonia de cabeça	
Racine	3	Clonia de patas anteriores	
	4	Perda de equilíbrio e extensão do dorso	
	5	Perda de equilíbrio e queda	

Tabela 1. Escala comportamental de Racine para modelos de epilepsia[Adaptado de Racine, 1969].

O modelo de hipertermia revelou similaridades interessantes com a epilepsia associada ao insulto febril. Com efeito, 35% dos animais submetidos à hipertermia por 20 minutos e 45% daqueles que foram mantidos nesse estado por 60 minutos apresentaram crises convulsivas, mostrando que a duração das CFs é determinante para a instalação das crises. Após um período de latência (o que também é comumente observado em pacientes com ELTM e histórico de insulto febril) os animais passaram a ter crises recorrentes e espontâneas no período entre 90 e 180 dias de vida, apresentando movimentos estereotipados e atividade epileptiforme no hipocampo (observada em 88% dos animais que apresentavam crises convulsivas) quando avaliados por EEG [Dubé et al., 2006; Dubé et al. 2010]. O aumento na atividade sináptica de células das regiões CA1 [Kamal et al., 2006] e CA3 [Notenboom et al., 2010] dos animais com crises convulsivas também foi observado. Esses dados mostram que o modelo experimental de hipertermia apresenta grande semelhança com o quadro observado em humanos, nos quais apenas uma parte das crianças com histórico de crises febris convulsivas prolongadas passa a ter crises recorrentes e espontâneas na região hipocampal após um período de latência. Assim, o modelo de hipertermia é útil para o estudo do processo epileptogênico na ELTM [McClelland et al., 2011; Dubé et al., 2012; Azevedo et al., 2018].

Para entender como as crises febris levam ao desenvolvimento da ELTM, estudos sobre o papel da inflamação no desenvolvimento da epilepsia por IPI febril foram também realizados, já que a febre leva ao aumento da produção de moléculas inflamatórias. Camundongos knockout para o receptor de IL-1ß (IL-1R1^{-/-}) foram utilizados. Esse receptor promove hiperexcitabilidade neuronal por diferentes mecanismos, como o aumento do cálcio intracelular que passa pelos receptores glutamatérgicos [Viviani et al., 2003; Balosso et al., 2008]. Assim animais IL-1R1^{-/-} são mais resistentes ao desenvolvimento de crises convulsivas quando comparados aos animais com receptores íntegros [Dubé et al., 2005]. Por outro lado, a administração de IL-1ß nos ventrículos laterais do cérebro aumenta a frequência de crises convulsivas, enquanto que o uso de antagonistas de seus receptores leva a uma diminuição ou supressão das crises [Heida e Pittman, 2005]. Foi também detectado aumento de IL-1ß no hipocampo de animais que apresentavam crises convulsivas recorrentes após insulto por hipertermia [Dubé et al., 2010]. Esse conjunto de dados revelou que a inflamação está relacionada ao desenvolvimento da ELTM. Posteriormente, diversos estudos em pacientes e modelos experimentais demonstraram de maneira convincente a associação entre epilepsia e inflamação no cérebro: citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, e moléculas associadas ao processo de resposta à injúria e estresse celulares, como HGMB1 e S-100^β, tem expressão aumentada no tecido epileptogênico, principalmente em células da glia [Vezzani, 2014].

Em seu conjunto, os estudos em modelos animais contribuíram para o entendimento do papel da febre na epileptogênese. No entanto, ainda é necessário um melhor conhecimento sobre os mecanismos moleculares e genômicos pelos quais CFs podem levar à ELTM. Uma abordagem experimental importante nessa direção é constituída pelos estudos de genômica funcional em explantes do hipocampo de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia [Wang et al., 2010; Bando et al., 2011; Bando et al., 2013; Moreira-Filho et al. 2015] ou obtidos de modelos animais de epilepsia [Okamoto et al, 2010; Winden et al. 2011].

1.5 Genômica e epilepsia

Os estudos de genômica funcional têm servido para esclarecer o mecanismo molecular de diversas doenças causadas pela interação genótipoambiente. Nessa linha, são particularmente importantes os estudos de redes de co-expressão gênica, que permitem investigar a transição entre estados funcionais de células e tecidos, a influência do ambiente sobre o funcionamento gênico e as transições saúde-doença [Barabási et al., 2011; Moreira-Filho et al. 2014a].

1.5.1 Redes de co-expressão gênica

As redes de co-expressão gênica - ou GCNs, do inglês *Gene Coexpression Networks* - são usualmente construídas a partir de dados de expressão gênica obtidos por tecnologia de DNA *microarrays*. Para a construção de GCNs os níveis de expressão gênica são comparados par-a-par e os pares de genes acima de um determinado limiar (*cutoff threshold*) são conectados, gerando uma rede de interação gene-gene [Weirauch, 2011; Moreira-Filho et al., 2014a]. As GCNs, assim como as redes de interação proteína-proteína e as redes metabólicas, e similarmente às redes sociais e à internet, são redes livres de escala [Barabási e Oltvai, 2004; Newman, 2010]: elas apresentam uma distribuição não uniforme do número de ligações entre seus nós/genes, ou seja, um pequeno número de genes tem muitas ligações com os demais, enquanto que a maioria dos genes têm poucas ligações. As propriedades topológicas e dinâmicas dessas redes fornecem importantes elementos para a compreensão da organização funcional de células e tecidos [Barabási e Oltvai, 2004; Zhu et al., 2007; Barabási et al., 2011; Bando et al., 2013].

Em GCNs os nós altamente conectados (ou *hubs*) são responsáveis pela manutenção da arquitetura da rede. Esses genes estão associados a funções biológicas essenciais e quando sua expressão varia a expressão de diversos outros genes também é modificada [Barabási et al., 2011]. Por outro lado, nas GCNs existem genes que apresentam poucas ligações, mas que interagem preferencialmente com *hubs* sendo chamados de *VIPs*, um termo adotado dos estudos de redes sociais [McAuley et al., 2007]. Os *VIPs*, também chamados

date-genes [Zhu et al., 2007] servem como conectores entre os módulos atuando, portanto, em uma hierarquia de controle uma alta, uma vez que os *hubs* estão sob sua influência. Existem ainda genes que apresentam um status *VIP*, ligando-se apenas a *hubs*, mas com um grande número de conexões com *hubs*, sendo assim chamados de *high-hubs* [Bando et al., 2013]. Os *high-hubs* representam a mais alta hierarquia de controle em uma rede de interação transcricional.

Redes livres de escala, como as GCNs, são resistentes a ataques: a estrutura da rede (conectividade, topologia) se mantem mesmo com a remoção de certo número de nós, o que é denominado robustez da rede [Albert et al., 2008]. Assim, quando, por exemplo, um fator ambiental interfere na expressão de genes altamente conectados - o que equivale à remoção de nós, ou alteração de sua hierarquia na rede – ocorrem modificações estruturais na rede, com alteração de sua topologia e funcionalidade [Moreira-Filho et al., 2014a]. Essas modificações nas GCNs refletem, em muitos casos, a modificação de estados funcionais de células e tecidos, retratando assim a transição saúde-doença [Vidal et al., 2011; Bando et al., 2013].

Conectividade e comunidades em GCNs - A conectividade (k) de uma rede livre de escala é expressa por k = 2L/N, sendo L o número de ligações totais e N o número de nós. A conectividade é uma medida da robustez da rede [Costa et al., 2013]. A maior ou menor conectividade em GCNs reflete incremento ou perda de ligações entre módulos transcricionais, também denominados comunidades [Barabási et al., 2011; Moreira-Filho et al., 2014b]. Em GCNs as comunidades são constituídas por grupos de genes altamente interconectados e com menor ligação com os demais genes da rede, que frequentemente estão relacionados a uma mesma função biológica [Barábasi e Oltvai, 2004; Zhu et al., 2007; Vidal et al., 2011; Chaussabel e Baldwin, 2014, Moreira-Filho et al., 2014b]. Os integrantes de um módulo, ou comunidade, estão conectados por genes de alta hierarquia, como high-hubs, e os módulos frequentemente se conectam por VIPs, ou date-genes [Yu et al., 2007; Zhu et al., 2007]. A detecção de comunidades em GCNs é muito relevante devido à associação entre funcões biológicas comunidades е [Chaussabel е Baldwin, 2014]. Matematicamente, a detecção de comunidades numa rede livre de escala é

usualmente feita pela descoberta da estrutura modular da rede que otimiza a medida de modularidade [Moreira-Filho et al., 2014b]. A modularidade pode ser determinada considerando a relação entre o número de ligações dos genes dentro de uma comunidade comparadas às conexões entre genes de comunidades diferentes, o que se conhece como algoritmo de Newman-Girvan [Newman e Girvan, 2004, Newman, 2010].

Dada a importância funcional das comunidades em GCNs, é essencial entender como diferentes comunidades de interconectam numa rede, isto é, quais as comunidades que apresentam maior número de conexões entre si e como esse perfil pode variar na transição de estados funcionais em células e tecidos. Utilizando-se métodos de teoria da informação, como a compressão do fluxo de informação entre comunidades [Rosvall e Bergstrom, 2008], é possível rearranjar as redes considerando apenas as relações entre as comunidades, o que é chamado de *coarse-grained community structure*. Essa estrutura é gerada a partir da contração de todos os nós/genes de cada comunidade em um único nó. As arestas entre esses nós são também reduzidas a uma conexão e graficamente representadas por diferentes espessuras de acordo com a quantidade de conexões presentes anteriormente [Moreira-Filho et al., 2015].

1.5.2 Estudo de GCNs na epilepsia

Para investigar os mecanismos moleculares relacionados à ELTM, diversos autores conduziram estudos do perfil de expressão gênica em explantes obtidos do hipocampo e córtex entorrinal de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia [Arion et al., 2006; Jamali et al., 2006; Ozbas-Gerçeker et al., 2006; van Gassen et al., 2008]. Esses estudos geraram uma grande quantidade de resultados, mas os dados dos diferentes laboratórios mostraram muitas divergências. Numa extensa revisão desses trabalhos, Wang e colaboradores (2010) concluíram que os estudos de perfil gênico precisariam ser feitos em regiões específicas do hipocampo.

Além da delimitação precisa das regiões hipocampais a serem estudadas, era também mandatório considerar o histórico dos pacientes, identificando, por exemplo, os casos com histórico de crises febris prolongadas, devido à importância do IPI no desenvolvimento da ELTM. Assim, em nosso laboratório

17

foram conduzidos estudos de expressão gênica da região CA3 do hipocampo utilizando explantes cirúrgicos obtidos de pacientes que apresentavam (FS) ou não (NFS) insulto precipitante febril.

Em um primeiro estudo [Bando et al., 2011], foram analisadas apenas as GCNs dos genes diferencialmente expressos entre os grupos FS e NFS, observando-se, para cada grupo, uma diferente topologia de rede e diferentes conjuntos de genes alta hierarquia (aqui identificados apenas pelo maior número de ligações gene-gene). Num segundo estudo comparativo entre pacientes FS e NFS, foi adotada uma nova metodologia de visualização e análise de redes que permitiu: i) a categorização hierárquica dos genes (*hubs, VIPs* e *high-hubs*); ii) a obtenção de redes completas, isto é, incluindo todos os transcritos válidos em CA3, na ordem da dezena de milhares, e não apenas dos diferencialmente expressos, cerca de algumas centenas [Bando et al., 2013]. Nessa análise, as redes obtidas a partir de genes diferencialmente expressos apresentavam genes de alta hierarquia mais relacionados à transmissão sináptica e excitabilidade neuronal, enquanto que muitos dos genes de maior hierarquia nas redes completas estavam associados a mecanismos compensatórios, como homeostase e neuroproteção.

Esses dois trabalhos revelaram que a ELTM com IPI febril representa um fenótipo molecular distinto, o que já havia sido indicado por estudos epidemiológicos [Heuser et al., 2011] e foi também confirmado por estudos de MRI de alto campo e análise de textura, realizados por nosso grupo de pesquisa [Alegro et al., 2012]. Mais ainda, alguns dos genes de alta hierarquia identificados podem ser possíveis alvos terapêuticos, devidos ao seu papel na excitabilidade neuronal [Bando et al., 2011; Bando et al., 2013]. É interessante notar que o grupo FS apresentou maior perda celular no giro denteado, verificado por MRI [Alegro et al. 2012] e histopatologia [Bando et al., 2013].

No entanto, os estudos com explantes cirúrgicos obtidos de pacientes apresentam duas importantes limitações: i) não há possibilidade de comparações com tecido normal; ii) não é possível uma análise temporal, uma vez que o acesso ao transcriptoma ocorre somente no momento da ressecção cirúrgica do explante. Assim, para uma análise dos processos biológicos que vão do insulto precipitante febril até o desenvolvimento da epilepsia é preciso utilizar modelos animais – como o de hipertermia - que "mimetizam" a epilepsia com IPI febril [Dubé et al., 2010]. Esses modelos também são importantes para a investigação de mecanismos epigenéticos: havendo o insulto precipitante ambiental (febre, trauma), esses mecanismos atuam na alteração de estados funcionais nas diferentes regiões do hipocampo e de outras partes do cérebro, participando da transição saúde-doença através da modificação das GCNs.

