

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Adriana Lis Pereira

**Expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229
associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de
pacientes com diagnóstico de epilepsia**

Ribeirão Preto
2023

Adriana Lis Pereira

**Expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229
associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de
pacientes com diagnóstico de epilepsia**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do **Título de Doutor** em Ciências.

Área de concentração: Morfologia e Medicina
experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha
Tirapelli

Ribeirão Preto
2023

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

Catálogo na publicação
Biblioteca

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Pereira, Adriana Lis

Expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de pacientes com diagnóstico de epilepsia; orientadora, Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli. Ribeirão Preto, São Paulo, 2023

85p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Versão original

1. Epilepsia. 2. Memória. 3. microRNAs.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Lis Pereira

Expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 associados a memória em amígdalas, hipocampus e sangue de pacientes com diagnóstico de epilepsia.

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

Opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura:

Dedicatória

À Deus, Maria Santíssima e aos Anjos de Luz que me guiam
onde Ele deseja que eu esteja.

Aos meus pais e melhores amigos que a vida me deu, José e
Sebastiana, cuja dedicação e esforço imensuráveis permitiram
minha formação acadêmica e moral, possibilitando-me uma
vida voltada à pesquisa e prática clínica com o objetivo de
ajudar pessoas.

Ao meu marido e companheiro pela presença constante,
estímulo, amor e apoio.

À minha amada e admirável orientadora que nunca mediu
esforços para me auxiliar neste caminho acadêmico, pelo
estímulo e amor, sou grata.

Agradecimento Especial

À Profa. Dra. Daniela Pretti Cunha Tirapelli, todo o meu respeito e admiração por tanto amor, gratidão profunda e infinita por me auxiliar com tanto altruísmo, generosidade, sabedoria, confiança, paciência, profissionalismo e serenidade na realização deste trabalho.

Agradecimentos

À Deus por me presentear com uma vida privilegiada e abundante em conhecimento científico, família, amigos e trabalho. Por me permitir honrar minha missão em ajudar pessoas dentro do humilde saber, sempre em construção e, assim poder contribuir com a sociedade, além de me beneficiar como bônus extra, com tanta saúde, coragem e disposição, me permitindo a dádiva de desfrutar e conviver com pessoas maravilhosas durante o desenvolvimento desta tese.

À Universidade de São Paulo, que pela segunda vez, me proporciona a oportunidade e todas as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Fisioterapia da Universidade de Ribeirão Preto pela minha graduação básica e aos Mestres que me despertaram o interesse audacioso de aliar pesquisa científica à prática clínica diária.

A todo Corpo Docente da pós-graduação da FMRP pelos ensinamentos, durante a realização de suas disciplinas.

À Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli por tanto, à começar por acreditar em mim mais do que eu mesma, em momentos extremamente desafiadores, permanecendo ao meu lado mesmo que eu mesma não estivesse do meu próprio lado por ignorância emocional e medo decorrente de situações diversas que ocorreram neste caminhar durante o doutorado. Gratidão por nunca ter desistido de mim e por ter me ensinado não só sobre seu vasto conhecimento científico, mas também sobre SER uma pessoa melhor, confiante, generosa e resiliente. Agradeço as valiosas sugestões e orientações durante a realização desta pesquisa e muito mais por sua amizade, incentivo e ensinamentos que sobrepujam este plano material. Gratidão por me aceitar e me mostrar que não estou sozinha neste mundo de querer ajudar pessoas e ser boa e gentil sem olhar à quem. Gratidão por me fazer acreditar em mim mesma inúmeras vezes e por me ajudar à ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. César Alexis Galera por todo ensinamento com serenidade e sabedoria na minha formação de mestrado da F.F.C.L.R.P. tão úteis em todo trabalho posterior, incluindo este.

Aos amigos, Janaína, Jairo, Maria Julia pela grande amizade desenvolvida e incentivos durante as atividades no laboratório de biologia molecular. Por toda dedicação em horários extras de trabalho e por todo conhecimento dispendido juntamente com ensinamentos sobre SER mais humano e generoso como nossa Mestre Profa Dra Daniela.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli pelo apoio científico e orientações dos aspectos anatômicos estudados nesta tese.

À Secretária, Juliana, pelo profissionalismo e dedicação imensuráveis para comigo nesta jornada de alguns anos de doutorado, sempre com muita educação, gentileza e sabedoria, me auxiliando e guiando.

Às minhas amigas fisioterapeutas Karina Paes e Laís Souza pelo companheirismo e amizade de todos estes anos e pela colaboração durante as ausências no período da pós-graduação.

À Lauceca, pelas fundamentais orientações das referências.

Ao meu marido pelo apoio nos momentos de ansiedade, medo, angústia e principalmente pela compreensão durante minhas ausências. Gratidão pelo seu amor e carinho nesses anos de convivência e por entender minha paixão pela ciência e por minha profissão, me apoiando de todas as formas dentro de sua sabedoria. Gratidão por me colaborar tornando o ambiente mais prazeroso e calmo para estudar.

À minha enteada Jessie, pela grande compreensão e respeito durante minhas ausências nos momentos de convivência familiar e pela alegria que me traz todos os dias que estamos juntas.

Aos meus pais, por me concederem a vida e por, com sua humildade, sabedoria e trabalho me propiciarem estudo, alimento, moradia, saúde e muito conhecimento moral sobre como devemos e podemos ser melhores à cada dia, sobre respeitar ao próximo e ser uma pessoa de bem, de caráter, de princípios e que trabalha para tornar este mundo melhor. Gratidão por tanto amor, por me ajudarem à realizar meus sonhos, por me guiarem em todos os momentos e me aceitarem como e sou, me ensinando dia à dia sob a luz da cristandade como ajudar pessoas e sermos pessoas íntegras.

À minha irmã e amigas irmãs Sueli, Márcia, Andrea Cauchick, Telma, Marília, Andrea Galvani, Maria Júlia, Rogéria e tantas outras, pelo amor e carinho e incentivo a desafiar os meus limites.

Aos meus pais, marido, enteada e amigos amados íntimos pela união, companheirismo e compreensão durante minhas ausências.

À CAPES - o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código do financiamento 001.

RESUMO

PEREIRA, Adriana Lis. **Expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de pacientes com diagnóstico de epilepsia.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

INTRODUÇÃO: A epilepsia é uma doença crônica do sistema nervoso central (SNC), que gera consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais, afetando mais de 70 milhões de pessoas em todo o mundo. O tipo mais comum de epilepsia focal é a do lobo temporal com esclerose hipocampal, caracterizada pela perda celular e gliose no hipocampo e amígdala. Vários estudos têm demonstrado a presença de déficit de memória em pacientes com epilepsia de difícil controle. Entretanto, pouco se sabe sobre os aspectos moleculares envolvidos no processo das alterações da função cognitivas dos pacientes com epilepsia. Neste contexto, a literatura atual tem demonstrado que pequenas moléculas de RNA denominadas microRNAs regulam vias moleculares importantes na epileptogênese. Portanto, identificar possível modulação de alvos moleculares associados a memória pelos microRNAs pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas assim como ferramentas que auxiliem no seu diagnóstico e prognóstico da doença. **JUSTIFICATIVA:** A epilepsia de lobo temporal tem sido associada a disfunções cognitivas, especialmente a distúrbios de memória de curta e de longa duração. Muitos estudos demonstram a presença de déficit de memória em pacientes epiléticos de difícil controle. A identificação de alvos moleculares associados a perda memória pode contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos assim como para o desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem no diagnóstico e prognóstico da doença. **HIPÓTESE:** Nossa hipótese é que microRNAs reguladores de alvos moleculares associados a memória podem estar envolvidos no prognóstico dos pacientes fármacosistentes após tratamento cirúrgico. **OBJETIVO:** Analisar a expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 reguladores de alvos associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de pacientes com diagnóstico de epilepsia. **MÉTODOS:** Amostras de hipocampo e sangue de 20 pacientes com ELTM, foram analisadas, sendo 10 com boa evolução pós-operatória (Engel I) e 10 com evolução pós-operatória insatisfatória (Engel III e IV). Hipocampos de necropsias e sangue de indivíduos saudáveis, foram utilizados para controle. A análise de expressão dos miRNAs foi feita utilizando a técnica de RQ-PCR. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** O microRNA-27a apresentou-se diferencialmente expresso entre o grupo controle e o grupo epilepsia tanto no hipocampo quanto no sangue. Entretanto, o mesmo não foi observado em amígdalas. Também apresentou-se diferencialmente expresso entre Engel I e III e IV tanto no sangue quanto em amígdalas e hipocampos. Entretanto, o padrão de expressão foi inverso, ou seja, em amígdalas o miR-27a apresentou níveis de expressão mais altos no grupo controle quando comparado com o grupo epilepsia e no hipocampo e sangue os níveis de expressão deste microRNA foram mais altos no grupo epilepsia. O microRNA-636 apresentou-se diferencialmente expresso quando observada a classificação de Engel em amígdalas. O microRNA-1229 não apresentou-se diferencialmente expresso entre os grupos estudados em amígdalas. A importância de mais estudos a cerca da participação desses microRNAs e sua elucidação de sua correlação com possíveis efeitos nocivos às funções cognitivas, devem ser investigados na epilepsia, afim de contribuir para novas descobertas

Palavras-chave: Epilepsia, Memória, microRNAs.

ABSTRACT

PEREIRA, Adriana Lis. **Expression of microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 associated with memory in tonsils, hippocampus and blood of patients diagnosed with epilepsy. 2023.** Thesis (Doctorate). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto – SP, 2023.

INTRODUCTION: Epilepsy is a chronic disease of the central nervous system (CNS), which generates neurobiological, cognitive and psychosocial consequences, affecting more than 70 million people worldwide. The most common type of focal epilepsy is temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, characterized by cell loss and gliosis in the hippocampus and amygdala. Several studies have demonstrated the presence of memory deficits in patients with difficult-to-control epilepsy. However, little is known about the molecular aspects involved in the process of changes in the cognitive function of patients with epilepsy. In this context, current literature has demonstrated that small RNA calls called microRNAs regulate molecular pathways important in epileptogenesis. Therefore, identifying possible modulation of molecular targets associated with memory by microRNAs can contribute to the development of new therapeutic approaches as well as tools that help in the diagnosis and prognosis of the disease. **JUSTIFICATION:** Temporal lobe epilepsy has been associated with cognitive dysfunctions, especially short- and long-term memory disorders. Many studies have demonstrated the presence of memory deficits in difficult-to-control epileptic patients. The identification of molecular targets associated with memory loss can contribute to the development of new therapeutic targets, as well as to the development of new tools that aid in the diagnosis and prognosis of the disease. **HYPOTHESIS:** Our hypothesis is that regulatory microRNAs of molecular targets associated with memory may be involved in the prognosis of drug-resistant patients after surgical treatment. **OBJECTIVE:** To analyze the expression of microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 that control targets associated with memory in tonsils, hippocampus and blood of patients diagnosed with epilepsy. **METHODS:** Hippocampus and blood samples from 20 patients with TLE were prognoses, 10 with good postoperative evolution (Engel I) and 10 with unsatisfactory postoperative evolution (Engel III and IV). Hippocampus from necropsies and blood from healthy individuals were used as controls. The expression analysis of the miRNAs was performed using the RQ-PCR technique. **RESULTS AND CONCLUSIONS:** The microRNA-27a was differentially expressed between the control group and the epilepsy group both in the hippocampus and in the blood. However, the same was not observed in the tonsils. It was also differentially expressed between Engel I and III and IV both in the blood and in the tonsils and hippocampus. However, the expression pattern was inverse, that is, in the tonsils, miR-27a showed higher expression levels in the control group when compared to the epilepsy group and in the hippocampus and in the blood, the expression levels of this microRNA were higher in the epilepsy group. MicroRNA-636 was differentially expressed by observing the Engel classification in nuclei. microRNA-1229 was not differentially expressed between the groups studied in tonsils. The importance of further studies on the participation of these microRNAs and the elucidation of their correlation with possible deleterious effects on cognitive functions should be investigated in epilepsy, in order to contribute to new discoveries.

Keywords: Epilepsy, Memory, microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Biogênese dos microRNAs (adaptado de Winter et al., 2009).27
- Figura 2** - Delineamento Experimental..... 45
- Figura 3** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. O miRNA-27a não apresentou-se diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p=0,4069$, teste Mann Whitney).51
- Figura 4** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0387$, teste Kruskal-Wallis).52
- Figura 5** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. ($p=0,0016$, teste Mann Whitney).53
- Figura 6** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em hipocampo de necropsia (controle) comparadas com hipocampo de pacientes Engel I e com hipocampo de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0099$, teste Kruskal-Wallis).54
- Figura 7** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a no sangue necropsia (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. ($p=0,0001$, teste Mann Whitney).55
- Figura 8** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em sangue de necropsia (controle) comparadas com sangue de pacientes Engel I e com sangue de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0001$, teste Kruskal-Wallis).56
- Figura 9** - Representação da média (\pm desvio padrão) da amígdala, hipocampo e sangue nos grupos controle, Engel I e Engel III e IV. ($p=0,0001$, teste Kruskal-Wallis).57
- Figura 10** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-636 em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. ($p=0,0911$, teste Mann Whitney)58
- Figura 11** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-636 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0018$, teste Kruskal-Wallis).59
- Figura 12** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. ($p=0,2042$, teste Mann Whitney).60
- Figura 13** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0671$, teste Kruskal-Wallis).61

- Figura 14** - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0387$, teste Kruskal-Wallis) 62
- Figura 15** - Representação da média (\pm desvio padrão) na expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em pacientes com epilepsia. ($p=0,4647$, teste Kruskal-Wallis)..... 63
- Figura 16** - Representação da média (\pm desvio padrão) na expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em pacientes com epilepsia. ($p=0,4647$, teste Kruskal-Wallis)..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALI	- Células de interface
APP	- Proteína precursora amiloide
cDNA	- DNA complementar
CEMEL	- Centro de Medicina Legal
CPE	- Células progenitoras endoteliais
DA	- Doença de Alzheimer
DEPC	- Dimetil pirocarbonato
DG	- Giro denteado
ELT	- Epilepsia do lobo temporal
ELT-EH	- Epilepsia do lobo temporal com esclerose hipocampal
ELTM	- Epilepsia do lobo temporal mesial
FC	- Fibrose Cística
FMRP-USP	- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G	- Guanina
GAD	- Enzima glutamato descarboxilase
GQ	- G-quadruplex
ILAE	- International League Against Epilepsy
KA	- Ácido caínico
mGluR	- Metabotrópicos
microRNAs	- pequenas moléculas de RNA
MicroRNAs	- pequenas moléculas de RNA
miR	- pequenas moléculas de RNA
miRNAs	- pequenas moléculas de RNA
miRs	- pequenas moléculas de RNA
MMPs	- Metaloproteinases de matriz
mRNA	- RNA mensageiro
MTLE-HS	- ELTM esclerose
PBS	- <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	- Polymerase Chain Reaction
PCR-RT	- Reverse Polymerase Chain Reaction
pré-miRNAs	- miRNAs precursores
pri-miRNA	- miRNA primário
p-Tau	- Tau hiperfosforilada
RQ-PCR	- Quantitativa em tempo real
SNC	- Sistema nervoso central
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
TNF-a	- fator de necrose tumoral-a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	EPILEPSIA	17
1.2	EPILEPSIA E MEMÓRIA.....	20
1.3	Epilepsia e microRNAs	25
1.3.1	microRNAs	25
1.3.2	Biogênese dos microRNAs	26
1.3.3	Os microRNAs como biomarcadores na Epilepsia.....	28
1.4	EPILEPSIA, MEMÓRIA e microRNAs.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVO.....	42
5	PACIENTES E MÉTODOS	44
5.1	Seleção dos Alvos:	44
5.2	Pacientes e Amostras:.....	44
5.3	Extração do RNA Tecidual.....	45
5.4	Extração do RNA do Plasma	46
5.5	Síntese de DNA complementar (cDNA)	47
5.6	Reação de PCR em Tempo Real.....	48
6	RESULTADOS	51
6.1	Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-1202, miR-1225-5p.....	51
6.1.1	microRNA - miR-27a.....	51
6.1.2	microRNA - miR-636.....	58
6.1.3	microRNA - miR-1229.....	60
7	DISCUSSÃO	66
8	Conclusão.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença crônica do sistema nervoso central (SNC), que pode afetar pessoas de todas as idades, sexos, raças, grupos de renda e localizações geográficas, gerando consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais. É caracterizada pela predisposição a crises epiléticas espontâneas e afeta mais de 70 milhões de pessoas em todo o mundo, apresentando maior incidência em países de baixa e média renda (DEVINSKY *et al.*, 2018; THIJS *et al.*, 2019; GBD 2016; EPILEPSY COLLABORATORS, 2019). Pode ser letal, principalmente devido a consequências diretas como estado de mal epilético (crise com duração ≥ 30 minutos), morte súbita inesperada na epilepsia e acidentes (por exemplo quedas, queimaduras e acidentes automobilísticos), ou devido a consequências indiretas das convulsões, tais como: suicídio, pneumonia por aspiração e efeitos adversos de medicamentos (DEVINSKY *et al.*, 2018; THIJS *et al.*, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A epilepsia é definida como “uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal excessiva ou síncrona anormal no cérebro” de acordo com a última atualização da Liga Internacional Contra a Epilepsia (International League Against Epilepsy - ILAE) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Três situações são consideradas no diagnóstico de epilepsia: ocorrência de pelo menos duas crises não provocadas por uma causa imediata ou com mais de 24 horas de intervalo; uma crise não provocada com alta probabilidade de recorrência ($\geq 60\%$ nos próximos 10 anos); ou um diagnóstico de síndrome epilética (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; THIJS *et al.*, 2019; GBD 2016; EPILEPSY COLLABORATORS, 2019).

A classificação de convulsões e epilepsia foi originalmente descrita em 1981 por uma comissão da ILAE, e continua sendo utilizada atualmente, sendo revisada e atualizada ao longo dos anos. Os níveis de classificação incluem o tipo de convulsão, o tipo de epilepsia e síndrome epilética. O primeiro nível, é baseado nos tipos de convulsões: focal (origem em um hemisfério cerebral); generalizada (origem em ambos hemisférios cerebrais simultaneamente); ou de início desconhecido (na

falta de informação suficiente para classificar a convulsão como focal ou generalizada) (THIJS *et al.*, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; PERUCCA *et al.*, 2020). O segundo nível, consiste na classificação de 4 tipos de epilepsia: focal, generalizada, focal e generalizada combinadas e epilepsia desconhecida. O terceiro nível, visa delinear a síndrome epiléptica, se baseando na etiologia da epilepsia, que pode ser dividida nas seguintes categorias: estrutural (inclui um detecção em exame de neuroimagem concordante com achados clínicos); genética (histórico familiar relevante ou uma variação específica em um gene, considerada patogênica para epilepsia); infecciosa (refere-se a um paciente com epilepsia, não a um paciente com convulsões devido a uma infecção aguda); metabólica (epilepsia provocada por um desequilíbrio metabólico); imunológica (quando uma doença autoimune é responsável pelo surgimento da epilepsia); e desconhecida (pacientes em que a etiologia permanece incerta) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; PERUCCA *et al.*, 2022; NABBOUT; KUCHENBUCH, 2020; RINEY *et al.*, 2022). Além disso, é importante o reconhecimento de comorbidades associadas, que incluem sintomas neurocomportamentais, neuropsiquiátricos (transtorno do espectro autista, depressão), cognitivos (deficiência intelectual e de aprendizagem) e motores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; PERUCCA *et al.*, 2022; NABBOUT; KUCHENBUCH, 2020).

