



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA MARTIN

PESQUISA POR BIOMARCADORES NO PLASMA NAS EPILEPSIAS

CAMPINAS

2019

MARIANA MARTIN

PESQUISA POR BIOMARCADORES NO PLASMA NAS EPILEPSIAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências

ORIENTADORA: ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

COORIENTADORA: SIMONI HELENA AVANSINI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MARIANA MARTIN E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M363p Martin, Mariana, 1994-
Pesquisa por biomarcadores no plasma nas epilepsias / Mariana Martin. –
Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Iscia Teresinha Lopes Cendes.

Coorientador: Simoni Helena Avansini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. MicroRNAs. 2. Biomarcadores. 3. Epilepsia. I. Lopes-Cendes, Íscia
Teresinha, 1964-. II. Avansini, Simoni Helena, 1980-. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Searching for blood-based biomarkers in the epilepsies

Palavras-chave em inglês:

MicroRNAs

Biomarkers

Epilepsy

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Íscia Teresinha Lopes Cendes

Clarissa Lin Yasuda

Luiz Henrique Martins Castro

Data de defesa: 29-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3160-4515>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9979671845833463>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIANA MARTIN

ORIENTADORA: ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

COORIENTADORA: SIMONI HELENA AVANSINI

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

2. PROFA. DRA. CLARISSA LIN YASUDA

3. PROF. DR. LUIZ HENRIQUE MARTINS CASTRO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 29/07/2019

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À família, especialmente minha mãe, Crênia Isabel Ferreira Martin, e meu pai, Valdir Martin (em memória), que foram pilares fundamentais durante todo o meu desenvolvimento físico, mental e espiritual.

À Dra. Iscia Lopes-Cendes, orientadora do trabalho de mestrado e exemplo profissional.

À Dra. Simoni Helena Avansini, co-orientadora do trabalho de mestrado e exemplo de ética, empatia e comprometimento.

Aos funcionários e pesquisadores do Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UNICAMP – em especial aos que compõem o Laboratório de Genética Molecular e aos médicos e residentes do Ambulatório de Epilepsia no Hospital de Clínicas – HC/ UNICAMP – pelo suporte científico, burocrático e operacional.

Aos pesquisadores Dr. Benilton de Sa Carvalho, Mestre Wélliton de Souza, Dr. Fábio Rossi Torres e Dr. Rodrigo Secolin – FCM/ UNICAMP – pelo suporte técnico, estatístico e de bioinformática.

Aos pacientes do Ambulatório de Epilepsia no Hospital de Clínicas – HC/UNICAMP – pelo consentimento voluntário de doação de material biológico e incentivo à pesquisa.

Ao Andrius Henrique Sperque, pelos nove anos de companheirismo e encorajamento ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processo nº 2016/26172-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – *Grant 2016/26172-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP)*.

Grata,

Mariana Martin

“O conhecimento é o ato de entender a vida”

Aristóteles

RESUMO

Os microRNAs são considerados biomarcadores em potenciais devido a sua estabilidade em fluidos corporais, como em plasma e soro, e sua associação com o diagnóstico e estadiamento de várias doenças. Nas epilepsias, é ainda um desafio identificar biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e na predição ou acompanhamento da resposta ao tratamento medicamentoso. Estima-se que ocorra diagnóstico incorreto em cerca de 25% dos pacientes com epilepsia e a resistência ao tratamento com drogas antiepilépticas pode atingir 30% dos casos. Assim, os objetivos desse estudo foram i) investigar se microRNAs circulantes podem ser usados como biomarcadores no diagnóstico de tipos específicos de epilepsia; ii) avaliar se microRNAs circulantes podem ser usados como biomarcadores de resposta ao tratamento farmacológico nas epilepsias. Nós analisamos os níveis de expressão dos microRNAs no plasma sanguíneo em diferentes tipos de epilepsia, incluindo 14 pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (sete pacientes resistentes e sete responsivos às drogas antiepilépticas), sete pacientes com Displasia Cortical Focal tipo II, sete com Epilepsia Genética Generalizada e sete indivíduos controle usando o sequenciamento de alto desempenho de microRNAs pela plataforma HiSeq2500 – Illumina. Nossos resultados indicaram que um total de 17 microRNAs circulantes estavam diferencialmente expressos (p-valor, $< 0,01$) sendo que 11 foram encontrados hiperexpressos hsa-miR-148-3p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-4508, hsa-miR-636, hsa-miR-141-3p e seis microRNAs estavam hipoeexpressos (hsa-miR-330-3p, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-4435 e hsa-miR-101-5p) em pacientes com epilepsia. Desses, 13 microRNAs mostraram-se relacionados à um tipo-específico de epilepsia, três microRNAs eram comuns aos quatro grupos de epilepsias analisados (hsa-miR-96-5p, hsa-miR-425-3p e hsa-miR-4508) e um microRNA foi diferencialmente expresso

quando comparamos pacientes responsivos e refratários ao tratamento farmacológico – hsa-miR-101-5p. Em conclusão, demonstramos que é possível identificar microRNAs diferencialmente expressos em diferentes tipos de epilepsia. Além disso, identificamos que existem microRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes de acordo com a resposta ao tratamento medicamentoso. Portanto, nossos resultados podem ser úteis no auxílio ao diagnóstico e no manejo de pacientes com diferentes tipos de epilepsia.

Palavras-chave: microRNAs, biomarcador, epilepsia

ABSTRACT

MicroRNAs are potential biomarkers due to their stability in body fluids, such as plasma and serum, and their association with diagnosis and staging of various diseases. In epilepsy, it is still a challenge to identify microRNAs that improve the diagnosis of the disease and the prediction of drug treatment. It is estimated that an incorrect diagnosis occurs in about 25% of patients with epilepsy and resistance to treatment with antiepileptic drugs can reach 30% of the cases. Thus, the objectives of this study were i) to investigate whether circulating microRNAs can be used as biomarkers in the diagnosis of specific types of epilepsy; ii) evaluate whether circulating microRNAs can be used as biomarkers of response to pharmacological treatment in epilepsy. We analyzed the expression levels of microRNAs in blood plasma in different types of epilepsy, including 14 patients with mesial temporal lobe epilepsy, seven patients with focal cortical dysplasia type II, seven with generalized genetics epilepsy and seven controls using high performance sequencing of microRNAs with HiSeq2500 - Illumina Platform. Our results indicated a total of 17 circulating microRNAs were differentially expressed (p-value, <0.01) which 11 microRNAs were found up-regulated (hsa-miR-148-3p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-4508, hsa-miR-636, hsa-miR-141-3p) and six microRNAs were down-regulated in patients with epilepsy (hsa-miR-330-3p, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-4435 e hsa-miR-101-5p). Thirteen microRNAs were related to type-specific of epilepsy, three microRNAs were found common in four different types of epilepsy (hsa-miR-96-5p, hsa-miR-425-3p e hsa-miR-4508) and one microRNA was found differentially expressed when comparing responsive and resistant patients to pharmacological treatment - hsa-miR-101-5p. In conclusion, we demonstrated that it is possible to identify microRNAs differentially expressed in different types of epilepsy. In

addition, we have identified microRNAs differentially expressed in plasma of patients according to the response to drug treatment. Therefore, our results may be helpful in the diagnosis and management of patients with different types of epilepsy.

Key words: microRNAs, biomarker, epilepsy

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Biogênese dos microRNAs e comunicação celular.	25
Figura 2. Desenho experimental da coorte de estudo	32
Figura 3. Workflow de dados de sequenciamento (RNA-seq).....	35
Figura 4. Desenho experimental da análise de expressão de microRNAs diferencialmente expressos.....	36
Figura 5. Desenho Gráfico da análise de expressão diferencial de microRNAs por múltiplas comparações estatísticas entre grupos de pacientes com epilepsia e indivíduos controles	37
Figura 6. Desenho Gráfico (a, b) a partir da análise de expressão diferencial de microRNAs por múltiplas comparações estatísticas entre grupos de pacientes e indivíduos controles	37
Figura 7. BoxPlot dos arquivos FASTQ.....	41
Figura 8 Distribuição total do tamanho dos fragmentos sequenciados	42
Figura 9. Diagrama de Venn da análise de expressão diferencial de microRNAs com p-valor ajustado $\leq 0,1$	43
Figura 10. Desenho gráfico mostrando microRNAs circulantes diferencialmente expressos nas diferentes etiologias de epilepsias estudadas.....	44

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs nos subtipos de ELTM <i>versus</i> controle	45
Tabela 2. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs na DCF <i>versus</i> controle	46
Tabela 3. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs na EGG <i>versus</i> controle	46
Tabela 4. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs nas Epilepsias <i>versus</i> controle	47
Tabela 5. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs em relação à resposta ao tratamento medicamentoso na Epilepsia	48

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-UTR: *3' untranslated region*

5'-UTR: *5' untranslated region*

AGO2: *Protein argonaute-2*

Atg16L1: *Autophagy related 16 like 1*

Atg7: *Autophagy related 7*

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

CBZ: Carbamazepina

CLB: Clobazam

DAE's: Drogas antiepilépticas

DCF: Displasia Cortical Focal

DCS: Dia de Coleta de Sangue

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGG: Epilepsia Genética Generalizada

EH: Esclerose Hipocampal

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM-EH: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial com Esclerose Hipocampal

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

EMJ: Epilepsia Mioclônica Juvenil

ERD: Epilepsia Resistente às Drogas antiepilépticas

GABA: *γ -Aminobutyric acid*

GABAA: *γ -Aminobutyric acid type A*

GABRA1: *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit*

GSH: *glutathione*

H3K27: *Lysine residue 27 of histone H3*

HC: Hospital de Clínicas

HDL: *High Density Lipoproteins*

HES1: *hes family bHLH transcription factor 1*

hESCs: células-tronco embrionárias humanas

ILAE: *International League Against Epilepsy*

KDM6B: *Lysine Demethylase 6B*

lin-4: *lineage-deficient-4*

logFC: *log₂FoldChange*

miRNA/ miR: microRNA

MRI: *Magnetic Resonance Imaging*

mRNA: RNA mensageiro

NEUROG2: *Neurogenin 2*

NICE: *National Institute for Clinical Excellence*

pré-miRNA: microRNA precursor

pri-miRNA: microRNA primário

RISC: *RNA-induced silence complex*

RNase II: *RNA polymerase II*

RNase III: *RNA polymerase III*

SE: *status epilepticus*

Tbx1: *T-box transcription fator*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

VPA: Ácido valpróico

LISTAS DE SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

A₄₁₄: absorbância no comprimento de onda de 414 nanômetros

mL: mililitro

nt: nucleotídeos

pb: pares de bases

rpm: rotação por minuto

μL: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 A epilepsia	19
1.1.1 <i>Displasia Cortical Focal</i>	20
1.1.2 <i>Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (ELTM)</i>	20
1.1.3 <i>Epilepsia Genética Generalizada (EGG)</i>	21
1.2 Desafios no Diagnóstico e Tratamento da Epilepsia	22
1.3 microRNAs	23
1.3.1 <i>microRNA circulantes como biomarcador molecular na epilepsia</i>	26
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Critérios éticos e científicos para o estudo	31
3.2 Desenho Experimental	32
3.3 Coleta de material biológico	33
3.4 Extração de microRNAs	34
3.5 Preparo de biblioteca de cDNA e Sequenciamento de Nova Geração	34
3.6 Análise de Bioinformática	35
3.7 Critérios definidos na análise de expressão diferencial de microRNAs	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Análise estatística da coorte de estudo	38
4.2 Análise dos perfis de microRNAs circulantes na coorte de estudo	40
5. DISCUSSÃO	49
5.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes presentes no plasma sanguíneo de pacientes com ELTM	50

5.2	Perfil de expressão de microRNAs circulantes presentes no plasma sanguíneo de pacientes com DCF tipo II.....	53
5.3	Perfil de microRNAs circulantes na EGG.....	55
5.4	Perfil de microRNAs circulantes na epilepsia.....	56
5.5	Perfil de microRNAs circulantes na resposta ao tratamento medicamentoso da epilepsia.....	58
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	REFERÊNCIAS.....	61
8.	ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 A epilepsia

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico grave (1) que afeta aproximadamente 50 milhões de indivíduos em todo o mundo. E a cada ano, estima-se que de 2 à 4 milhões de pessoas são diagnosticadas com a doença (2).

Para a Liga Internacional Contra Epilepsia (*The International League Against Epilepsy* - ILAE), a epilepsia é definida como um distúrbio neurológico caracterizada pela predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição de ao menos uma crise epilética (3).