1.5.3 Epilepsia e Epigenética

As alterações epigenéticas, que modificam a expressão gênica de forma transiente ou duradoura em resposta a estímulos ambientais, envolvem diversos mecanismos: acetilação/desacetilação de histonas, metilação do DNA em sítios promotores, e ação de RNAs não codificantes, como os lncRNAs [Szyf, 2015]. Evidências recentes têm mostrado que essas modificações ocorrem nos processos de epileptogênese e epilepsia [Qureshi e Mehler, 2010, Miller-Delaney, 2015].

A análise da metilação do DNA obtido da região CA3 do hipocampo de ratos após a indução de crises febris prolongadas mostrou uma alteração no perfil de metilação global [Kobow et al., 2013] e hiper ou hipometilação de seqüências promotoras de muitos genes relacionados à tolerância ao insulto ou à injúria hipocampal [Miller-Delaney et al., 2012]. Esse fato também foi observado em pacientes com ELTM: há hipermetilação de genes relacionados à dispersão das células granulares [Kobow et al., 2009] e alterações do perfil de metilação em mais de uma centena de genes associados à esclerose hipocampal, neste caso acompanhada de modificações na expressão de diversos microRNAs [Miller-Delaney et al., 2015].

1.5.4 Epilepsia e microRNAs

Os microRNAs promovem a regulação pós-transcricional de seus genes alvo por se ligarem a região 3'-não traduzida do RNA mensageiro (mRNA), levando à sua degradação [Bartel, 2004; Zhang et al., 2015]. Diferenças na expressão de centenas de microRNAs já foram identificadas em diferentes modelos experimentais de ELTM que utilizaram excitadores neuronais (como pilocarpina) ou estimulação elétrica [Hu et al., 2012; Bot et al., 2013]. Esses microRNAs se relacionam a diferentes vias, como proliferação e desenvolvimento neuronal, inflamação e apoptose. Muitos desses trabalhos identificaram alterações nos mesmos microRNAs, como miR-34a com papel indutor de morte neuronal [Hu et al., 2011; Hu et al., 2012], miR-132 relacionado a respostas inflamatórias [Hu et al., 2011; Jimenez-Mateos et al., 2011] e miR-146a que se relaciona ao aumento da secreção de IL-1β [Aronica et al., 2010; Omran et al., 2012].

Estudos do perfil global de microRNAs em tecido hipocampal obtido de pacientes com ELTM ou de autópsia de controles normais igualmente identificaram alterações na expressão de centenas de microRNAs [Kan et al., 2012; McKieman et al., 2012], incluindo a hiperexpressão de microRNAs, como o miR-132 e o miR-146a, também observada nos modelos animais anteriormente mencionados.

1.5.5 microRNAs e GCNs

A tecnologia de DNA microarrays possibilita a obtenção de dados globais de expressão de microRNA, permitindo estudar as alterações na expressão dos microRNAs em diferentes condições experimentais, ou nos estados de saúde e doença, comparativamente ao perfil de expressão dos genes nessas mesmas condições. Esse estudo comparativo envolve, usualmente, o emprego de bancos de dados de microRNAs que listam seus genes alvo, preditos ou confirmados experimentalmente, e a visualização e análise de GCNs. Para compreender as relações entre microRNAs e as GCNs, identificam-se quais microRNAs diferencialmente expressos interagem com os genes em cada rede. Em redes completas, isto é que incluem todos os transcritos válidos, se consideram apenas as interações com genes de alta hierarquia, como os hubs, enquanto que para redes de genes diferencialmente expressos podem ser considerados todos os genes. Uma análise mais elaborada pode envolver a construção de uma rede regulatória bipartida microRNA-mRNA a partir da análise do coeficiente de correlação par-a-par entre os perfis de expressão de microRNAs e mRNAs [Li et al., 2013].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar em modelo experimental de convulsão febril induzida por hipertermia as alterações temporais nos perfis de microRNAs e de expressão gênica em explantes da região CA3 hipocampal e do córtex entorrinal.

2.2 Objetivos específicos

- Obter, por tecnologia de *microarrays*, o perfil de expressão diferencial de microRNAs e a expressão gênica global (mRNA), em diferentes intervalos de tempo (um, 19, 49 e 109 dias pós-insulto) da região CA3 ventral dos seguintes grupos de animais: controle (CTL) e submetidos á hipertermia sem posterior desenvolvimento de crises convulsivas espontâneas (HS);

- Construir redes de co-expressão gênica para os grupos A e B, acima descritos, e para os diferentes intervalos de tempo pós-insulto, com caracterização hierárquica dos genes para identificar a interação entre módulos transcricionais e suas alterações;

Obter os perfis de expressão diferencial de microRNA para os grupos A
 e B nos diferentes intervalos de tempo pós-insulto;

- Análise integrada da expressão de microRNA e expressão gênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais aqui utilizados obedeceram aos critérios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo para o modelo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP sob o n°460/13.

3.1 Protocolos Experimentais

3.1.1 Animais

Nesse projeto foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério em estantes individuais, respeitando o período claro/escuro de 12h a temperatura controlada de $23 \pm 1^{\circ}$ C. Os animais foram acasalados em caixas com 3 fêmeas e 1 macho e a gravidez avaliada por 4 dias subsequentes. A partir do 17º dia de gravidez as fêmeas foram isoladas e, a partir do 20º dia, o nascimento dos filhotes é verificado.

Ao nascimento dos animais (P0), a ninhada é reduzida a oito filhotes (sacrifício por decapitação) para evitar desnutrição e, no dia posterior (P1), foi feita a sexagem. Os machos e as fêmeas foram separados após o desmame.

3.1.2 Modelo Experimental de Convulsão Febril

No décimo primeiro dia de vida (P11) os animais foram submetidos ao protocolo de convulsão febril induzida por hipertermia [Baram et al, 1997; revisto em Dubé et al., 2010]. Inicialmente, os animais foram pesados e depois expostos em uma caixa de vidro, com duas lâmpadas incandescentes de 40W 220V (Figura 1), a temperatura média de 39,5 a 42°C, até atingirem a temperatura corporal de 39,5 – 41°C, medida via oral por um termômetro específico a cada 15 minutos. Após esse período, os animais foram mantidos a essa temperatura por um período de 45 minutos [Baram et al., 1997; Dubé et al., 2000; Dubé et al., 2006; Azevedo et al., 2018].

Passados 45 minutos de hipertermia, os animais foram novamente pesados, hidratados e monitorados por um período de uma hora (período pósindução) por uma câmera para análise comportamental. O grupo controle não foi exposto ao calor, mas também foi mantido na caixa utilizada para indução febril.



Figura 1. Caixa para indução de hipertermia, adaptada do modelo original de Dubé (2006).

3.1.3 Grupos experimentais

Para o posterior estudo das alterações genômicas decorrentes da indução febril, os animais foram separados em três grupos: controle (CTL) e submetidos à hipertermia sem posterior desenvolvimento de crises convulsivas espontâneas (HS). A separação dos grupos sem crises e com crises foi feita de acordo com a escala de Racine. Em todos esses grupos foram incluídos animais em diferentes períodos (dias) pós-insulto (P12, P30, P60 e P120). No grupo de animais submetidos ao insulto hipertérmico cerca de 45% apresentaram crises convulsivas entre 2 e 5 na escala de Racine.

Os períodos para a análise temporal foram escolhidos de acordo com os seguintes critérios: P12 – Avaliação da alteração aguda pela escala de Racine, um dia após o insulto hipertérmico; P30 – Análise do primeiro período de latência entre a hipertermia e o início das crises (ver abaixo); P60 – Período de susceptibilidade a crises não recorrentes induzidas por cainato (ver abaixo); P120 – Período de crises recorrentes [Dubé et al., 2006; Dubé et al., 2010]. Em

P30 os ratos submetidos previamente ao insulto hipertérmico mostram-se resistentes à droga pro-convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) [Gonzalez-Ramirez et al., 2009] Inversamente, em P60 esses animais mostram-se susceptíveis a doses sub-convulsivantes da droga cainato [Zhao et al., 1985].

3.1.4 Microdissecção do hipocampo

A microdissecção foi realizada após decapitação [Gorter et al., 2006]. A região CA3 ventral do hipocampo dos animais foi removida por incisão na parte ventrocaudal abaixo da fissura rinal.

As amostras de CA3 foram estocadas em tubos Eppendorf contendo RNA laterTM (Qiagen) para posterior extração do RNA total.

3.2 Obtenção de microRNA

3.2.1 Extração do RNA total

As amostras microdissecadas de CA3 foram homogeneizadas com o TissueRupter (Qiagen, catálogo #9001272, Valencia, CA, EUA) e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen, catálogo #74804, Valencia, CA), de acordo com especificações do fabricante. A integridade desse material foi avaliada no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) por meio do valor RIN (RNA Integrity Number). Apenas amostras com RIN≥7, isto é, com mais de 70% de moléculas integras, foram utilizadas nos experimentos posteriores de marcação e hibridação.

3.2.2 Amplificação e marcação fluorescente do RNA

O kit Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies) foi utilizado na geração do cRNA (RNA complementar) para as etapas de marcação e hibridização. O protocolo consiste da transcrição reversa de uma alíquota de 100ng de RNA total em cDNA. Esse, por sua vez, é sintetizado em cRNA, marcado com o corante fluorescente Cy3 e purificado por colunas pelo kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, catálogo #25-0500-71, Alemanha).

A qualidade do cRNA foi calculada com base em medidas espectrofotométricas obtidas no equipamento Nanovue (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA). Foram consideradas qualificadas para uso nos experimentos as amostras que apresentaram rendimento superior a 1.65 µg e atividade específica de Cy3 maior que 9 pmol por µg de RNA.

Para as lâminas de microRNA foi utilizado o kit miRNA Complete Labeling and Hyb (Agilent Tecnologies, catálogo #5190-0456, Santa Clara, CA, EUA) para as etapas de marcação e hibridação.

3.2.3 Microarrays de mRNA e microRNA

Os experimentos para análise de expressão gênica e de microRNAs foram realizados na plataforma da Agilent Technologies, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante. Para expressão gênica foram utilizadas lâminas de *microarrays* de mRNA, com oligonucleotídeos de 60 bases contendo 44.000 transcritos do genoma de rato (Agilent whole rat genome 4X44K v3 oligonucleotide microarrays, G2519F-028282). Para expressão de microRNAs foram utilizadas lâminas de *microarrays* com oligonucleotídeos de 15 bases contendo 719 transcritos de microRNAs de rato (Agilent Rat miRNA Microarray, Release 19.0, 8x15K, G4471A-046066).

3.2.4 Hibridização das lâminas de *microarrays* e aquisição dos dados

As lâminas de mRNA foram incubadas a 65°C por 17 horas e as lâminas de microRNA foram incubadas a 55°C por 20 horas, ambas em uma câmara de hibridização e submetidas às etapas de lavagem de acordo com o protocolo da Agilent versão 6.5 (maio de 2010), para as lâminas de mRNA, e o protocolo da Agilent versão 2.4 (setembro de 2011), para as lâminas de microRNA. Após a hibridização, as imagens foram capturadas pelo leitor Agilent Bundle (Agilent Technologies G2505C) e extraídas pelo software Feature Extraction versão 10.7.3 (Agilent Technologies), para que os valores de expressão fossem obtidos a partir do parâmetro de sinal processado (*gProcessedSignal*). A qualidade dessas lâminas foi analisada pelo relatório de controle de qualidade gerado pelo

software. As médias das intensidades das sondas de cada gene foram obtidas e em seguida, foi calculado o logaritmo na base 2 (log2) dos valores encontrados.

3.3 Bioinformática

3.3.1 Análise das redes de co-expressão gênica (WGCNA)

Construção de redes e identificação de módulos - Todos os genes anotados em GO (23.786 genes para CTL e HS) foram usados para *weighted gene coexpression network analysis* (WGCNA). As redes foram construídas usando o pacote de software WGCNA R. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para a obtenção de medidas de similaridade de co-expressão gênica e para a construção subsequente de uma matriz de adjacência utilizando matriz de poder brando e de sobreposição topológica (TOM). O processo de *soft threshold* transforma a matriz de correlação para imitar a topologia sem escala. O TOM é usado para filtrar conexões fracas durante a construção da rede. A identificação do módulo é baseada no TOM e no clustering hierárquico de linkage médio. Mantendo-se o critério de topologia livre de escala, a potência (*soft threshold*) β = 12 foi considerada para ambas as redes (Figura 2). Por fim, um algoritmo de corte (*dynamic tree cut*) foi usado para a seleção de ramos do dendrograma.

O módulo eigengene (ME) é definido como o primeiro componente principal de um determinado módulo, que pode ser considerado um representante dos perfis de expressão gênica em um módulo. A associação ao módulo (MM), também conhecida como conectividade baseada em eigengene (kME), é definida como a correlação de cada perfil de expressão gênica com o módulo eigengene de um determinado módulo.

A conectividade do nó intramodular foi calculada considerando: i) kTotal, toda a conectividade de rede de cada gene; ii) kWithin, conexões genéticas com outros genes no mesmo módulo [Langfelder & Horvath, 2008].