A classificação apropriada e a identificação da etiologia da doença, tem contribuído para a melhor compreensão dos mecanismos patofisiológicos, assim como de biomarcadores específicos associados, o que permitirá o delineamento de estratégias de tratamento mais eficazes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; NABBOUT; KUCHENBUCH, 2020).

A epilepsia do lobo temporal com esclerose hipocampal (ELT-EH) é o tipo mais comum de epilepsia focal, caracterizado pela perda celular e gliose no hipocampo e amígdala (principais estruturas mesiais do lobo temporal) (MOURA *et al.*, 2012; HAMAMOTO *et al.*, 2020; GATTÁS *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de estudos histopatológicos e análises de neuroimagem através de amostras de tecidos epiléticos de humanos após a remoção cirúrgica, ou tecidos obtidos de modelos animais epiléticos, têm permitido a melhor compreensão dos principais genes, mecanismos fisiológicos e vias envolvidas no surgimento e avanço da doença. Após autópsia e análise de tecidos de 26 pacientes

com epilepsia do lobo temporal, foram identificadas anormalidades multifocais afetando principalmente o hipocampo (85%), cerebelo (46%) e amígdala (42%) (HAMAMOTO *et al.*, 2020; HERMANN *et al.*, 2021).

O processo no qual um cérebro normal gradualmente desenvolve epilepsia é chamado de epileptogênese, que pode ser dividida em três fases:

- 1- Alterações cerebrais iniciam após um breve insulto (como traumatismo craniano ou acidente vascular cerebral).
- 2- Período latente: inicia imediatamente após o insulto (traumatismo craniano ou acidente vascular cerebral) ou devido a um tumor ou encefalite, e persiste até a ocorrência de convulsões crônicas não provocadas.
- 3- Convulsões recorrentes (alterações celulares e moleculares exacerbam a gravidade da doença).

Esse processo causa várias alterações biológicas, tais como: gliose, inflamação descontrolada, neurodegeneração, alterações nos circuitos neurais, deterioração da barreira hematoencefálica, reprogramação epigenética e alterações estruturais e funcionais em receptores, canais iônicos, transportadores e enzimas responsáveis pela neurotransmissão excitatória e inibitória (PATEL *et al.*, 2019).

O controle da excitabilidade neuronal é conduzido pelo glutamato e GABA, que respectivamente controlam a neurotransmissão excitatória e inibitória no cérebro. Os receptores de glutamato podem ser ionotrópicos (AMPA, NMDA e cainato), ou metabotrópicos (mGluR). O aumento dos níveis de glutamato extracelular é observado em tecidos epiléticos animais e humanos. A neurotoxicidade e morte neuronal excitotóxica é causada principalmente pela ativação excessiva de receptores NMDA e subsequente acúmulo intraneuronal de cálcio, como resultado da interrupção da homeostase gerada pelas convulsões (MOURA *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2019; HAMAMOTO *et al.*, 2020; RHO; BOISON. 2022). O neurotransmissor GABA, interage com os canais iônicos por meio dos receptores GABAA (GABAA-Rs), e promove hiperpolarização neuronal através da regulação do fluxo de cloreto nas células (PATEL *et al.*, 2019; HAMAMOTO *et al.*, 2020).

Os astrócitos, mediados por vias de sinalização inflamatórias, podem promover a epileptogênese e recorrência de convulsões, pois estão envolvidos na degradação de redes perineuronais em torno de neurônios inibitórios e sinaptogênese excitatória reativa, favorecendo a hiperexcitabilidade neuronal. Portanto, os astrócitos

têm a capacidade de interferir na cadeia de suprimento do glutamato vesicular e do GABA, afetando os níveis de glutamato extracelular, o suprimento de GABA e glutamato e a função sináptica (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA., 2019; PATEL *et al.*, 2019; VEZZANI *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços na medicina com a descoberta de medicamentos anti-epilépticos, o tratamento continua sendo um desafio. as drogas utilizadas atualmente, principalmente para epilepsia aguda, não são capazes de agir com eficiência na epileptogênese (HAMAMOTO *et al.*, 2020). Além disso, aproximadamente 40% dos casos de epilepsia são resistentes aos medicamentos. Esses pacientes devem ser direcionados a centros especializados, para análise e direcionamento a outras opções de tratamento, tais como: cirurgia e terapias de neuromodulação. No entanto, o tratamento cirúrgico não é aplicável a todos os pacientes e depende da natureza e localização da área epileptogênica no cérebro (THIJS *et al.*, 2019).

A Escala de Engel, tem sido amplamente utilizada para avaliar o resultado após o tratamento cirúrgico, dividindo os pacientes em quatro classes (I - IV):

- Engel I - não apresenta crises convulsivas;
- Engel II - apresenta raras crises convulsivas, ≤ 2 vezes ao ano;
- Engel III - redução significativa da frequência de crises convulsivas (redução maior que 90%);
- Engel IV - não apresenta redução do número de crises convulsivas, ou não apresenta melhorias significativas.

Engel I é considerado como bom prognóstico, enquanto Engel II–IV são considerados como mal prognósticos. Aproximadamente 10% dos casos apresentam pouca ou nenhuma melhora no controle das crises (SHIH *et al.*, 2011; ANTÔNIO *et al.*, 2019; GATTÁS *et al.*, 2022; YAO *et al.*, 2022).

Devido às dificuldades encontradas para definição do diagnóstico e prognóstico da doença, assim como na escolha de abordagens terapêuticas adequadas à condição, é de extrema importância a identificação de potenciais biomarcadores para o delineamento de estratégias de tratamento mais eficazes.

1.2 EPILEPSIA E MEMÓRIA

A memória não é apenas a retenção do conhecimento, mas sim a capacidade do ser humano em conservar e relembrar mentalmente conhecimentos, conceitos, vivências, fatos, sensações e pensamentos experimentados em tempo anterior. É uma função primordial que permite codificar, armazenar e recordar informação externa, potencialmente útil, permitindo ao ser vivo uma adaptação ao meio através do aumento do conhecimento deste. Os processos de codificação, formados pela representação do mundo no cérebro através do ajuste de sinapses nas redes neuronais, incluem três etapas: retenção, armazenamento e recuperação da mesma.

Consiste também na capacidade do ser humano em conservar e relembrar mentalmente conhecimentos, conceitos, vivências, fatos, sensações e pensamentos experimentados em tempo anterior. A memória refere-se à retenção de habilidades adquiridas ou de informação e em situações cotidianas, os adultos, especialmente os idosos, podem ter algumas dificuldades de recuperação de memória. Mesmo sendo consequência do envelhecimento, a diminuição da eficiência da memória é também influenciada por questões como genética, fatores ambientais, vivências, hábitos lingüísticos, caráter e personalidade. A perda da memória está relacionada com a degeneração dos neurônios cerebrais tanto por envelhecimento quanto por alterações decorrentes de patologias, traumas e déficits neurológicos adquiridos ou congênitos, como epilepsias, aonde há uma perda evolutiva dessas células nervosas, afetando assim a capacidade de memorização (RODRIGUES; MARQUES, 2006; VALENTI, *et al.*, 2022).

Existem vários tipos de memória, pois há diversas fontes de armazenamento de dados em nossa mente e não limitado em uma área determinada de nosso cérebro. Alguns estudos, referem-se à Memória Sensorial por exemplo, ou seja, as transitórias, as que duram segundos ou até menos.

Os precursores dos estudos de memória Logie (1986, 1995) e Baddeley (2000, 2007) conceituam a memória humana em relação ao tempo. Referem-se, portanto, a Memória de Curto Prazo e Memória de Longo Prazo. Memória Imediata ou Memória de Curto Prazo é a que podemos retê-la cerca de 20 segundos se prestarmos atenção à informação sensorial que nos chega. Memória de Longo Prazo é a memória duradoura.

A informação que se torna uma representação detalhada na memória é considerada uma memória permanente. Para se transformar em Memória de Longo

Praza temos anteriormente a Memória de Trabalho. É a memória que proporciona o tempo e o espaço para trabalhar a informação que é necessária para tarefas cognitivas complexas. A memória de trabalho pode reter a informação por dias ou até semanas. Para se transformar em Memória de longo prazo, precisa de algum modo se tornar significativa, ou seja, têm que ser feitas conexões entre a nova informação e a já armazenada (GALERA; PEREIRA de SOUZA, 2010; NEVES, 2015).

A memória de trabalho tem a função de armazenar a informação recebida do ambiente, transformá-la e relacioná-la às informações relevantes armazenadas na memória de longo prazo.

No modelo proposto por Baddeley (2000, 2007), a memória de trabalho envolve quatro subsistemas funcionais distintos, sendo três armazenadores e um processador central. O laço fonológico, que armazena a informação verbal e auditiva, é composto por um armazenador passivo e por um sistema de recitação articulatória, que fortalece os traços de memória. A informação referente aos objetos e às relações espaciais entre eles, seja informação presente no ambiente ou gerada pela imaginação visual, é armazenada pelo esboço visuoespacial. O buffer episódico teria a função de integrar e armazenar temporariamente, em representações complexas, as informações armazenadas nos outros subsistemas, assim como aquela recuperada da memória de longo prazo. O executivo central teria a função de controle e coordenação dos subsistemas de armazenamento em uma vasta gama de tarefas, principalmente naquelas que apresentam alguma novidade para o sujeito. A existência de um sistema especializado para o processamento da informação verbal ou fonológica é bem determinado. A independência entre os sistemas responsáveis pelo armazenamento da informação fonológica e visuoespacial foi estabelecida em estudos comportamentais com sujeitos normais, em estudos neuropsicológicos, e em estudos que utilizam técnicas de imagens funcionais do córtex (ROLAND; FRIBERG, 1985; GALERA; PEREIRA de SOUZA, 2010).

Em estudo realizado por Galera e Pereira de Souza (2010), em crianças normoclínicas, foi explorada a relação entre a memória para posições espaciais codificadas a partir da visão e a partir da informação cinestésica produzida pela movimentação passiva da mão para posições no espaço. A suposição inicial deste trabalho, era que a representação espacial baseada na informação cinestésica (afetada em casos de déficits neurológicos) poderia ser diferenciada da representação

espacial baseada na informação visual através de taxas de desenvolvimento diferenciadas para esses dois tipos de informação.

Os resultados mostraram que, quando considerada a extensão das séries memorizadas ou o número de cruzamentos no teste aplicado para este tipo de avaliação da memória motora (Blocos de Corsi), o desempenho tende a melhorar com a idade numa taxa maior para a informação visual do que para a informação motora, mas esta diferença não é estatisticamente significativa.

Os autores constataam que os resultados obtidos não permitiram afirmar de maneira conclusiva a existência de um sistema motor independente de um sistema espacial, mas sim à despertar a aplicação clínica de correção motora em distúrbios neurofuncionais, como epilepsia, utilizando o raciocínio de que a porcentagem de respostas corretas está correlacionada às duas modalidades de memória (visual e cinestésica).

Importante ressaltar que esta pesquisa abre a possibilidade de se avaliar a memória espacial a curto prazo em deficientes visuais, campo não muito explorado e que pode contribuir para melhora da qualidade de vida em pessoas com lesão neurológica, como na epilepsia, visto o treino motor ser crucial para a reabilitação nos casos afetados por condições de déficit neuromotor aonde a plasticidade neuronal pode ser estimulada.

A plasticidade cerebral refere-se à capacidade de reorganização estrutural e funcional das redes neurais em resposta a desafios externos. Além do aprendizado e da memória, que permitem a adaptação ao ambiente em mudança, a neuroplasticidade é necessária para a recuperação após distúrbios e lesões. A plasticidade cerebral se manifesta em muitos níveis no sistema nervoso, variando de eventos moleculares, como alterações na expressão gênica, disponibilidade e função de proteínas, à fisiologia celular e ao comportamento. No nível celular, a plasticidade é suportada por modificações dinâmicas na conectividade neural e na excitabilidade que são impulsionadas por mudanças moleculares nas sinapses, entre neurônios e células gliais (THOM, 2014; RATHOUR; NARAYANAN, 2019).

O hipocampo é a região cerebral mais amplamente estudada na epilepsia humana e experimental. Atualmente, a esclerose do hipocampo é uma das patologias mais comuns, na epilepsia em programas cirúrgicos para o tratamento resistente à medicamentos. Pode ser observada juntamente com outras síndromes epiléticas, mas destaca-se sua elevada associação à síndrome da epilepsia do lobo temporal mesial,

com incidência em grandes séries cirúrgicas de epilepsia, entre 30,5% e 45% de todas as síndromes epilépticas e em 56% com a síndrome do lobo temporal mesial (THOM, 2014).

As alterações celulares e moleculares que tornam o hipocampo epileptogênico, a identificação de biomarcadores que podem ser preditivos do resultado após a cirurgia, bem como a correlação com outras comorbidades associadas às convulsões constituem nos dias atuais, o foco de pesquisa de muitos pesquisadores, com intuito de promover eficazes diagnósticos neuropatológicos.

Partindo do questionando de como a capacidade de mudar, através da sinaptogênese, é um ingrediente essencial para armazenar novas informações recebidas, ou se a degeneração poderia manter o equilíbrio entre os objetivos aparentemente contraditórios da necessidade de mudar, regenerar, para a codificação e a necessidade de resistir à mudança para manter a homeostase, catalogaram sistematicamente linhas de evidências, abrangendo múltiplas escalas de análise, que apontam para a expressão de degeneração na fisiologia e plasticidade do hipocampo; os autores Rastogi *et al.* (2022), avaliaram o potencial de degeneração como uma estrutura para alcançar os objetivos conjuntos de codificação e homeostase sem interferência cruzada.

Através da hipótese de que a complexidade biológica, envolvendo interações, pode estabelecer caminhos diversos para atingir objetivos conjuntos. Essas rotas díspares fornecem vários graus de liberdade para o sistema de homeostase de codificação executar suas tarefas de maneira dependente de entrada e estado. Em conclusão, a expressão da degeneração abrangendo múltiplas escalas aparentemente contraditórias oferece uma regeneração sináptica ideal e constituem apenas rotas alternativas que o sistema pode recrutar para a realização de seus objetivos (RASTOGI *et al.*, 2022).

Como no caso de déficit de memória motora recente, de pacientes com epilepsia, pesquisas fornecem informações sobre a neurociência da memória humana. Nestes casos, é observado a possibilidade de aprendizado de novas informações, porém dificuldade em recordar eventos de anos anteriores. Os processos envolvidos no comprometimento da memória recente não são claros e resultando da interação de múltiplos fatores, incluindo a disfunção do hipocampo, o qual desempenha um papel contínuo no armazenamento de memória episódica e

semântica recente ao longo do tempo. Pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial apresentam um risco particular de déficits hipocâmpais (RASTOGI *et al.*, 2022).

Beroun *et al.* (2019), em modelos animais, demonstraram que as metaloproteinases de matriz (MMPs), grupo de mais de vinte proteases, com função de clivar componentes da matriz extracelular, moléculas de adesão celular, bem como citocinas e fatores de crescimento, desempenham um papel fundamental em processos fisiológicos e patológicos cerebrais, especialmente processos de aprendizagem e memória, em distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, vários tipos de vícios, epilepsia, síndrome do X frágil e depressão. Uma possível ligação conectando todas essas condições é a plasticidade sináptica fisiológica onde algumas MMPs, por exemplo, MMP-9, contribuíram para a reorganização estrutural e funcional das sinapses excitatórias localizadas nas espinhas dendríticas. Outro tema comum que liga as condições patológicas acima mencionadas é a neuroinflamação e as MMPs também demonstraram ser importantes mediadores das respostas imunes.

1.3 Epilepsia e microRNAs

A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico definido como pelo menos duas convulsões não provocadas em 24 horas. A doença afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas de todas as idades em todo o mundo. De acordo com a classificação da Liga Internacional Contra a Epilepsia, as crises são divididas em focais, generalizadas e desconhecidas (ASADI-POOYA *et al.*, 2017). As crises focais são mais comuns do que as crises generalizadas em crianças e adultos, e a epilepsia do lobo temporal é o subtipo de doença focal mais comum. Além disso, a ELT é o tipo mais comum de epilepsia resistente a medicamentos. Recentemente, o papel dos microRNAs (miRNAs) na fisiopatologia da epilepsia também foi descrito como biomarcadores da epilepsia e novas abordagens terapêuticas (JOHNSON, 2019). Curiosamente, variações de nucleotídeos únicos em sequências miRNAs ou seus genes-alvo da região 3' não traduzida podem afetar o risco de epilepsia e a expressão de seus genes-alvo, aumentando assim a suscetibilidade a doenças, incluindo a epilepsia (YAN *et al.*, 2019).

1.3.1 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica no nível pós-transcricional, degradando ou inibindo a tradução de moléculas que são alvos de RNA mensageiro (mRNA). Os miRNAs estão envolvidos na maioria das principais funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação da transcrição. Tem demonstrado sua função na via de degradação do mRNA ou sua repressão translacional. As funções dos miRNAs foram inicialmente determinadas em amostras de tecidos primários (ZHANG; QU; WANG, 2019). Estudos recentes mostrando ácidos nucleicos fetais circulantes no plasma materno e detecção de miRNAs extracelulares circulantes no sangue sugerem ampla oportunidade para o desenvolvimento do uso de miRNAs circulantes como biomarcadores para diagnóstico molecular não invasivo (LU; ROTHENBERG, 2018).

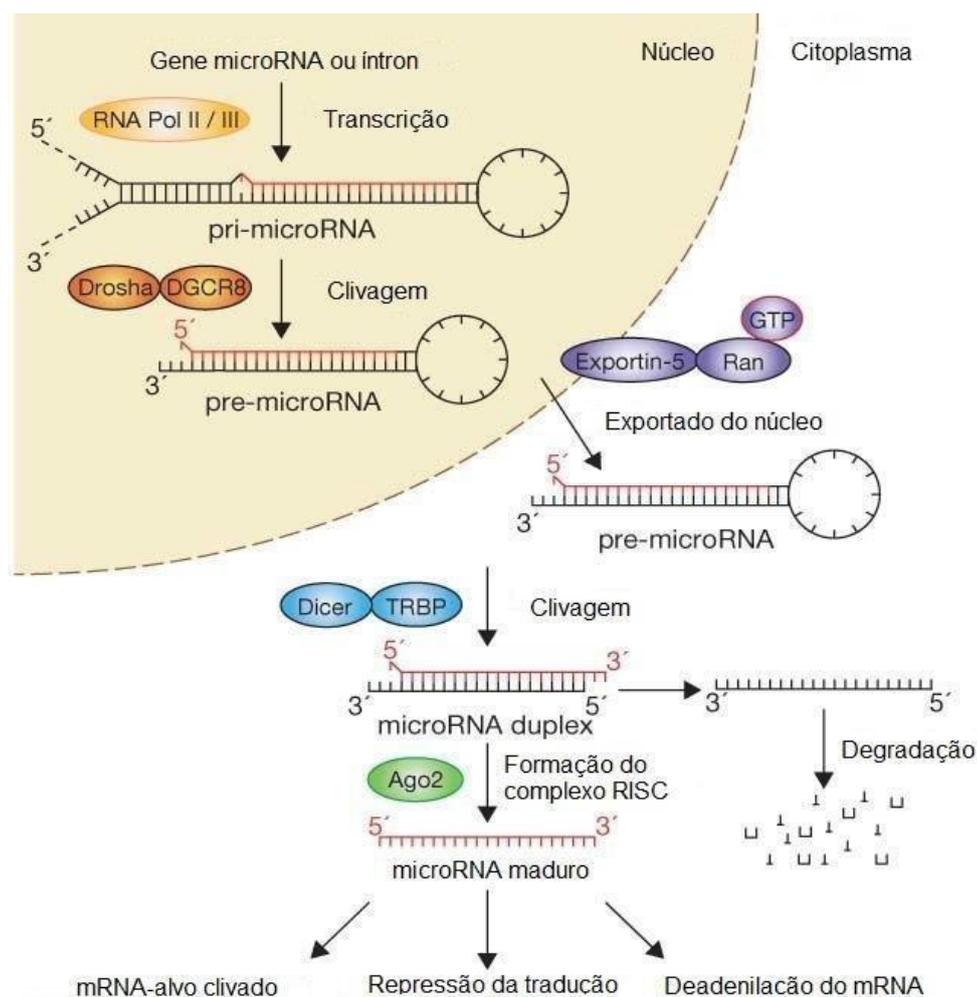
Os miRNAs circulantes permanecem bastante estáveis mesmo após sofrerem condições adversas, tais como temperaturas extremas, ácidos ou álcalis fortes e uma preservação a longo prazo. Além disso, as funções dos miRNAs também estão envolvidas na modulação de uma variedade de processos celulares e fisiopatologia, como sobrevivência neuronal, diferenciação, metabolismo, morte / apoptose, cânceres e até mesmo doenças cerebrais (LIU *et al.*, 2019b; XIAO *et al.*, 2019).