Contudo, a epilepsia é uma doença com diversos subtipos, e portanto, heterogênea, já que diversos fatores genéticos e fisiopatológicos, de forma isolada ou combinada, podem contribuir para o aumento do risco de se desenvolver as crises epiléticas (4), sendo essa característica um dos maiores impedimentos ao aprimoramento do diagnóstico e do tratamento.

Apesar do tratamento medicamentoso adequado, um terço dos pacientes permanecem com crises epiléticas recorrentes (5). Esta condição é chamada de epilepsia resistente às drogas antiepiléticas (ERD), caracterizada pela incapacidade de se tornar livre de crises epiléticas após ser testado o uso de duas drogas antiepiléticas (DAEs) em doses adequadas (6) e as principais ERD são a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) (7) e a Displasia Cortical Focal (DCF) (8,9).

1.1.1 Displasia Cortical Focal

A Displasia Cortical Focal (DCF) é um tipo de malformação do desenvolvimento cortical caracterizada pela desorganização da laminação do córtex cerebral (10). Representa a causa mais prevalente de epilepsia resistente às drogas antiepilépticas em crianças (9) e pode ser considerada a segunda ou terceira causa mais comum em adultos (8). Além disso, o tratamento cirúrgico pode ser considerado a única opção de tratamento desses pacientes, embora a localização precisa da zona epileptogênica também seja um desafio, uma vez que um terço dos pacientes apresentem MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*) normal (11).

Segundo Blümcke e colaboradores (10), a DCF tipo II é definida como uma malformação com deslaminação cortical e anormalidades citológicas específicas, sendo essa última característica o que diferencia a DCF tipo IIa - presença de neurônios dismórficos sem células em balão - da DCF tipo IIb - presença de neurônios dismórficos e células em balão. O presente trabalho se restringiu ao estudo da DCF do tipo II, correspondente à 29-39% de todos os pacientes com DCF (12).

1.1.2 Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (ELTM)

A Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (ELTM) abrange um conjunto de diferentes patologias e diversas etiologias, sendo a Esclerose Hipocampal (EH) o substrato patológico mais comum da ELTM (ELTM-EH). Segundo a ILAE, é definida como uma epilepsia focal com características semiológicas e eletroencefalográficas de crises epilépticas que se iniciam nas regiões temporais mesiais (13).

Representa a epilepsia focal mais prevalente em adultos (7). No geral, pacientes com ELTM-EH são prevalentes em centros clínicos, e apesar do manejo adequado do tratamento medicamentoso, que pode variar, em geral, de uma a três drogas antiepilépticas (14), pacientes com ELTM-EH possuem altos índices de resistência às drogas e são comumente indicados para o tratamento cirúrgico, através da Lobectomia Temporal e da Hipocampectomia (15).

Apesar do tratamento cirúrgico para esta etiologia estar bem estabelecido, com taxa de 60-70% (16) de remissão das crises epiléticas, 15-38% dos pacientes possuem RMI negativa para EH o que inviabiliza o tratamento cirúrgico para esses casos. Com isso, existe a necessidade urgente de outros marcadores para ELTM, além da presença de EH.

1.1.3 Epilepsia Genética Generalizada (EGG)

A Epilepsia Genética Generalizada (EGG) também chamada de Epilepsia Genética Idiopática é considerada uma epilepsia de contribuição predominantemente genética com herança complexa (17).

A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) é uma das síndromes mais frequentes da EEG e representa 5% de todos os diagnósticos de epilepsia (18), sendo o tipo mais comum que acomete adolescentes (17).

É reconhecido que a EMJ é uma síndrome muito bem controlada através do tratamento medicamentoso, sendo que as DAEs mais usadas são ácido valpróico, lamotrigina, levetiracetam, topiramato e zonisamida (19). Contudo, segundo Atakli e colaboradores (20), o tempo necessário para a definição do diagnóstico clínico da EMJ é de cerca de três anos, e apesar do aprimoramento de critérios para classificação da epilepsia e, mesmo quando as

alterações típicas do eletroencefalograma estão presentes, os diagnósticos errôneos ainda ocorrem em mais de 20% dos pacientes.

1.2 Desafios no Diagnóstico e Tratamento da Epilepsia

O diagnóstico correto de epilepsia é um desafio. Estima-se que o diagnóstico incorreto pode ocorrer em 25% dos casos em adultos (21) e 39% dos casos pediátricos (22).

Um estudo realizado pelo *National Institute for Clinical Excellence* (NICE) na Inglaterra, estimou que os custos diretos do diagnóstico incorreto são em média de £100 000 000, 00 por ano (23).

Mais do que prejuízo monetário, o diagnóstico incorreto contempla uma série de consequências para o paciente, que incluem exposição a drogas antiepilépticas inadequadas e ineficazes, efeitos colaterais e as consequências sociais como estigma, limitação do estilo de vida, aumento de taxas de desemprego, e aumento de mortalidade (24).

Além da dificuldade do diagnóstico correto, há outro aspecto que afeta substancialmente os pacientes com epilepsia: a resposta ao tratamento (25,26).

Como mencionado anteriormente, um terço de todos os pacientes apresentam crises epiléticas recorrentes, que não são bem controladas apesar do tratamento medicamentoso adequado (5). Para esses pacientes, o tratamento mais adequado é o cirúrgico (27).

A Academia Americana de Neurologia (*American Academy of Neurology*) recomenda que a cirurgia de epilepsia seja indicada precocemente para pacientes com resistência às DAEs, a fim de evitar os impactos sociais e psicológicos (27).

No entanto, a indicação cirúrgica é um processo longo, decorrente de uma longa investigação, seja ela devido à dificuldade de se localizar a região epileptogênica, ou pela presença de MRI normal ou, até mesmo por esta região pertencer às áreas funcionais do

córtex cerebral. Um estudo realizado em 2006 mostrou que o atraso médio desde o início das crises até indicação cirúrgica pode ultrapassar 20 anos (28).

Assim, torna-se urgente a busca por ferramentas que aprimorem a compreensão dos diferentes tipos de epilepsia e resposta às intervenções terapêuticas, contribuindo para um diagnóstico clínico preciso e para o desenvolvimento de tratamentos mais adequados e individualizados a cada paciente (4).

Nesse sentido, o desenvolvimento de biomarcadores moleculares e não-invasivos para a epilepsia teria o benefício de complementar informações à prática clínica, e assim, aprimorar o diagnóstico clínico, a predição quanto à resposta às drogas antiepiléticas e o prognóstico quanto à resposta ao tratamento cirúrgico, evolução ou resolução da doença (4,29).

1.3 microRNAs

Em 1993, o estudo de Victor Ambros e colaboradores com o modelo de nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) demonstrou que um pequeno RNA não codificante era responsável pela regulação negativa da expressão gênica da proteína LIN-14 e, desse modo, exercia função de regulação do desenvolvimento larval de *C. elegans*.

Este microRNA, composto por 22 nucleotídeos, recebeu previamente a denominação de lin-4 (do inglês, *lineage-deficient-4*) em referência a seu gene codificador (30). Contudo, a relevância dessa descoberta apenas foi reconhecida em 2000, quando se constatou que o microRNA let-7, também presente em *C. elegans*, era altamente conservado entre as espécies (31).

A partir desses trabalhos, os microRNAs foram então definidos como pequenas moléculas de RNA endógenos de fita simples não codificante de proteínas, medindo cerca de

20 pares de bases, responsáveis pela regulação gênica pós transcricional (32,33). Estima-se que, em seres humanos, aproximadamente dois terços dos genes codificadores sejam modulados por microRNAs (34).

A biogênese (Figura 1) dessas moléculas inicia no núcleo celular: primeiramente um gene é transcrito em uma molécula denominada microRNA primário (pri-microRNA) pela enzima RNA polimerase II; esse transcrito com estrutura em forma de grampo, é clivado, ainda no núcleo celular, pela RNase III – Drosha – e seu cofator – DGCR8, formando o precursor do microRNA maduro (pré-microRNA) com cerca de 70 nucleotídeos. A Exportina-5 transfere o pré-microRNA do núcleo para o citoplasma celular, onde é feito o processamento dessa molécula pela RNase III, Dicer, em um microRNA maduro de fita dupla com aproximadamente 20 pares de bases, o qual é clivado na extremidade 5' pelo conjunto enzimático RISC (do inglês, *RNA-induced silence complex*), resultando no microRNA propriamente dito (32,33).

Os microRNAs maduros desempenham um papel na regulação da expressão gênica pós-transcricional (28). Essas moléculas incorporadas ao complexo RISC interagem, em geral, com a região 3'UTR do RNA mensageiro alvo (mRNA), ora suprimindo a expressão gênica através da repressão da tradução ou levando a degradação do mRNA alvo (32). Como demonstrado em outros estudos, a expressão gênica também pode ser regulada através da interação de microRNAs com outras regiões, como a região 5'-UTR do mRNA alvo, na sequência de codificação e em promotores de genes. E ainda, sob certas condições, os microRNAs podem ativar a expressão gênica (33,35). Dessa forma, estima-se que cerca de 60% de todas as proteínas humanas são diretamente reguladas por microRNAs (36,37).

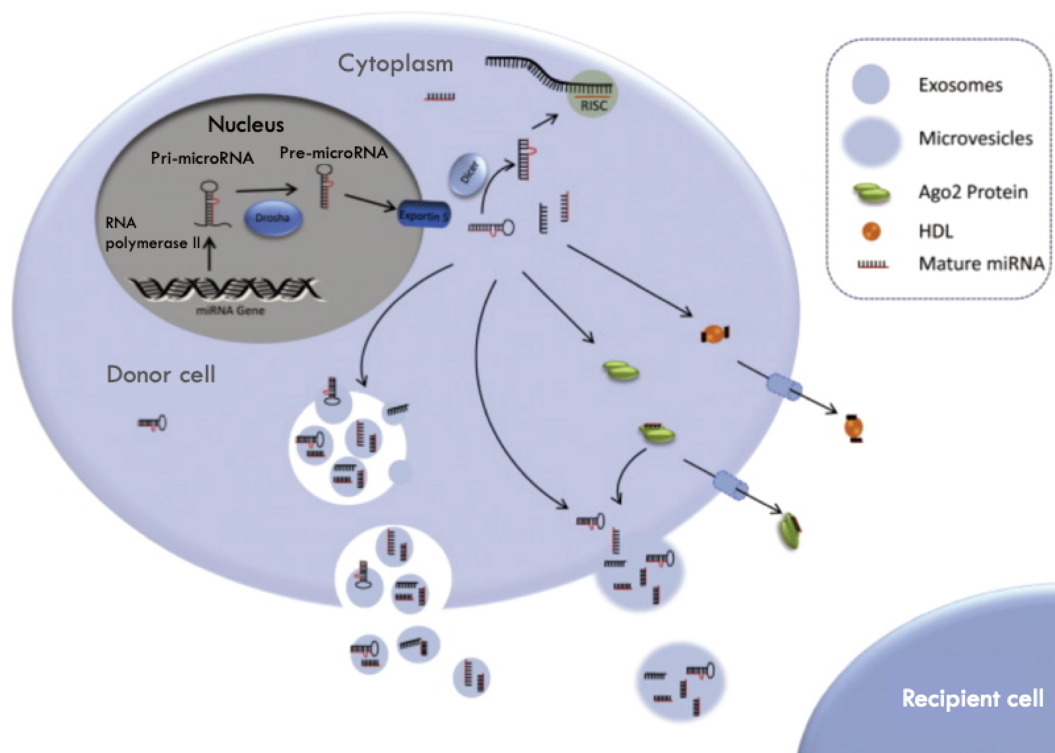


Figura 1. Biogênese dos microRNAs e comunicação celular. No núcleo celular, os Pri-microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e em seguida processados pela proteína Drosha. Após esse processamento essas moléculas são chamadas de Pre-microRNA. A molécula Exportina-5 transfere o Pre-microRNA do núcleo para o citoplasma celular, onde é feito o processamento do Pre-microRNA para o microRNA maduro pela proteína Dicer. Os microRNAs maduros podem ser incorporados às microvesículas, exossomos, à proteína Ago2 ou complexado com lipídios HDL. Após o encapsulamento/ complexação, o microRNA maduro é liberado para o meio extracelular e participa da comunicação celular. (Sohel et al., 2016)

Os microRNAs possuem um relevante papel de regulação e modulação orquestrada do desenvolvimento do córtex cerebral, incluindo as etapas de proliferação, diferenciação, migração e organização celular (38,39). E demonstram ter o padrão tempo e tecido específicos (40). Assim, da 5^a a 12^a semana de gestação em seres humanos, sabe-se que os microRNAs hsa-let-7b, hsa-miR-9, hsa-miR-124, hsa-miR-137 e hsa-miR-184 participam

da proliferação celular enquanto o hsa-miR-34a, hsa-miR-153, hsa-miR-181a e hsa-miR-324 atuam na diferenciação das células progenitoras em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Da 6^a à 24^a semana foi observado que os o hsa-miR-9, hsa-miR-134 e hsa-miR-137 atuam durante a migração neuronal. E durante a 16^a à 40^a semana de gestação – fase de organização neuronal – participam o hsa-miR-125b e hsa-miR-137 (39). Desta mesma forma, inúmeros estudos têm associado a expressão desregulada de microRNAs em tecidos aos estados de doença e fenótipo (48,49) e em destaque em câncer (35,41).