Figura 2. Análise de topologia de rede para grupos CTL e HS. Os ráficos no lado direito mostram o índice de ajuste livre de escala (eixo y) como uma função da potência de *Soft Threshold* (eixo x) para grupos CTL (a) e para HS (b). Os gráficos no lado esquerdo mostram o *Mean Connectivity* (eixo y) como uma função de *Soft Threshold* (eixo x).

Associação de module-*traits* - Primeiro obteve-se a Significância do Gene (GS), que é um valor da correlação entre a característica (intervalos de tempo) de cada grupo e os valores de expressão gênica. O GS médio para um módulo particular é considerado como uma medida de significância do módulo (MS). Os valores de GS foram obtidos usando a correlação de Pearson e para atribuir um valor p à significância do módulo, usamos o teste t de Student. Os módulos, que apresentaram alto valor de correlação $|r| \ge 0.5$ e p <0.01 foram selecionados para análise funcional biológica de genes modulares.

Análise intramodular para seleção de hubs - kTotal e kWithin foram usados para categorização do gene. Genes apresentando alto kTotal e kWithin foram considerados como hubs no módulo. Nós plotamos todos os valores genéticos em um gráfico kTotal vs kWithin.

Análise de preservação de módulo (análise de rede por consensus) - Por fim, foi realizada uma análise de rede de consenso para avaliar a preservação do módulo na rede HS quando a redes de consenso, uma rede comparativa entre os módulos HS e CTL. Esta preservação é obtida calculando as sobreposições de cada par de módulos de consenso HS usando o teste exato de Fisher para atribuir um valor p a cada uma das sobreposições entre pares [Langfelder & Horvath, 2008].

Construção e visualização das sub-redes de co-expressão gênica – As subredes de co-expressão gênica para os três módulos positivamente e significativamente correlacionados ao período P120 do grupo HS foram construídas utilizando threshold de 0.10, o qual considera apenas conexões com sobreposição topológica (TOM) acima desse valor. A visualização das conexões das sub-redes entre os genes mais conectados de cada módulo foi realizada utilizando o *software* Cytoscape (versão 3.1.0, <u>www.cytoscape.org</u>). Além disso, os miRNAs altamente correlacionados aos genes dos hubs foram integrados nessas sub-redes.

3.3.2 Análise do perfil de microRNAs nas redes de co-expressão

Os miRNAs diferencialmente expressos (DE) ao longo dos intervalos de tempo selecionados para cada grupo (CTL ou HS) foram identificados usando o teste ANOVA (p <0,05) no software TMeV (TIGR MultiExperiment Viewer). Os miRNAs abundantemente expressos para cada grupo e intervalos de tempo foram selecionados a partir de um ponto de corte acima do desvio padrão (SD) das médias das amostras.

A expressão dos *hubs* também foi avaliada ao longo dos intervalos de tempo para cada grupo (CTL ou HS) utilizando o teste ANOVA (p <0,05) no TMeV para identificar os genes dos polos DEs.

As interações do miRNA com *hubs* foram avaliadas pela correlação de Pearson em software R para identificar a correlação negativa ($r \le -0.75$) que mostra a interação biológica entre os genes do miRNA.

4. RESULTADOS

4.1 Análise comparativa de miRNAs

Duas análises globais de miRNA foram realizadas: uma análise temporal para identificar os miRNAs diferencialmente expressos (DEs) ao longo dos intervalos de tempo para cada grupo (CTL e HS) e outras análises pontuais para identificar os miRNAs abundantemente expressos para cada intervalo de tempo no grupo CTL ou HS.

Na primeira análise foram encontrados 20 miRNAs DE específicos para o grupo CTL, 13 específicos para o grupo HS e 20 miRNAs comuns para ambos os grupos, conforme descrito na Tabela 2.

Group	DE miRNA
CTL and HS	let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, miR-125a-5p,
(20 miRNAs)	miR-128-3p, miR-149-5p, miR-190a-3p, miR-190a-5p, miR-223-3p,
	miR-328a-3p, miR-329-3p, miR-342-3p, miR-369-3p, miR-374-3p,
	miR-434-3p, miR-494-3p,miR-539-3p, miR-98-5p
CTL	let-7f-5p, let-7i-5p, miR-1-5p, miR-1224, miR-125b-5p, miR-186-5p,
(20 miRNAs)	miR-190b-5p, miR-191a-3p, miR-196c-5p, miR-204-5p, miR-221-3p,
	miR-29a-3p, miR-331-5p, miR-338-3p, miR-365-3p, miR-376b-5p, miR-
	466b-2-3p, miR-466b-3p, miR-6216, miR-7b
HS	miR-126a-5p, miR-129-2-3p, miR-136-5p, miR-144-5p, miR-16-3p,
(13 miRNAs)	miR-32-3p, miR-3473, miR-376c-5p, miR-384-3p, miR-466b-5p,
	miR-672-5p, miR-99a-5p, miR-9a-5p

Tabela 2. Análise comparativa de miRNAs diferencialmente expressos(DE) entre os grupos CTL e HS.

Na identificação dos miRNAs abundantemente expressos foram encontrados um total de 12 miRNAs (Tabela 3), todos identificados como DE em um ou ambos os grupos experimentais. Quatro miRNAs abundantes - let-7b-5p, let-7c-5p, miR-1224, miR-125b-5p - são comuns a todos os grupos e intervalos de tempo e os outros são abundantemente expressos apenas em um grupo e/ou intervalos.

abundantly	P1	2	P3	30	Pe	60	P1	20
miRNAs	CTL	HS	CTL	HS	CTL	HS	CTL	HS
let-7a-5p		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
let-7b-5p	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
let-7c-5p	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
let-7d-5p			Х				Х	Х
let-7e-5p							Х	Х
miR-1224	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
miR-125a-5p				Х		Х		
miR-125b-5p	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
miR-128-3p								Х
miR-29a-3p								Х
miR-328a-3p					Х			
miR-494-3p	Х	Х			Х	Х		Х

Tabela 3.Análise comparativa dos miRNAs DE abundantementeexpressos nos grupos CTL e HS.

4.2 Análise das redes de co-expressão gênica por WGCNA

Redes globais de expressão gênica foram obtidas por WGCNA para cada grupo CTL e HS. Após a adotar um valor de corte, o dendrograma de agrupamento hierárquico identificou 14 módulos genéticos distintos para CTL e 12 para HS. O tamanho do módulo variou de 105 (módulo *salmon*) a 1.369 (módulo *turquoise*) para o grupo CTL e de 93 (módulo *green yellow*) para 2.205 (módulo *turquoise*) para o HS. A análise integrativa do gene miRNA mostrou que os miRNAs são restritos em relação a um grupo específico e/ou intervalo de tempo.

4.2.1 Rede CTL

A análise das relações módulo-trait identificou nove módulos - *blue, magenta, pink, black, green, red, greenyellow, turquoise, brown, yellow* - significativamente associados (p <0,05) a pelo menos um intervalo de tempo (Figura 3a).



Figura 3. WGCNA do grupo CTL (a) Heatmap para a relação entre módulos e cinco características: sexo e os intervalos de tempo P12, P30, P60 e P120. A barra de cores indica os valores de significância do módulo (MS) que variam de 1 a -1. No heatmap, os números indicam os valores de correlação do módulo e os números entre parênteses indicam p-valores. Nove módulos - *magenta, pink, black, green, red, green yellow, turquoise, brown and yellow* - estão positivamente e altamente associados a pelo menos um intervalo de tempo (p <0,05). (b) Dendrograma dos módulos obtido para o grupo CTL. As caixas vermelhas indicam os sub-meta-módulos com *hubs* que têm alta correlação com miRNAs. miRNAs em negrito são DE apenas no grupo CTL. * miR-125b-5p é abundantemente expresso apenas no grupo CTL.

Como esses módulos apresentaram valores de correlação altos e positivos, categorizamos os genes desses módulos por meio de medidas de conectividade intramodular para identificar os hubs, ou seja, os nós da rede que apresentam kTotal alto e kWithin (Figura 4).



Figura 4. Categorização de *hubs* para o grupo CTL. Gráficos de dispersão entre conectividade de rede (eixo x) e conectividade intramodular (eixo y) dos genes presentes nos módulos *blue, magenta, pink, black, green, red, turquoise, brown, and yellow* da rede CTL. As cores dos pontos identificam os hubs selecionados.

Todos os *hubs* são genes DE e suas funções biológicas aparecem descritas na Tabela 4.

module	Module	CTL Hubs	P12 P3	30 P6	0 P120	p-value	GO annotation	DE miRNAs co-expression (Pearson`s <i>r</i> value)
a ₁	Black	Apod	1			5E-08	brain development	
		Cd302				8E-06	phagocytosis	
						1E-08	positive regulation of MAPK cascade; nervous system	
		Dok4				6E 00	development	
		Gsta1				0E-09	glutatnione binding	
		GSta3				3E-07	glutatnione transferase activity	
		mano				1E-00	hyperinterior signaling pathway	
		Kiaa0895					hrain	miR-223-3n (-0.80)
		Mphosph6				8E-07	maturation of 5.8S rRNA	
		Rac3				8E-09	neuron projection; cell morphogenesis	
	Red	Clpx				4E-11	ATP metabolic process	
		Mpg				2E-10	peptidyl-tRNAs recycling	miR-1-5p (-0.78); miR-186-5p (-0.85); miR-196c-5p (-0.85)
		Pigc				3E-09	GPI anchor biosynthetic process	miR-1-5p (-0.82); miR-186-5p (-0.86); miR-196c-5p (-0.87)
							nucleoside:sodium symporter activity; nucleoside	
		SIc28a2		_		4E-10	transmembrane transport	
		o . In				05 40	positive regulation of glucose import; positive	
	Green	Crebiz				8E-13	regulation of lipid biosynthetic process	
		Dact1				12-13	Instone deacetylase binding; negative regulation of	miP-1-5n (-0.87); miP-186-5n (-0.82); miP-196c-5n (-0.87)
		Dacin Dnaih3				2E-14	heat shock protein (HSP40 family member)	miR-1-5p (-0.86); miR-186-5p (-0.82); miR-196c-5p (-0.85)
		Med29				1E-11	transcriptional mediator: transcriptional regulation	miR-1-5p (-0.85); miR-186-5p (-0.78); miR-196c-5p (-0.85)
						1E-12		miR-1-5p (-0.86); miR-186-5p (-0.79); miR-196c-5p (-0.84); mil
		Nkiras2					GTPase activity; signal transduction	223-3p (-0.81)
						5E-12	protein serine/threonine kinase activity; magnesium	miR-1-5p (-0.87); miR-186-5p (-0.80); miR-196c-5p (-0.85); mil
		Pik1					ion binding	223-3p (-0.78)
						8E-10		miR-1-5p (-0.78); miR-186-5p (-0.76); miR-196c-5p (-0.85); mi
		Pycr1					cellular response to oxidative stress	223-3p (-0.77)
						2E-13	quinolinate catabolic process; nicotinate-nucleotide	
		Qprt				75 44	diphosphorylase (carboxylating) activity	
		Corr -				/⊑-14	mDNA opliging via collision	miR-1-5p (-0.87); miR-186-5p (-0.81); miR-196c-5p (-0.87); mil
		Sneco1				15-11	actin outoekeleton organization	220-0µ (-0.70)
		Specci				4E-11	sterol biosynthetic process: oxidation-reduction	miP-1-5n (-0.81); miP-186-5n (-0.78); miP-196c-5n (-0.84); mil
		Tm7sf2				46 11	process	223-3n (-0.77)
	-					3E-13	axon development: positive regulation of neuron	220 00 (011 1)
	Pink	Dynit1					projection development	miR-1-5p (-0.81)
		,				2E-11	chaperone-mediated protein folding; heat shock	
		Fkbp5					protein binding	
		Galk1	1			1E-10	galactose binding; galactitol metabolic process	
		Gtf2a2				1E-08	transcription factor binding	miR-1-5p (-0.78); miR-196c-5p (-0.76)
		Mcfd2				8E-09	calcium ion binding; brain development	
		MrpI14				3E-09	translation	
		Ppp2r3b				2E-09	calcium ion binding; dopaminergic synapse (KEGG)	miR-1-5p (-0.81); miR-196c-5p (-0.80)
		Ptrh2			_	2E-07	negative regulation of gene expression	miR-1-5p (-0.75); miR-196c-5p (-0.85)
		Ptrna i				9E-00	peptidyl-tRNAs recycling	
		Zfn575				46 11	brain	miR-1-5n (-0.81)
	Magenta	Abcc2			-	9E-07	ATP binding; ABC transporters (KEGG)	miR-1-5p (-0.76)
	0	Abcf2				2E-05	ATP binding	
		C1d				2E-05	RNA binding; RNA degradation (KEGG)	miR-196c-5p (-0.78)
		lft46				1E-08	cilium assembly; intraciliary transport	miR-374-3p (-0.76)
		Lsm7				0.0002	mRNA splicing, via spliceosome	
		RGD1308430				6E-08	not determined	miR-1-5p (-0.83); miR-186-5p (-0.80); miR-196c-5p (-0.87)
		Smg6				2E-06	regulation of RNA stability	
		Tmco3				0.0003	proton transmembrane transport	
		Tspan6				2E-08	negative regulation of NIK/NF-kappaB signaling	miR-1-5p (-0.78); miR-186-5p (-0.79); miR-196c-5p (-0.79)
	Green valle	Avorto				ə⊑•11	calcium-mediated signaling; positive regulation of dutamate secretion	miR-125a-5n (-0.84); [et-7a-5n (-0.82); miP 125h 5n* (-0.95)
	Green yellow	Avpria Cachela				1E-02	yoltage-gated calcium charged activity	miR-125b-5p* (-0.76)
		Code127				1E-00	vonage-gated caloum channel activity	mmx-1230-30 (-0.70)
		Dhx40				1E-07	mRNA splicing via spliceosome	
		Fad1				2E-07	small GTPase binding: regulation of GTPase activity	miR-125a-5p (-0.76); miR-125b-5p* (-0.83)
		Hmox1				6E-07	cell death; ferroptosis (KEGG)	let-7a-5p (-0.77); miR-125b-5p* (-0.82)
						1E-08	retinaldehyde binding protein: expression	
		Ribp1					predominatly restricted to brain	miR-125a-5p (-0.80); let-7a-5p (-0.76); miR-125b-5p* (-0.85)
		Tmem167b				3E-09	ubiquitously expressed transmembrane protein	miR-186-5p (-0.75)
		Zc3h6				1E-07	negative regulation of transcription, DNA-templated	
	Brown	Dpy30				0.0012	histone H3-K4 methylation	miR-6216 (-0.75)
		Dstyk				6E-05	negative regulation of apoptotic process	
		Efcab14				1E-05	calcium sensor and calcium signal modulator	
		Fah				8E-08	tyrosine catabolic process	
		Lage3				1E-06	tRNA modificationn; EKC/KEOPS complex	miR-6216 (-0.77)
		Pgis Senedo				2E-08	o-prosphogluconolactonase activity	
		Sapcd2				1E-09	regulation of establishment of planar polarity	min - 128-3p (-0.77)
		Serpina11				00033	negative regulation of endopeptidase activity	шк-т20-эр (-0.77)
		Sama				0.0033	Spliceosomal ShrinP assembly; mRNA splicing	miB-6216 (-0.76)
		Timm17b				3E-06	(NEAG I OWE)	miR-329-3n (-0.75) miR-6216 (-0.76)
		Tmem208				2E-08	vacuolar protein processing	miR-6216 (-0.79)
	Yellow	Atrn				0.0001	response to oxidative stress	mmvz ((0.7 8)
	10101	H2afi				2E-06	chromatin organization	miR-1-5p (-0.77)
		LOC288913				0.0004	not determined	- F. Y M M.
						1E-05	oxidation-reduction process: negative regulation of	
		Qsox1					macroautophagy	
		Spsb4				2E-05	ubiquitin-protein transferase activity	
	Turquoise	Hist1h1t				1E-12	negative regulation of chromatin silencing	miR-125b-5p* (-0.79)
					1		insulin receptor binding; cellular response to brain-	
		lrs1				1E-16	derived neurotrophic factor stimulus	miR-125b-5p* (-0.82)
		Pnn1r16a				9E-14	regulation of phosphoprotein phosphataco activity	miP 125h 5n* (0.78)