1.3.2 Biogênese dos microRNAs

A biogênese dos miRNAs ocorre a partir da transcrição no núcleo celular, a partir a transcrição do DNA para um RNA primário (pri-miR), na grande maioria dos casos, a transcrição de miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, enzima que também é responsável pela transcrição de genes codificadores de proteínas. Os nucleotídeos do miRNA primário (pri-miRNA) são transcritos e formam estruturas secundárias, como a região "tronco", onde os dois segmentos de RNA se pareiam com seus complementos, e a região "loop", onde as bases se pareiam com seus não complementares, formando assim um anel cíclico (estrutura em grampo). No núcleo, os pri-miRNAs são processados por um complexo que inclui enzimas Drosha e proteínas de ligação ao RNA de fita dupla. As estruturas resultantes, denominadas miRNAs precursores (pré-miRNAs), são exportadas para o citoplasma pela exportina-5. No citoplasma, os pré-miRNAs são processados por Dicer, que remove as alças na

estrutura em grampo, formando assim os duplexes de RNA. Este duplex de RNA é integrado ao complexo de silenciamento induzido por complexo (RISC), onde as duas fitas de RNA são separadas. Uma dessas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, enquanto a fita complementar sofre degradação. O miR maduro está associado a um complexo ou conjunto de enzimas chamadas complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e suprime ou inibe a síntese de proteínas por clivagem de RNAs mensageiros (mRNAs) ou impedindo a tradução de mRNAs, inibindo a produção de proteínas (WINTER *et al.*, 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Biogênese dos microRNAs (adaptado de Winter *et al.*, 2009).



Fonte: Winter, *et al.*, 2009

1.3.3 Os microRNAs como biomarcadores na Epilepsia

Nos últimos anos, o interesse em usar miRNAs como biomarcadores aumentou. Seus papéis na regulação de múltiplos alvos tornam esses pequenos RNAs ferramentas promissoras para auxiliar na detecção precoce de doenças, que podem ser exploradas em diagnósticos, prognósticos e novos alvos terapêuticos. Outra vantagem de usá-lo é que, em comparação com o mRNA, o miRNA é mais estável e menos suscetível à modificação química e degradação pela RNase. No entanto, o uso de miRNAs únicos como biomarcadores é limitado devido à falta de especificidade e sensibilidade (CAO; LI; CHAN, 2016; EYILETEN *et al.*, 2021).

A análise da expressão alterada de um painel de miRNAs é necessária para usar esses pequenos RNAs como biomarcadores. MicroRNAs (miRNAs) podem desempenhar papéis importantes na patogênese de doenças neurológicas. O pareamento de bases ocorre entre o miR e o gene alvo, geralmente dentro do 3'-UTR do mRNA, levando ao recrutamento de outros fatores que levam à degradação do mRNA ou repressão traducional (GONG; HUANG; CHEN, 2022). Nos mamíferos, 60% dos mRNAs têm sequências de sementes de ligação a miR conhecidas; assim, no cérebro, os miRs são particularmente abundantes e controlam a neurogênese. No modelo de camundongo Dicer knockout, a biogênese do miR é bloqueada, levando à perda neuronal e à morte prematura dos animais (SUN *et al.*, 2022).

A pesquisa sobre epilepsia mostrou que muitos miRNAs específicos estão desregulados nessa síndrome, o que pode ter implicações na etiologia e no tratamento da epilepsia. Muitos miRs, como o miR-124, são altamente expressos em células cerebrais, mas indetectáveis em outros tecidos. Além disso, neurônios excitatórios e inibitórios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos expressam miRs específicos (MARTINEZ; PELOW, 2023). Por outro lado, a perda de miRs individuais também pode ser suficiente para produzir fenótipos do SNC, como perda de miR-9, perda de miR-124 levando a defeitos no desenvolvimento do cérebro que resulta em neurodegeneração do hipocampo (SANUKI *et al.*, 2011), e a deleção pós-natal de miR-128 de neurônios dopaminérgicos resulta em epilepsia (TAN *et al.*, 2013).

Atualmente, o papel dos miRs na fisiopatologia da epilepsia tem sido descrito na estrutura e função sináptica (miR-134, miR-128, miR-203 e miR-139), neurogênese e migração neuronal (miR-134, miR-128, miR-124 e miR-137),

inflamação (miR-146 e miR-22), transcrição (miR-132, miR-124 e miR-199) e morte celular (miR-34a e miR-184) (BRENNAN; HENSHALL, 2020).

O miR-25a (miR-25a-3p) consiste em 22 nucleotídeos (CAUU GCAC UUGU CUCG GUCU GA) e tem 1163 transcrições de mRNA alvo previstas com conservadas sites (TargetScanHuman versão 7.1). O miR-25a pertence à família de sementes miR25a-3p/32-5p/92-3p/363-3p/367-3p amplamente conservada evolutivamente e tem os mesmos alvos de mRNA previstos como o outro miRNA membros desta família de sementes. O miR-25a (miR-25a-5p) consiste em 22 nucleotídeos (AGGC GGAG ACAC GGGC AAUU GC) e tem 1868 transcrições de mRNA previstas; no entanto, esses alvos previstos são principalmente falsos positivos. O miR-25a tem se demonstrado como um importante regulador em eventos de desenvolvimento celular, atuando como um regulador negativo do crescimento do músculo cardíaco e desenvolvimento de células cardíacas (GO:0055022), podendo atuar na hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca em condições fisiopatológicas (SÁRKÖZY; KAHÁN; CSONT, 2018).

Além disso, muitas das moléculas-alvo do miR25a podem ser encontradas entre células extracelulares componentes da matriz e receptores de membrana. Sob condições fisiopatológicas, o miR-25a também é um miRNA oncogênico bem descrito, tendo um papel importante no desenvolvimento e disseminação de muitos tipos de tumores, incluindo tumores cerebrais, pulmão, mama, ovário, próstata, tireóide, cânceres de esôfago, gástrico, colorretal, hepatocelular, etc. (MENG *et al.*, 2015).

Outros grupos de moléculas alvo do miR-25a são importantes reguladores da apoptose, autofagia, estresse oxidativo, inflamação, manipulação de cálcio, etc. Esses mecanismos podem ser fatores-chave na patogênese do infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, diabetes mellitus, nefropatia diabética, nefropatia tubulointersticial, asma brônquica, lesão cerebral por isquemia/reperfusão, doenças neurodegenerativas, esquizofrenia, esclerose múltipla, etc (SÁRKÖZY; KAHÁN; CSONT, 2018).

Para Pan *et al.*, 2015, em um estudo, o miR-25a foi reprimido em um modelo de privação de oxigênio-glicose por 48 horas e 48 horas reperfusão em neuroblastoma humano SH-SY5Y e células IMR-32. O aumento da expressão do miR-25a apresentou-se protegida contra a apoptose induzida por privação/reperfusão de oxigênio-glicose, possivelmente pela via Fas/FasL. Este efeito protetor do miR-25 contra a apoptose nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e IMR-32, que

demonstrou o benéfico da estimulação magnética transcraniana associada a superexpressão do miR-25a e a repressão de sua ação direta alvo p57 (CDKN1C). É um membro dos inibidores da quinase independente da ciclina (CDK) que bloqueiam o ciclo celular na fase G1/S.

Em contraste, a expressão de miR-125a-5p apresentou regulado negativamente no hipocampo de ratos epiléticos induzidos por pentilenotetrazol (LIU *et al.*, 2019a). O aumento da expressão do miR-125a-5p atenuou a epilepsia e diminuiu níveis de fator no hipocampo suprimindo a proteína quinase IV independente de calmodul (CAMK4), sugerindo que o miR125a-5p pode representar um novo tratamento para a epilepsia (VIJAYAN; REDDY, 2016; LIU *et al.*, 2019a).

A importância de regular os níveis de miRNA foi demonstrada em uma infinidade de estudos, com níveis desregulados sendo associados a várias doenças, como Doença de Alzheimer (DA), Síndrome de Down e muitos cânceres. Tem sido proposto que a formação de estruturas secundárias alternativas em pré-miRNAs pode afetar seu processamento pela Dicer e, assim, a produção de miRNA maduro dentro da célula. Estudos de bioinformática concluíram que 13-16% de todos os pré-miRNA humanas sequências contêm regiões ricas em guanina (ricas em G) que têm o potencial de formar G-quadruplex (GQ) estruturas. GQs são estruturas secundárias não canônicas formadas pelo empilhamento de dois ou mais arranjos cíclicos e planares de quarteto G de quatro resíduos de guanina e estabilizados por tipo Hoogsteen ligações de hidrogênio, interações de empilhamento π - π e cátions monovalentes intercalantes. A formação dessas estruturas GQ dentro de pré-miRNAs ricos em G foi proposto para inibir seu processamento por Dicer devido à falta de um loop de haste terminal. Entre os pré-miRNAs com sequências ricas em G que têm potencial para formar estruturas GQ é o pré-miRNA-1229, cujo produto miRNA maduro, miRNA-1229-3p, recentemente demonstrou controlar diretamente a expressão de SORL1. Além disso, neste estudo foi realizado um GWAS que demonstrou que o alelo guanina para adenina rs2291418 variante (citosina para uracil no RNA) dentro do pré-miRNA-1229 está associada com doença neurodegenerativa e o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) aumenta a produção de miRNA-1229-3p e diminui a níveis de SORL1. Neste estudo, utilizamos várias técnicas para mostrar que uma estrutura GQ se forma em pré-miRNA-1229 que coexiste em equilíbrio com a estrutura em grampo estendida canônica e que esse equilíbrio é deslocado na

variante rs2291418, favorecendo a estrutura em grampo estendido (GHANBARI *et al.*, 2016; NISHIBEPPU *et al.*, 2020).

Com relação o miR-636, verificou-se que a regulação da expressão de proteínas foi examinada usando uma abordagem computacional que previu o 3' -UTRs de mRNA de IL1R1, RANK, IKKB e FAM13A para conter regiões de sementes que são reconhecidas por uma variedade de miRNAs incluindo miR-636 (MORISHITA *et al.*, 2018).

Em um estudo, a expressão de miRNA e mRNA em ar-líquido culturas de células de interface (ALI) e em amostras brônquicas de Pacientes com Fibrose Cística (FC) e indivíduos saudáveis sem FC. Nós também realizamos modulação experimental *in vitro* da expressão de miR-636 para elucidar a regulação de quatro alvos diferentes (IL1R1, RANK, IKK β e FAM13A), determinado por bioinformática análise e confirmada pela análise funcional, no contexto de CF. Finalmente, determinamos um papel potencial para neutrófilos miR636 e biomarcadores plasmáticos de inflamação em pacientes com FC (BARDIN *et al.*, 2019).

1.4 EPILEPSIA, MEMÓRIA e microRNAs

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é caracterizada como um distúrbio neurológico crônico, no qual pode afetar cerca de 65 milhões de pessoas em todo mundo (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

As epilepsias genéticas envolvem mutações em genes neuronais cruciais como KCC2 e HCN1, e ainda, as epilepsias adquiridas normalmente evoluem de diversas patologias resultantes da perda neuronal, mudança de metabolismo neuronal, inflamação crônica e outras, podendo ser a origem de convulsões espontâneas recorrentes (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

São as alterações nas propriedades dos neurônios e outras células presentes no sistema nervoso central (SNC), controlam o desenvolvimento da hiperexcitabilidade e consequente atividade convulsiva da epilepsia. Por exemplo, as alterações genéticas podem alterar as atividades neuronais, bem como mudanças na expressão gênica, interrompendo a função reguladora transcricional e pós-transcricional (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Durante o processo pelo qual um cérebro normal torna-se epilético (epileptogênese), diversos mecanismos regulatórios transcricionais e pós

transcricionais demonstraram-se alterados, funcionando de forma aberrante (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

A epileptogênese é definida pelo período assintomático entre o estímulo súbito, como por exemplo, uma lesão cerebral por trauma, e a primeira convulsão apresentada pelo doente de forma espontânea. A relação desse espaço de tempo ainda é discutida na comunidade científica, uma vez que a primeira crise detectável, sendo este considerado o fim da epileptogênese, pode ser precedida por crises convulsivas não detectáveis. E ainda, a epilepsia pode apresentar-se de forma progressiva, onde o período da epileptogênese pode não terminar no momento da primeira crise, resultando na evolução da frequência e gravidade das crises (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Como característica patológica do processo da epileptogênese é possível observar processos de neuroinflamação crônica, morte neuronal (processo apoptótico), alteração da neurogênese, processos epigenômico além de outros eventos (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Os microRNAs são pequenas moléculas de fita simples não codificantes formados por cerca de 19 à 20 nucleotídeos. Seu papel é atuar como importante regulador da expressão gênica a nível pós-transcricional.

Dado a importância da participação dessas pequenas moléculas na regulação de diversas funções biológicas extremamente importantes, a participação dos microRNAs em eventos patológicos que medeiam a epileptogênese já vem sendo explorado (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Por exemplo, o miR-146a um dos microRNA regulado positivamente em astrócitos de ratos epiléticos e em amostras cerebrais de pacientes adultos com ELT. Esses astrócitos superexpressando o miR-146a foram associados a áreas de esclerose hipocampal, fenótipo frequentemente encontrado em pacientes farmacoresistentes, caracterizado pela perda neuronal e gliose. Desse modo, o miR-146a demonstrou mediar as respostas neuroinflamatórias por ação de IL-1 β na epileptogênese, demonstrando uma atividade pró-excitatória. Esse mesmo comportamento em relação à expressão do miR-146a e os eventos da epileptogênese, também foram observados em crianças com ELTM e experimentos com murinos (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Outro evento importante durante a epileptogênese é a neurodegeneração. No hipocampo, a perda progressiva de neurônios é marca conhecida da

epileptogênese, contribuindo para a formação de uma rede hiperexcitável, desequilibrando a inibição do processo de excitação e os efeitos na reorganização sináptica entre os neurônios restantes. Quando ocorre atividade convulsiva de forma progressiva, ocasiona a perda progressiva de neurônios de forma predominante nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, além da perda de grânulos denteados e neurônios hiliares, mantendo uma pequena preservação da região CA2. Diversos microRNAs participam da regulação dos processos apoptóticos envolvidos, como por exemplo, os microRNAs: miR-132, miR-34a, miR-184 e outros (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

O referido estudo analisou a expressão diferencial de microRNAs no hipocampo, amígdala e sangue de pacientes com ELTM, demonstrando a potencial utilização dos microRNAs como marcadores e biomarcadores de ELTM em amostras biológicas distintas, com capacidade de auxiliar no diagnóstico e prognóstico dos doentes (BRENNAN; HENSHALL, 2018).

Junto ao hipocampo, a amígdala representa outro componente chave do sistema límbico, que desempenha papel crítico na emoção, aprendizado e memória, e as interconexões dos núcleos amigdalares e regiões hipocampais são complexas, e estão envolvidas com as disfunções da doença de Alzheimer, transtorno pós traumático e ELTM (MCDONALD; MOTT, 2017).

A amígdala basolateral, em especial a porção anterior do núcleo basolateral, é capaz de modular a consolidação da memória causada por experiências emocionalmente excitantes, através de suas projeções e interconexões para outras regiões, como a região do hipocampo. Em experimentos animais, os efeitos da modulação da memória do hipocampo, dependem de vias diretas ou indiretas conectadas a amígdala basolateral ao hipocampo. Em humanos, as interações amígdala-hipocampo são essenciais para o aprimoramento da memória explícita em eventos emocionalmente excitantes (MCDONALD; MOTT, 2017).

A integridade do hipocampo e amígdala é importante para o funcionamento da memória, e em ELTM, observa-se uma intensa desregulação das interconexões da função amígdala-hipocampo, que além de contribuir para os eventos a cerca da epileptogênese, a disfunção dessas estruturas contribui para o déficit cognitivo de memória declarativa e espacial. Em especial, observa-se um déficit específico na codificação do aprimoramento da memória impulsionada pela emoção através do eixo amígdala-hipocampo (MCDONALD; MOTT, 2017).

Quando a convulsão acontece em uma determinada região, rapidamente outra região excitada a participar da convulsão. Essas atividades neuronais decorrentes das interconexões entre hipocampo-amígdala resultam na perda neuronal em ambos (MCDONALD; MOTT, 2017).

As alterações cognitivas na ELTM abrangem não somente déficits de memória, mas também uma vasta gama de alterações cognitivas incluindo linguagem, função executiva, atenção e velocidade de processamento, entretanto, alterações de memória são recorrentes em parte dos pacientes com ELTM resistentes a medicamentos (MCDONALD; MOTT, 2017).

Mecanismos associados à neurodegeneração durante a epileptogênese podem ser responsáveis pelas alterações cognitivas. Pacientes com epilepsia crônica resistente terapêutica apresentam características de envelhecimento cerebral avançado, com uma carga aumentada de β -amilóide₄₂ e expansão ventricular acelerada, bem semelhante às características que acometem pacientes com distúrbios neurodegenerativos, como doença de Alzheimer (CHANG; SHAO; MUCKE, 2021).

A proteína Tau associada à microtúbulos (gene MAPT) é uma proteína desordenada encontrada abundantemente nos axônios, com duração de interação com microtúbulos curta e caracterizada como um processo rápido. Em doença de Alzheimer, a base molecular e celular para as alterações cognitivas é um acúmulo progressivo da proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau), presente em emaranhados neurofibrilares, produzindo espécies neurotóxicas de β -amilóide₄₂, como amiloide insolúvel- β 56 e o acúmulo de β 4 em placas de amiloides insolúveis (MCDONALD; MOTT, 2017). A produção de β -amilóide₄₂ acontece pelo processamento amiloidogênico da proteína precursora amiloide (APP) e enzimas de clivagem. A fosforilação da proteína Tau é um pré-requisito para agregação e toxicidade, e é regulada por diversas proteínas quinases e fosfatases (GOURMAUD *et al.*, 2020).

Características de processos neurodegenerativos como o aumento da expressão de APP, placas amiloides e emaranhados neurofibrilares foram observados em pacientes com ELTM resistentes ao tratamento, associados a convulsões e comprometimento cognitivo (GOURMAUD *et al.*, 2020; MCDONALD; MOTT, 2017). A excitação neuronal também é capaz de promover regulação de Tau promovendo sua liberação extracelular e fosforilação, onde seu aumento rápido e persistente pode ser associado a ativação neuronal patológica. Em modelos animais de epilepsia crônica

e convulsão resultaram na fosforilação de Tau prolongada e possível associação com o déficit cognitivo (GOURMAUD *et al.*, 2020).