Além dos padrões de expressão em tecido, em 2007, surgiram os primeiros indicativos que os microRNAs poderiam estar presentes no meio extracelular de forma estável. O trabalho de Valadi *et al.* (42), observou que células da linhagem dos mastócitos secretavam exossomos que continham mRNAs e microRNAs. Mais, Lawrie e colaboradores (41) detectaram níveis aumentados de microRNAs no soro de pacientes com linfoma, especialmente o hsa-miR-21, hsa-miR-155 e hsa-miR-210 e observaram que os níveis de expressão do hsa-miR-21 estava relacionado ao tempo de sobrevivência dos pacientes.

E desde então, o grande potencial dos microRNAs como biomarcadores sanguíneos tem surgido, com a expectativa de discriminação de assinaturas moleculares com ampla aplicabilidade clínica, como diagnóstico e prognóstico de doenças (4,43).

1.3.1 microRNA circulantes como biomarcador molecular na epilepsia

MicroRNAs circulantes são moléculas delicadamente reguladas espaço-temporalmente, através do transporte de informações da célula doadora à célula receptora através dos fluidos corporais. Evidências sugerem que moléculas circulantes, como os microRNAs circulantes, podem ser usados como potenciais biomarcadores para doenças neurológicas (33,34).

No Sistema Nervoso Central (SNC), um conjunto de microRNAs extracelulares pode ter origem a partir da liberação controlada dessas moléculas por secreção celular, através de dano celular ou rompimento da barreira hematoencefálica, permitindo a passagem de pequenas quantidades de microRNAs expressos no cérebro para biofluidos, como a corrente sanguínea (29).

Esses microRNAs, são complexados com proteínas (Ago2), lipídios (HDL) ou encapsulados em vesículas extracelulares, como as microvesículas e exossomos (Figura 1). Ao serem secretados da célula doadora, circulam por algum tempo nos biofluidos corporais, tais como plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, urina e esperma (44,45), onde podem ser detectados por meio de técnicas não invasivas, como a coleta de sangue (32).

Os microRNAs circulantes têm sido demonstrado serem biomarcadores adequados para vários distúrbios e doenças, incluindo a doença de Parkinson (46) Esclerose Múltipla (47) e Doença de Alzheimer (48).

Além disso, diferenças foram observadas na expressão de microRNAs em fluidos corporais – plasma, soro e fluido cefalorraquidiano – em estudos sobre epilepsia, com padrões de expressão distintos em relação às variáveis como: tipo de epilepsia (49), *status epilepticus* (44) ou tratamento medicamento em uso (50), sugerindo uma oportunidade para biomarcadores de diagnósticos, prognóstico e predição quanto à resposta ao tratamento farmacológico (29).

Recentemente, Wang e colaboradores (51) publicaram o primeiro trabalho com um grupo clinicamente heterogêneo de pacientes com epilepsia em relação ao grupo controle. Foi demonstrado que diversos microRNAs apresentavam níveis de expressão anormais no soro, incluindo o hsa-miR-106b-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-194-5p. Seu pioneirismo foi relevante para a comunidade científica, contudo, a

especificidade dos achados merecem considerações: sua casuística heterogênea não foi capaz de criar um perfil de expressão de microRNAs único para etiologias específicas; além disso, o perfil genérico de expressão desses achados, embora estatisticamente significativo, não foram comprovados serem biologicamente específicos para a epilepsia, já que as doenças neurológicas possuem vias de expressão comum (4).

Um segundo estudo de Wang *et al.* identificou diferenças nos níveis de expressão de microRNAs circulantes no soro comparando um grupo de pacientes resistente às drogas antiepilépticas e pacientes responsivos às DAEs com epilepsia de etiologias diversas, encontrando níveis de expressão anormais de hsa-miR-301a como um bom candidato para discriminar esses dois grupos.

Seu desenho experimental, apesar de mais restrito do que o anterior, ainda abrange grupos heterogêneos de epilepsia, e considera que a expressão de microRNAs em relação às DAEs não homogêneas são similares entre as diversas etiologias e que as diferentes vias de metabolismo de drogas não influenciaria na expressão dos microRNAs, o que foi contestado em trabalhos futuros (4).

Inclusive, foi demonstrado em um dos estudos do autor (50), através da observação dos níveis de expressão do hsa-miR-134 no soro de pacientes com epilepsia antes e após a administração da DAE ácido valproico, que os microRNAs circulantes podem ter suas expressões alteradas em relação à droga antiepiléptica administrada nos pacientes, justificando o cuidado quanto a homogeneização dos grupos de estudo e possíveis divergências entre estudos de epilepsias com DAEs heterogêneas.

Além desses achados, em 2017, um estudo envolvendo a expressão de microRNAs em exossomos a partir de plasma sanguíneo em pacientes com ELTM *versus* indivíduos controles demonstrou que diferentes microRNAs mostravam expressões anormais,

destacando-se o hsa-miR-8071 e hsa-miR-197-5p (52). No mesmo ano, nosso grupo (49) demonstrou que o hsa-miR-134 apresentava padrão de expressão anormal quando comparava-se microRNAs circulantes no plasma de pacientes com ELTM e indivíduos controles, independente da presença de EH e da resposta ao tratamento.

Contudo, também foi observado que a comparação de estudos com materiais biológicos distintos, como plasma e soro ou seleção de microvesículas específicas (ex.: exossomos) deve ser feita de forma cuidadosa, já que os processamentos para obtenção desses materiais podem afetar na seleção de um espectro de microRNAs circulantes distintos (53).

Considerando, ainda, o desafio em se estudar epilepsia como doença heterogênea, trabalhos recentes mostraram que o uso combinacional de múltiplos microRNAs podem oferecer maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico (4,54), tornando possível a realização de um perfil abrangente de microRNAs circulantes na epilepsia.

Até o momento, cerca de 30 trabalhos foram publicados sobre biomarcadores para epilepsia em humanos (4), dos quais aproximadamente dez abordam a análise de expressão de microRNAs. Contudo, a maioria restringiu-se à busca por biomarcadores de diagnóstico, sendo poucos os trabalhos que exploraram biomarcadores preditivos quanto ao tratamento.

Mais, Pitkanen e colaboradores (4) em sua revisão bibliográfica argumentam que a construção de estudos de biomarcadores relevantes e reprodutíveis para epilepsia só é possível a partir da inclusão e comparação criteriosa de etiologias específicas e homogêneas, além da comparação entre dados de epilepsia e outras doenças neurológicas, os quais não foram feitos até o presente trabalho.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- 1) investigar se microRNAs circulantes podem ser usados como biomarcadores no diagnóstico de tipos específicos de epilepsia;
- 2) avaliar se microRNAs circulantes podem ser usados como biomarcadores de resposta ao tratamento farmacológico de pacientes com epilepsia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Critérios éticos e científicos para o estudo

Foi estudada uma coorte de pacientes acompanhados prospectivamente no ambulatório de Epilepsia de Difícil Controle no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Antes de serem submetidos aos procedimentos de estudo, todos os pacientes e controles assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Campinas.

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por neurologista com experiência no tratamento de pacientes com epilepsia. Todos os pacientes foram submetidos à exame neurológico, eletroencefalogramas interictais seriados e ressonância magnética de alta resolução usando um protocolo específico para epilepsia. A atrofia hipocampal, em pacientes com ELTM, foi avaliada por análise visual e as imagens foram classificadas como tendo achados normais ou sinais de Esclerose Hipocampal (EH).

Além disso, antes da coleta de material biológico, todos os pacientes foram entrevistados por meio de um questionário estruturado para coleta de informações como idade atual do paciente, idade de início da epilepsia, presença de crise febril, histórico familiar de epilepsia e identificação e/ou número de DAE's utilizadas.

3.2 Desenho Experimental

O desenho experimental deste trabalho consistiu no *screening* de microRNAs para serem usados como biomarcadores no diagnóstico de etiologias de epilepsia a partir da análise dos níveis de expressão de microRNAs sequenciados, seguido de múltiplas comparações entre grupos de pacientes com epilepsia de diferentes etiologias e indivíduos controles.

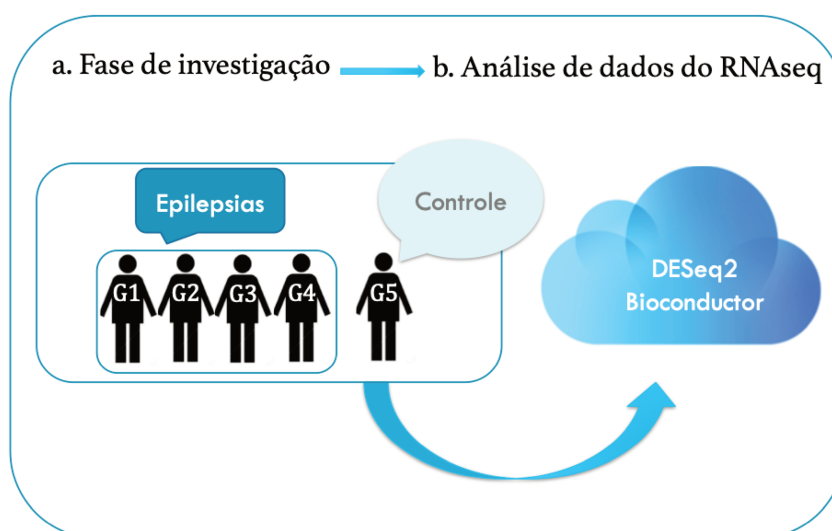


Figura 2. Desenho experimental da coorte de estudo. a) fase de investigação: múltiplas comparações entre grupos de pacientes e controles; b) análise de expressão diferencial de microRNAs sequenciados através do pacote *DESeq2*; G1: Epilepsia de Lobo Temporal Mesial responsiva à farmacoterapia; G2: Epilepsia de Lobo Temporal Mesial resistente à farmacoterapia; G3: Displasia Cortical Focal; G4: Epilepsia Genética Generalizada; G5: Indivíduos saudáveis

Para isso, foram recrutados 28 pacientes, sendo 14 pacientes com ELTM classificados de acordo com critérios clínicos, eletroencefalográficos e de ressonância magnética [59] e divididos de acordo com a resposta ao tratamento medicamentoso sob uso de Clobazam (CLB) e Carbamazepina (CBZ); sete pacientes classificados como responsivos às

DAE's (Figura 2, G1), definidos como pacientes livres de crises epiléticas por pelo menos 24 meses, e sete foram classificados como resistentes aos medicamentos (Figura 2, G2), definidos como pacientes com qualquer frequência de convulsões nos últimos 24 meses, após o teste de pelo menos duas DAEs diferentes em doses ideais. Ainda, foram selecionados sete pacientes com DCF tipo II, confirmado por anátomo-patológico e resistentes ao uso de politerapia para DAE's (Figura 2, G3), e sete pacientes com EGG sob o uso exclusivo da droga ácido valpróico (Figura 2, G4) e sete controles saudáveis, sem epilepsia (Figura 2, G5).

Os critérios de exclusão para pacientes consistiram de presença de dupla patologia, epilepsia com causa conhecida ou presença de comorbidades neurológicas; e para indivíduos controles aqueles com menos de 18 anos, com doença neurológica/ psiquiátrica ou com histórico familiar de doença neurológica/ psiquiátrica.

3.3 Coleta de material biológico

Para a utilização do plasma sanguíneo, foi coletado sangue periférico (6 ml) em tubos de EDTA mantidos em gelo por até três horas. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml do plasma foram transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 12 000 rpm por 10 minutos à 4°C para sedimentar os debris celulares remanescentes. Subsequentemente, o sobrenadante foi transferido para tubos novos e armazenado à -80°C.