Resultados

Tabela 4. Rede CTL: Processo biológico dos *hubs* em módulos positivos e altamente associados a intervalos de tempo (vermelho escuro ou verde escuro) e co-variação da expressão DE miRNA-gene. √ indica *hubs* que apresentam alto valor GS associado a intervalos de tempo; genes em negrito também são genes centrais na rede HS; miRNAs em negrito são DE apenas no grupo CTL; e *miR-125b-5p é abundantemente expresso. As cores da coluna vermelha ou verde indicam, respectivamente, genes expressos em hiper ou hipo em intervalos de tempo.

O dendrograma do módulo CTL eigengene apresentou dois metamódulos principais, aqui designados como <u>a</u> e <u>b</u> (Figura 3b). É interessante notar que o meta-módulo <u>a</u> engloba dois sub-meta-módulos: a1 e a2 que estão relacionados aos intervalos P12 e P30, respectivamente. Os módulos *black* e *green* estão intimamente associados com P12 e P30, respectivamente. O metamódulo <u>b</u> engloba dois sub-meta-módulos: b1 e b2 que estão relacionados aos intervalos P120 e P60, respectivamente. Além disso, os módulos *brown* e *yellow* estão intimamente associados ao intervalo P60 e ao módulo *turquoise* com o P120.

Módulos e genes associados ao intervalo P12 - O intervalo P12, relacionado ao sub-meta-módulo a1, está mais associado aos módulos *blue, magenta, pink, green, red e black*. Neste intervalo de tempo, cinco miRNAs DE - miR-1-5p, miR-186-5p, miR-196c-5p, miR-223-3p, miR-374-3p - regulam a expressão da maior parte dos *hubs* neste intervalo.

O módulo *magenta* possui três *hubs* com funções relevantes para desenvolvimento cerebral. O *hub Tspan6* está envolvido na transmissão sináptica no hipocampo e na plasticidade neuronal [Salas et al., 2017]. Os *hubs Smg6* e *Tmco3* estão relacionados ao processo sináptico e são importantes para o crescimento neuronal [Long et al., 2010; Duan et al., 2018a].

O módulo *pink* engloba também três importantes *hubs*. O gene *Dynlt1* regula a gênese de neurônios a partir de precursores corticais [Gauthier-Fisher et al., 2009]. O *Gtf2a2* é um gene alvo de p53 envolvido no processo apoptótico [Girardot et al., 2015], assim como *Ptrh2*, que atua na sobrevivência celular durante o desenvolvimento cerebral [Hu et al., 2014].

O módulo *black* apresenta quatro *hubs* importantes. O gene *Apod* está relacionado à motilidade neuronal [Rickhag et al., 2006], diferenciação neuronal e ao impulso nervoso [García-Mateo et al., 2018]. O gene *Dok4* está relacionado à diferenciação neuronal [Grimm et al., 2001], mielinização celular e axonogênese [Blugeon et al., 2011]. Outro *hub*, *Cd302*, está relacionado à migração de células dendríticas e à fagocitose [Lo et al., 2016]. O *hub Rac3* está associado ao desenvolvimento de interneurônios gabaérgicos nas regiões cortical e hipocampal [de Curtis, 2014].

O módulo green apresenta três hubs relevantes – Crebl2, Nkiras2 e Pycr1 - todos também são hubs no grupo HS. O gene Crebl2 está relacionado a apoptose e proliferação celular [Ma et al., 2015]. O gene Nkiras2 está relacionado ao estresse oxidativo [Luna et al., 2009]. O hub Pycr1 está associado ao desenvolvimento neural e à autofagia [Zaki et al., 2016].

O módulo *red* abriga o *hub Clpx*, [Al-Furoukh et al., 2015], que codifica uma enzima mitocondrial essencial para a proteostase em células de mamíferos.

Módulos e genes associados ao intervalo P30 - O intervalo P30, incluído no sub-meta-módulo a2, está significativamente associado a três módulos - *salmon, tan* e *green yellow* - sendo este último o único módulo significativamente correlacionado com P30. Neste intervalo de tempo, quatro miRNAs DE - miR-125a-5p, miR-125b-5p (esses dois também abundantemente expressos neste período), miR-7a-5p, miR-186-5p - regulam a expressão de muitos *hubs* nesses módulos.

O módulo green yellow engloba diversos genes envolvidos com apoptose, uma função relevante para o desenvolvimento cerebral. Dos nove *hubs* pertencente a este módulo, três deles - *Cacna1g, Fgd1* e *Hmox1* - estão relacionados à apoptose e transmissão neural. O *Cacna1g* é um gene que codifica uma subunidade de um canal de cálcio ativado de baixa voltagem, relacionado à ativação do potencial de ação [Calderón-Rivera et al., 2015], aumentando a convulsão espontânea na epilepsia quando mutado [Calhoun et al., 2016]. O gene *Fgd1* está relacionado a diversas vias de desenvolvimento neuronal [Bottani et al., 2007] e o gene *Hmox1* está associado à neuroplasticidade e vias de sobrevivência celular [Schipper & Song, 2015].

36

Módulos e genes associados ao intervalo P60 - O intervalo P60, relacionado ao sub-meta-módulo b2, é altamente associado aos módulos *brown*, *yellow* e *purple* e os *hubs* associados a este período são regulados por três miRNAs DE: miR-1-5p, miR-128-5p e miR-329-5p.

O módulo *brown* possui onze *hubs*, sendo um deles, *Dstyk*, altamente expresso no cérebro de ratos jovens (2 semanas) e adultos (100 dias). Esse gene atua indução de apoptose por vias dependente e independente de caspase e sua ablação experimental reduz a capacidade de aprendizado e memória em roedores [Li et al., 2014]. O módulo *yellow* possui dois *hubs* relevantes: o gene *Atrn* - também *hub* no grupo HS - está relacionado aos processos de mielinização e mutações neste gene levam à hipomielinização neuronal [Izawa et al., 2010]; o gene *Qsox1* se relaciona à apoptose e ao estresse oxidativo [Morel et al., 2007], processos importantes para a manutenção neuronal.

Módulos e genes associados ao intervalo P120 - Por fim, o intervalo P120, associado ao submeta-módulo b1, está mais relacionado ao módulo *turquoise* que apresenta três *hubs* regulados por miR-125b-5p, miRNA DE abundantemente expresso neste intervalo de tempo. Um desses *hubs*, *Irs1*, é um fator neurotrófico para os neurônios do hipocampo [Zheng & Quirion, 2004].

Resumidamente, os módulos significativos no grupo CTL abrangem muitos *hubs* envolvidos em funções relevantes para o desenvolvimento do cérebro, tais como apoptose, transmissão neural e vias de sinalização.

4.2.2 Rede HS

A análise das relações módulo-*trait* identificou oito módulos - *greenyellow, blue, red, brown, green, black, magenta, and purple* - que foram significativamente (p <0,05) associados a pelo menos um intervalo de tempo (Figura 5a).



Figura 5. WGCNA do grupo HS (a) Heatmap para a relação entre módulos e cinco características: gênero e intervalos de tempo P12, P30, P60 e P120. Barra de cores indica os valores de significância do módulo (MS) que variam de 1 a -1. No heatmap, os números indicam os valores de correlação do módulo e os números entre parênteses indicam p-valores. Oito módulos - *green yellow, blue, red, brown, green, black, magenta and purple* - estão positivamente e altamente associados a pelo menos um intervalo de tempo (p <0,05). (b) Dendrograma do módulo obtido para o grupo HS. Caixas vermelhas indicam os sub-meta-módulos com *hubs* que têm alta correlação com miRNAs. miRNAs em negrito são DE apenas no grupo HS.

Comparativamente ao grupo CTL, em HS todos os módulos têm, além de *hubs* envolvidos em funções importantes para o desenvolvimento cerebral, vários outros *hubs* relevantes envolvidos com funções relacionadas a epilepsia, tais como remodelamento da cromatina, estresse oxidativo e inflamação. Como oito módulos apresentaram os valores de correlação mais altos e positivos com pelo menos um intervalo de tempo, categorizamos os hubs desses módulos por meio de conectividade intramodular (Figura 6).



Figura 6. Categorização de hubs para o grupo HS. Gráficos de dispersão entre conectividade de rede (eixo x) e conectividade intramodular (eixo y) dos genes presentes nos módulos *green yellow, blue, red, brown, green, black, magenta, and purple* da rede HS. As cores dos pontos identificam os *hubs* selecionados.