Desse modo, redes hiperexcitáveis podem desempenhar alterações neurodegenerativas, e vias moleculares associadas podem estar implicadas na epileptogênese e seus alterações cognitivas. Logo, a redução da proteína Tau pode prevenir ou diminuir a sinalização celular aberrante, e conseqüentemente, disfunções da rede neuronal, como por exemplo, atividade epilética (GOURMAUD *et al.*, 2020).

Pouco se sabe sobre os aspectos moleculares envolvidos no processo da epileptogênese e alterações da função cognitivas nos pacientes com ELMT. O miR-27a demonstrou ser um regulador da proteína Tau, e quando hiperexpresso, se correlacionou a neurodegeneração e neuroinflamação, processos característicos da epileptogênese. O miR-27a também se correlacionou com crises epiléticas em um estudo experimental, onde correlacionou-se com uma classificação de crises grau III/IV com alta descarga epilética no hipocampo (SU *et al.*, 2022).

O neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) está associado à déficits da memória de trabalho e alterações cognitivas em diversas patologias (LETT *et al.*, 2016). É um dos principais neurotransmissores inibitórios derivados de glutamato, cujo desempenha papel crítico na sinalização do sistema nervoso central (SNC) e também em outros tipos celular não neuronal. O glutamato é convertido em GABA através da ação da enzima glutamato descarboxilase (GAD), presente em duas isoformas GAD67 E GAD65, sendo estes produtos de dois diferentes genes: GAD1 e GAD2 respectivamente. Entre esses, o GAD67 encontra-se constitutivamente ativo e é responsável por mais de 90% do neurotransmissor GABA no SNC, por outro lado, GAD65 possui ativação transitória (NEURAY *et al.*, 2020); GAD1 possui papel importante na neurotransmissão GABAérgica da memória de trabalho (LETT *et al.*, 2016).

Mutações em GAD1 levam a um desequilíbrio de GABA no SNC, e foi observado que convulsões eram uma característica comum em pacientes jovens apresentando um desequilíbrio de GABA, demonstrando o importante papel de da função GABAérgica na indução de convulsões. Essa disfunção GABAérgica pode ser ocasionada tanto pela síntese anormal de GABA (disfunção de GAD1) quanto por sinalização anormal como mau funcionamento do seu receptor (LETT *et al.*, 2016).

Em um experimento animal, demonstrou que animais com GAB ausente ou em determinada subunidade do seu receptor GABA-A, apresentaram-se propensos

ao desenvolvimento de crises epiléticas espontâneas. Em cérebro de pacientes epiléticos, ocorre uma redução de neurônios GABAérgicos, sustentando a hipótese de que as convulsões diminuem ainda mais a liberação de GABA no cérebro (LETT *et al.*, 2016; NEURAY *et al.*, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A epilepsia de lobo temporal tem sido associada a disfunções cognitivas, especialmente a distúrbios de memória de curta e de longa duração. Muitos estudos demonstram a presença de déficit de memória em pacientes epiléticos de difícil controle. A identificação de alvos moleculares associados a perda memória pode contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos assim como para o desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem no diagnóstico e prognóstico da doença.

3 HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que microRNAs reguladores de alvos moleculares associados a memória podem estar envolvidos no prognóstico dos pacientes fármacoresistentes após tratamento cirúrgico.

4 OBJETIVO

4 OBJETIVO

Analisar a expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-636, miR-1229 reguladores de alvos associados a memória em amígdalas, hipocampos e sangue de pacientes com diagnóstico de epilepsia.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5 PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

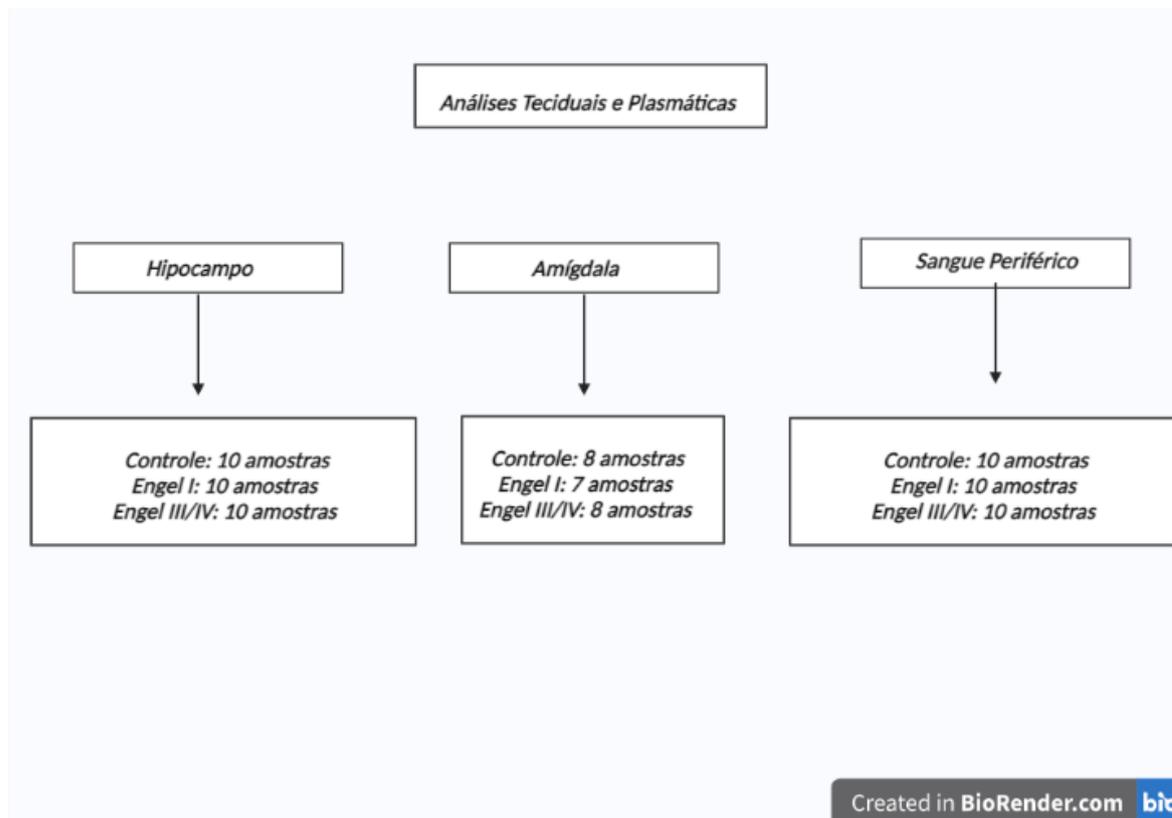
5.1 Seleção dos Alvos

Os microRNAs envolvidos no presente estudo (miR-27a, miR-1229 e miR-636) foram selecionados confirmação em plataformas de bioinformática como Targetscan e Mirwalk, e através da busca na literatura em artigos científicos.

5.2 Pacientes e Amostras

Em nosso estudo, analisamos as amostras de 20 pacientes com o diagnóstico de ELTM, atendidos na divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em suas respectivas áreas de hipocampo, amígdala e sangue. Destes, 10 pacientes pertenciam a classificação de Engel I e 10 a classificação de Engel III/IV. Devido aos trabalhos já realizados anteriormente por nosso grupo de trabalho com a temática de epilepsia e amígdala e ao esgotamento de algumas amostras do nosso biobanco, no grupo de amostras provenientes de amígdala, nosso número amostral foi de 7 pacientes classificados em Engel I e 8 pacientes classificados em Engel III/IV (Figura 2).

Figura 2 - Delineamento Experimental



Fonte: Elaboração Própria (BioRender.com).

As amostras teciduais dos dois grupos controles (10 amostras para hipocampo e 8 amostras para amígdala) foram obtidas de peças cadavéricas provenientes de autópsias realizadas no Centro de Medicina Legal (CEMEL), oriundas de indivíduos saudáveis sem histórico médico de doenças.

5.3 Extração do RNA Tecidual

Às amostras foram adicionados 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA será precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado, então, 1000µl de

etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C .

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também foi utilizado um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2 μl . Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280).

Para valores menores do que 1,6 considera-se que o material esteja degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. A faixa ideal a ser obtida é de 1,7 a 1,9, porém consideramos uma amostra boa na faixa de 1,61 a 1,99.

5.4 Extração do RNA do Plasma

A extração do RNA foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN), com protocolo adaptado a partir das orientações do fabricante. Em um tubo falcon estéril e livre de RNase de 15mL, adiciona-se 4mL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) a 400 μL de plasma, homogeneíza e deixe o material de repouso por 5 min em temperatura ambiente. Adicionou-se 800 μl de clorofórmio (proporção 1:5 com a quantidade de Trizol® inicial), misturando vigorosamente por 30 segundos. O material foi deixado em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifuga-se por 15 minutos a 12.000g a 4°C . Ao final da centrifugação houve um sistema de 3 fases: incolor=RNA, branco=DNA, vermelho=proteína.

A fase incolor foi transferida para outro falcon de 15 ml, adicionou-se 1,5 vezes o volume conseguido da fase incolor de etanol 100% e agite vigorosamente a amostra. Em seguida, adicionou-se 700 μl dessa solução na coluna RNeasy MinElute Spin®, centrifugando a $> 8000\text{g}$ por ao menos 15 seg. O líquido resultante foi descartado e repetido o passo anterior com o resto da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. Posteriormente, adicionado 700 μl de Tampão RWT (Buffer RWT do Kit) em cada coluna, centrifugando também a $> 8000\text{g}$ por ao menos 15 segundos, sempre descartando o líquido resultante.

Foram adicionados 500l de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a $> 8000g$ por ao menos 15 segundos, e descartando líquido resultante. Serão adicionados 500l de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a $> 8000g$, desta vez por 2 minutos, descartando, o líquido resultante. Foi centrifugado com o máximo da centrífuga por 1 minuto, descartando líquido resultante. Foi trocado o coletor da coluna e será adicionado $30\mu\text{l}$ de água RNA-free.

Foi centrifugado a $> 8000g$ por 1 minuto e transferido para um Eppendorf o líquido resultante, congelando-o a -80°C imediatamente. Para a verificação da integridade do RNA obtido, as amostras foram analisadas em Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com RNA 6000 Pico chip.

Também foi utilizado s um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a $2\mu\text{l}$. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280). A faixa ideal a ser obtida para essa razão é de 1,70 a 2,00.

5.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA, a transcrição reversa foi feita utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados $0,75\mu\text{l}$ de RT Buffer, seguido de $0,075\mu\text{l}$ de dNTP's, $1,5\mu\text{l}$ de primers específicos (miRNAs e controles endógenos), e $0,5\mu\text{l}$ da enzima MultiScribeTM, $0,094\mu\text{l}$ de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de $7,5\mu\text{l}$, e sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a 16°C , 30 min a 42°C , 5 min a 85°C e, em seguida, a 4°C . Para o PCR em tempo real, foram utilizados $4,5\mu\text{L}$ do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de $10\mu\text{L}$.

5.6 Reação de PCR em Tempo Real

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial de microRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase, tradução literal de Polymerase Chain Reaction (PCR), quantitativa em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão de microRNAs, são utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems). Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado microRNA) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso, a média do U6) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT do calibrador, neste caso, utilizou a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta$ CT. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT.

Realizamos a quantificação relativa dos microRNAs, nas quais as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA.

Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram, então, exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT.

As condições padrão de amplificação serão 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Os dados foram

constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

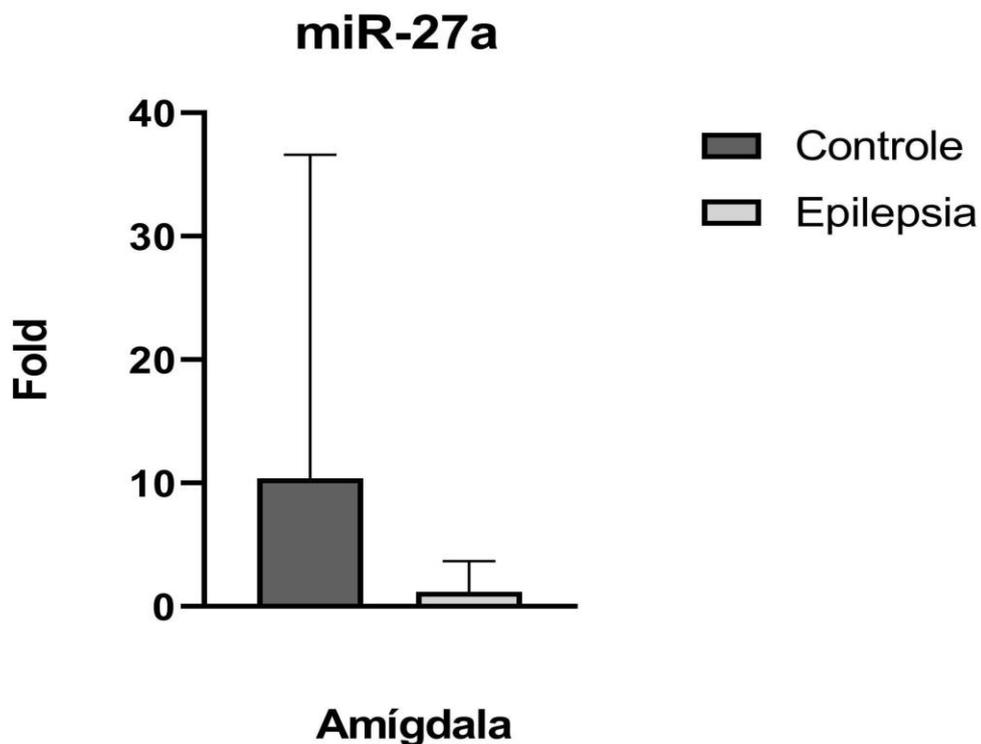
6.1 Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-1202, miR-1225-5p

A expressão dos microRNAs miR-27a, miR-636, miR-1229 foi analisada em todas as amostras de amígdala, hipocampo e sangue dos pacientes com epilepsia, também foi analisado os seus respectivos grupos controles.

6.1.1 microRNA - miR-27a

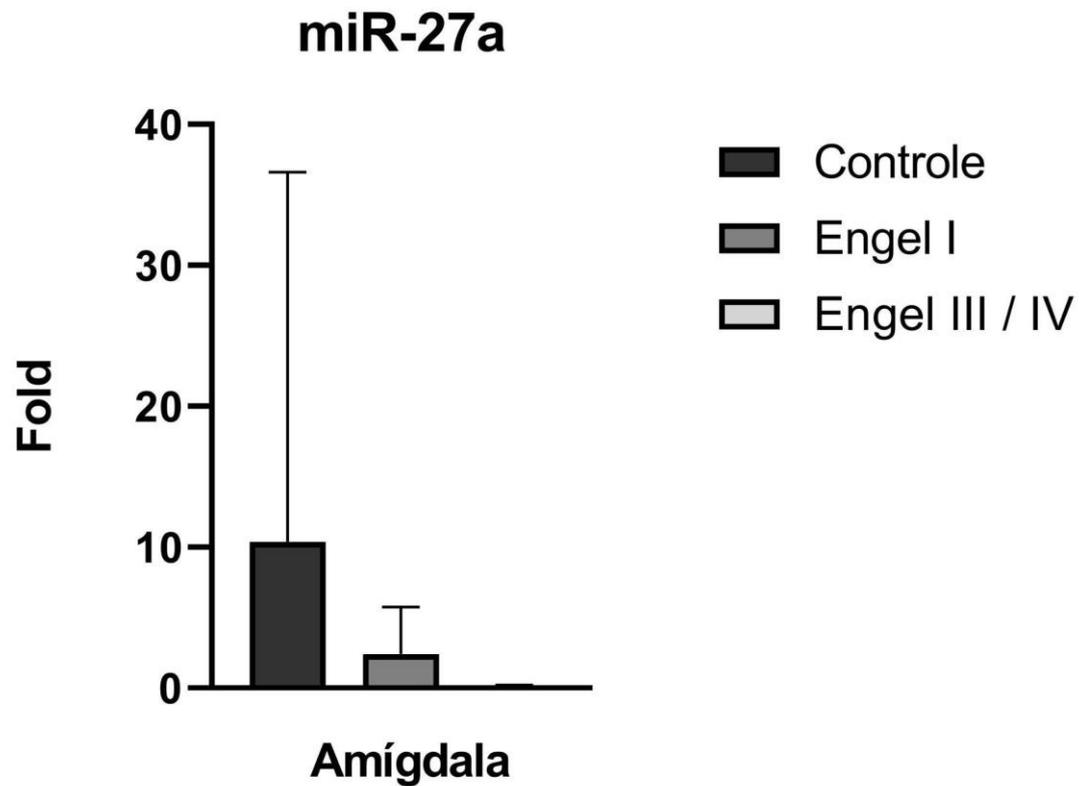
Os resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão do miR-27a quando comparados amígdalas de necrópsia (controle) com amígdalas de pacientes com epilepsia estão ilustrados na figura 3.

Figura 3 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. O miRNA-27a não apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p=0,4069$, teste Mann Whitney).



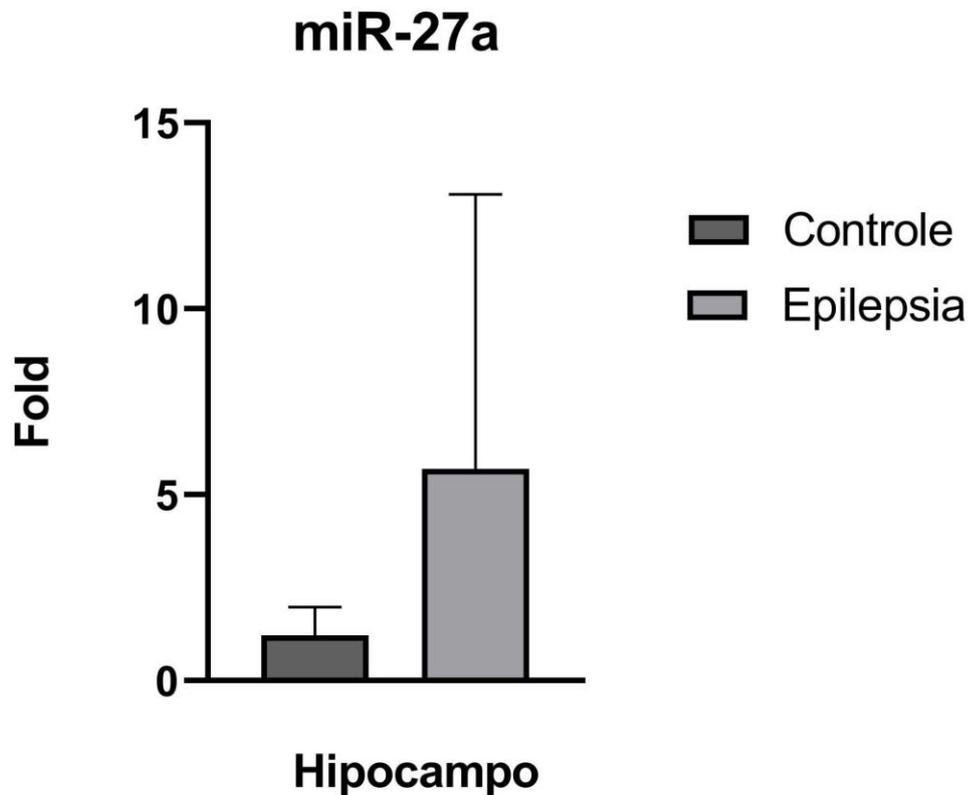
A comparação entre amígdalas de necropsia (controle) com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV estão ilustrados na figura 4.