A concentração de hemoglobina livre no plasma foi mensurada pelo método espectrofotométrico (BioTek Instruments, E.U.A.) e as amostras com leitura $A_{414} > 0,2$ foram excluídas.

3.4 Extração de microRNAs

A extração de microRNA circulante no plasma foi feita com o uso do kit de isolamento de microRNA *MirVana PARIS* (Ambion, Austin, E.U.A) a partir de 625 μL de plasma sanguíneo, segundo o protocolo do fabricante com algumas otimizações descritas a seguir.

Na etapa de desnaturação, foi acrescentado 3,5 μL do microRNA exógeno, *spike-in control* (Ce_miR-39_1, Qiagen, E.U.A) como normalizador para etapa de extração, bem como 4 μL de acrilamida linear como carreador de microRNAs circulantes.

Ainda, após a primeira centrifugação e coleta de 600 μL do material filtrado, o material remanescente foi misturado com 600 μL de água livre de RNase e filtrado novamente, sendo coletado desse segundo processo 600 μL . No final do processamento, foi recuperado um total de 1200 μL de material filtrado.

Ao final da extração de microRNAs circulantes, o material foi eluído em 35 μL de água livre de RNase. E mensurações de concentração foram feitas usando o kit Qubit microRNAs assay (Thermo Fisher, Brasil).

3.5 Preparo de biblioteca de cDNA e Sequenciamento de Nova Geração

A biblioteca de cDNA a partir dos microRNAs extraídos foi feita com o uso do kit *Illumina Tru-Seq small RNA-Sequencing libraries* (Illumina, San Diego, CA) e as amostras foram indexadas utilizando o kit de preparação *TruSeq Small RNA Library Prep Kit -Set A, B, C e D* (Illumina, San Diego, CA).

As bibliotecas amplificadas e indexadas foram normalizadas por volume (25 μL) e unidas, formando um *pool* de 875 μL , o qual foi fraccionado por tamanho, com intervalo de

160-145 pb, utilizando géis de poliacrilamida 6%, a fim de descartar o excesso de adaptadores e purificar a biblioteca de possíveis contaminantes.

O tamanho e a concentração das bibliotecas purificadas foram confirmados com o kit *Agilent High Sensitivity DNA* (Agilent, E.U.A). E, por fim, a normalização da biblioteca à 2 nM para sequenciamento multiplex no sequenciador *HiSeq 2500* (Illumina, Brasil) foi feita através de qPCR com o kit *KAPA Library Quantification* (Kapa Biosystems, E.U.A).

3.6 Análise de Bioinformática

A qualidade dos dados do sequenciamento foi avaliada com o *FastQC* (Babraham Institute, versão 0.11.7). A filtragem dos dados foi feita com o pacote do *software Reaper*, removendo fragmentos menores que 15 nucleotídeos (nds). Após a filtragem, os fragmentos foram convertidos em RNA (conversão de arquivo FASTQ para FASTA) e alinhados contra o banco de dados de microRNAs maduros e *harpins* (hsa, mirBase, versão 22.1) através do programa *Bowtie* (versão 1.2.2, Johns Hopkins University). A contagem dos fragmentos alinhados a cada microRNA maduro conhecido foi feita com o programa *mirDeep2 quantifier.pl* (versão 3, https://drmirdeep.github.io/mirdeep2_tutorial.html). E, por fim, a análise da expressão diferencial dos microRNAs entre os grupos do estudo utilizou o pacote *DESeq2* (Bioconductor, versão 1.22.1) – Figura 3.

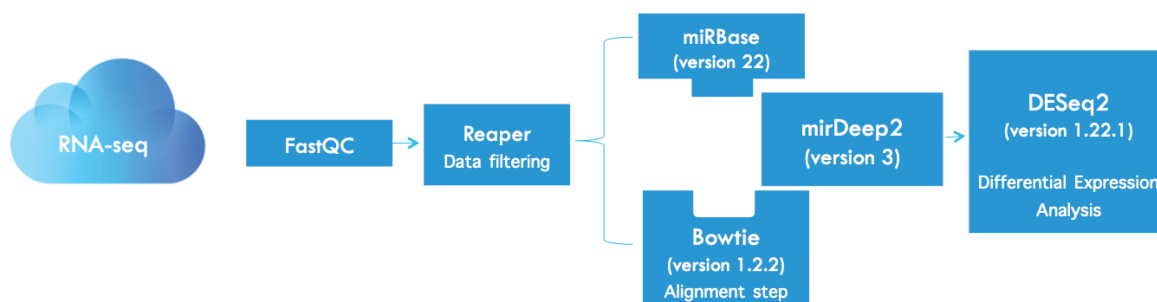


Figura 3. Workflow de dados de sequenciamento (RNA-seq)

3.7 Critérios definidos na análise de expressão diferencial de microRNAs

Para a análise de expressão diferencial de microRNAs foram feitas múltiplas comparações estatísticas utilizando grupo de paciente *versus* grupo controle (Figura 4 , lista 1) e grupo de paciente *versus* grupo de paciente (Figura 4, lista 2).

Desenho da análise estatística por múltiplas comparações	
1. Paciente <i>versus</i> controle	2. Paciente <i>versus</i> paciente
ELTM resistente (a) <i>versus</i> controle	ELTM resistente (a) <i>versus</i> DCF (c)
ELTM responsivo (b) <i>versus</i> controle	ELTM responsivo (b) <i>versus</i> EGG (d)
ELTM (a+b) <i>versus</i> controle	ELTM (a+b) <i>versus</i> EGG (d)
DCF (c) <i>versus</i> controle	ELTM (a+b) <i>versus</i> DCF (c)
EGG (d) <i>versus</i> controle	DCF (c) <i>versus</i> EGG (d)
Epilepsia (a+b+c+d) <i>versus</i> controle	Epilepsia resistente (a+c) <i>versus</i> Epilepsia responsiva (b+d)
	ELTM resistente (a) <i>versus</i> ELTM responsivo (b)

Figura 4. Desenho experimental da análise de expressão de microRNAs diferencialmente expressos. 1) Grupo de paciente *versus* grupo de controle e 2) grupo de paciente *versus* grupo de paciente

Ao final, os resultados foram organizados nos gráficos a seguir para seleção de microRNAs exclusivos em cada um dos grupos de estudo (Figura 5, 6).

Para a seleção de microRNAs candidatos foram considerados os seguintes parâmetros matemáticos: (I) p-valor ajustado (p_{adj}) $\leq 0,01$; (II) p-valor $\leq 0,01$ e $-1,5 \leq \log_2\text{FoldChage} \leq 1,5$. Ainda, as funções biológicas já descritas de cada microRNAs foram verificadas utilizando o banco de dados de interações entre microRNAs e alvos curados, *miRTarBase* (atualização de 2018).

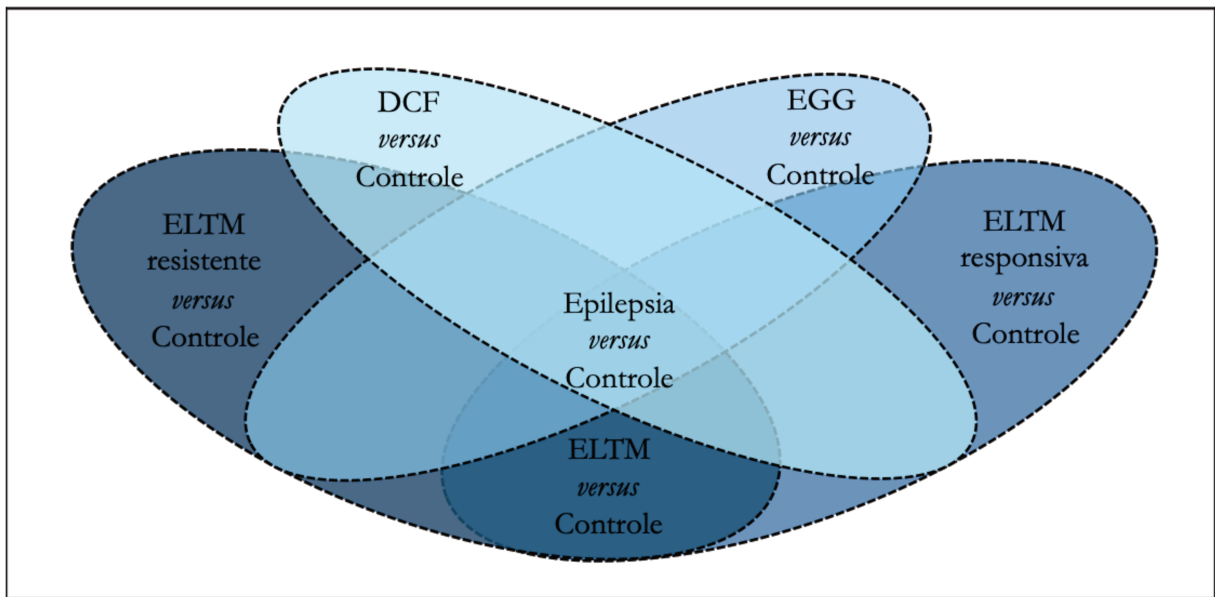


Figura 5. Desenho Gráfico da análise de expressão diferencial de microRNAs por múltiplas comparações estatísticas entre grupos de pacientes com epilepsia e indivíduos controles

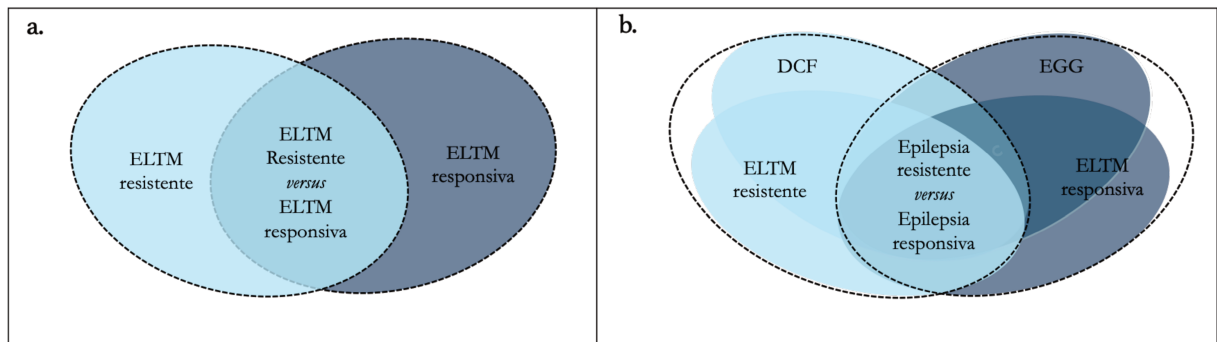


Figura 6. Desenho Gráfico (a, b) a partir da análise de expressão diferencial de microRNAs por múltiplas comparações estatísticas entre grupos de pacientes e indivíduos controles; a) Análise de pacientes com ELTM resistente *versus* ELTM responsivo; b) Análise de epilepsias resistentes (grupos em azul claro) *versus* epilepsias responsivas (grupos em azul escuro)

4. RESULTADOS

4.1 Análise estatística da coorte de estudo

Os dados desta coorte foram compilados no Quadro 1.