As funções biológicas desses hubs estão listadas na Tabela 5.

ub-Meta odule	Module	HS Hubs	P12 F	P30 P6	0 P120	p-value	GO annotation	DE miRNAs co-expression (Pearson`s r value
	Red	Amd1				2.52E-10	polyamine metabolic process	miR-190a-5p (-0.88); miR-144-5p (-0.78)
		Dcakd Dhcr7	7			2.85E-12 2.76E-12	coenzyme A biosynthetic process; phosphorylation regulation of cholesterol biosynthetic process; oxidation-reduction process; 7 displayed biotectory and the proceeding of the process of	-
		Fam89b	~			3.81E-08	denydrocholesterol reductase activity negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway: apactive could tag of SMAD protein gional transduction	
		Galk1	-			7 08E-12	galactose metabolic process: galactokinase activity	
		Nkiras2				4.60E-13	signal transduction	
		Tmem229b	 Image: A second s			5.17E-12	transmembrane protein	
	Brown	B3gnt7				4.1E-15	poly-N-acetyllactosamine biosynthetic process; protein glycosylation	
		Crebi2				1.1E-16	cell differentiation; positive regulation of glucose import; positive regulation of lipid biosynthetic process; positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	r miR-190a-5p (-0.85); miR-144-5p (-0.80)
		Mtss1				5.8E-13	magnesium ion homeostasis; actin cytoskeleton organization	
		Pgap1				1.7E-14	ER to Golgi vesicle-mediated transport; GPI anchor metabolic process	
		Plk1				7.7E-15	G2/M transition of mitotic cell cycle; microtubule bundle formation; protein serine/threonine kinase activity	
		Ppp1r9b				2.2E-16	D2 dopamine receptor binding; calcium-mediated signaling; hippocampus development; dendrite development; cerebral cortex development	miR-190a-5p (-0.82); miR-144-5p (-0.79)
		Ppp2r3b				0.0E+00	protein dephosphorylation; negative regulation of cell proliferation; calcium-	
		B				0.55.40	dependent protein serine/threonine phosphatase activity	
		Pycr1 Brm2				2.5E-12 5.7E-13	cellular response to oxidative stress; oxidation-reduction process; oxidation-reduction process; positive regulation of cell proliferation	
		Sdc1				6.7E-13	inflammatory response; canonical Wnt signaling pathway; response to	
							calcium ion; response to cAMP	
	Blue	Adora2a				5.7E-14	type 5 metabotropic glutamate receptor binding; Inhibitory postsynaptic potential; excitatory postsynaptic potential; membrane depolarization; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of neuron apoptotic process; glutamatergic synapse	
		Ccdc61				2.0E-13	centrosome component	
		Dnajc22				7.1E-14	heat shock protein family (Hsp40) member	
		Gnpda2 Gnem?				4.2E-12	N-acetylglucosamine catabolic process; glucosamine catabolic process	
		Kctd9				1.4E-14	intracellular signal transduction	miR-384-3p (-0.75)
		Nudt1				1.3E-14	dATP catabolic process; purine nucleotide catabolic process; DNA repair	
	Croon vall	Zfp426				0.0E+00	regulation of transcription, DNA-templated	
	Gleen ye	Mvb12a				0.0038	protein transport	
		Pth2		 Image: A second s		9.69E-04	neuropeptide signaling pathway	
		Samd4b		1		2.23E-04	neuron development	
		Vcpip1		1		1.43E-05	protein ubiquitination; endoplasmic reticulum membrane fusion	
	Black	Cdca7		<u> </u>		0.0023 3.2E-09	regulation of peptidase activity	
	Brack	Cdk1				5.4E-10	mitotic cell cycle; apoptotic process; cellular response to hydrogen peroxide	
		Cmbl				2.3E-10	hydrolase activity	miR-190a-5p (-0.85); miR-144-5p (-0.78)
		Col5a3				9.2E-12	extracellular matrix organization; cell-matrix adhesion; cell adhesion	
		Fa2h				5.9E-07	central nervous system myelin maintenance; perpheral nervous system myelin maintenance; fatty acid metabolic process; oxidation-reduction process	miR-384-3p (-0.75)
		Lgi3				1.4E-07	regulation of exocytosis	miR-384-3p (-0.75)
		Nid2				4.5E-11	cell-matrix adhesion; calcium ion binding	
		Plp1				1.8E-07	axon development; central nervous system myelination; glial cell differentiation; inflammatory response; myelination	
		RGD156336	5			1.8E-09	not determined	
		Serpina11				3.5E-11	negative regulation of endopeptidase activity	
		Tead2				3.1E-09	hippo signaling; negative regulation of cell death; cellular response to	
	Green	Chaf1b				3 1E-08	chromatin assembly: histone binding	
	0.000	Fbp2				8.0E-12	gluconeogenesis; dephosphorylation	
		Gins1				2.9E-11	DNA replication	
		Gpx7				2.7E-11	oxidation reduction process	
		Gskip				9.3E-09	regulation of Wnt signaling pathway; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	
		Kif16b				8.3E-09	Golgi to endosome transport; early endosome to late endosome transport	
		Nop9				7.1E-09	RNA binding	
		Nm1				1.40E-09	neuron projection extension	miR-384-3p (-0.75)
		Nusap1				8.34E-11	positive regulation of mitotic nuclear division; mitotic chromosome condensation	
		Rangrf				2.45E-10	ER to Golgi vesicle-mediated transport; regulation of membrane potential;	
		Socs2			1	2.84E-10	positive regulation of neuron differentiation; intracellular signal transduction;	
							negative regulation of JAK-STAT cascade; regulation of cell growth	
	Magenta	Action		_		3.48E-06	chromatin remodeling: nervous system development	·
	magenta	Atp13a2			1	7.48E-06	autophagosome organization; calcium ion transmembrane transport; cellular	
							response to oxidative stress; positive regulation of protein secretion; positive	
		0-1-00				4.455.00	regulation of exosomal secretion	
		Cdkn2aip				4.45E-06 5.35E-05	negative regulation of cell growth; positive regulation of signal transduction:	nin (-130a-5p (-0.79)
							cellular response to DNA damage stimulus	
		Cptp			1	2.56E-04	regulation of interleukin-1 beta secretion; negative regulation of NLRP3	
		0.45				0.445.00	inflammasome complex assembly; negative regulation of autophagy	
		Uyp5a Dann1				0.14E-06	election (ranster activity PDZ domain binding	mirt-190a-sp (-0.80)
		Lig4			1	7.34E-05	central nervous system development; DNA repair	
		Sec62			1	9.17E-06	protein transport	miR-190a-5p (-0.76)
		Sh2d3c				0.0015	positive regulation of signal transduction	
	Purele	Smarca2				1.89E-04	negative regulation of cell proliferation; chromatin remodeling	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	- u pie	Frs2				3.00E-06	activation of MAPK activity; neurotrophin TRKA receptor binding	
		Glo1			1	1.64E-07	glutathione metabolic process; negative regulation of apoptotic process	
		Golga4			1	3.59E-08	positive regulation of axon extension; Golgi to plasma membrane protein	miR-190a-5p (-0.84); miR-144-5p (-0.75)
		Heno12				1 975 05	transport	miR-342-3n (-0.76)
		Pkp4				2.63E-05	cell-cell junction assembly; cell-cell adhesion	nin(-0+2-0p (-0.70)
		Rps2				5.15E-08	ribosomal protein S2; RNA binding	

Tabela 5. Rede HS: Processo biológico dos *hubs* em módulos positivos e altamente associados a intervalos de tempo (vermelho escuro ou verde escuro) e co-variação da expressão DE miRNA-gene. √ indica *hubs* que apresenta, alto valor GS associado a intervalos de tempo; genes em negrito são também *hubs* na rede CTL; miRNAs em negrito são DE apenas no grupo HS. As cores da coluna vermelha ou verde indicam, respectivamente, genes expressos em hiper ou hipo em intervalos de tempo.

O dendrograma do módulo HS apresentou dois meta-módulos principais, aqui designados como <u>a</u> e <u>b</u> (Fig. 5b). É interessante notar que o meta-módulo a engloba dois sub-meta-módulos: a1 e a2, que estão relacionados aos intervalos P30 e P12, respectivamente. Os módulos *red* e *green yellow* estão intimamente associados com P12 e P30, respectivamente. O meta-módulo b engloba dois sub-meta-módulos: b1 e b2 que estão relacionados aos intervalos P60 e P120, respectivamente. Além disso, os módulos *black* e *yellow* estão fortemente associados ao intervalo P60 e o módulo *green* ao intervalo P120. Todos os intervalos de tempo apresentam muitos *hubs* relacionados a três miRNAs DE: miR-384-3p, miR-190a-5p e miR-144-5p.

Módulos e genes associados a P12 - O intervalo P12, relacionado ao submeta-módulo a2, está significativamente associado aos módulos *red, blue, brown* e *turquoise*.

O módulo *red* tem sete *hubs*, sendo três deles possivelmente relevantes na reação ao insulto hipertérmico. Com efeito, um deles, o gene *Amd1* está relacionado à regulação da diferenciação de precursores neurais [Zhang et al., 2012]. O *hub Dhcr7* está associado a alterações nas transmissões serotoninérgicas quando mutado em camundongos [Trent et al., 2014]. O *Nkiras2*, também *hub* em P12 no grupo CTL, está relacionado ao estresse oxidativo [Luna et al., 2009].

O módulo *blue* possui oito *hubs*, dois deles relacionados à transmissão neural e um deles relacionado à resposta inflamatória. O polimorfismo do *hub Adora2a* está relacionado ao estado epiléptico febril e convulsões [Shinohara et al., 2013]. O *hub Kctd9* é um membro da família dos genes *Kctd*, que está relacionado à epilepsia mioclônica com curso grave, sendo diferencialmente expresso em pacientes com epilepsia do lobo temporal farmacologicamente resistentes [Van Bogaert et al., 2007]. O gene *Gpsm3* está relacionado ao inflamassoma [Giguère et al., 2014] e regula *NIrp3*, um gene envolvido na atividade epiléptica e convulsões [Meng et al., 2014].

O módulo *brown* tem dez *hubs* e quatro deles, sendo dois *hubs* também no grupo CTL, têm funções relevantes no cérebro. O gene *Crebl2* está relacionado a apoptose e proliferação celular [Ma et al., 2015]. O *hub Mtss1* regula o crescimento de neuritos [Yu et al., 2016]. O gene *Sdc1* atua na proliferação e manutenção de células progenitoras neurais [Wang et al., 2012] e está relacionado à via Wnt [Yu et al., 2017], importante no processo de epileptogênese na epilepsia do lobo temporal [Huang et al., 2015]. O *hub Pycr1* está associado ao desenvolvimento neural e à autofagia [Zaki et al., 2016].

Módulos e genes associados a P30 - O intervalo P30, associado ao submetamódulo a1, é altamente relacionado ao módulo *green yellow* e nenhum DE miRNA foi associado à regulação da expressão dos *hubs* desse módulo. O módulo *green yellow* possui seis *hubs*, sendo dois deles relacionados à transmissão neuronal: o gene *Atrn*, já descrito na rede CTL, está relacionado à mielinização; e o gene *Pth2* está relacionado à transmissão glutamatérgica excitatória [Dobolyi et al., 2010] e à crises tardias quando expresso em níveis não adequados [Dimitrov & Usdin, 2010]. O gene *Samd4b* se relaciona à diferenciação celular durante a neurogênese em mamíferos [Amadei et al., 2015].

Módulos e genes associados a P60 - O intervalo P60, relacionado ao submeta-módulo b1, é altamente associado aos módulos *black* e *yellow*. O módulo *black* possui onze *hubs*, três deles relacionados à transmissão neural. O gene *Cdk1* quando mutado leva à epilepsia associada a lesões glioneuronais [Schick et al., 2007]. A regulação positiva de *Plp1* está relacionada à atividade elétrica na epilepsia do lobo temporal [Arion et al., 2006]. O gene *Tead2* regula a proliferação celular durante o desenvolvimento neocortical [Vied et al., 2014]. O *hub Lgi3* foi relacionado ao funcionamento alterado de canais iônicos na epilepsia do lobo temporal [Arion et al., 2002]. **Módulos e genes associados a P120 -** O intervalo P120, associado ao submeta-módulo b2, está mais relacionado a quatro módulos – *green, pink, magenta* e *purple* - que apresentam *hubs* fortemente correlacionados com os miRNAs DE - miR-384-3p, miR-190a-5p e miR-144-5p - expressos em todos os intervalos de tempo, e ao miR-342b-3p, um miRNA DE expresso somente neste intervalo. A análise de enriquecimento neste módulo mostrou que muitos dos seus genes estão envolvidos em funções como transmissão neural, fagocitose, apoptose e resposta imune/inflamatória.

O módulo green apresenta onze hubs, quatro deles relacionados à transmissão neural, vias de sinalização relevantes na epilepsia, e apoptose. O hub Gpx7 está relacionado ao estresse oxidativo e é hiperexpresso na convulsão induzida por cainato em ratos jovens [Friedman et al., 2013]. O gene Gskip está relacionado à apoptose e à via Wnt, via atuante na epileptogênese na ELTM [Huang et al., 2015]. O gene Socs2, que regula os processos apoptóticos, é diferencialmente expresso no hipocampo do rato após convulsão induzida por pilocarpina [Rosell et al., 2003].

O módulo *magenta* possui onze *hubs*, três dos quais relacionados à funções neurais e outros dois relacionados à resposta imune/inflamatória. O *hub Actl6b*, alias *Baf53b*, regula a plasticidade sináptica, que é diminuída na sua hipoexpressão [White et al., 2016]. O *hub Atp13a2* está relacionado à regulação do metabolismo de ferro no cérebro [Hayflick et al., 2018]. O metabolismo de ferro no cérebro é alterado pelo estado inflamatório induzido pela epilepsia de insulto febril e isso está sendo avaliado como um potencial biomarcador na epilepsia [Auvin et al., 2017]. O *hub Cab39* está relacionado à regulação da via PI3K/AKT na epilepsia do lobo temporal [Duan et al., 2018b) e na epilepsia experimental no rato [Mazumder et al., 2018]. O *hub Cdkn2aip*, ou CARF, é uma proteína que se liga ao DNA e tem função relevante no desenvolvimento sináptico e na função neuronal [West, 2011]. O gene *Cptp*, está envolvido na geração de eicosanoides pro-inflamatórios [Simanshu et al., 2013]. O *hub Lig4* codifica uma proteína com forte efeito neuroprotetor por inibir o canal de cálcio TREK-1 [Wang et al., 2018].

O módulo *purple* tem sete *hubs*, sendo três deles claramente relacionados a excitação neuronal e epilepsia, como descrito a seguir. O gene *Frs2* está relacionado à maturação neuronal no giro denteado e à sinaptogênese excitatória [Nandi et al., 2018]. O gene *Glo1* tem variantes polimórficas em humanos [Tao et al., 2016] e em camundongos [Distler et al., 2013] que se relacionam à epilepsia de início tardio, refratariedade a drogas anticonvulsivantes e susceptibilidade aumentada a crises convulsivas. Por fim, o gene *Hspa13* está relacionado à via ERAD (*Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation*), um marcador da epilepsia associada a crises febris convulsivas [Todd et al., 2014].