Figura 4 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0387$, teste Kruskal-Wallis).



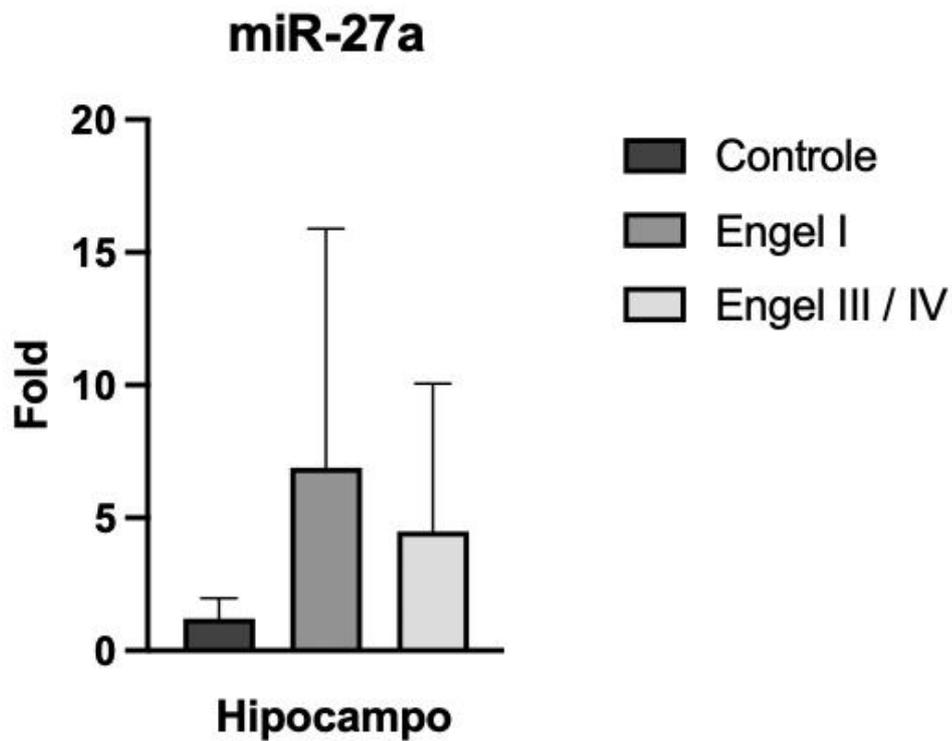
Na figura 5, estão ilustrados os resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão do miR-27a quando comparados hipocampo de necrópsia (controle) com hipocampos de pacientes com epilepsia.

Figura 5 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em hipocampo de necropsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. ($p=0,0016$, teste Mann Whitney).



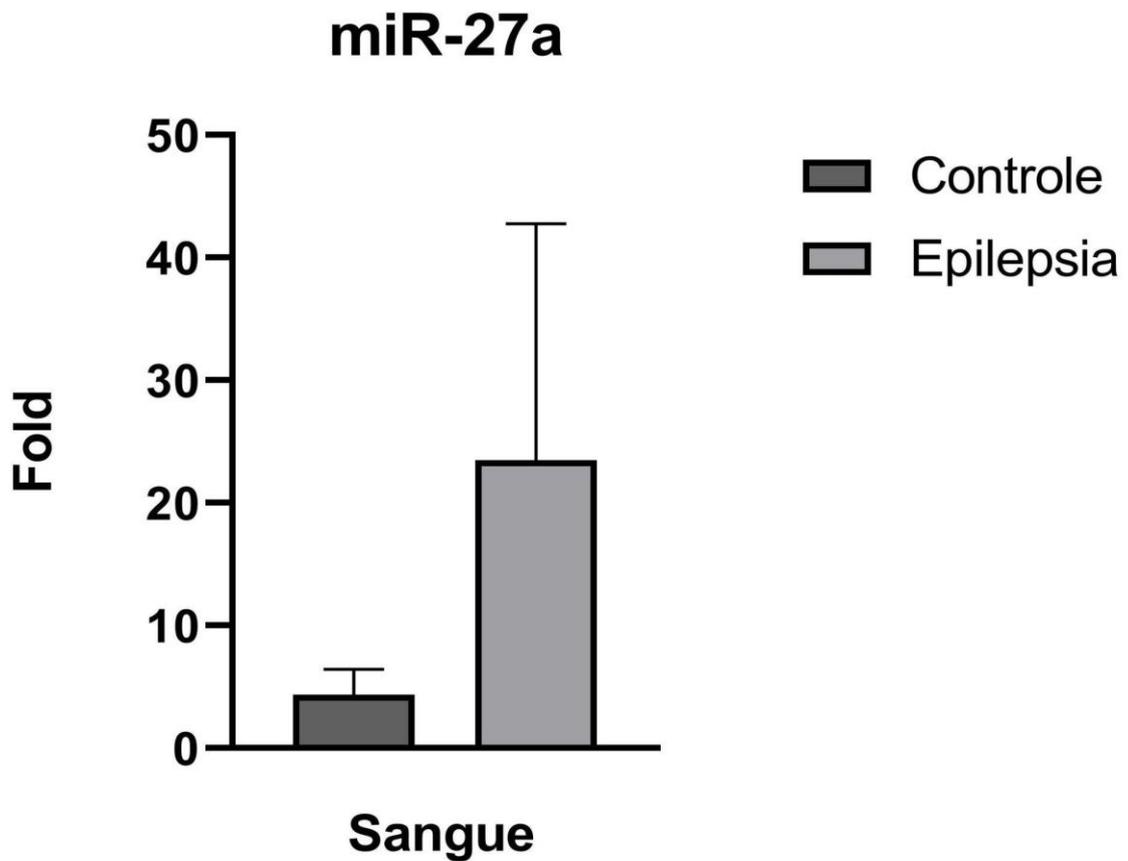
A comparação entre hipocampo de necropsia (controle) com hipocampo de pacientes Engel I e com hipocampo de pacientes Engel III e IV estão ilustrados na figura 6.

Figura 6 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em hipocampo de necropsia (controle) comparadas com hipocampo de pacientes Engel I e com hipocampo de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0099$, teste Kruskal-Wallis).



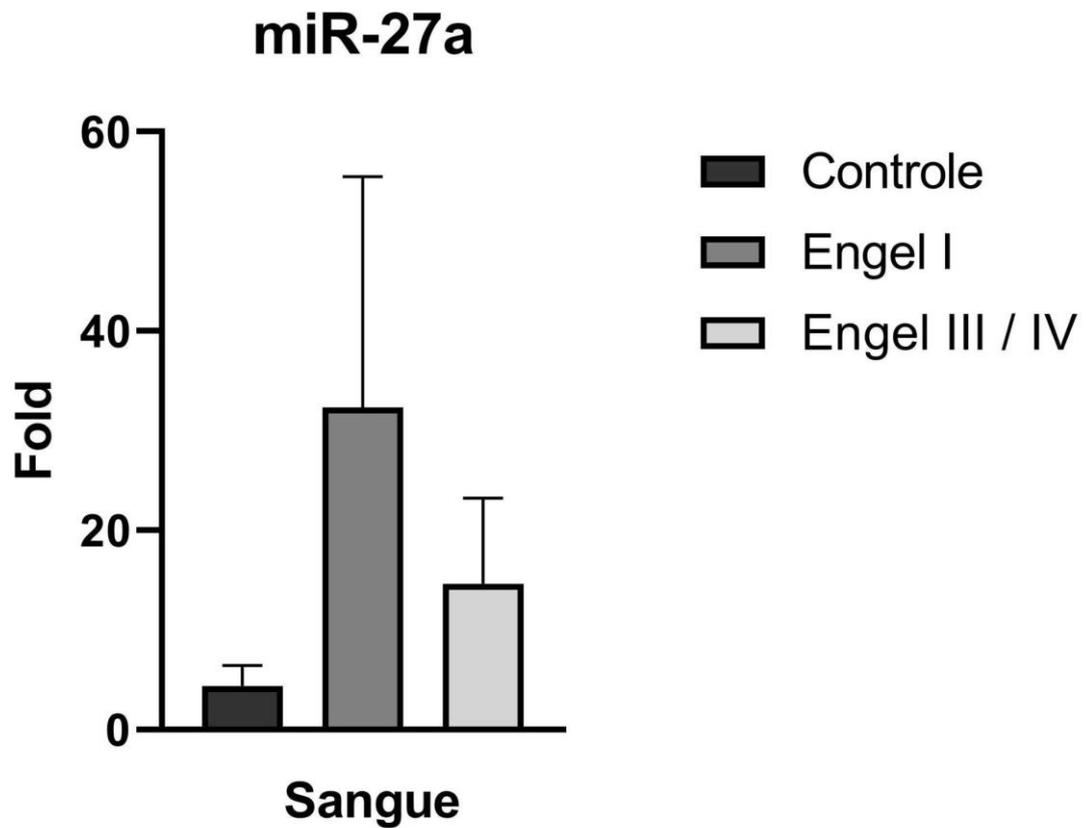
Na figura 7, estão ilustrados os resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão do miR-27a quando comparados amostra sangue de pacientes (controle) com amostra de sangue de pacientes com epilepsia.

Figura 7 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a no sangue necropsia (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. ($p=0,0001$, teste Mann Whitney).



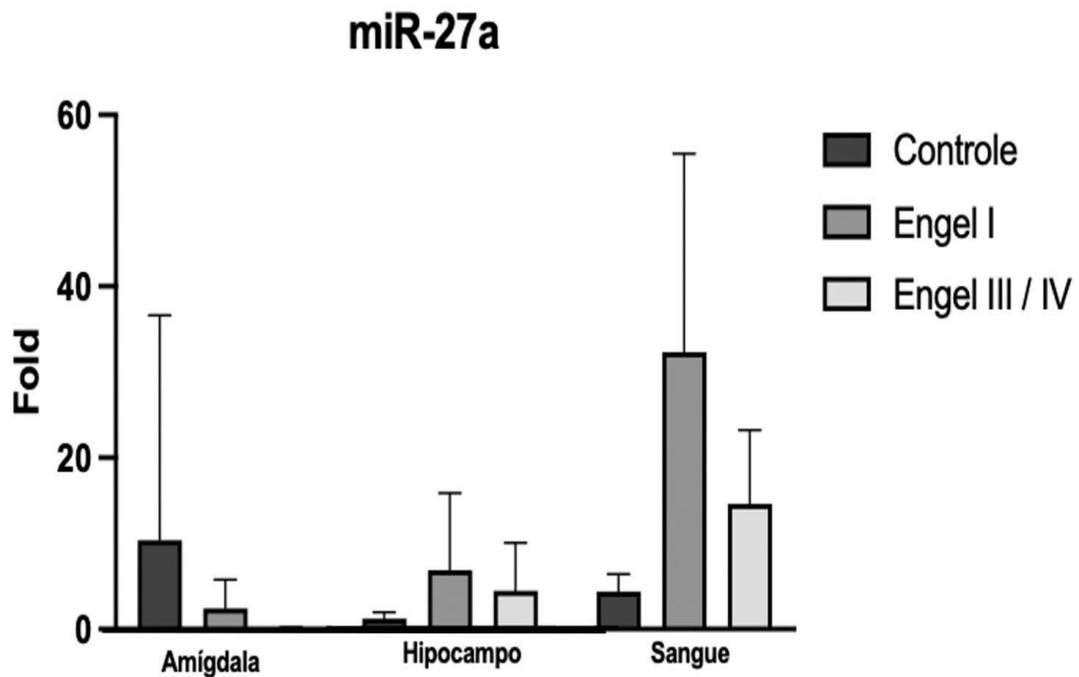
A comparação entre amostra de sangue (controle) com amostra de sangue de pacientes Engel I e com amostra de sangue de pacientes Engel III e IV estão ilustrados na figura 8.

Figura 8 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a em sangue de necropsia (controle) comparadas com sangue de pacientes Engel I e com sangue de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0001$, teste Kruskal-Wallis)



Na figura 9 observa-se a comparação das amostras dos grupos Controle, Engel I e Engel III e IV em relação as amostras de pacientes com amígdala, hipocampo e de sangue.

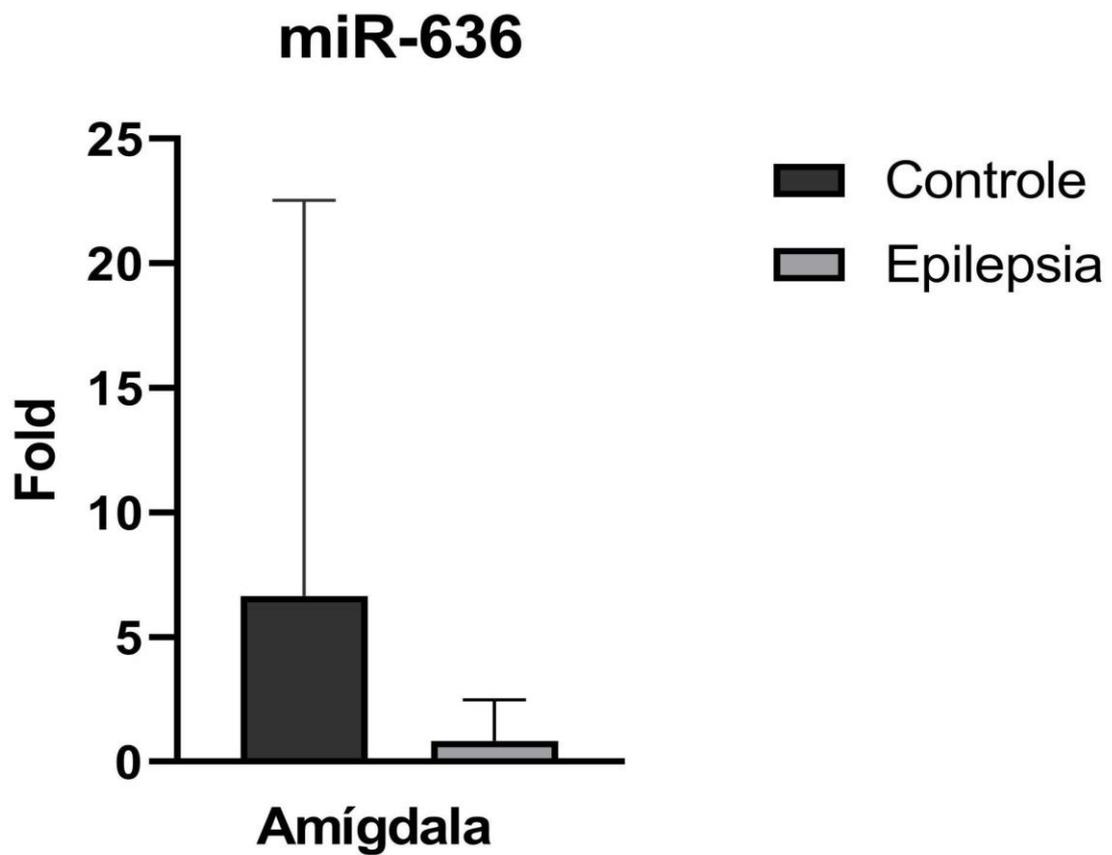
Figura 9 - Representação da média (\pm desvio padrão) da amígdala, hipocampo e sangue nos grupos controle, Engel I e Engel III e IV. ($p=0,0001$, teste Kruskal-Wallis).



6.1.2 microRNA - miR-636

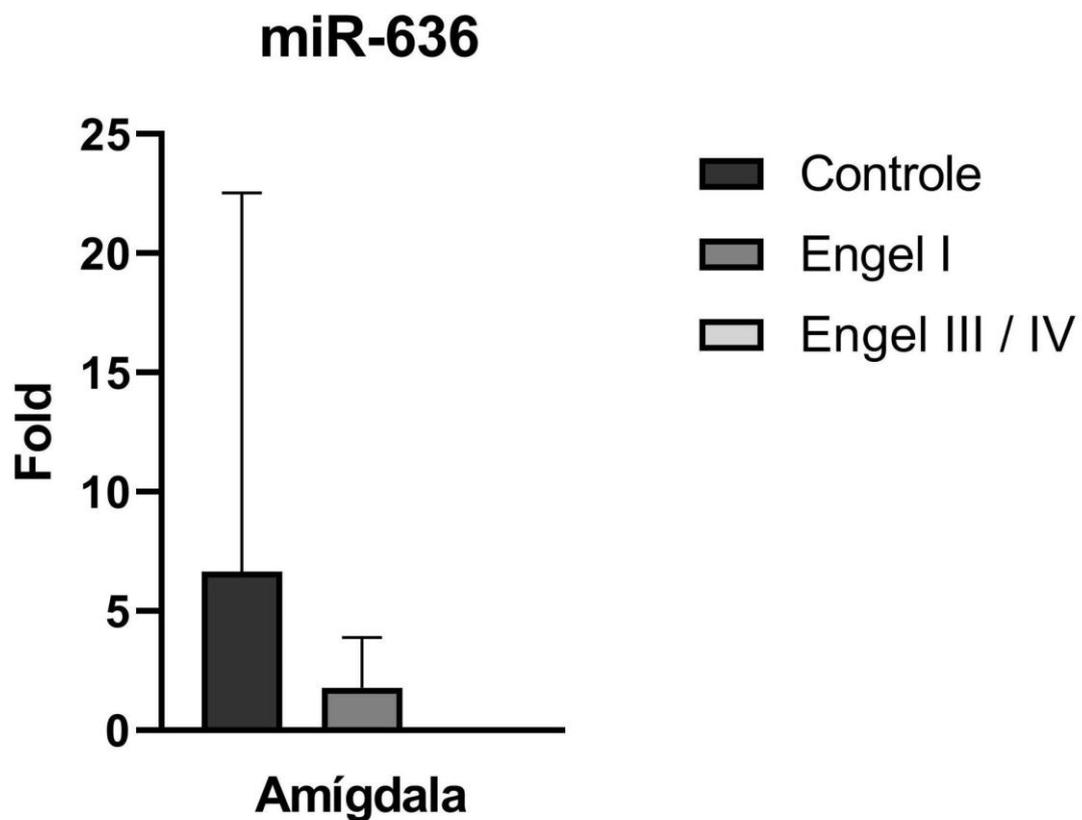
Os resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão do miR-636 quando comparados amígdalas de necrópsia (controle) com amígdalas de pacientes com epilepsia estão ilustrados na figura 10.

Figura 10 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-636 em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. ($p=0,0911$, teste Mann Whitney)



A comparação entre amígdalas de necropsia (controle) com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV estão ilustrados na figura 11.