Quadro 1. Achados clínicos e neuropatológicos na coorte da fase de validação

Coorte de estudo							
Variável		ELTM (n=14)		EGG (n=7)	DCF (n=7)	Controle (n=7)	p-valor
		Resistente (n=7)	Responsivo (n=7)				
Gênero	Masculino	4	1	5	1	3	0,1417 ^a
	Feminino	3	6	2	6	4	
Mediana da Idade (anos)		55 (52-62)	57 (47-67)	26 (17-60)	18 (5-38)	51 (30-63)	5,13E-04 ^b
Idade mediana do início das crises (anos)		10 (1-23)	10 (3-22)	15 (6-18)	3 (1-11)	-	0,0786 ^b
Mediana da Frequência de crises (mensais)		3 (2-45)	0	0 (0-90)	75 (30-150)	0	1,66 E-05 ^b
DAEs em uso		CBZ, CLB	CBZ, CLB	VPA	>2 DAEs	Sem DAEs	-
Tipo de crise (ILAE,2017)	Sente o início	Sim	5	3	-	-	1 ^c
		Não	1	1	-	-	
	Perda da consciência	Sim	4	2	-	-	1 ^c
		Não	2	2	-	-	
	Generalizada	Sim	4	3	-	-	1 ^c
		Não	2	1	-	-	
Crise Febril		Sim	0	1	-	-	1 ^c
		Não	4	3	-	-	
Esclerose hipocampal	Sim	Direita	2	1	0	0	2,00E-06 ^a
		Esquerda	3	6	0	0	
		Bilateral	2	0	0	0	
	Não		0	0	7	7	
Histórico familiar		Sim	4	4	1	1	0.06461 ^a
		Não	3	3	6	6	
Cirurgia neurológica realizada		Sim	0	0	1	0	1 ^a
		Não	7	7	6	7	
Crise durante o DCS		Sim	0	0	0	-	1 ^a
		Não	7	7	7	-	
Crise 24h antes o DCS		Sim	2	0	1	-	0,7428 ^a
		Não	5	7	6	-	

ELTM: Epilepsia de Lobo Temporal Mesial; EGG: Epilepsia Genética Generalizada; DCF: Displasia Cortical Focal; CBZ: Carbamazepina; CLB: Clobazam; VPA: Ácido Valpróico; DAEs: Drogas Antiepilépticas; DCS: Dia de Coleta de Sangue; a: Teste χ^2 de Person com p-valor simulado (baseado em 1 000 000 replicatas); b: Teste de Kruskal Wallis; c: Teste de Fisher

A coorte de estudo contempla quatro grupos de pacientes: ELTM resistente e responsivos às DAEs, DCF tipo II, EGG, e indivíduos controle.

Observamos que em pacientes com ELTM a maioria fez uso da combinação de duas drogas antiepilépticas Clobazam e Carbamazepina, com isso, para homogeneização desse tipo de epilepsia, definimos como critério de inclusão adicional nessa fase de triagem apenas pacientes que faziam uso dessas duas drogas antiepilépticas. E entre os grupos de pacientes com EGG, foram recrutados para estudo sete indivíduos que estavam em uso exclusivo da droga ácido valpróico.

Para o grupo de DCF, foram recrutados sete pacientes que tivessem o diagnóstico anatomo-patológico confirmado para DCF do tipo II. Para essa etiologia, não foi possível obter um grupo homogêneo com relação às DAE's usadas devido à alta refratariedade dessa condição, e, portanto, a necessidade frequente de uso de politerapia.

De modo geral, foram priorizados pacientes que não tiveram crises epilépticas até 24 horas antes da coleta de material biológico com o objetivo de não influenciar nos níveis de microRNAs circulantes relacionados à crise espontânea recente.

Dentre as variáveis analisadas no conjunto de dados (Tabela 1), mostraram diferenças significativas (p-valor <0,05) a média de idade e frequência de crises entre os grupos estudados, evidenciadas em **negrito**.

Por meio do teste de Dunn com correção de Bonferroni foi observada diferença significativa entre a idade de pacientes com DCF tipo II e pacientes com ELTM refratário (p-

valor = 0,005), responsivo (p-valor = 0,0024) e controles (p-valor = 0,04). Ainda, o mesmo teste foi usado para comparar média de frequência de crises, indicando diferença entre a frequência de crises de pacientes ELTM resistente *versus* responsivo (p-valor = 0,02), ELTM resistente *vs.* controles (p-valor = 0,03), ELTM responsivo *vs.* DCF (p-valor = 0,0002), EGG *vs.* DCF (p-valor = 0,01) e DCF *vs.* controles (p-valor = 0,0002). Essas diferenças são esperadas, já que as crises na DCF têm início mais precocemente, e são mais graves. Sabe-se que pacientes com EGG em geral tem epilepsia mais benigna em relação aos outros grupos.

Assim, com base na frequência de crises epiléticas definiu-se como grupos de epilepsia resistentes ao tratamento medicamentoso o grupo de ELTM resistente às DAEs e o grupo de DCF, enquanto os grupos ELTM responsivo às DAEs e EGG foram definidos como grupos de epilepsias responsivas ao tratamento com drogas antiepiléticas.

4.2 Análise dos perfis de microRNAs circulantes na coorte de estudo

A análise qualitativa dos dados do sequenciamento é apresentada a seguir. Os fragmentos de microRNAs sequenciados (*reads*) atingiram uma média de dois milhões de *reads*, evidenciando com isso boa qualidade no sequenciamento de cada amostra, variando entre os *scores* de pontuação máxima 30-40 (Figura 7).

Considerando o tamanho médio dos microRNAs de 20 pares de bases, esperava-se que a distribuição dos comprimentos dos fragmentos sequenciados se concentrasse nesse pico. Contudo, conforme a Figura 8, observou-se dois picos, o primeiro, com média em 15 pares de bases e o segundo com 22 pares de bases. Removendo-se fragmentos menores que 15 nucleotídeos, considerados adaptadores ou outras classes de pequenos RNAs, a quantidade final de dados gerados foi de 20% de todas as *reads* sequenciadas.

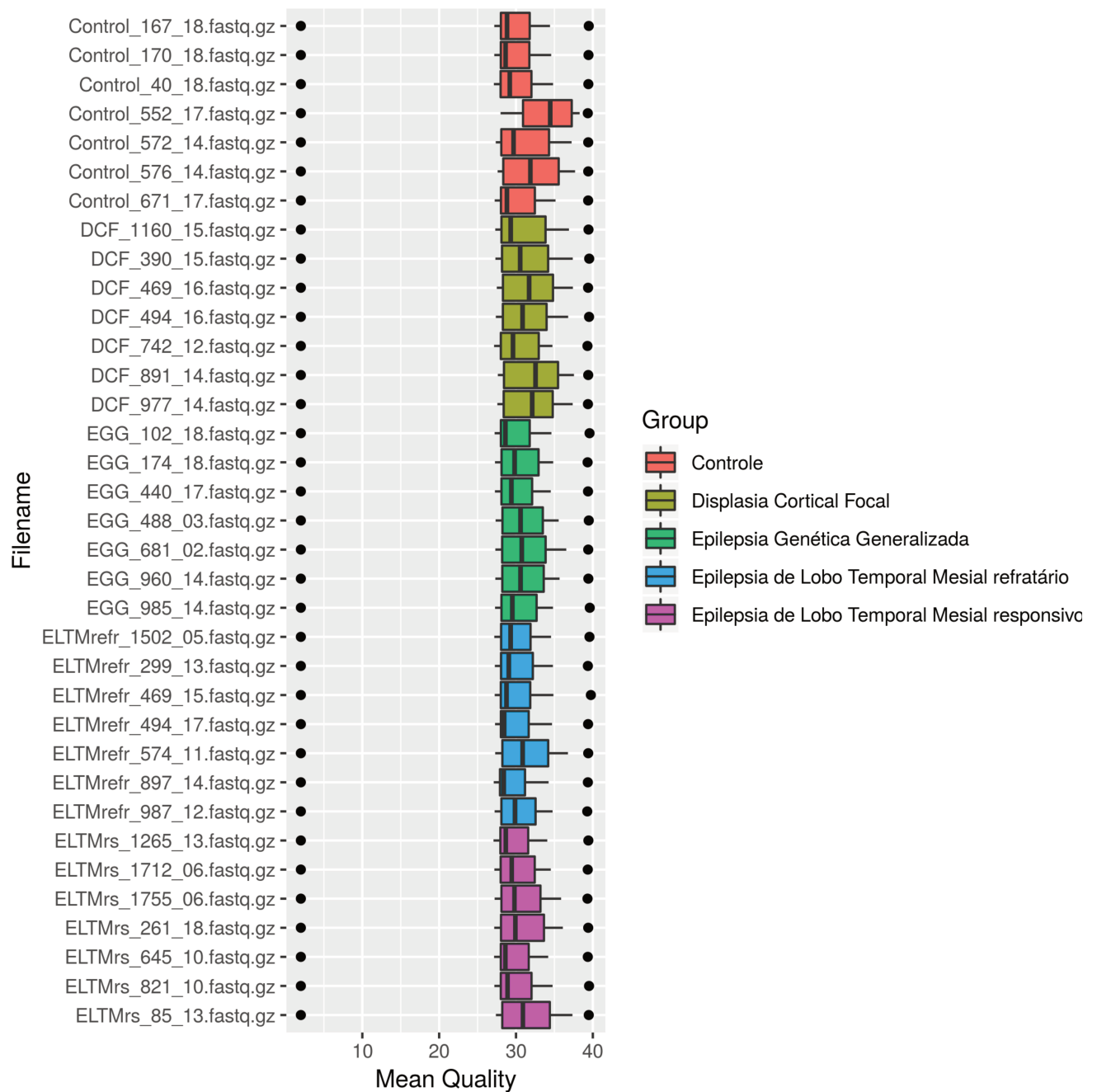


Figura 7. BoxPlot dos arquivos FASTQ. Representação da distribuição da qualidade média das amostras sequenciadas. Cores representam grupos de estudo específicos. *Mean Quality*: qualidade média; *Filename*: nome do arquivo; *Group*: grupo de estudo

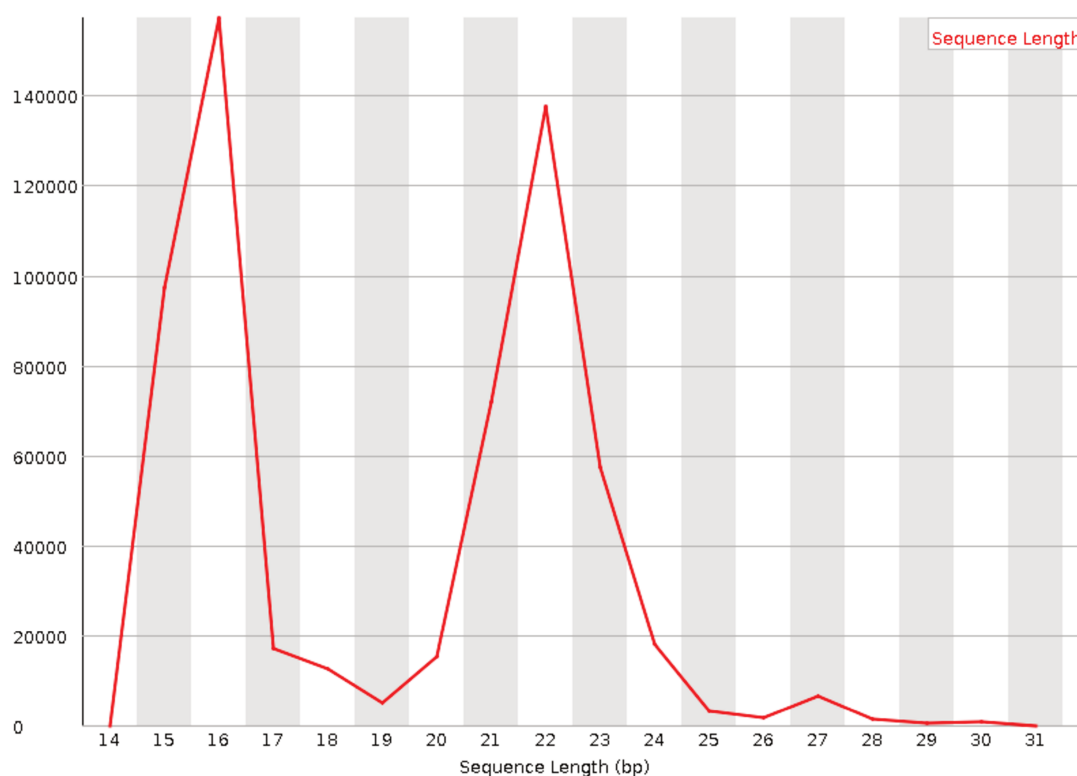


Figura 8. Distribuição total do tamanho dos fragmentos sequenciados. pb: pares de bases; *sequence length*: tamanho da sequência (*read*)

O sequenciamento total de microRNAs, organizados em um Diagrama de Venn, (Figura 9) mostrou que 31 microRNAs foram identificados como diferencialmente expressos com p-valor ajustado à 10%, dos quais, 28 microRNAs mostraram-se específicos para EEG, um único microRNA específico para DCF e os outros dois microRNAs não eram tipo-específicos para as doenças estudadas.