Considerando- se apenas os três módulos altamente correlacionados ao período P120 em HS, foram construídas as sub-redes desses módulos (Figura 7). Investigou-se a correlação entre miRNAs DE e os hubs dessas sub-redes. Nota-se aqui que o módulo *green* não apresentou, no threshold adotado (0.10) ligações com os demais módulos. Por correlação de Pearson, verificou-se que, no módulo *green*, o miR-384-3p interage com o *hub Nrn1l*. Nos módulos *magenta* e *purple*, o miR-190a-5p liga-se aos *hubs: Cyb5a* e *Sec62*, ambos de alto GS, e *Cab39*, em *magenta* e ao *hub* de alto GS *Golga4* em *purple*. O miR-144-5p interage também com *Golga4*. Finalmente, miR-342-3p interage com o *hub* s foi feita nos parágrafos anteriores e o papel dos três módulos aqui considerados será analisado na seção de Discussão.

É importante mencionar que todos os *hubs* em HS são genes DE com variação temporal e que grande parte possui um alto valor de GS. Este resultado indica que módulos contendo genes HGS como *hubs* estão relacionados a funções variáveis ao longo de todos os intervalos de tempo ou a funções associadas a estágios agudos (P12) ou crônicos (P120).

Em resumo, os módulos significativos no grupo HS abrangem, além de *hubs* envolvidos em funções importantes para o desenvolvimento do cérebro, muito outros *hubs* que estão associados a funções relacionadas ao processo de epileptogênese, como inflamação, neurogênese e excitação neuronal.



Figura 7. Sub-redes para os três módulos HS associados a P120 e miRNAs altamente correlacionados a *hubs*. Genes e miRNAs são representados como nós circulares e vee, respectivamente. Os nós estão coloridos de acordo o módulo: *green*, *magenta* e *purple*. Os *hubs* são identificados pela cor da borda do nó: azul para *hubs* e amarelo para *hubs* com alto valor de GS. As linhas cinzas indicam ligações gene-gene e linhas cinzas escuro indicam interações gene-miRNA altamente correlacionados (r \leq -0,75).

4.2.3 Análise do consenso do grupo HS

A análise da rede HS com a rede consenso entre os grupos CTL e HS mostrou que os módulos significativos e mais preservados – *brown*, *green* e *black* - estão relacionados a funções associadas ao desenvolvimento cerebral, como homeostase celular transmissão neural. Por outro lado, os módulos significativos, mas menos preservados – *green yellow, blue, red, magenta* e *pink* - estão mais associados aos estágios agudo (P12) e crônico (P120) (Figura 7). Conclui-se assim que os módulos menos preservados constituem uma assinatura genômica funcional que caracteriza o insulto precipitante inicial em P12 e a instalação do período de crises crônicas em P120.





Figura 8. Análise comparativa de módulos HS e módulos de consenso HS-CTL. Os números na tabela indicam as contagens de genes na interseção dos módulos de consenso correspondentes. A barra de cores gradiente de branco a vermelho indica o valor log (p) (teste exato de Fisher).

5. DISCUSSÃO

O estudo dos mecanismos celulares e moleculares evolvidos na epileptogênese constitui um assunto de grande interesse, uma vez que o melhor entendimento desse processo poderia levar a novas alternativas terapêuticas e à descoberta de drogas anti-epileptogênicas. Nesse contexto, é preciso considerar que na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), a forma mais comum da doença em adultos, o insulto precipitante, febril ou não-febril, determina o subtipo da ELTM, o que inclui características clínicas, como a refratariedade a drogas anti-convulsivantes, período silente e, muito importante, o mecanismo molecular da doença [Bando et al., 2011; Engel et al., 2012; Bando et al., 2013; Moreira-Filho et al., 2015]. Boa parte dos estudos sobre o mecanismo molecular da ELTM utilizou explantes de hipocampo obtidos em cirurgia de epilepsia. Embora esses estudos tenham contribuído muito para o conhecimento da ELTM refratária, não há aqui possibilidade de comparações com tecido normal, ou de observação temporal do desenvolvimento da doença. Como abordado na seção de Introdução, o recurso a modelos animais é uma boa alternativa para contornar as limitações dos estudos com explantes cirúrgicos. Assim, neste trabalho conduzimos uma investigação temporal integrada de redes de co-expressão gênica e microRNAs em um modelo experimental de convulsão febril induzida por hipertermia, utilizando ratos Wistar [Azevedo et al., 2018].

Estudos genômicos comparativos foram conduzidos na região CA3 ventral do hipocampo de animais submetidos a insulto hipertérmico (HS) e controles (CTL), nos intervalos de tempo P12, P30, P60 e P120 (ver Métodos). Diferenças significativas entre os grupos HS e CTL foram primeiramente observadas na análise dos níveis de expressão de miRNA. Essa análise revelou cinquenta e três miRNAs expressos diferencialmente (DE), dos quais vinte estavam presentes tanto no grupo HS como no grupo de controle. Vinte miRNAs eram DE no grupo CTL, treze miRNAs eram DE no grupo HS, no qual os animais desenvolveram crises convulsivas após o tratamento hipertérmico. Para melhor compreender o papel desses miRNA ao longo dos intervalos de tempo nos grupos CTL e HS, conduzimos o estudo da variação da expressão gênica global em CA3 por WGCNA - nos mesmos intervalos de tempo e grupos de

47

comparação - e integramos esses resultados aos dados de miRNA em módulos transcricionais selecionados, conforme apresentado na seção anterior.

O modelo de insulto por hipertermia utilizado nesse trabalho revelou similaridades interessantes com a epilepsia do lobo temporal medial associada ao insulto febril. Com efeito, 45% dos animais apresentaram crises convulsivas após o insulto hipertérmico. Crianças que sofrem uma crise febril prolongada até quatro anos de idade têm risco entre 23 e 42% risco desenvolver epilepsia [Shinnar et al., 2008; Hesdorffer et al., 2016], com o aumento do risco associado à ocorrência de status epilepticus. Além disso, os animais passaram a ter crises recorrentes e espontâneas após 120 dias de vida - isto é, após um período de latência - o que também é comumente observado em pacientes que desenvolvem ELTM após insulto febril no início da infância [Moreira-Filho et al., 2015]. Mais importante ainda, a análise temporal do perfil transcricional e de miRNA dos dois grupos, CTL e HS, ao longo de quatro intervalos de tempo revelou um quadro indicativo do mecanismo molecular da doença, indo do insulto precipitante inicial (IPI) até o início das crises convulsivas crônicas. Esse quadro é a seguir discutido, comparando-se os resultados obtidos em cada intervalo de tempo entre os grupos CTL e HS.

Intervalo P12 – No intervalo P12, os animais do grupo CTL apresentaram um perfil de expressão gênica em CA3 caraterizado por módulos e *hubs* majoritariamente associados a funções relevantes para o desenvolvimento cerebral, o que é esperado em se tratando de aninais jovens que não foram submetidos ao insulto hipertérmico (ver Tabela 4). Assim, observou-se no grupo CTL que o módulo *magenta* se relaciona à plasticidade neuronal e ao processo sináptico, com destaque para os genes *Tmco3*, *Tspan6* e *Smg6* [Long et al., 2010; Salas et al., 2017; Duan et al., 2018a]. O módulo *pink* está associado à gênese neuronal e à apoptose, enquanto o módulo *black* se associa à diferenciação, motilidade e migração celular no hipocampo. *Apod*, um *hub* desse módulo, altamente expresso e significante em P12, está associado à diferenciação motilidade e transmissão do impulso nervoso em neurônios [García-Mateo et al., 2018]. O módulo *green* se relaciona à apoptose, estresse oxidativo e autofagia envolvendo, respectivamente, os genes *Crebl2*, *Nkiras2* e *Pycr1* [Luna et al., 2009; Ma et al., 2015; Zaki et al., 2016].

Já no grupo HS, em que P12 corresponde ao intervalo imediatamente pós insulto, o perfil de expressão gênica associa-se principalmente a funções relacionadas ao impacto do insulto precipitante no tecido da região CA3. Esse impacto traduz-se em alterações na transmissão sináptica e na resposta inflamatória (ver Tabela 5). Realmente, foi observado em HS nesse intervalo que o módulo red possui genes relacionados ao estresse oxidativo e alterações em transmissões sinápticas, respectivamente, com os hubs Nkiras2 e Dhcr7 [Luna et al., 2009; Trent et al., 2014]. Já o módulo brown se associa à apoptose, proliferação celular e vias de sinalização em epilepsia, como Wnt, importante no processo de epileptogênese no lobo temporal, principalmente com os genes Crebl2 e Sdc1 [Ma et al., 2015; Yu et al., 2017]. E, por fim, o módulo blue apresenta hubs fortemente associados a características distintivas da epilepsia, como convulsões, resistência a drogas anticonvulsivantes e atividade do inflamassoma, respectivamente, com os hubs Nlpr3 e Adora2a, Kctd e Gpsm3 [Van Bogaert et al., 2007; Shinohara et al., 2013; Giguère et al., 2014; Meng et al., 2014].

Intervalo P30 – No intervalo P30, os animais do grupo CTL apresentaram um perfil de expressão gênica por WGCNA caracterizado por um único módulo, *green yellow*, o qual contém *hubs* associados a funções do desenvolvimento cerebral (ver Tabela 4). Nesse módulo se destacam os genes: *Cacna1g*, associado a transmissão neuronal [Calderón-Rivera et al., 2015]; *Fgd1*, atuante em diversas vias de desenvolvimento neuronal e [Bottani et al., 2007]; *Hmox1*, relacionado à plasticidade neuronal [Schipper & Song, 2015].

No grupo HS, P30 é primeiro intervalo do período silente, isto é, do período de latência entre o insulto inicial e o aparecimento de convulsões recorrentes. O módulo significativamente relacionado a esse intervalo é o *green yellow*, que se caracteriza por apresentar um perfil de expressão gênica associada à neurogênese, com o *hub Samd4b* [Amadei et al., 2015], e à transmissão neuronal, com os genes *Atrn*, envolvido na mielinização e também *hub* no grupo CTL, e *Pth2*, envolvido na regulação da transmissão glutamatérgica [Dimitrov & Usdin, 2010]. Cabe lembrar que nesse primeiro intervalo silente os aninais apresentam resistência a convulsões induzidas por PTZ [Gonzalez-Ramirez et al. 2009].

49

Intervalo P60 – No intervalo P60, os animais do grupo CTL apresentaram um perfil de expressão gênica em CA3 caraterizado por módulos e hubs relacionados principalmente à manutenção neuronal. Assim, observou-se no grupo CTL que os módulos *brown* e *yellow* apresentam, respectivamente, como principais *hubs* os genes *Dstyk* e *Qsox1*, relacionados a processos apoptóticos e de resistência ao estresse oxidativo, importantes para o desenvolvimento cerebral [Morel et al., 2007; Li et al., 2014].

Já no grupo HS o segundo intervalo do período silente tem o módulo *black* como significativamente associado. Esse módulo se caracteriza por um perfil de expressão gênica relacionado a alterações na transmissão neural relacionadas ao processo de início das crises convulsivas recorrentes. Nesse módulo, como detalhado na seção de Resultados, diversos hubs estão associados a alterações cerebrais que ocorrem em processos epilépticos: lesões de células neuronais, atividade elétrica e alterações em canais iônicos na epilepsia do lobo temporal, respectivamente, com os genes *Cdk1*, *Plp1* e *Lig3* [Gu et al., 2002; Arion et al., 2006; Schick et al., 2007].

É interessante notar que em P60 já há uma susceptibilidade do cérebro a convulsões, o que é evidenciado pelo fato de que, nesse intervalo, animais previamente insultados têm convulsões quando submetidos a doses sub-convulsivantes de cainato [Zhao et al. 1985].

Intervalo P120 – No intervalo P120, os animais do grupo CTL apresentaram um perfil de expressão gênica por WGCNA caracterizado por um único módulo, o *turquoise*, o qual contém *hubs* associados a funções como silenciamento da cromatina e estimulo neurotrófico (ver Tabela 4). *Irs1*, um *hub* desse módulo, altamente expresso e significante em P120, é um fator neurotrófico para neurônios hipocampais [Zheng & Quirion, 2004].