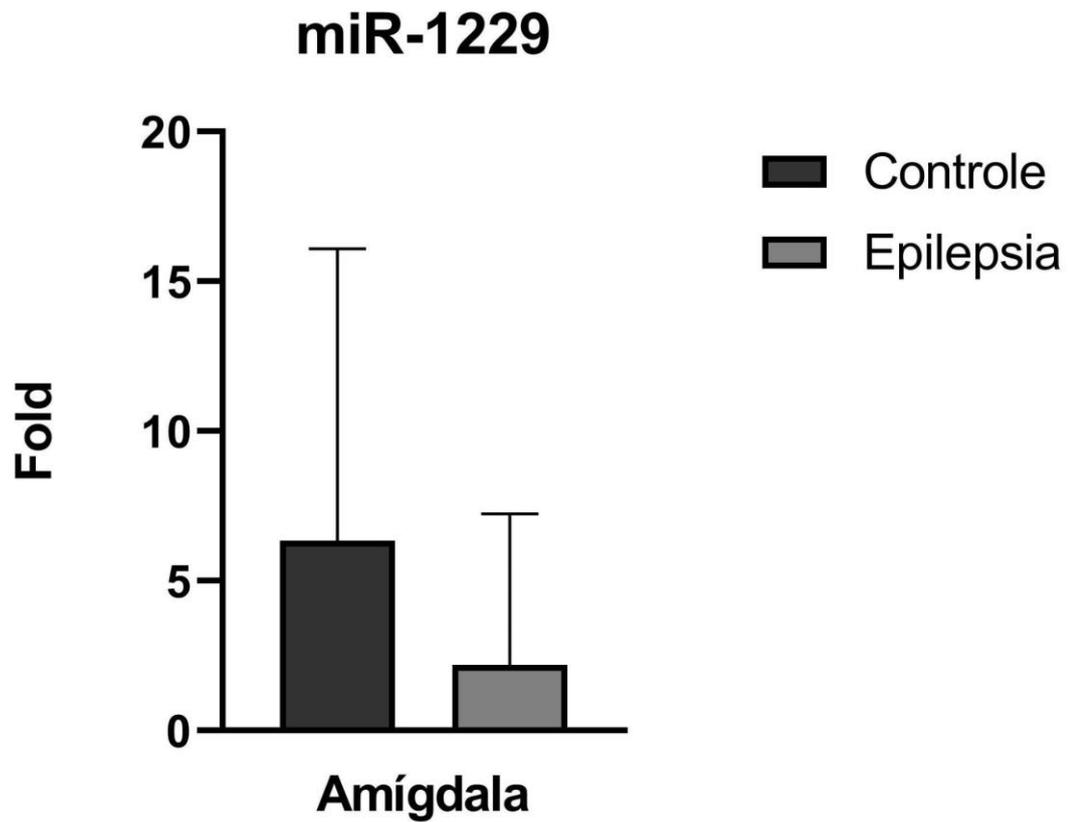
Figura 11 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-636 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0018$, teste Kruskal-Wallis)



6.1.3 microRNA - miR-1229

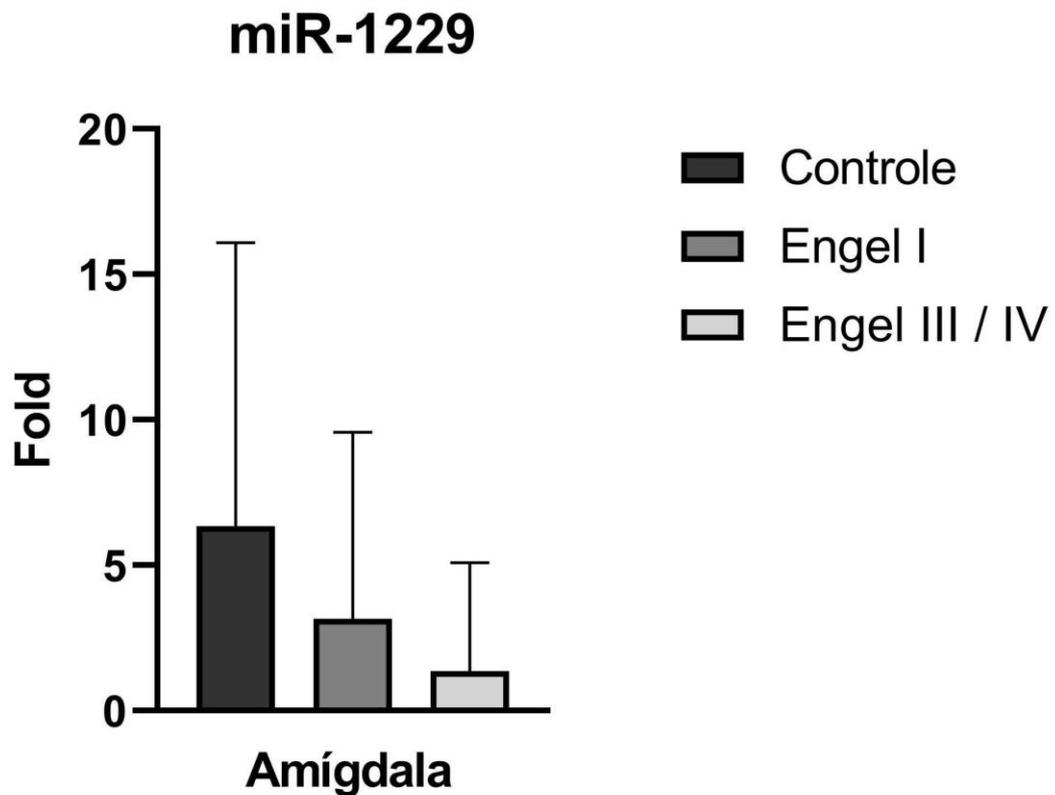
Os resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão do miR-1229 quando comparados amígdalas de necrópsia (controle) com amígdalas de pacientes com epilepsia estão ilustrados na figura 12.

Figura 12 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) e amígdalas de pacientes com epilepsia. ($p=0,2042$, teste Mann Whitney).



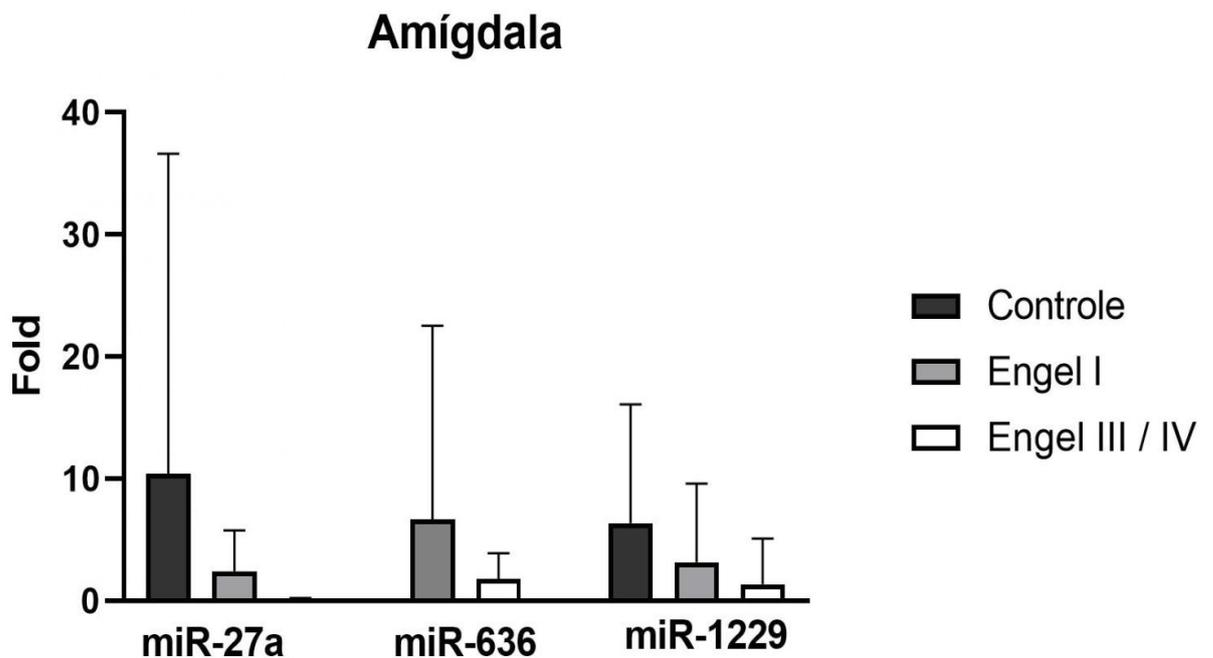
A comparação entre amígdalas de necropsia (controle) com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV estão ilustrados na figura 13.

Figura 13 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0671$, teste Kruskal-Wallis)



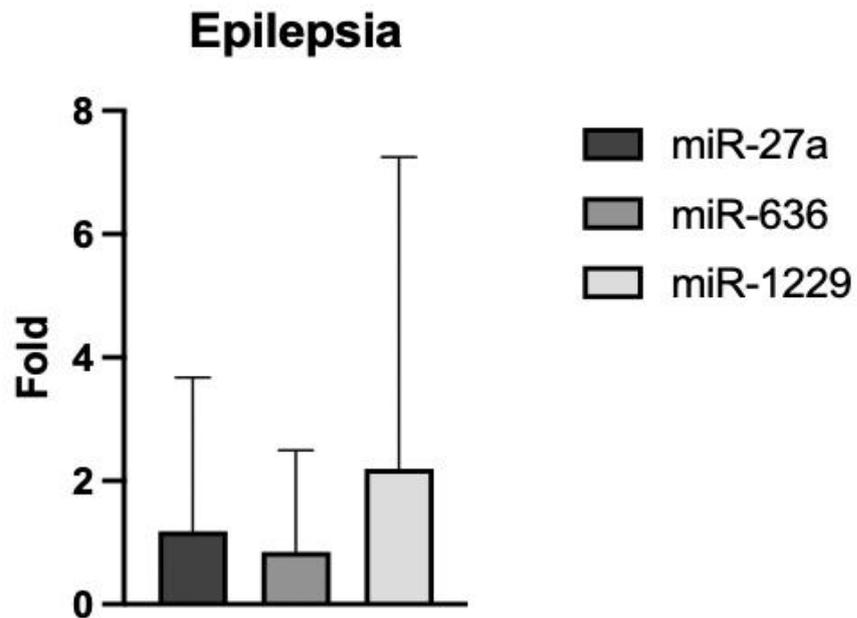
Na figura 14 observa-se a comparação das amostras dos grupos Controle, Engel I e Engel III e IV em relação as expressões miR-27a, miR636 e miR-1229 de amostras de pacientes com amígdala.

Figura 14 - Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em amígdalas de necropsia (controle) comparadas com amígdalas de pacientes Engel I e com amígdalas de pacientes Engel III e IV. ($p=0,0387$, teste Kruskal-Wallis)



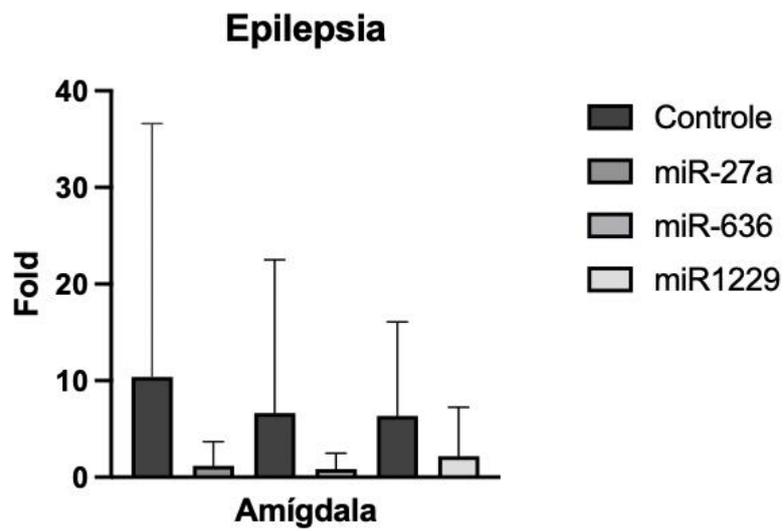
Na figura 15 observa-se a comparação das expressões miR-27a, miR-636 e miR-1229 em relação a pacientes com epilepsia.

Figura 15 - Representação da média (\pm desvio padrão) na expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em pacientes com epilepsia. ($p=0,4647$, teste Kruskal-Wallis)



Na figura 16 representação na expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em pacientes com epilepsia.

Figura 16 - Representação da média (\pm desvio padrão) na expressão do miR-27a, miR-636, miR-1229 em pacientes com epilepsia. ($p=0,4647$, teste Kruskal-Wallis)



7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O tratamento cirúrgico deve ser indicado aos pacientes com diagnóstico de epilepsia focal ou generalizada resistentes ao tratamento farmacológico. Alguns fatores podem interferir nos resultados após a cirurgia, dentre eles as características histopatológicas e biomoleculares, a idade do paciente, duração da epilepsia e localização anatômica da cirurgia. Esses fatores podem alterar a estrutura normal do cérebro, o metabolismo e diversas funções cerebrais, consequentemente resultando em déficit cognitivo, considerado a comorbidade mais frequente a longo prazo. A frequência e duração prolongadas das crises afetam negativamente a cognição, e se relacionam com um mal prognóstico (ALLONE *et al*, 2017; LAMBERINK *et al*, 2020). A memória é o domínio mais comumente prejudicado dentro da comorbidade cognitiva em pacientes com epilepsia do lobo temporal, e se relaciona com a atrofia do hipocampo (ALLONE *et al*, 2017).

Foi observada a presença de epileptogênese residual a partir do acompanhamento a longo prazo do controle de crises convulsivas após ressecção cirúrgica. Uma meta-análise identificou que de 70 pacientes com epilepsia do lobo frontal, 21 (30%) mantiveram o controle completo das crises após 5 anos e de 371 pacientes com epilepsia do lobo temporal, 197 (53%) tiveram o controle completo das crises em 10 anos. Além disso, observaram a recorrência de convulsões em 50% dos pacientes do segundo ao sexto mês, e a maioria das falhas no controle das crises ocorreram dentro de 1 ano após a cirurgia. Apesar de alguns pacientes se beneficiarem com a cirurgia, há uma dificuldade de identificar todas as regiões epileptogênicas (SPENCER; GERRARD; ZAVERI, 2018).

Para Lu *et al.*, 2019, em um estudo verificou o efeito e o mecanismo do miRNA-27a-3p na epilepsia. Foi avaliado em modelos *in vivo* e *in vitro* de epilepsia induzidos usando ácido caínico (KA). A expressão de miR-27a-3p no hipocampo de ratos epiléticos comparado ao grupo controle ou células neuronais foram detectadas por meio de PCR-RT juntamente com o nível de crises epiléticas. O nível da expressão deste miRNA foi significativamente maior no hipocampo de ratos epiléticos e em neurônios induzidos por KA. Juntamente, foi verificado que a inibição de miR-27a-3p aliviou convulsões, inibiu a apoptose de neurônios do hipocampo, reduziu os níveis de expressão de interleucina-1b (IL-1b), IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em

tecidos hipocampais em ratos epiléticos, aumentando a expressão de Bcl2 e diminuiu a expressão de Bax e Caspase3. Portanto, estes resultados indicaram que a inibição de miR-27a-3p protegeu contra a resposta inflamatória induzida por epilepsia e a apoptose neuronal do hipocampo.

Estima-se que aproximadamente 60% de todas as proteínas humanas sejam diretamente reguladas por miRNAs. Um único miRNA pode ter dezenas de alvos, regulando múltiplos genes em uma única via ou um único gene em múltiplas vias. Por exemplo, a perda de expressão do gene miR-128 no cérebro do camundongo resultou na regulação positiva de mais de 1.000 transcritos de mRNA, 154 dos quais eram miR-128, com mais de 25 alvos previstos caindo na quinase 1 regulada por sinal extracelular /2 (ERK1/2). No entanto, também aumenta o potencial de efeitos colaterais indesejados ou imprevistos de qualquer terapia baseada em miRNA. O primeiro banco de dados de miRNA em epilepsia - EpimiRBase sendo que este banco de dados disponível publicamente fornece as informações sobre alterações na expressão de miRNA no cérebro e no sangue (HENSHALL *et al.*, 2016).

Os microRNAs (miRNAs) são descritos como reguladores na patogênese da epilepsia do lobo temporal (ELT) e desempenhando um papel importante nos processos inflamatórios e imunológicos. Um estudo avaliou a expressão dinâmica de miR-183 e miR-135a específicos do cérebro, miR-125b e miR-128 e miR-30c e miR-27a relacionados à inflamação. Ratos foram induzidos ao estado epilético através da administração de pilocarpina. A análise de PCR-RT foi realizada no hipocampo de ratos 2 horas, 3 semanas e 2 meses após o status epilepticus representando as fases aguda, latente e crônica, respectivamente. Também os níveis de expressão dos miRNAs foram quantificados no hipocampo obtido de pacientes com ELT e controles normais. No modelo animal, os miR-183, miR-135a e miR-125b foram mais expressos durante as fases aguda e crônica em comparação aos controles, mas não durante a fase latente. Já os miR-30c e miR-27a-3p foram regulados positivamente nas fases aguda e crônica da ELT. Por outro lado, o miR-128 demonstrou-se significativamente diminuído em todas as fases do desenvolvimento da ELT. Em pacientes com ELT, miR-183, miR-135a, miR-125b, miR-30c e miR-27a foram apresentaram níveis de expressão mais altos, enquanto miR-128 apresentou níveis de expressão mais baixos (ALSHARAFI; XIAO, 2015).

Conforme comentando anteriormente no presente estudo, o hipocampo e a amígdala constituem estruturas do sistema límbico, cujo apresenta papel crucial

para o aprendizado, emoções e também memória. As interconexões formadas pelas regiões hipocâmpais e núcleos amigdalares são extremamente complexas, e em diversas patológicas, podemos observar o comprometimento dessas estruturas, como por exemplo, na doença de Alzheimer e ELTM (MCDONALD; MOTT, 2017).

Por exemplo, na doença de Alzheimer ocorre um declínio clínico com perda progressiva de memória, alterações no comportamento e alterações cognitivas. Nos achados histopatológicos da doença de Alzheimer, observamos a presença de placas neuríticas, formadas através do acúmulo fibrilar do peptídeo beta-amiloide (A β) e dos emaranhados neurofibrilares, cujo formado pela proteína TAU. Quando ocorre a hiperfosforilação da proteína TAU acontece à desestabilização dos microtúbulos do citoesqueleto, ocasionando anormalidades no transporte axonal e morte neuronal (TORAL-RIOS *et al.*, 2020)

Foi demonstrado que a relação da proteína TAU com a excitabilidade é importante, ao passo que observou-se um aumento na incidência de convulsões não provocadas em pacientes portadores da doença de Alzheimer, podendo ser este, um resultado das alterações de circuitos neuronais e neurodegenerativos (TORAL-RIOS *et al.*, 2020).

Na doença de Alzheimer os circuitos neuronais afetados envolvem áreas relacionadas com a epileptogênese, como hipocampo e amígdala, que estão relacionadas diretamente a ELTM. Histologicamente, em pacientes com ELTM observou-se a presença de agregados da proteína TAU hiperfosforilada. Com isso, fica evidente a relação da proteína TAU com a hiperexcitabilidade e convulsões, e sua contribuição para acelerar os processos de desenvolvimento do comprometimento cognitivo dos doentes, como por exemplo, a perda de memória (TORAL-RIOS *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, nas amostras correspondentes a área de amígdala, não encontramos diferença estatística ao analisar a expressão do miR-27a ao comparar o grupo controle com o grupo epilepsia, entretanto, quando analisamos a expressão do miR-27a em relação ao grupo controle e a classificação de Engel, observamos uma expressão diferencial do miR-27a no grupo Engel III e IV, onde o mesmo apresentou-se hiperexpresso.

Por outro lado, nas amostras correspondentes as regiões do hipocampo observamos a hiperexpressão no grupo epilepsia em relação ao grupo controle, bem como a hiperexpressão dos pacientes Engel I. Nas amostras de sangue periférico,

também encontramos um aumento na expressão diferencial do miR-27a no grupo epilepsia em relação ao controle. Pacientes classificados em Engel I também apresentaram hiperexpressão do miR-27a.

Com base nas plataformas de bioinformática identificamos a participação do miR-27a com a regulação a expressão da proteína TAU, entretanto, até o presente momento, poucos estudos correlacionam a expressão do referido microRNA e a expressão da proteína TAU.

Em um estudo experimental de Su *et al* (2022), o miR-27a foi correlacionado a crises epiléticas e com pacientes classificados em Engel III e IV, cujo possuíam alta hiperexcitabilidade e descarga epilética no hipocampo. Além disso, a hiperexpressão do miR-27aa correlacionou-se com processos característicos da epileptogênese como a neurodegeneração e neuroinflamação (SU *et al.*, 2022).