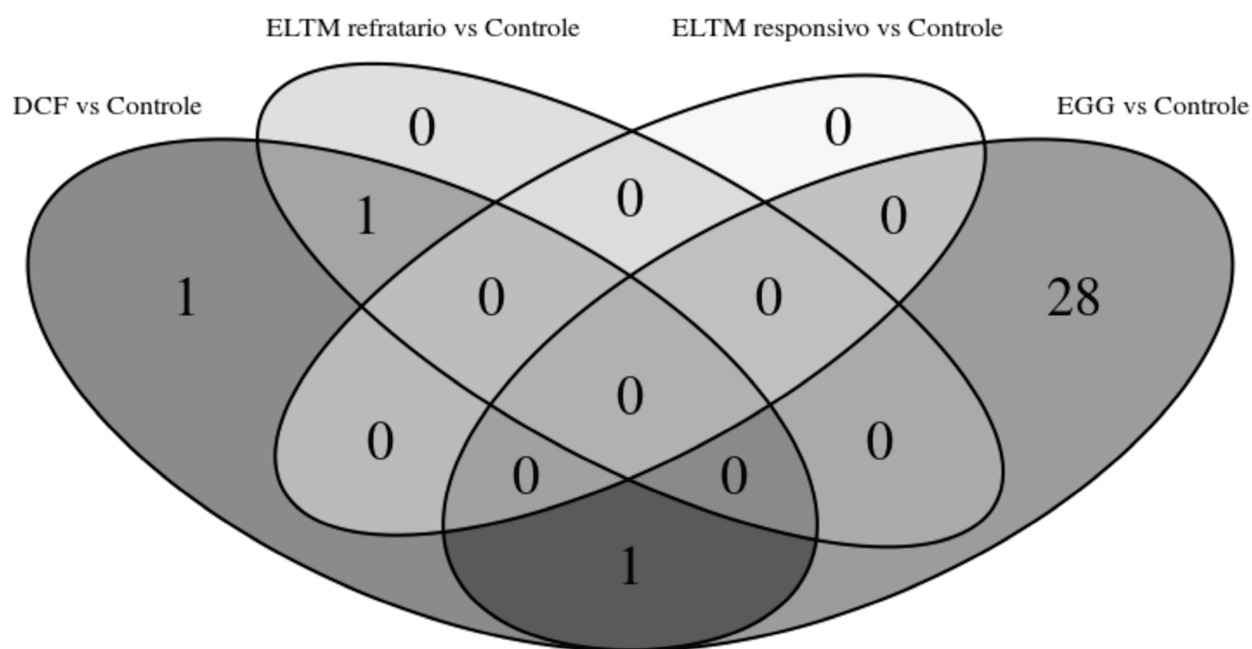


Figura 9. Diagrama de Venn da análise de expressão diferencial de microRNAs com p-valor ajustado $\leq 0,1$

Com o objetivo de encontrar potenciais microRNAs específicos também para os subtipos de ELTM, os níveis de microRNAs foram considerados diferencialmente significativos se seguissem os critérios: (I) p-valor ajustado (padj) $\leq 0,01$ ou (II) p-valor $\leq 0,01$ e $-1,5 \leq \log_2\text{FoldChage} \leq 1,5$.

Com base nos critérios estabelecidos, foram selecionados um total de 17 microRNAs circulantes, sendo 11 microRNAs hiperexpressos, hsa-miR-148-3p, -215-5p, -128-3p, -182-5p, -627-5p, -502-3p, -32-5p, -96-5p, -4508, -636, -141-3p e seis microRNAs hipoexpressos, hsa-miR-330-3p, -877-5p, -139-5p, -4435 e hsa-miR-101-5p, dois quais 13 microRNAs mostraram-se relacionados ao tipo-específico de epilepsia, três microRNAs mostraram expressão diferencial para todas as epilepsias em relação ao grupo controle e um microRNA foi relacionado à resposta ao tratamento medicamentoso (Figura 10).

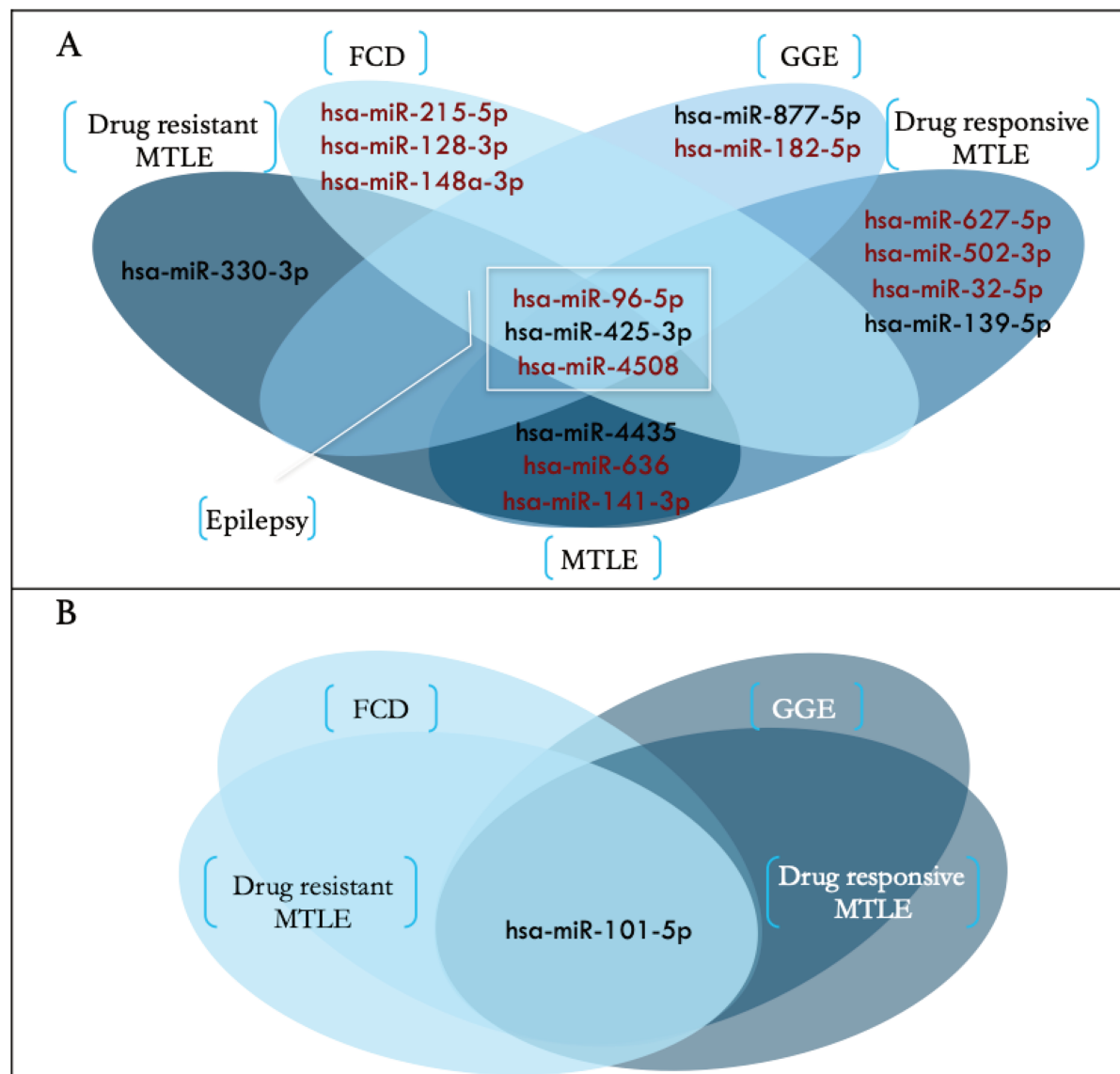


Figura 10. Desenho gráfico mostrando microRNAs circulantes diferencialmente expressos nas diferentes etiologias de epilepsias estudadas ($p < 0,01$). A) microRNAs circulantes associados à tipos específicos de epilepsia quando realizada múltiplas comparações. B) microRNAs circulantes associados ao tratamento medicamentoso em pacientes com epilepsia. Os microRNAs circulantes encontrados hiperexpressos no plasma sanguíneo estão apresentados em vermelho e hipoexpressos em preto. MTLE: Mesial Temporal Lobe Epilepsy (Epilepsia de Lobo Temporal Mesial); FCD: Focal Cortical Dysplasia (Displasia Cortical Focal); GGE: Genetic Generalized Epilepsy (Epilepsia Genética Generalizada); Drug responsive MTLE (ELTM responsiva às drogas antiepilépticas); Drug resistant MTLE (ELTM resistente às drogas antiepilépticas); Epilepsy (Epilepsia)

A análise estatística da expressão diferencial de microRNAs circulantes para a ELTM em relação aos indivíduos controles resultou em oito microRNAs, sendo quatro específicos para ELTM responsiva às DAEs, hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-32-5p e hsa-miR-139-5p, um microRNA específico para ELTM resistente às DAEs – hsa-miR-330-3p e três microRNA genéricos para ELTM, hsa-miR-4435, hsa-miR-636 e hsa-miR-141-3p, justificados estatisticamente pelos valores de $\log_2\text{FoldChange}$, p-valor e p-valor ajustado (Tabela 1).

Tabela 1. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs nos subtipos de ELTM *versus* controle

microRNA	Análise Estatística			
	$\log_2\text{FC}$	p-valor	padj	Comparação
hsa-miR-627-5p	2.4960	0.0032	0.3703	ELTM responsiva às DAEs <i>versus</i> controle
hsa-miR-502-3p	2.3524	0.0009	0.3473	ELTM responsiva às DAEs <i>versus</i> controle
hsa-miR-32-5p	1.4998	0.0115	0.5623	ELTM responsiva às DAEs <i>versus</i> controle
hsa-miR-139-5p	-2.6953	0.0044	0.3703	ELTM responsiva às DAEs <i>versus</i> controle
hsa-miR-330-3p	-1.5401	0.0121	0.9992	ELTM resistente às DAEs <i>versus</i> controle
hsa-miR-4435	-1.7277	0.0029	0.0964	ELTM <i>versus</i> controle
hsa-miR-636	3.0275	0.0002	0.0286	ELTM <i>versus</i> controle
hsa-miR-141-3p	1.7974	0.0038	0.1026	ELTM <i>versus</i> controle

$\log_2\text{FC}$: $\log_2\text{FoldChange}$; padj: p-valor ajustado; ELTM: Epilepsia de Lobo Temporal Mesial; DAEs: Drogas antiepiléticas; $\log_2\text{FoldChange} > 0$: microRNAs hiperexpressos em pacientes *versus* controle; $\log_2\text{FoldChange} < 0$: microRNAs hipoexpressos em pacientes *versus* controle

A análise estatística de microRNAs circulantes diferencialmente expressos para a DCF em relação aos indivíduos controles resultou em três microRNAs: hsa-miR-148a-3p,

hsa-miR-215-5p e hsa-miR-128-3p, com base, respectivamente, nos valores de padj (0.0004), p-valor (0,0043) com log₂FoldChange (1,6810) e padj (0,0051) observados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs na DCF *versus* controle

microRNA	Análise Estatística			Comparação
	log2FC	p-valor	padj	
hsa-miR-148a-3p	0.8908	4.00E-07	0.0004	DCF <i>versus</i> controle
hsa-miR-215-5p	1.6810	0.0043	0.6609	
hsa-miR-128-3p	0.8429	9.51E-06	0.0051	

log₂FC: Log₂FoldChange; padj: p-valor ajustado; DCF: Displasia Cortical Focal; log₂FoldChange > 0: microRNAs hiperexpressos em pacientes *versus* controle; log₂FoldChange < 0: microRNAs hipoexpressos em pacientes *versus* controle

A análise estatística da expressão diferencial de microRNAs circulantes para a EGG (Tabela 3) em relação aos indivíduos controles resultou em dois microRNAs: hsa-miR-877-5p e hsa-miR-182-5p com base, respectivamente, nos valores de padj (0.0083), e p-valor (0,0032) com log₂FoldChange (1.5614) apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs na EGG *versus* controle

microRNA	Análise Estatística			Comparação
	log2FC	p-valor	padj	
hsa-miR-877-5p	-2.4151	0.0001	0.0083	EGG <i>versus</i> controle
hsa-miR-182-5p	1.5614	0.0032	0.0561	

log₂FC: Log₂FoldChange; padj: p-valor ajustado; EGG: Epilepsia Genética Generalizada; log₂FoldChange > 0: microRNAs hiperexpressos em pacientes *versus* controle; log₂FoldChange < 0: microRNAs hipoexpressos em pacientes *versus* controle

A análise estatística da expressão diferencial de microRNAs circulantes para a epilepsia (ELTM + DCF + EGG) em relação aos indivíduos controles resultou em três microRNAs: hsa-miR-96-5p, hsa-miR-425-3p e hsa-miR-4508, com base, respectivamente, nos valores de padj (0.0004), p-valor (0,000169) com log₂FoldChange (-1,847) e p-valor (0,00132) com log₂FoldChange (1,8437), mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs nas Epilepsias *versus* controle

microRNA	Análise Estatística			Comparação
	log2FC	p-valor	padj	
hsa-miR-96-5p	3.4387	1.20E-6	0.0004	Epilepsia <i>versus</i> controle
hsa-miR-425-3p	-1.847	1.69E-4	0.0145	
hsa-miR-4508	1.8437	1.32E-3	0.0907	

log₂FC: Log₂FoldChange; padj: p-valor ajustado; log₂FoldChange > 0: microRNAs hiperexpressos em pacientes *versus* controle; log₂FoldChange < 0: microRNAs hipoexpressos em pacientes *versus* controle

Finalmente, a análise estatística da expressão diferencial de microRNAs em relação à resposta ao tratamento farmacológico na epilepsia gerou um resultado: hsa-miR-101-5p, o qual está estatisticamente justificado na Tabela 5 pelo p-valor ajustado e log₂FoldChange.