Já no grupo HS, no qual P120 corresponde ao intervalo de início das crises convulsivas recorrentes, o perfil de expressão gênica associa-se principalmente a funções provavelmente relacionadas ao processo de recorrência das crises convulsivas. Esse processo traduz-se, principalmente, em alterações na transmissão neural, fagocitose, apoptose e resposta imune/inflamatória. Realmente, foi observado em HS nesse intervalo que o módulo green possui genes relacionados ao estresse oxidativo, à apoptose e vias de sinalização em epilepsia, como Wnt, importante no processo de epileptogênese no lobo temporal [Huang et al., 2015]. Esse módulo também inclui os genes Gpx7 e Socs2, os quais são diferencialmente expressos em modelos de convulsões induzidas farmacologicamente, sendo o Socs2 um hub altamente expresso e significante em P120 [Rosell et al., 2003; Friedman et al., 2013]. O módulo magenta apresenta genes relacionados à plasticidade sináptica e neuroproteção envolvendo, respectivamente, os genes Actl6 e Lig4, ambos altamente expressos e significantes em P120 [White et al., 2016; Wang et al., 2018]. Nesse módulo, também se destacam dois outros genes significantes e altamente expressos nesse período: Atp23a2 e Cptp, relacionados à processos inflamatórios [Simanshu et al., 2013; Hayflick et al., 2018]. Por fim, o módulo purple possui genes relacionados ao estímulo neuronal excitatório e à epilepsia. Nesse módulo, merecem destaque o gene Fr2, associado ao processo de excitação neuronal, o gene Glo1, no qual variações polimórficas se relacionam à susceptibilidade a crises e à refratariedade farmacológica, e o gene Hspa13, relacionado a crises febris convulsivas [Todd et al., 2014; Tao et al., 2016; Nandi et al., 2018]. Esses três genes são significantes e altamente expressos no intervalo P120.

Em síntese, o estudo genômico temporal aqui conduzido num modelo de insulto hipertérmico em ratos, que mimetiza a epilepsia do lobo temporal mesial de insulto precipitante febril [Dubé et al. 2012; Azevedo et al. 2018], permitiu: identificar perfis de expressão gênica e de miRNA que caracterizam os períodos imediatamente sequentes ao insulto precipitante, os período silente, ou de latência, e o período de início das crises convulsivas recorrentes.

É interessante notar que esse modelo animal recapitula a epileptogênese por insulto precipitante febril, do insulto ao início da fase crônica. Os resultados da análise temporal aqui apresentados - não possíveis de serem obtidos no estudo de explantes cirúrgicos de pacientes com ELTM refratária, muitos dos quais tiveram insulto precipitante febril – constituem uma contribuição à descoberta de potenciais alvos terapêuticos que sirvam, no futuro, ao desenvolvimento de drogas antiepileptogênicas.

6. CONCLUSÕES

1) O modelo animal de insulto hipertérmico em ratos mostrou ser adequado para a investigação dos mecanismos moleculares associados epilepsia do lobo temporal mesial induzida por insulto precipitante febril.

2) A adoção de uma metodologia de análise temporal da expressão gênica e de miRNAs na região CA3 do hipocampo permitiu identificar eventos moleculares associados à resposta ao insulto precipitante hipertérmico, ao período silente pós-insulto, bem como ao período em que se instalam as convulsões recorrentes.

3) A identificação de genes e miRNAs associados à resposta ao insulto, período silente e período de crises recorrentes é uma contribuição para a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Para isso, futuramente, devem ser realizados, neste mesmo modelo animal, estudos complementares de histopatologia do cérebro e condução de estudos em outras áreas além de CA3, tais como amigdala e córtex.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Furoukh N, Ianni A, Nolte H, et al. ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPRmt) in mammalian cells. Biochim Biophys Acta, 2015. 1853(10):2580-2591.
- Albert I, Thakar J, Li S, et al. Boolean network simulations for life scientists. Source Code Biol Med, 2008. 14;3:16.
- Alegro MC, Silva AV, Bando SY, et al. Texture analysis of high resolution MRI allows discrimination between febrile and afebrile initial precipitating injury in mesial temporal sclerosis. Magn Reson Med, 2012. 68: 1647– 1653.
- Ahmad S, Marsh ED. Febrile status epilepticus: current state of clinical and basic research. Semin Pediatr Neurol, 2010. 17(3):150-4.
- Amadei G, Zander MA, Yang G, et al. A Smaug2-Based Translational Repression Complex Determines the Balance between Precursor Maintenance versus Differentiation during Mammalian Neurogenesis. J Neurosci, 2015. 35(47):15666-15681.
- Arion D, Sabatini M, Unger T, et al. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis, 2006. 22: 374–387.
- Aronica E, Fluiter K, Iyer A, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammationassociated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. Eur J Neurosci, 2010. 31(6):1100-7.
- Auvin S, Walker L, Gallentine W, et al. Prospective clinical trials to investigate clinical and molecular biomarkers. Epilepsia, 2017. 58(S3):20-26.
- Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? Trends Neurosci, 2002. 25(10): 518-24.
- Azevedo H, Khaled NA, Santos P, et al. Temporal analysis of hippocampal CA3 gene coexpression networks in a rat model of febrile seizures. Disease Models & Mechanisms, 2018. 11:1-12.
- Bae EK, Jung KH, Chu K, et al. Neuropathologic and clinical features of human medial temporal lobe epilepsy. J Clin Neurol, 2010 6:73-80.
- Balosso S, Maroso M, Sanchez-Alavez M, et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. Brain, 2008. 131: 3256–3265.
- Bando SY, Alegro MC, Amaro E JR, et al. Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy. PLoS One, 2011. 6:e26268.
- Bando SY, Silva FN, Costa LF, et al. Complex Network Analysis of CA3 Transcriptome Reveals Pathogenic and Compensatory Pathways in Refractory Temporal Lobe Epilepsy. PLoS One, 2013. 8(11):e79913.
- Barabási AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. Nat Rev Genet, 2004. 5(2):101-13.
- Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network Medicine: a network based approach to human disease. Nat Rev Genet, 2011. 13: 56–68.
- Baram TZ, Gerth A, Schultz L. Febrile seizures: an age appropriate model. Brain Res Dev, 1997. 246:134 –143.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004. 116(2):281-97.
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Nabbout R, et al. Fever, genes and epilepsy. Lancet Neurol, 2004. 3: 421–30.

Blair RD. Temporal lobe epilepsy semiology. Epilepsy Res Treat. 2012; 2012:751510.

- Blugeon C, Le Crom S, Richard L, et al. Dok4 is Involved in Schwann Cell Myelination and Axonal Interaction In Vitro. GLIA, 2011. 59:351-362.
- Bot AM, Debski KJ, Lukasiuk K. Alterations in miRNA levels in the dentate gyrus in epileptic rats. PLoS One, 2013. 8:e76051.
- Bottani A, Orrico A, Galli L, et al. Unilateral Focal Polymicrogyria in a Patient With Classical Aarskog–Scott Syndrome Due to a Novel Missense Mutation in an Evolutionary Conserved RhoGEF Domain of the Faciogenital Dysplasia Gene FGD1. Am J Med Genet A, 2007. 143A(19):2334-2338.
- Calderon-Rivera A, Sandoval A, Gonzalez-Ramirez R, et al. Regulation of Neuronal Cav3.1 Channels by Cyclin-Dependent Kinase 5 (Cdk5). Plos One, 2015. 10(3):1-19.
- Calhoun JD, Hawkins NA, Zachwieja NJ, Kearney JA. Cacna1g is a genetic modifier of epilepsy caused by mutation of voltage-gated sodium channel Scn2a. Epilepsia, 2016. 57(6):1-8.
- Chaussabel D, Baldwin N. Democratizing systems immunology with modular transcriptional repertoire analyses. Nat Rev Immunol, 2014. 14: 271-280.
- Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. BMC Bioinformatics. 2013;128:14.
- Choy M, Dubé CM, Ehrengruber M, Baram TZ. Inflammatory processes, febrile seizures, and subsequent epileptogenesis. Epilepsy Curr, 2014. 14(1Suppl):15-22.
- Chungath M, Shorvon S. The mortality and morbidity of febrile seizures. Nat Clin Pract Neurol, 2008. 4: 610–621.
- Clauset A, Shalizi CR, Newman MEJ. Power-law distributions in empirical data. SIAM Review, 2009. 51:661-703.
- Cornejo BJ, Mesches MH, Coultrap S, et al. A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. Ann Neurol, 2007. 61: 411-426.
- Costa LF, Tognetti MAR, Silva FN. Concentric characterization and classification of complex network nodes: Application to an institutional collaboration network. Physica A, 2013. 387: 6201-6214.
- de Curtis I. Roles of Rac1 and Rac3 GTPases during the development of cortical and hippocampal GABAergic interneurons. Frontiers, 2014. 8:1-7.
- Dimitrov E, Usdin TB. Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues Modulates the Mouse Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Via Paraventricular Glutamatergic Neurons. J Comp Neurol, 2010. 518(21):4375-4394.
- Distler MG, Gorfinkle N, Papale LA, et al. Glyoxalase 1 and its substrate methylglyoxal are novel regulators of seizure susceptibility. Epilepsia, 2013. 54(4):649–657.
- Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. Prog Neurobiol, 2010. 90(1):29-59.
- Duan C, Wang H, Chen Y, et al. Whole exome sequencing reveals novel somatic alterations in neuroblastoma patients with chemotherapy. Cancer Cell Int, 2018. 18(21):1-6.
- Duan W, Chen Y, Wang XR. MicroRNA-155 contributes to the occurrence of epilepsy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Int J Mol Med, 2018. 42(3):1577-1584.
- Dubé C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, et al. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. Ann Neurol, 2000. 47:336–344.
- Dubé C, Vezzani A, Behrens M, et al. Interleukin-1beta contributes to the generation of

experimental febrile seizures. Ann Neurol, 2005. 57:152-155.

- Dubé C, Richichi C, Bender RA, et al. Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. Brain, 2006. 129:911–922.
- Dubé CM, Ravizza T, Hamamura M, et al. Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. J Neurosci, 2010. 30:7484–7494.
- Dubé CM, McClelland S, Choy MK, et al. Fever, febrile seizures and epileptogenesis. Basic Mechanisms of the Epilepsies, 2012. 4th edition.
- Engel J Jr, Mcdermott MP, Wiebe S, et al. Early Randomized Surgical Epilepsy Trial (ERSET) Study Group. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. JAMA, 2012. 307: 922–930.
- Fisher RS, Boas WE, Blume W, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia, 2005. 46: 470–472.
- Friedman LK, Mancuso J, Patel A, et al. Transcriptome profiling of hippocampal CA1 after early-life seizure-induced preconditioning may elucidate new genetic therapies for epilepsy. European Journal of Neuroscience, 2013. 38:2139-2152.
- Garcia-Mateo N, Pascua-Maestro R, Perez-Castellanos A. Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glycocalyx removal. GLIA, 2018. 66:670-687.
- Gauthier-Fisher A, Lin DC, Greeve M, et al. Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. Nature Neuroscience, 2009. 12(6):735-744.
- Giguere PM, Gall BJ, Ezekwe EAD, et al. G Protein Signaling Modulator-3 Inhibits the Inflammasome Activity of NLRP3. J Biol Chem, 2014. 289(48):33245-33257.
- Girardot M, Pecquet C, Chachoua I, et al. Persistent STAT5 activation in myeloid neoplasms recruits p53 into gene regulation. Oncogene, 2015. 34:1323-1332.
- Gonzalez-Ramirez M, Salgado-Ceballos H, Orozco-Suarez SA, Rocha L. Hyperthermic seizures and hyperthermia in immature rats modify the subsequent pentylenetetrazole-induced seizures. Seizure, 2009. 18: 533-536.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, et al. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. J Neurosci, 2006. 26(43):11083-110.
- Gorter JA, Iyer A, White I, et al. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis, 2014. 62:508-20.
- Grabenstatter HL, Del Angel YC, Carlsen J, et al. The effect of STAT3 inhibition on status epilepticus and subsequent spontaneous seizures in the pilocarpine model of acquired epilepsy. Neurobiol Dis, 2014. 62: 73-85.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, et al. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. JCR, 2001. 154(2):345-354.
- Gu W, Wevers A, Schroder H, et al. The LGI1 gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins. FEBS letters, 2002. 519:71-76.
- Guedes FA, Galvis-Alonso OU, Leite JP. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. J. epilepsy clin. Neurophysio, 2006. 12 suppl.1: 10-17.

- Han T, Qin Y, Mou C, et al. Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1β receptor through PI3K/Akt pathway. Am J Transl Res, 2016. 8(10): 4499-4509.
- Hayflick SJ, Kurlan MA, Hogarth P. Neurodegeneration with brain iron accumulation. Handb Clin Neurol, 2018. 147:293-305.
- Heida JG, Pittman QJ. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. Epilepsia, 2005. 46: 1906–1913.
- Hesdorffer DC, Shinnar S, Lax DN, et al. Risk factors for subsequent febrile seizures in the FEBSTAT study. Epilepsia, 2016. 57(7):1042-1047.
- Heuser K, Cvancarova M, Gjerstad L, Tauboll E. Is Temporal Lobe Epilepsy with childhood febrile seizures a distinctive entity? A comparative study. Seizure, 2011. 20: 163-166.
- Hu K, Zhang C, Long L, et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. Neurosci Lett, 2011. 488: 252–257.
- Hu K, Xie YY, Zhang C, et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. BMC Neuroscience, 2012. 13:115.
- Hu H, Matter ML, Issa-Jahns L, et al. Mutations in PTRH2 cause novel infantile-onset multisystem disease with intellectual disability, microcephaly, progressive ataxia, and muscle weakness. Ann Clin Transl Neurol, 2014. 1(12):1024–1035.
- Huang C, Fu XH, Zhou D, Li JM. The Role of Wnt/b-Catenin Signaling Pathway in Disrupted Hippocampal Neurogenesis of Temporal Lobe Epilepsy: A Potential Therapeutic Target? Neurochem Res, 2015. 40:1319-1332.
- Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuwamura M. Abnormal myelinogenesis both in the white and gray matter of the attractin-deficient mv rat. Brain Res, 2010. 1312:145-155.
- Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, et al. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. Brain, 2006. 129: 625–641.
- Jimenez-Mateos EM, Bray I, Sanz-Rodriguez A, et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. Am J Pathol, 2011. 179(5):2519-32.
- Jones T, Jacobsen SJ. Childhood febrile seizures: overview and implications. Int J Med Sci, 2007. 7;4(2):110-4.
- Kamal A, Notenboom RG, de Graan PN, Ramakers GM. Persistent changes in action potential broadening and the slow afterhyperpolarization in rat CA1 pyramidal cells after febrile seizures. Eur J Neurosci, 2006. 23(8): 2230-4.
- Kan AA, van Erp S, Derijck AA, et al. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. Cell Mol Life Sci, 2012. 69:3127–3145.
- Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, et al. Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68:356-64.
- Kobow K, Kaspi A, Harikrishnan KN, et al. Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. Acta Neuropathol, 2013. 126(5):741-56.

- Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics, 2008. 9(559):1-13.
- Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. Neurosci Biobehav Rev, 2013. 37:2887-99.
- Lewis DV, Shinnar S, Hesdorffer DC, et al. Hippocampal sclerosis after febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. Ann Neurol, 2014. 75(2):178-85.
- Li W, Chen L, Li W, et al. Unraveling the characteristics of microRNA regulation in the developmental and aging process of the human brain. BMC Medical Genomics, 2013. 6:55.
- Li K, Liu JW, Zhu ZC, et al. DSTYK kinase domain ablation impaired the mice capabilities of learning and memory in water maze test. Int J Clin Exp Pathol, 2014. 7(10):6486-6492.
- Lo T, Silveira PA, Fromm PD, et al. Characterization of the Expression and Function of the C-Type Lectin Receptor CD302 in Mice and Humans Reveals a Role in Dendritic Cell Migration. J Immulog, 2016. 197:885-898.
- Long AA, Mahapatra CT, Woodruff EA, et al. The nonsense-mediated decay pathway maintains synapse architecture and synaptic vesicle cycle efficacy. J Cell Sci, 2010. 123(19):3303-3315.
- Luna C, Li G, Qiu J, et al. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. Molecular Vision, 2009. 15:2488-2497.
- Ma L, Zhao W, Zhu F, et al. Global characteristics of csig-associated gene expression changes in human heK293 cells and the implications for csig regulating cell proliferation and senescence. Frontiers, 2015. 6:1-11.
- Marchi N, Granata T, Janigro D. Inflammatory pathways of seizure disorders. Trends Neurosci, 2014. 37(2):55-65.
- Mazumder AG, Patial V, Sing D. Mycophenolate mofetil contributes to downregulation of the hippocampal interleukin type 2 and 1β mediated PI3K/AKT/mTOR pathway hyperactivation and attenuates neurobehavioral comorbidities in a rat model of temporal lobe epilepsy. Brain Behav Immun, 2018. S0889-1591(18):30612-3.
- McAuley JJ, Costa LF, Caetano TS. RICH-club phenomenon across complex network hierarchies. Appl Phy Lett, 2007. 91:084103.
- McClelland S, Dubé CM, Yang J, Baram TZ. Epileptogenesis after prolonged febrile seizures: mechanisms, biomarkers and therapeutic opportunities. Neuroscience letters, 2011. 497(3):155-62.
- McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. PLoS One, 2012. 7:e35921.
- Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, et al. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. Oxid Med Cell Longev, 2014. 2014:293689.
- Meng XF, Tan L, Tan MS, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. J Neuroinflammation, 2014. 11:212.
- Meyer AC, Dua T, Ma J, et al. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. Bull World Health Organ 2010. 88: 260–266.
- Miller-Delaney SF, Das S, Sano T, et al. Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. J Neurosci, 2012. 32: 1577–1588.

- Miller-Delaney SF, Bryan K, Das S, et al. Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. Brain, 2015. 138(Pt 3): 616-31.
- Moran C, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Pacheco A, et al. Bmf upregulation through the AMP-activated protein kinase pathway may protect the brain from seizure-induced cell death. Cell Death Dis, 2013. 4:e606.
- Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, et al. Methods for Gene Coexpression Network Visualization and Analysis. Transcriptomics in Health and Disease, 2014a. Chapter 4: 79-94.
- Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, et al. Methods for Gene Coexpression Network Visualization and Analysis. Transcriptomics in Health and Disease, 2014b. Chapter 7: 123-136.
- Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, et al. Community Structure Analysis of Transcriptional Networks Reveals Distinct Molecular Pathways for Early- and Late-Onset Temporal Lobe Epilepsy with Childhood Febrile Seizures. Plos One, 2015. 10(5):1-37.
- Morel C, Adami P, Musard JF. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. Exp Cell Res, 2007. 313(19):3971-3982.
- Nandi S, Alvina K, Lituma PJ, et al. Neurotrophin and FGF Signaling Adapter Proteins, FRS2 and FRS3, Regulate Dentate Granule Cell Maturation and Excitatory Synaptogenesis. Neuroscience. 2018. 369:192-201.
- Newman ME, Girvan M. Finding and evaluating community structure in networks. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2004. 69(2 Pt 2):026113.
- Newman MEJ. Networks An Introduction, 2010. Chapter 8:247-261.
- Notenboom RG, Ramakers GM, Kamal A, et al. Long-lastinMOREL g modulation of synaptic plasticity in rat hippocampus after early-life complex febrile seizures. Eur J Neurosci, 2010. 32(5): 749-58.
- Okamoto OK, Janjoppi L, Bonone FM, et al. Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. BMC Genomics, 2010. 11:230.
- Omran, A., Peng, J., Zhang, C., et al. Interleukin-1β and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 2012. 53: 1215–1224
- Ozbas-Gerçeker F, Redeker S, Boer K, et al. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 2006. 138: 457–474.
- Pandolfo M. Genetics of epilepsy. Semin Neurol, 2011. 31:506–518.
- Patterson KP, Baram TZ, Shinnar S. Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. Neurotherapeutics, 2014 11: 242-250.
- Pernice HF, Schieweck R, Kiebler MA, Popper B. mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy. BMC Neurosci, 2016. 17(1):73.
- Potter WB, O'Riordan KJ, Barnett D, et al. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. PLoS One, 2010. 5(2):e8996.
- Qureshi IA, Mehler MF. Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis. Neurobiol Dis, 2010. 39:53-60.
- Racine RJ. The modificiation of afterdischarge and convulsive behavior in the rat by electrical stimulation, 1969. p.64.

- Rickhag M, Wieloch T, Gido G, et al. Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. J Neurochem, 2006. 96:14-29.
- Rosell DR, Akama KT, Nacher J, Mcewen BS. Differential expression of suppressors of cytokine signaling-1, -2, and -3 in the rat hippocampus after seizure: implications for neuromodulation by gp130 cytokines. Neuroscience, 2003. 122(2):349-358.
- Rosvall M, Bergstrom CT. Maps of random walks on complex networks reveal community structure. PNAS, 2008. 105: 1118-1123.
- Saeed AI, Sharov V, White J, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques, 2003. 34: 374-378.
- Salas IH, Callaerts-Vegh Z, Arranz AM, et al. Tetraspanin 6: A novel regulator of hippocampal synaptic transmission and long term plasticity. PLOS ONE, 2017. 12(2):1-21.
- Sano T, Reynolds JP, Jimenez-Mateos EM, et al. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. Cell Death Dis, 2012. 3:e287.
- Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. Curr Neurosci Rep, 2007. 7:348-354.
- Schick V, Majores M, Fassunke J, et al. Mutational and expression analysis of CDK1, cyclinA2 and cyclinB1 in epilepsy-associated glioneuronal lesions. Neuropathology and Applied Neurobiology, 2007. 33:152-162.
- Schipper HM, Song W. A Heme Oxygenase-1 Transducer Model of Degenerative and Developmental Brain Disorders. Int. J. Mol. Sci, 2015. 16:5400-5419.
- Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. Trends Neurosci, 2012. 35(1):36-46.
- Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti MDAG, et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? An Acad Bras Cienc, 2009. 81:345-365.
- Simanshu DK, Kamlekar RK, Wijesinghe DS, et al. Nonvesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. Nature, 2013. 500(7463):463-467.
- Shinnar S, Hesdorffer DC, Nordli DR, et al. Phenomenology of prolonged febrile seizures. Neurology, 2008. 71:170-176.
- Shinohara M, Saitoh M, Nishisawa D, et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. Neurology, 2013. 80:1571-1576.
- Steinlein OK. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. Nat Rev Neurosci, 2004. 5:400-408.
- Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. BMC Res Notes, 2012. 5:685.
- Szyf M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. Trends Mol Med, 2015. 21(2):134-144.
- Tao H, Si L, Zhou X, et al. Role of glyoxalase I gene polymorphisms in late-onset epilepsy and drug-resistant epilepsy. J Neurol Sci, 2016. 363:200-206.
- Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res Treat, 2012. 630853.
- Todd E, Gurba KN, Botzolakis EJ, et al. GABAA receptor biogenesis is impaired by the γ2 subunit febrile seizure-associated mutation, GABRG2(R177G). Neurobiol Dis, 2014. 69:215-224.

- Trent S, Fry JP, Ojarikre OA, Davies W. Altered brain gene expression but not steroid biochemistry in a genetic mouse model of neurodevelopmental disorder. Mol Autism, 2014. 5(1):21.
- Van Bogaert P, Azizieh R, Desir J, et al. Mutation of a Potassium Channel–Related Gene in Progressive Myoclonic Epilepsy. Ann Neurol, 2007. 61:579–586.
- van Gassen KL, de Wit M, Koerkamp MJ, et al. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 2008. 49: 1055–1065.
- Vezzani A. Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology. Epilepsy Curr, 2014. 14(1 Suppl): 3-7.
- Vidal M, Cusick ME, Barabási AL. Interactome networks and human disease. Cell, 2011. 144(6):986-98.
- Vied CM, Freudenberg F, Wang Y, et al. A multi-resource data integration approach: identification of candidate genes regulating cell proliferation during neocortical development. Front Neurosci, 2014. 8:257.
- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptormediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J Neurosci, 2003. 23: 8692–8700.
- Wang YY, Smith P, Murphy M, Cook M. Global expression profiling in epileptogenesis: does it add to the confusion? Brain Pathol, 2010. 20(1):1-16.
- Wang Q, Yang L, Alexander C, Temple S. The niche factor syndecan-1 regulates the maintenance and proliferation of neural progenitor cells during mammalian cortical development. PLoS One. 2012;7(8):e42883.
- Wang W, Liu D, Xiao Q, et al. Lig4-4 selectively inhibits TREK-1 and plays potent neuroprotective roles in vitro and in rat MCAO model. Neuroscience letters, 2018. 671:93-98.
- Weirauch MT. Gene expression network for the analysis of cDNA microarray data. Applied statistics for network biology: methods in systems biology, 2011. Chapter 11: pp 215–250.
- Winden KD, Karsten SL, Bragin A, et al. A systems level, functional genomics analysis of chronic epilepsy. PLoS One, 2011. 6:e20763.
- Witkos TM, Koscianka E, Krzyzokiak WJ. Practical aspects of microRNA Target Prediction. Current Molecular Medicine, 2011. 11:93-109.
- White AO, Kramar EA, Lopez AJ, et al. BDNF rescues BAF53b-dependent synaptic plasticity and cocaine-associated memory in the nucleus accumbens. Nature communications, 2016. 7:11725.
- Wong M. Commentary: mTOR inhibition suppresses established epilepsy in a mouse model of cortical dysplasia. Epilepsia, 2016. 57(9):1349-1350.
- Yu H, Kim PM, Sprecher E, et al. The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. PLoS Comput Biol, 2007. 3: e59.
- Yu J, Lin S, Liang MWL, et al. Metastasis suppressor 1 regulates neurite outgrowth in primary neuron cultures. Neuroscience, 2016. 333:123-131.
- Yu C, Griffiths LR, Haupt LM. Exploiting Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Neurogenesis-Controlling Lineage Specification and Fate. Front Integr Neurosci, 2017. 11:28.
- Zaki MS, Bhat G, Sultan T, et al. PYCR2 mutations cause a lethal syndrome of microcephaly and failure to thrive. Ann Neurol, 2016. 80(1):59-70.
- Zhang D, Zhao T, Ang HS, et al. AMD1 is essential for ESC self-renewal and is

translationally down-regulated on differentiation to neural precursor cells. Gene & Development, 2012. 26:461-473.

- Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015. doi: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.
- Zhao D, Wu X, Pei Y, Zuo Q. Kindling phenomenon of hyperthermic seizures in the epilepsy-prone versus the epilepsy-resistant rat. Brain Research, 1985. 358(1-2):390-393.
- Zheng WH, Quirion R. Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. J Neurochem, 2004. 89:844-852.
- Zhu X, Gerstein M, Snyder M. Getting connected: analysis and principles of biological networks. Genes Dev, 2007. 21(9):1010-24.