Em outro estudo, os autores sugeriam a participação do miR-27a como potencialmente útil no diagnóstico da ELTM, uma vez que o miR-27a é capaz de inibir a apoptose neuronal em regiões do hipocampo, ao promover a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e diminuir expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e caspase-3. Ainda neste estudo, o miR-27a apresentou uma expressão diferencial no sangue de pacientes com epilepsia em comparação ao grupo controle (RAOOF *et al.*, 2018).

Observou-se em outro estudo, que inibidores do miR-27a poderiam prevenir a resposta inflamatória durante a epileptogênese, induzida pela apoptose neuronal no hipocampo (LU *et al.*, 2019).

Com isso, o aumento da expressão do miR-27a em nosso estudo nas amostras de amígdala, hipocampo e sangue, poderia correlacionar-se possivelmente a uma expressão exacerbada da proteína TAU, também aos eventos críticos da epileptogênese, como a neurodegeneração e neuroinflamação, que contribuem para os efeitos do acúmulo desta proteína.

Nesse cenário, a expressão diferencial do miR-27a regulando a expressão da proteína TAU, poderia ser envolvido com as alterações cognitivas dos pacientes, em especial, com a perda de memória. Visto que a proteína TAU associou-se a eventos de hiperexcitabilidade, comuns durante o estado epilético, e que contribui acelerando o comprometimento cognitivo dos pacientes.

Alguns estudos demonstram o eixo do desenvolvimento da doença de Alzheimer em pacientes com ELTM, ao sofrerem um declínio cognitivo, apresentando

pontuações cognitivas baixas, como por exemplo, em testes de memória verbal. De modo não surpreendente, devido aos eventos de neurodegeneração, pacientes com idade superior a 50 anos com ELMT refratária, tornou-se um fator de risco para o declínio cognitivo rápido e subsequente perda de memória (TAI *et al.*, 2016).

Uma série de estudos tem sido proposta para demonstrar a prevalência da relação da epilepsia com a demência e doença de Alzheimer, sendo este um forte ponto onde a participação do miR-27a e da proteína TAU também merece ser investigada, pois o eixo da regulação do miR-27a e proteína TAU foi pouco explorado na literatura, e estão associados diretamente a eventos de neurodegeneração e deficiência cognitiva.

Para Lu *et al.*, 2019, verificaram o papel do miRNA-27a-3p na epilepsia utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. A expressão de miR-27a-3p no hipocampo de ratos epiléticos comparado ao grupo controle ou células neuronais foram detectadas por meio de PCR-RT juntamente com o nível de crises epiléticas. O nível da expressão deste miRNA foi significativamente maior no hipocampo de ratos epiléticos e em neurônios induzidos por ácido caínico (KA). Também foi verificado que a inibição de miR-27a-3p aliviou convulsões, inibiu a apoptose de neurônios do hipocampo, reduziu os níveis de expressão de interleucina-1b (IL-1b), IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em tecidos hipocampais em ratos epiléticos, aumentando a expressão de Bcl2 e diminuiu a expressão de Bax e Caspase3. Portanto, estes resultados indicaram que a inibição de miR-27a-3p protegeu contra a resposta inflamatória induzida por epilepsia e a apoptose neuronal do hipocampo.

Outro estudo investigou o papel de miR-27a-3p, miR328-3p e miR-654-3p como biomarcadores circulantes no diagnóstico da epilepsia e possível prognóstico da intervenção cirúrgica na coorte hipocampal ELTM Esclerose (MTLE-HS), incluindo pacientes com bom prognóstico cirúrgico (Engel I) e aqueles com baixo prognóstico cirúrgico (Engel III-IV). O miR-27a-3p não foi validado como um marcador circulante para diagnóstico ou prognóstico. No entanto, o miR-328-3p pode-se verificar a diferenciação do Controle, Controle Engel I, Controle Engel III-IV e níveis para diagnóstico do paciente Engel I+Engel III-IV São 90,3%, 96,8% e 93,5%, respectivamente. Além disso, o miR654-3p foi verificado a diferença dos grupos controles em pacientes com Engel I, comparados aos pacientes Engel III-IV devido o baixo nível de prognóstico (IORIATTI *et al.*, 2020).

Para He *et al.*, 2022, analisaram os níveis de NEAT1 em soro e líquido cefalorraquidiano em pacientes com Doença de Alzheimer, onde esses foram negativamente correlacionados com os níveis do miR-27a-3p, no estudo foi demonstrado o local que havia sítios de ligação entre NEAT1 e miR27a-3p, e também haviam sítios de ligação entre BACE1 e miR-27a-3p. Observou-se que o NEAT1 pode ter como alvo o miR-27a-3p para regular a expressão de BACE1. O autor ainda relata que o BACE1 é uma enzima chave sintetizada para A β e tornando-se um alvo importante para o tratamento medicamentoso da DA, o que verificando os níveis de NEAT1, que foram hiperexpressos no cérebro de pacientes com DA e puderam manter a estabilidade de BACE1 e promovendo sua expressão adsorvendo miR27a-3p, de modo a promover a produção e sedimentação de A β em pontos no cérebro, resultando em degeneração neural.

Com relação ao microRNA-636, o papel deste na regulação da expressão da proteína foi avaliada por Bardin *et al.*, (2019), usando uma abordagem computacional que previu que os 3'-UTRs de IL1R1, RANK, IKBKB e FAM13A mRNA contêm regiões de semente que são reconhecidas por uma variedade de miRNAs, incluindo miR-636, onde verificaram informações nos transcritos humanos modulando de IL1R1, RANK, IKBKB e FAM13A, pela ligação aos seus 3'UTRs, regulando mediadores inflamatórios.

Estudos demonstram que alterações induzidas por BDNF no perfil de miRNA não definidos em Células Progenitoras endoteliais (CPE), uma vez tratadas com BDNF. O miR-3928 demonstrou estimular proliferação de células de osteossarcoma e miR-636 e miR-485-5p demonstraram inibir a proliferação de células cancerígenas. Embora neste estudo o BDNF presente o miR-3928 regulado, miR-636 regulado positivamente e miR-485-5p, os efeitos desses miRNAs no endotélio a formação de colônias ainda precisa ser determinada (HE *et al.*, 2018).

Para Albanel *et al.* (2019), em uma revisão sistemática verificou que os miRNAs hsa-miR-7974, miR-3619-5p, miR-455-3p, miR-3176, miR-3187-3p, miR-636 e miR-454-5p foram regulados negativamente após exposição das metaloproteinases, o que sugere que seu padrão de desregulação pode contribuir para o comprometimento da viabilidade celular.

Para Ma; Zhou; Chen (2019), em seu estudo, verificaram que o miR-636 teve uma hipoexpressão em tecidos e células de pacientes com câncer de colo cervical de útero associado com a sinalização na via Hedgehog e marcadores na

transição epitélio-mesenquimal. Também foi observado a superexpressão do miR-636 na fase de maior taxa de proliferação e migração celular do ciclo celular induzido parada na fase G0/G1 em câncer ovariano. Uma vez que o miR-636 foi silenciado, a proliferação celular e a migração foram significativamente aumentadas, bem como aumento de Vimentina e diminuição da E-caderina, o que indica a promoção do processo de transição epitélio-mesênquima. Nesse estudo, os autores validaram que o miR-636 inibiu crescimento tumoral e EMT de OVC in vivo.

Ao analisarmos a expressão do miR-636 em amostras de amígdala, não encontramos diferenças em relação ao grupo controle e epilepsia, entretanto, observamos uma hipoexpressão do miR-636 em relação aos pacientes Engel I e Engel III e IV, comparado a expressão do grupo controle.

Em relação à expressão miR-1229 analisado também em amostras de amígdalas, não encontramos diferenças em relação a expressão do grupo controle e epilepsia, e em comparação ao grupo controle e Engel I e Engel III e IV.

Para Ghanbari *et al.* (2016), em um de seus estudos detectaram uma associação entre o precursor do miR-1229 e risco de Doença de Alzheimer. O pré-miR-1229 é precursor de dois miRNAs maduros (miR-1229-3p e miR1229-5p), entretanto, o miRNA 3p tem se demonstrado o produto predominante. Indicam que o alelo mutante melhora a estabilidade da estrutura em grampo do pré-miR-1229. Em seu estudo analisou que o alelo mutante aumenta a estabilidade ou o processamento do miR-1229-3p maduro. O risco do alelo deste microRNA no SNP foi demonstrado para aumentar a expressão de miR-1229-3p, diminuindo assim a expressão de SORL1, um gene associado à Doença de Alzheimer. Além disso, entre mais de 42.000 variantes em regiões de ligação a miRNA, 10 variantes no 3' UTR de nove genes foram associados a esse distúrbio. Foi verificado que o miR-1229-3p regula SORL1 e que a diminuição da expressão SORL1 está envolvida na causa da Doença de Alzheimer.

Com base em uma pesquisa minuciosa realizada em plataformas de bioinformática, identificamos como alvo dos miR-636 e miR-1229 os genes GAD1 e GAD2, cujo quais estão envolvidos com o eixo da neurotransmissão GABAérgica da memória de trabalho, associados também a crises convulsivas. As anormalidades GABérgicas são encontradas principalmente em regiões consideradas importantes para a memória declarativa e de curto prazo (WANG et al., 2022)

Até o presente momento, nenhum estudo demonstrou a participação direta do eixo da regulação dos miR-636 e miR-1229 com GAD1 e GAD2 na epilepsia e seu impacto no déficit cognitivo desses pacientes, como a perda de memória (WANG *et al.*, 2017).

O gene GAD1 é responsável pela codificação da proteína GAD67, o principal contribuindo para produção de GABA no sistema nervoso central (SNC), além de ser a principal isoformas embrionária e desempenhar papel importante durante a sinaptogênese e desenvolvimento neuronal (NEURAY *et al.*, 2020).

Uma característica associada a GAB1 é o desenvolvimento de convulsões, demonstrando que anormalidades nas funções GABAérgicas resultam na indução de convulsões. Em cérebros de epiléticos, foi demonstrado uma redução de neurônios GABAérgicos, ou seja, as próprias convulsões diminuem a liberação de GABA no cérebro (NEURAY *et al.*, 2020).

A cognição e as emoções estão associadas aos circuitos GABAérgicos principalmente nas regiões mesocorticaislimbicas, como amígdala e hipocampo, sendo GABA um receptor fundamental do sistema límbico (WANG *et al.*, 2022).

Em um estudo de pacientes com esquizofrenia, notou-se que alterações na expressão do gene GAD1 atua como modificador da estrutura cerebral e das funções cognitivas, afetando o desempenho da memória de trabalho (LETT *et al.*, 2016).

A expressão diferencial dos miR-636 e do miR-1229 em nosso estudo, possivelmente poderia se correlacionar com a reduzida de GAD1 e GAD2 em pacientes epiléticos, e ainda, ser relacionada a piora do déficit cognitivo de memória nesses pacientes. A importância de novos estudos a cerca da participação desses microRNAs e sua relação com a regulação da expressão dos genes GAD1 e GAD2, bem como a elucidação do seus possíveis efeito nocivos as funções cognitivas, devem ser investigados durante a epileptogênese, afim de contribuir para novas descobertas.

8 CONCLUSÃO

8 Conclusão

O microRNA-27a apresentou-se diferencialmente expresso entre o grupo controle e o grupo epilepsia tanto no hipocampo quanto no sangue. Entretanto, o mesmo não foi observado em amígdalas. Também se apresentou diferencialmente expresso entre Engel I e III e IV tanto no sangue quanto em amígdalas e hipocampos. Entretanto, o padrão de expressão foi inverso, ou seja, em amígdalas o miR-27a apresentou níveis de expressão mais altos no grupo controle quando comparado com o grupo epilepsia e no hipocampo e sangue os níveis de expressão deste microRNA foram mais altos no grupo epilepsia.

O microRNA-636 apresentou-se diferencialmente expresso quando observada a classificação de Engel em amígdalas. O microRNA-1229 não se apresentou diferencialmente expresso entre os grupos estudados em amígdalas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLONE, C.; BUONO, V. L.; CORALLO, F.; PISANI, L. R.; POLLICINO, P.; BRAMANTI, P.; MARINO, S. Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v. 15, n. 381, p. 7-15, Oct. 2017. DOI: 10.1016/j.jns.2017.08.007.
- ALSHARAFI, W.; XIAO, B. Dynamic expression of microRNAs (183, 135a, 125b, 128, 30c and 27a) in the rat pilocarpine model and temporal lobe epilepsy patients. **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. 1096-1102, 2015. DOI: 10.2174/1871527314666150317225945.
- ANTÔNIO, L. G. L.; FREITAS-LIMA, P.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; ASSINATI Jr, J. A.; MATIAS, C. M.; CIRINO, M. L. A.; TIRAPELLI, L. F.; VELASCO, T. R.; SAKAMOTO, A. C.; CARLOTTI JR., C. G.; TIRAPELLI, D. P.C. Expression of MicroRNAs miR-145, miR-181c, miR-199a and miR-1183 in the Blood and Hippocampus of Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **J. Mol. Neurosci.**, Totowa, v. 69, n. 4, p. 580-587, Dec. 2019. DOI:10.1007/s12031-019-01386-w.
- ASADI-POOYA, A. A.; STEWART, G. R.; ABRAMS, D. J.; SHARAN, A. Prevalence and incidence of drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy in the United States. **World Neurosurg.**, New York, v. 99, p. 662–666. Mar. 2017. DOI: 10.1016/j.wneu.2016.12.074.
- BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends Cogn. Sci.**, Kidlington, v. 4, n. 11, p. 417-423, Nov. 2000. DOI: 10.1016/s1364-6613(00)01538-2.
- BADDELEY, A. **Working memory, thought, and action**. Oxford Psychology Series. (Oxford, 2007; online edn, Oxford Academic, 22 Mar. 2012), DOI: 10.1093/acprof:oso/9780198528012.001.0001.
- BARDIN, P.; FOUSSIGNIÈRE, T.; ROUSSELET, N.; REBEYROL, C.; PORTER, J. C.; CORVOL, H.; TABARY, O. miR-636: a newly-identified actor for the regulation of pulmonary inflammation in cystic fibrosis. **Front. Immunol.**, Switzerland, v. 15, n. 10, p. 2643, Nov. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02643.
- BEROUN, A.; MITRA, S.; MICHALUK, P.; PIJET, B.; STEFANIUK, M.; KACZMAREK, L. MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. **Cell. Mol. Life. Sci.**, Basel, v. 76, n. 16, p. 3207-3228, Aug. 2019. DOI: 10.1007/s00018-019-03180-8.
- BRENNAN, G. P.; HENSHALL, D. C. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v.16, n. 9, p. 506-519, Sep. 2020. DOI: 10.1038/s41582-020-0369-8.
- BRENNAN, G. P.; HENSHALL, D. C. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 667, p. 47–52, Fev. 2018. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.017.

- BUSCH, R. M.; YEHA, L.; BLÜMCKE, I.; HU, B.; PRAYSON, T.; HERMANN, B. P.; NAJM, I. M.; ENG, C. Molecular and subregion mechanisms of episodic memory phenotypes in temporal lobe epilepsy. **Brain Commun.**, Oxford, v. 4, n. 6, p. fcac285, Nov. 2022. DOI: 10.1093/braincomms/fcac285.
- CAO, D. D.; LI, L.; CHAN, W. Y. MicroRNAs: Key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 17, n. 6, p.842. May. 2016. DOI: 10.3390/ijms17060842.
- CHANG, C.W.; SHAO, E.; MUCKE, L. Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. **Science**, Washington, v. 371, n. 6532, p. eabb8255, Fev. 2021. DOI: 10.1126/science.abb8255.
- DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; O'BRIEN, T. J.; JETTE, N.; SCHEFFER, I. E.; DE CURTIS, M.; PERUCCA, P. Epilepsy. **Nat. Rev. Dis. Primers**, London, v. 3, n. 4, p. 18024, May. 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.24.
- EYILETEN, C.; SHARIF, L.; WICIK, Z.; JAKUBIK, D.; JAROSZPOPEK, J.; SOPLINSKA, A.; POSTULA, M.; CZLONKOWSKA, A.; KAPLON-CIESLICKA, A.; MIROWSKA-GUZEL, D. The relation of the brain-derived neurotrophic factor with microRNAs in neurodegenerative diseases and ischemic stroke. **Mol. Neurobiol.**, New York, v. 58, n. 1, p. 329–347, Jan. 2021. DOI: 10.1007/s12035-020-02101-2.
- FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v. 139, p. 73-79, Jan. 2018. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015.
- FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia.**, Amsterdam, v. 58, n. 4, p. 522-530, Apr. 2017. DOI: 10.1111/epi.13670.
- GALERA, C.; PEREIRA DE SOUZA, A. L. Memória visuoespacial e cinestésica de curto prazo em crianças de 7 a 10 anos. **Estud. Psicol.**, Natal, v. 15, n. 2, p. 137-143, Aug. 2010. DOI: 10.1590/S1413-294X2010000200002.
- GATTÁS, D.; NETO, F. S.L.; FREITAS-LIMA, P.; BONFIM-SILVA, R.; MALAQUIAS DE ALMEIDA, S.; CIRINO M. L. A.; GUIMARÃES TIEZZI, D.; TIRAPELLI, L. F.; VELASCO, T. R.; SAKAMOTO, A. C.; MATIAS, C. M.; CARLOTTI JR, C. G.; TIRAPELLI, D. P.C. MicroRNAs miR-629-3p, miR-1202 and miR-1225-5p as potential diagnostic and surgery outcome biomarkers for mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Neurochirurgie**, v. 68, n. 6, p. 583-588, Dec. 2022. DOI: 10.1016/j.neuchi.2022.06.002.
- GBD 2016 EPILEPSY COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol.**, London, v. 18, n. 4, p. 357-375, Apr. 2019. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30454-X.

- GHANBARI, M.; IKRAM, M. A.; DE LOOPER, H. W. J.; HOFMAN, A.; ERKELAND, S. J.; FRANCO, O. H.; DEGHAN, A. Genome-wide identification of microRNA-related variants associated with risk of Alzheimer's disease. **Sci. Rep.**, London, v. 22, n. 6, p. 28387, Jun. 2016. DOI: 10.1038/srep28387.
- GONG, X.; HUANG, M.; CHEN, L. Mechanism of miR-132-3p promoting neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. **eNeuro**, v. 9, n. 1, p. ENEURO.0393-21. Jan. 2022. DOI: 10.1523/ENEURO.0393-21.2021.
- GOURMAUD, S.; SHOU, H.; IRWIN, D. J.; SANSALONE, K.; JACOBS, L. M.; LUCAS, T. H.; MARSH, E. D.; DAVIS, K. A.; JENSEN, F. E.; TALOS, D. M. Alzheimer-like amyloid and tau alterations associated with cognitive deficit in temporal lobe epilepsy. **Brain**, London, v. 143, n. 1, p. 191–209, Jan. 2020. DOI: 10.1093/brain/awz38.
- HAMAMOTO, O.; TIRAPELLI, D. P. D. C.; LIZARTE NETO, F. S.; FREITAS-LIMA, P.; SAGGIORO, F. P.; CIRINO, M. L. A.; ASSIRATI JR, J. A.; SERAFINI, L. N.; VELASCO, T. R.; SAKAMOTO, A. C.; CARLOTTI JR, C. G. Modulation of NMDA receptor by miR-219 in the amygdala and hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. **J. Clin. Neurosci.**, Melbourne, v. 74, p. 180-186, Apr. 2020. DOI: 10.1016/j.jocn.2020.02.024.
- HE, T.; SUN, R.; LI, Y.; KATUSIC, Z. S. Effects of brain-derived neurotrophic factor on MicroRNA expression profile in human endothelial progenitor cells. **Cell Transplant.**, Elmsford, v. 27, n. 6, p. 1005-1009, Jun. 2018. DOI: 10.1177/0963689718761658.
- HE, L., CHEN, Z., WANG, J.; FENG, H. Expression relationship and significance of NEAT1 and miR-27a-3p in serum and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. **BMC Neurol.**, London, v. 22, n. 203, p. 1-8, Jun. 2022. DOI: 10.1186/s12883-022-02728-9.
- HENSHALL, D. C.; HAMER, H. M.; PASTERKAMP, R. J.; GOLDSTEIN, D. B.; KJEMS, J.; PREHN, J. H. M.; SCHORGE, S.; LAMOTTKE, K.; ROSENOW, F. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. **Lancet Neurol.**, London, v.15, n. 13, p. 1368-1376, Dec. 2016. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30246-0.
- HERMANN, B. P.; STRUCK, A. F.; BUSCH, R. M.; REYES, A.; KAESTNER, E.; MCDONALD, C. R. Neurobehavioural comorbidities of epilepsy: towards a network-based precision taxonomy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v. 17, n. 12, p. 731-746, Dec. 2021. DOI: 10.1038/s41582-021-00555-z.
- IORIATTI, E. S.; CIRINO, M. L. A.; NETO, F. S. L.; VELASCO, T. R.; SAKAMOTO, A. C.; FREITAS-LIMA, P.; TIRAPELLI, D. P. C.; CARLOTTI JR., C. G. Expression of circulating microRNAs as predictors of diagnosis and surgical outcome in patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsy Res.**, Amsterdam v. 166, p. 106373, Oct. 2020. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2020.106373.