Tabela 5. Análise estatística da expressão diferencial de microRNAs em relação à resposta ao tratamento medicamentoso na Epilepsia

microRNA	Análise Estatística			Comparação
	log2FC	p-valor	padj	
hsa-miR-101-5p	-2.4130	6.05E-5	0.0648	Epilepsia resistente <i>versus</i> Epilepsias responsivas às DAEs
hsa-miR-101-5p	-2.9875	0.0020	0.9903	ELTM resistente <i>versus</i> ELTM responsivo às DAEs

log2FC: Log₂FoldChange; padj: p-valor ajustado; ELTM: Epilepsia de Lobo Temporal Mesial; DAEs: Drogas antiepilépticas; log₂FoldChange > 0: microRNAs hiperexpressos em pacientes *versus* controle; log₂FoldChange < 0: microRNAs hipoexpressos em pacientes resistentes às drogas antiepilépticas *versus* pacientes responsivos às drogas antiepilépticas

5. DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou investigar se os microRNAs circulantes no plasma sanguíneo poderiam ser usados como biomarcadores no diagnóstico de etiologias de epilepsia e foi possível identificar 13 microRNAs relacionados ao tipo-específico da doença (Figura 10a)

Oito microRNAs mostraram serem específicos para ELTM (Tabela 1). Para DCF tipo II, foi possível observar a presença de três microRNAs específicos (Tabela 2) e dois microRNAs mostraram-se únicos para a EEG (Tabela 3). Além disso, foi possível identificar três microRNAs como biomarcadores de epilepsia em geral (Tabela 4).

O trabalho também teve como objetivo avaliar se os microRNAs circulantes poderiam ser usados como biomarcadores preditivos quanto à resposta ao tratamento farmacológico, sendo identificado um microRNA (Figura 10b, Tabela 5).

A epilepsia é uma doença heterogênea, na qual padrões de expressão monogênicos não são esperados, mas sim a contribuição de uma cascata de sinalização celular complexa, incluindo a combinação de diversos microRNAs, contribuindo para um perfil de expressão de microRNAs específicos para determinada etiologia da doença.

Pitkanen *et al.*, (4) ressaltam a importância do uso combinado de microRNAs como biomarcadores na epilepsia para aumento de sua especificidade em relação às outras doenças neurológicas, já que essas possuem similaridades e vias de expressão comum, incluindo padrões anormais de expressão de microRNAs. E esse desafio, segundo os autores, deve ser superado com a comparação de etiologias distintas na epilepsia e outras doenças neurológicas (4,55).

Nosso estudo abordou diferentes etiologias da epilepsia com o cuidado de obtermos uma casuística homogênea com relação às drogas antiepilépticas utilizadas por cada grupo e à resposta ao tratamento medicamentoso, com o objetivo de selecionar biomarcadores sensíveis e específicos para distingui-los, bem como para prever a resposta às DAE's ministrada no início do tratamento.

5.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes presentes no plasma sanguíneo de pacientes com ELTM

A comparação de microRNAs circulantes diferencialmente expressos no grupo de pacientes com ELTM-EH em relação às outras etiologias de epilepsia e indivíduos controles resultou em cinco microRNAs hiperexpressos hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-32-5p, hsa-miR-636 e hsa-miR-141-3p e três hipoexpressos hsa-miR-139-5p, hsa-miR-4435, hsa-miR-330-3p.

Quando comparado somente pacientes com ELTM, observou-se a presença de uma potencial assinatura molecular entre os grupos resistente e responsivo às DAE's. Os microRNAs hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-32-5p e hsa-miR-139-5p apresentaram diferencialmente expressos no plasma sanguíneo de pacientes com ELTM-EH responsiva às DAEs, enquanto que o hsa-miR-330-3p foi encontrado apenas no grupo de pacientes com ELTM-EH resistentes às DAEs.

O perfil de expressão dos microRNAs circulantes identificados nessa análise corroborou com alguns dados já descritos na literatura, a saber: em 2011, Jimenez-Mateos e colaboradores (56) conduziram estudo de perfil de expressão de microRNAs usando hipocampo de camundongos que desenvolveram *status epilepticus* 24 horas após indução por ácido caínico, e encontraram o miR-330-3p e outros 11 microRNAs hipoexpressos. Do

mesmo modo, Bot *et al.* (57), em seu estudo de expressão de microRNAs no giro denteado a partir de modelos de ratos com epilepsia de lobo temporal, encontraram 57 microRNAs hipoexpressos, incluindo o miR-330-3p. Esses achados, ainda que limitados à modelos animais, sugerem que o hsa-miR-330-3p pode ser um potencial biomarcador não invasivo para a ELTM com crises recorrentes e espontâneas e pode ter papel na resposta às DAE's.

Dentre os microRNAs demonstrados em nosso estudo como potenciais biomarcadores para ELTM-HS responsiva às DAE's, destaca-se o hsa-miR-502-3p. Wang e colaboradores também identificaram o hsa-miR-502-3p hiperexpresso no soro de pacientes com epilepsia responsiva às DAE's (51), contudo, em um segundo trabalho este microRNA foi encontrado hiperexpresso no hipocampo de pacientes com ELTM-EH resistente ao tratamento medicamentoso (58).

Essa divergência no nível de expressão do hsa-miR-502-3p pode estar relacionada aos diferentes critérios de inclusão de pacientes com epilepsia na casuística de cada estudo. No estudo de Wang *et al.* (51) foram estudadas diferentes etiologias de epilepsia, incluindo a ELT, enquanto Kaalund *et al.* (58) restringiram seus estudos a pacientes com ELTM resistente ao tratamento farmacológico com evidências de presença de EH.

Da mesma forma, essa diferença de expressão também pode ser explicada pela diferença dos materiais biológicos analisados em ambos os estudos. Como se sabe, microRNAs têm padrão de expressão tecido-específico (40) o que pode explicar porque Wang e colaboradores (51) encontraram o miR-502-3p hiperexpresso em soro de pacientes com epilepsia responsiva ao tratamento e Kaalund *et al.* (58) hiperexpresso no hipocampo de pacientes com ELTM-EH com resistência ao tratamento farmacológico.

Entretanto, os padrões de expressão desregulados de alguns microRNAs podem estar diretamente relacionado às condições fisiopatológicas no organismo (32). Assim,

juntos, esses dois achados na literatura reforçam a importância do miR-502-3p para a epilepsia, e estudos futuros com uma casuística mais homogênea são necessários na associação desse microRNA à resposta às DAE's.

Os microRNAs, hsa-miR-139-5p e hsa-miR-32-5p também foram encontrados no nosso estudo respectivamente hipo e hiperexpressos no plasma de pacientes com ELTM-EH responsivos ao tratamento medicamentoso. O hsa-miR-139-5p já foi encontrado hipoexpresso em hipocampo de ratos após *status epilepticus* (60), enquanto o hsa-miR-32-5p foi descrito hiperexpresso em estudo com dor neuropática (61) em modelo animal e associado com autismo (62) e parece não ter um papel específico relacionado à epilepsia, mas sua função precisa ser mais investigada.

Dentre os microRNAs demonstrados em nosso estudo como potenciais biomarcadores para ELTM-HS (resistentes e responsivos às DAE's), destacam-se o hsa-miR-4435 e hsa-miR-141-3p, ambos correlacionados aos estudos de Wang e colaboradores (51,63), respectivamente hipo e hiperexpressos em soro de pacientes com diferentes etiologias de epilepsia, o que corrobora com nossos achados em plasma sanguíneo.

O hsa-miR-4435 também foi relacionado à esquizofrenia por predição de alvos de microRNAs no estudos de Costain *et al.* (2014), incluindo a predição gênica GABRA1 do receptor de GABAA (64), responsável pela mediação no neurotransmissor inibidor GABA (ácido gama-aminobutílico). Com base nesses estudos, o hsa-miR-4435 não é um biomarcador específico para a epilepsia, mas pode estar relacionado com a expressão gênica em doenças neurológicas.

Os microRNAs hsa-miR-627-5p e hsa-miR-636 encontrados nas análises de amostras de plasma, respectivamente, de pacientes com ELTM-EH responsivo às DAE's e ELTM-EH em geral, não foram descritos na literatura relacionadas às doenças neurológicas.

Com isso, podem ser considerados biomarcadores inéditos para o diagnóstico da ELTM se confirmarmos a presença numa coorte de validação e se mais estudos forem realizados para identificar sua função como biomarcador e/ou na epileptogênese deste tipo específico de epilepsia.

5.2 Perfil de expressão de microRNAs circulantes presentes no plasma sanguíneo de pacientes com DCF tipo II

A comparação de microRNAs circulantes diferencialmente expressos no grupo de pacientes com DCF tipo II em relação às outras etiologias e indivíduos controles resultou em três microRNAs hiperexpressos, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-215-5p e hsa-miR-128-3p.

Em nossa análise, o hsa-miR-148a-3p e hsa-miR-128-3p não apresentaram um logFC significativo, contudo os p-valores ajustados foram $< 0,05$, o que demonstra que esses microRNAs estão diferencialmente expressos entre pacientes com DCF em relação à indivíduos saudáveis e de forma singular em relação às outras etiologias.

No estudo de Ichi *et al.* em 2010, o miR-148a-3p e outros três microRNAs foram identificados hiperexpressos em embriões de camundongos mutantes propensos à defeitos do tubo neural em relação aos embriões selvagens.

Nesse trabalho, foi apresentada a hipótese de que o miR-148a seria um dos microRNAs responsáveis pela regulação genética pós-transcricional da enzima KDM6B, que tem o papel na desmetilação da histona H3K27 (do inglês, *lysine residue 27 of histone H3*) associada com os genes HES1 e NEUROG2, que são essenciais para o desenvolvimento correto do tubo neural. Desse modo, o aumento da expressão do miR-148a implica de forma indireta no aumento da metilação da histona H3K27, alterando a atividade nos promotores dos

genes HES1 e NEUROG2, o que prejudica a proliferação de células-tronco e causa neurogênese prematura (65).

Em 2014, Hinton e colaboradores (66) fizeram a triagem da expressão de microRNAs durante a transição de células-tronco embrionárias humanas (hESCs) da fase de pluripotência para endoderma definitivo. Nesse estudo, identificaram 40 microRNAs hiperexpressos em células pluripotentes em relação aos endodermas, incluindo o hsa-miR-148a-3p.

E em 2017, Veno *et al.*, identificaram um perfil de microRNAs com expressão altamente específica ao longo do dobramento cortical do cérebro suíno, dentre os quais incluía o miR-148-3p, com aumento de expressão do início ao fim do dobramento cortical.

Esses achados juntos inferem que o miR-148a-3p, tanto em modelo animal como em humano, possui padrões de expressão tempo-específico durante o desenvolvimento cerebral, e sua modulação adequada é essencial na regulação de uma cascata gênica referente à proliferação e diferenciação de células tronco relacionadas à neurogênese. Ainda, a manutenção da hiperexpressão desse microRNA em adultos pode inferir à presença de células neuronais prematuras como, por exemplo, células em balão, encontradas na DCF do tipo II.