- JOHNSON, E. L. Seizures and epilepsy. **Med. Clin. North Am.**, v. 103, n. 2, p. 309–324. Mar. 2019. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.10.002.
- LAMBERINK, H. J.; OTTE, W. M.; BLÜMCKE, I.; BRAUN, K. P. J.; EUROPEAN EPILEPSY BRAIN BANK WRITING GROUP; STUDY GROUP; EUROPEAN REFERENCE NETWORK EpiCARE. Seizure outcome and use of antiepileptic drugs after epilepsy surgery according to histopathological diagnosis: a retrospective multicentre cohort study. **Lancet Neurol.**, London, v. 19, n. 9, p. 748–757, Sep. 2020. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30220-9.
- LETT, T. A.; KENNEDY, J. L.; RADHU, N.; DOMINGUEZ, L. G.; CHAKRAVARTY, M. M.; NAZERI, A.; FARZAN, F.; WALTER, H. HEINZ, A.; MULSANT, B.H.; DASKALAKIS, Z. J.; VOINESKOS, A. N. Prefrontal White Matter Structure Mediates the Influence of GAD1 on Working Memory. **Neuropsychopharmacol.**, New York, v. 41, n. 9, p. 2224–2231, Aug. 2016. DOI: 10.1038/npp.2016.14.
- LIU, Q.; WANG, L.; YAN, G.; ZHANG, W.; HUAN, Z.; LI, J. MiR-125a-5p Alleviates Dysfunction and Inflammation of Pentylentetrazolinduced Epilepsy Through Targeting Calmodulin-dependent Protein Kinase IV (CAMK4). **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 16, n. 4, p. 365–372, 2019a. DOI: 10.2174/1567202616666190906125444.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, P.; BAI, H.; LI, X.; XIAO, J.; YUAN, Q.; GENG, S.; YIN, H.; ZHANG, H.; WANG, Z.; LI, J.; WANG, S.; WANG, Y. MicroRNA-128 knockout inhibits the development of Alzheimer’s disease by targeting PPAR γ in mouse models. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 843, p. 134–144, Jan. 2019b. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.11.004
- LOGIE, R. H. Visuo-spatial processing in working memory. **Q. J. Exp. Psychol. A.**, London, v. 38, n. 2, p. 229–247, May. 1986. DOI: 10.1080/14640748608401596.
- LOGIE, R. H. **Visuo-spatial working memory**. Published Psychology Press, 176 pg. 1995.
- LU, J.; ZHOU, N.; YANG, P.; DENG, L.; LIU, G. MicroRNA-27a-3p downregulation inhibits inflammatory response and hippocampal neuronal cell apoptosis by upregulating mitogen-activated protein kinase 4 (MAP2K4) expression in epilepsy: in vivo and in vitro studies. **Med. Sci. Monit.**, Warsaw, v. 25, p. 8499–8508, Nov. 2019. DOI: 10.12659/MSM.916458.
- LU, T. X.; ROTHENBERG, M. MicroRNA. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 141, n. 4, p. 1202–1207, Apr. 2018. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- MA, J.; ZHOU, C.; CHEN, X. miR-636 inhibits EMT, cell proliferation and cell cycle of ovarian cancer by directly targeting transcription factor Gli2 involved in Hedgehog pathway. **Cancer Cell. Int.**, London, v. 21, n. 64, p. 1–14, Jan. 2021. DOI: 10.1186/s12935-020-01725-7.
- MARTINEZ, B.; PELOW, P. MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. **Neural Regen. Res.**, Mumbai, v. 8, n. 4, p. 716–726, Apr. 2023. DOI: 10.4103/1673-5374.354510.

- MCDONALD, A. J.; MOTT, D. D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. **J. Neurosci. Res.**, New York, v. 95, n. 3, p. 797–820, Mar. 2017. DOI: 10.1002/jnr.23709.
- MENG, X.; JOOSSE, S. A.; MÜLLER, V.; TRILLSCH, F.; MILDE-LANGOSCH, K.; MAHNER, S.; GEFFKEN, M.; PANTEL, K.; SCHWARZENBACH, H. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. **Br. J. Cancer.**, London, v. 113, p. 1358–1366, 2015. DOI: 10.1038/bjc.2015.340
- MORISHITA, A.; YONEYAMA, H.; IWAMA, H.; FUJITA, K.; WATANABE, M.; HIROSE, K.; TADOKORO, T.; OURA, K.; SAKAMOTO, T.; MIMURA, S.; NOMURA, T.; ORYU, M.; HIMOTO, T.; SHIMOTOHNO, K.; MASAKI, T. Circulating microRNA-636 is associated with the elimination of hepatitis C virus by ombitasvir/paritaprevir/ritonavir. **Oncotarget.**, Albany, v. 9, n. 62, p. 32054–32062, Aug. 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.25889.
- MOURA, J. C.; TIRAPELLI, D. P.; NEDER, L.; SAGGIORO, F. P.; SAKAMOTO, A. C.; VELASCO, T.R.; PANEPUCCI, R. A.; LEITE, J. P.; ASSIRATI JR, J. A.; COLLI, B. O.; CARLOTTI JR, C. G. Amygdala gene expression of NMDA and GABA(A) receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. **Hippocampus.**, New York, v. 22, n. 1, p. 92-97. Jan. 2012. DOI: 10.1002/hipo.20863.
- NABOUT, R.; KUCHENBUCH, M. Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v. 16, n. 12, p. 674-688. Dec. 2020. DOI: 10.1038/s41582-020-0409-4.
- NEURAY, C.; MAROOFIAN, R.; SCALA, M.; SULTAN, T.; PAI, G. S.; MOJARRAD, M.; KHASHAB, H. E.; DEHOLL, L.; YUE, W.; ALSAIF, H. S.; ZANETTI, M. N.; BELLO, O.; PERSON, R.; ESLAHI, A.; KHAZAEI, Z.; FEIZABADI, M. H.; EFTHYMIU, S.; SYNAPS; STUDY GROUP; EL-BASSYOUNI, H. T.; SOLIMAN, D. R.; TEKES, S.; OZER, L.; BALTAC, V.; KHAN, S.; BEETZ, C.; AMR, K. S.; SALPIETRO, V.; JAMSHIDI, Y.; ALKURAYA, F. S.; HOULDEN, H. Early-infantile onset epilepsy and developmental delay caused by bi-allelic GAD1 variants. **Brain**, London, v. 143, n. 8, p. 2388–2397, Aug. 2020. DOI: 10.1093/brain/awaa178.
- NEVES, D. S. R. **Características fenomenológicas, estruturais e funcionais da memória autobiográfica em homens e mulheres em cumprimento de pena de prisão.** 2015. Tese (Doutoramento em Psicologia) - Faculdade de Psicologia e de Ciências da Educação da Universidade de Coimbra, Coimbra – Portugal, 2015.
- NISHIBEPPU, K.; KOMATSU, S.; IMAMURA, T.; KIUCHI, J.; KISHIMOTO, T.; ARITA, T.; KOSUGA, T.; KONISHI, H.; KUBOTA, T.; SHIOZAKI, A.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OTSUJI, E. Plasma microRNA profiles: identification of miR-1229-3p as a novel chemoresistant and prognostic biomarker in gastric cancer. **Sci. Rep.**, London, v. 10, n. 1, p. 3161, Feb. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-59939-8.
- PAN, L.; HUANG, B. J.; MA, X. E.; WANG, S. Y.; FENG, J.; LV, F.; LIU, Y.; LIU, Y.; LI, C. M.; LIANG, D. D.; LI, J.; XU, L.; CHEN, Y. H. MiR25 protects cardiomyocytes against oxidative damage by targeting the mitochondrial calcium uniporter. **Int. J.**

- Mol. Sci.**, Basel, v. 16, n. 3, p. 5420–5433, Mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms16035420>.
- PATEL, D. C.; TEWARI, B. P.; CHAUNSALI, L.; SONTHEIMER, H. Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 20, p. 282–297, Feb. 2019. DOI: 10.1038/s41583-019-0126-4.
- PERUCCA, E.; MOSHÉ, S. L.; WIRRELL, E. C.; TINUPER, P. International league against epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. **Epilepsia**, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 1443-1474, 2022, May. 2022. DOI: 10.1111/epi.17240.
- RAOOF, R.; BAUER, S.; EL NAGGAR, H.; CONNOLLY, N. M. C.; BRENNAN, G. P.; BRINDLEY, E.; HILL, T.; MCARDLE, H.; SPAIN, E.; FORSTER, R. J.; PREHN, J. H. M.; HAMER, H.; DELANTY, N.; ROSENOW, F.; MOONEY, C.; HENSHALL, D. C. Dual-center, dual-platform microRNA profiling identifies potential plasma biomarkers of adult temporal lobe epilepsy. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 38, p. 127–141, Nov. 2018. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.10.068.
- RASTOGI, S.; MEADOR, K. J.; BARR, W. B.; DEVINSKY, O.; LEEMAN-MARKOWSKI, B. A. Remote Memory in Epilepsy: Assessment, Impairment, and Implications Regarding Hippocampal Function. **Front. Neurol.**, Lausanne, v. 8, n. 13, p. 855332, Apr. 2022. DOI: 10.3389/fneur.2022.855332.
- RATHOUR, R. K.; NARAYANAN, R. Degeneracy in hippocampal physiology and plasticity. **Hippocampus**, New York, v. 29, n. 10, p. 980-1022, Oct. 2019. DOI: 10.1002/hipo.23139.
- RHO, J. M.; BOISON, D. The metabolic basis of epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v. 18, n. 6, p. 333-347, Jun. 2022. DOI: 10.1038/s41582-022-00651-8.
- RINEY, K.; BOGACZ, A.; SOMERVILLE, E.; HIRSCH, E.; NABBOUT, R.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M.; ALSAADI, T.; JAIN, S.; FRENCH, J.; SPECCHIO, N.; TRINKA, E.; WIEBE, S.; AUVIN, S.; CABRAL-LIM, L.; NAIDOO, A.; PERUCCA, E.; MOSHÉ, S. L.; WIRRELL, E. C.; TINUPER, P. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. **Epilepsia**, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 1443-1474, Jun. 2022. DOI: 10.1111/epi.17240.
- RODRIGUES, A. A.; MARQUES, S. L. Influence of the instructions on the performance and establishment of memorization strategies in space judgments. **Span. J. Psychol.**, Madrid, v.9, n. 2, p. 312-320, Nov. 2006. DOI: 10.1017/s1138741600006211.
- ROLAND, P.E.; FRIBERG, L. Localization of cortical areas activated by thinking. **J. Neurophysiol**, Bethesda, v. 53, n. 5, p. 1219-1243, May, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.1985.53.5.1219>.
- SANUKI, R.; ONISHI, A.; KOIKE, C.; MURAMATSU, R.; WATANABE, S.; MURANISHI, Y.; IRIE, S.; UNEO, S.; KOYASU, T.; MATSUI, R.; CHÉRASSE, Y.;

- URADE, Y.; WATANABE, D.; KONDO, M.; YAMASHITA, T.; FURUKAWA, T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. **Nat. Neurosci.**, New York, v. 14, p. 1125–1134, Aug. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2897>.
- SÁRKÖZY, M.; KAHÁN, Z.; CSONT, T. A myriad of roles of miR-25 in health and disease. **Oncotarget.**, Albany, v. 9, n. 30, p. 21580-21612, Apr. 2018. DOI: [10.18632/oncotarget.24662](https://doi.org/10.18632/oncotarget.24662).
- SHIH, Y. H.; YEN, A. M.; YEN, D. J.; HUNG, L. P.; CHEN, H. H.; LIOU, H. H. A novel postoperative seizure classification for long-term mortality of patients with intractable epilepsy: comparison with the Engel system. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 69, n. 1, p. 64-71, Jul. 2011. DOI: [10.1227/NEU.0b013e3182134126](https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3182134126).
- SPENCER, D. D.; GERRARD, J. L.; ZAVERI, H. P. The roles of surgery and technology in understanding focal epilepsy and its comorbidities. **Lancet Neurol.**, London, v. 17, n. 4, p. 373-382, Apr. 2018. DOI: [10.1016/S1474-4422\(18\)30031-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30031-0).
- SU, Z.; LI, Y.; CHEN, S.; LIU, X.; ZHAO, K.; PENG, Y.; ZHOU, L. Identification of Ion Channel-Related Genes and miRNA-mRNA Networks in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Front. Genet.**, Lausanne, v. 13, p. 853529, Mar. 2022. DOI: [10.3389/fgene.2022.853529](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.853529).
- SUN, Z.; TONG, Y.; LI, J.; WANG, Y.; GAO, F.; LI, H.; WANG, C.; DU, L.; JIANG, Y. Ultrasensitive photoelectrochemical biosensor based on black/red phosphorus heterojunction@Bi₂Te₃ hybrid and enzymatic signal amplification for the detection of colorectal cancer-related piRNA-823. **Sens. Actuators B: Chem.**, Lausanne, v. 368, p. 132244. Oct. 2022. DOI: [10.1016/j.snb.2022.132244](https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132244).
- TAI, X. Y.; KOEPP, M.; DUNCAN, J. S.; FOX, N.; THOMPSON, P.; BAXENDALE, S.; LIU, J. Y.; REEVES, C.; MICHALAK, Z.; THOM, M. Hyperphosphorylated tau in patients with refractory epilepsy correlates with cognitive decline: a study of temporal lobe resections. **Brain**, London, v. 139, n. 9, p. 2441–2455, Sep. 2016. DOI: [10.1093/brain/aww187](https://doi.org/10.1093/brain/aww187).
- TAN, C. L.; PLOTKIN, J. L.; VENO, M. T.; SCHIMMELMANN, M. V.; FEINBERG, P.; MANN, S.; HANDLER, A.; KJEMS, J.; SURMEIER, D. J.; O'CARROLL, D.; GREENGARD, P.; SCHAEFER, A. MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. **Science**, Washington, v. 342, n. 6163, p. 1254–1258, Dec. 2013. DOI: [10.1126/science.1244193](https://doi.org/10.1126/science.1244193).
- THIJS, R. D.; SURGES, R.; O'BRIEN, T. J.; SANDER, J. W. Epilepsy in adults. **Lancet**, London, v. 393, n. 10172, p. 689-701, Feb. 2019. DOI: [10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0).
- THOM, M. Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 520-543, Aug. 2014. DOI: [10.1111/nan.12150](https://doi.org/10.1111/nan.12150).
- TORAL-RIOS, D.; PICHARDO-ROJAS, P. S.; ALONSO-VANEGAS, M.; CAMPOS-PEÑA, V. GSK3 β and Tau Protein in Alzheimer's Disease and Epilepsy. **Front.**

- Cell. Neurosci.**, Lausanne v. 14, p. 19, Mar. 2020. DOI: 10.3389/fncel.2020.00019.
- VALENTI, L.; WADA, P. I.; BASSO, G. R.; JACKSON, M. C.; GALERA, C. Attentional load effects on emotional content in face working memory. **Q. J. Exp. Psychol. (Hove)**, London, v. 26, p. 17470218221125216, Sep. 2022. DOI: 10.1177/17470218221125216.
- VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v.15, n. 8, p. 459-472, Aug. 2019. DOI:10.1038/s41582-019-0217-x.
- VEZZANI, A.; RAVIZZA, T.; BEDNER, P.; ARONICA, E.; STEINHÄUSER, C.; BOISON, D. Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, London, v. 18, n. 12, p. 707-722, Dec. 2022. DOI: 10.1038/s41582-022-00727-5.
- VIJAYAN, M.; REDDY, P. H. Peripheral biomarkers of stroke: Focus on circulatory microRNAs. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1862, n. 10, p. 1984-1993, Oct. 2016. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.08.003.
- WANG, Y. S.; QIU, TY, FU, Q.; XIONG, S. Q.; WANG, Z. Z.; LU, M. F.; YANG, J. H.; HU, Z. Z. Unravelling biological roles and mechanisms of GABABR on addiction and depression through mood and memory disorders. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 155, p. 113700, Nov. 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113700.
- WANG, Y.; WU, Z.; BAI, Y. T.; WU, G. Y.; CHEN, G. Gad67 haploinsufficiency reduces amyloid pathology and rescues olfactory memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Mol. Neurodegener.**, London, v. 12, n. 1, p. 73, Out. 2017. DOI: 10.1186/s13024-017-0213-9.
- WINTER, J., JUNG, S., KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat. Cell. Biol.**, London, v. 11, p. 228–234, Marc. 2009. DOI: 10.1038/ncb0309-228.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2019). Epilepsy: a public health imperative: summary. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325440>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- XIAO, W.; WU, Y.; WANG, J.; LUO, Z.; LONG, L.; DENG, N.; NING S, ZENG Y.; LONG, H.; XIAO, B. Network and pathway-based analysis of single-nucleotide polymorphism of miRNA in temporal lobe Epilepsy. **Mol. Neurobiol.**, New York, v. 56, p. 7022–7031, Apr. 2019. DOI: 10.1007/s12035-019-1584-4.
- YAN, Y.; XIE, R.; ZHANG, Q.; ZHU, X.; HAN, J.; XIA, R. Bcl-xL/Bak interaction and regulation by miRNA let-7b in the intrinsic apoptotic pathway of stored platelets. **Platelets**, Abingdon, v. 30, n. 1, p. 75-80, 2019. DOI: 10.1080/09537104.2017.1371289.
- YAO, Y.; ZHANG, D.; QI, Y.; QIAN, R.; NIU, C.; FEI, X. Surgical resection of dysembryoplastic neuroepithelioma tumor associated with epilepsy based on

imaging classification. **Neurol. Res.**, New York, v. 44, n. 7, p. 591-597, Jul. 2022. DOI: 10.1080/01616412.2021.2024730.

ZHANG, H.; QU, Y.; WANG, A. Antagonist targeting microRNA-146a protects against lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats by nuclear factor- κ B pathway. **Mol. Med. Rep.**, Atenas, v. 17, n. 4, p. 5356–5361, Jan. 2018 [On line]. DOI: 10.3892/mmr.2018.8465.