O hsa-miR-128-3p, por sua vez, foi associado à excitabilidade neuronal em camundongos com epilepsia (67) e foi encontrado no soro de pacientes com epilepsia resistente às drogas antiepiléticas de modo geral (52). Apesar dos achados literários não apontarem relação específica desse microRNA à etiologia estudada, o hsa-miR-128-3p pode contribuir na construção de um perfil de expressão de microRNAs na DCF.

Finalmente, o hsa-miR-215-5p, hiperexpresso em nossa análise, foi encontrado hipoexpresso em hipocampo de ratos com epilepsia na fase aguda (68), o que demonstra a importância da validação de experimentos em humanos.

5.3 Perfil de microRNAs circulantes na EGG

A primeira análise apresentada na Figura 9 mostrou que em uma análise estatística mais restritiva, considerando o p-valor ajustado em detrimento do p-valor padrão, a EGG foi a etiologia com maior probabilidade de apresentar microRNAs de expressão anormal no plasma sanguíneo em comparação aos indivíduos controles.

Esses dados prévios podem ser explicados pela presença de crises epiléticas de caráter generalizado, ou seja, com a presença de crises que afetem o hemisfério cerebral de modo abrangente. Como consequência a desregulação da expressão de microRNAs nessa etiologia parece abranger um espectro maior dessas moléculas em comparação à DCF e ELTM.

Contudo, foi observado que o tamanho do efeito desses microRNAs para a doença eram pouco expressivos e a análise final resultou em dois microRNAs diferencialmente expressos, o hsa-miR-182-5p e o hsa-miR-877-5p, no grupo de pacientes com EGG em relação às outras etiologias e aos indivíduos controles (Tabela 3).

Em 2015, Wang e colaboradores (52) encontrou o hsa-miR-877-5p hipoexpresso no soro de pacientes com epilepsia quando comparado pacientes responsivos e resistentes às DAEs, corroborando com nosso achado em plasma sanguíneo em pacientes com EGG responsivos às drogas antiepiléticas.

E o hsa-miR-182-5p foi previamente descrito hiperexpresso em hipocampo de pacientes com ELTM (69), uma etiologia diferente da EGG, reforçando a necessidade de estudos de validação futuros.

5.4 Perfil de microRNAs circulantes na epilepsia

A comparação de microRNAs circulantes diferencialmente expressos entre todos os pacientes pertencentes a essa casuística e indivíduos controles resultou em dois microRNAs hiperexpressos, hsa-miR-96-5p e hsa-miR-4508, no plasma sanguíneo e apenas um microRNA hipoexpresso, hsa-miR-425-3p.

Em nossa análise, chamou-nos a atenção a elevada expressão do hsa-miR-96-5p ($\log_{FC} > 3,0$) em pacientes com epilepsia quando comparada aos indivíduos saudáveis. Além disso, esse microRNA parece ter grande relevância no processo de epileptogênese, uma vez que já foi relacionado a morte neuronal, gliose e inflamação, como veremos a seguir.

Segundo Gan e colaboradores (70), em seu estudo sobre a função e alvos do miR-96 no hipocampo de ratos prematuros quando expostos ao *status epilepticus* (SE), esse microRNA mostrou regular negativamente as proteínas Atg7 (do inglês, *Autophagy related 7*) e Atg16L1 (do inglês, *Autophagy related 16 like 1*), responsáveis pela formação de autofagossomos em neurônios e astrócitos respectivamente. Eles sugerem que a elevada expressão do miR-96 previne o dano neuronal ocasionado pelo SE através da inibição dessas proteínas de formação de autofagossomos no hipocampo, evidenciando a função protetiva desse microRNA nas células neuronais durante e após o *status epilepticus* e seu potencial papel terapêutico na epilepsia.

Outro estudo realizado por Kinoshita *et al.* (71) com modelo animal, mostrou que o miR-96-5p também regula negativamente a proteína EAAC1 (do inglês, *cysteine transporter excitatory amino acid carrier 1*), responsável pela síntese de glutathiona (GSH, do inglês *Glutathione*) – um antioxidante com função de neuroproteção cerebral. E nesse caso, a hipoexpressão do microRNA demonstrou aumentar os níveis do antioxidante GSH no cérebro de camundongos.

Com base nos dois estudos com modelo animal, podemos inferir que o miR-96-5p parece ter papel importante no controle da exposição das células neuronais à fatores de risco como a oxidação ou morte celular. E por isso, os níveis de expressão dessa molécula pode estar diretamente relacionada à homeostase cerebral, e regulação da excitabilidade neuronal.

Além disso, um terceiro estudo (72) também realizado em camundongos, com o objetivo de identificar a função e os reguladores da proteína Tbx1 (do inglês, *T-box transcription factor*) na síndrome de DiGeorge ou síndrome da deleção 22q11.2, demonstrou que o miR-96 possui um *loop* de regulação de *feedback* negativo com a proteína Tbx1, e que ambos têm importante papel na regulação da taxa de proliferação de células progenitoras dentais e no desenvolvimento craniofacial.

Acrescido ao fato de que o miR-96 desempenha papel de regulação da proliferação de células de origem ectodérmica como as dentais e neuronais, outros estudos mostraram que pacientes com a síndrome de DiGeorge possuem alta frequência de distúrbios do neurodesenvolvimento, como a esquizofrenia (73) e a epilepsia (74), reforçando a relevância do miR-96 como molécula reguladora de questões do neurodesenvolvimento e como potencial biomarcador no perfil de epilepsia.

O hsa-miR-425-3p foi descrito hipoexpresso em hipocampo de camundongo com modelo de epilepsia de lobo temporal na fase aguda, o que corrobora com nosso achado (75). E o hsa-miR-4508 não foi previamente descrito na literatura relacionado às doenças neurológicas e pode ser um potencial biomarcador inédito para diagnóstico das epilepsias.

5.5 Perfil de microRNAs circulantes na resposta ao tratamento medicamentoso da epilepsia

Foi realizada a comparação de microRNAs circulantes diferencialmente expressos entre pacientes resistentes e responsivos às DAE's. A primeira análise consistiu na comparação de pacientes com ELTM resistente *versus* ELTM responsiva ao tratamento medicamentoso (Figura 4a). A segunda análise (4b) consistiu na comparação do grupo de pacientes com epilepsia resistente às drogas antiepilépticas (união de pacientes com ELTM resistente e com DCF) em relação aos pacientes com epilepsia responsiva (união dos pacientes com ELTM responsiva e EGG).

Ambas as análises resultaram no hsa-miR-101-5p, encontrado hipoexpresso em pacientes com epilepsia resistente às DAE's em relação aos pacientes responsivos ao tratamento farmacológico.

A comparação restritiva entre os pacientes com ELTM (Figura 4a), apesar de não ser estatisticamente significativas pelo p-valor ajustado, corrobora com a análise abrangente de pacientes com diferentes etiologias (Figura 4b). Além disso, dois estudos na literatura são relevantes neste contexto.

O estudo de Wang *et al.* (2015) corrobora com nosso achado ao comparar soro de pacientes com epilepsia e diferentes respostas às drogas antiepilépticas.

E em 2016, Lippi e colaboradores (76) avaliaram células de hipocampo em modelo animal e mostraram que o miR-101 é um dos microRNAs mais abundantes nos primeiros estágios de vida de camundongos, presentes em neurônios piramidais e interneurônios. Essa abundância foi explicada por sua função: orquestrar o desenvolvimento das redes neurais para atingir a excitabilidade ótima no camundongo adulto. Assim, o bloqueio precoce do miR-101, mesmo de forma transitória, mostrou induzir

hiperexcitabilidade ao longo prazo e a déficits persistentes de memória no camundongo adulto.

Juntos, esses dados fortalecem a hipótese de que os níveis de hsa-miR-101-5p são relevantes na indução da hiperexcitabilidade neuronal e na sensibilidade às drogas antiepilépticas, e pode ser um relevante biomarcador preditivo ao tratamento farmacológico.

De modo geral, no nosso estudo, o perfil de expressão de microRNAs tipo-específico de diferentes etiologias de epilepsia, incluindo a ELTM, DCF e EGG, demonstrou muitas consistências e algumas inconsistências com os achados prévios na literatura.

Fatores como o estilo de vida de pacientes, drogas usadas previamente e momento da coleta do material biológico podem causar variabilidade na abundância e expressão de microRNAs (51,52) Ainda, os níveis de microRNAs provenientes de amostras com processamentos distintos, como o plasma e soro, ou de espécies distintas devem ser correlacionados com cautela, pois podem ser fatores de variabilidade na análise (4).

Estudos de validação técnica e biológica serão necessários para predizer a reprodutibilidade dos dados, bem como a sensibilidade e especificidade desses microRNAs como ferramentas de diagnóstico/ predição na clínica médica.

6. CONCLUSÃO

1) O estudo evidenciou que 13 microRNAs são potenciais biomarcadores de diagnóstico para diferentes tipos específicos de epilepsia: hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-182-5p, hsa-877-5p, hsa-miR-627-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-636, hsa-miR-141-3p e hsa-miR-4435.

2) O hsa-miR-101-5p foi identificado como um possível biomarcador preditivo da resposta ao tratamento farmacológico em pacientes com epilepsia.

7. REFERÊNCIAS

1. Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, Goldstein DB, Kjems J, Prehn JHM, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *The Lancet Neurology*. 2016.
2. WHO. Epilepsy fact sheet [Internet]. *Epilepsia*. 2018 [citado 9 de janeiro de 2019]. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13294>
3. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* [Internet]. 1 de abril de 2005 [citado 24 de novembro de 2018];46(4):470–2. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
4. Pitkänen A, Ekolle Nnode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers – Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis* [Internet]. 18 de maio de 2018 [citado 9 de janeiro de 2019]; Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996118301451?via%3Dihub>
5. Brodie MJ, Barry SJE, Bamagous GA, Norrie JD, Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy [Internet]. 2012 [citado 25 de novembro de 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348850/pdf/zn11548.pdf>
6. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* [Internet]. 3 de novembro de 2009 [citado 28 de fevereiro de 2019];51(6):1069–77. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889013>
7. Cendes F. Mesial temporal lobe epilepsy syndrome: an updated overview. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* [Internet]. 2005 [citado 10 de janeiro de 2019];11(3):141–4. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492005000300006&lng=en&tlng=en
 8. Kabat J, Król P. Focal cortical dysplasia - review. *Polish J Radiol* [Internet]. abril de 2012 [citado 28 de fevereiro de 2019];77(2):35–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844307>
 9. Palmini A, Holthausen H. Focal malformations of cortical development. In: *Handbook of clinical neurology* [Internet]. 2013 [citado 10 de janeiro de 2019]. p. 549–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622203>
 10. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters H V, Palmini A, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* [Internet]. janeiro de 2011 [citado 14 de dezembro de 2018];52(1):158–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219302>
 11. Chassoux F, Landré E, Mellerio C, Turak B, Mann MW, Daumas-Duport C, et al. Type II focal cortical dysplasia: Electroclinical phenotype and surgical outcome related to imaging. *Epilepsia* [Internet]. 1 de fevereiro de 2012 [citado 17 de dezembro de 2018];53(2):349–58. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2011.03363.x>
 12. Sisodiya SM, Fauser S, Cross JH, Thom M. Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *Lancet Neurol* [Internet]. setembro de 2009 [citado 17 de dezembro de 2018];8(9):830–43. Available at:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442209702017>
13. Wieser HG, Häne A. Antiepileptic drug treatment in seizure-free mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis following selective amygdalohippocampectomy. *Seizure* [Internet]. 1 de dezembro de 2004 [citado 21 de dezembro de 2018];13(8):534–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519912>
 14. Androsova G, Krause R, Borghei M, Wassenaar M, Auce P, Avbersek A, et al. Comparative effectiveness of antiepileptic drugs in patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* [Internet]. 1 de outubro de 2017 [citado 21 de dezembro de 2018];58(10):1734–41. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13871>
 15. Goncalves-Ferreira A, Campos AR, Herculano-Carvalho M, Pimentel J, Bentes C, Peralta AR, et al. Amygdalohippocampotomy: surgical technique and clinical results Clinical article. *J Neurosurg*. 2013;118(5):1107–13.
 16. Muzumdar, DPatil M, Goel A, Ravat S, Sawant N, Shah U. Mesial temporal lobe epilepsy – An overview of surgical techniques. *ATInternational J Surg* [Internet]. 1 de dezembro de 2016 [citado 21 de dezembro de 2018];36:411–9. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919116309827?via%3Dihub>
 17. Mullen SA, Berkovic SF, Berkovic SF, Lowenstein DH, Kato M, Cross H, et al. Genetic generalized epilepsies. *Epilepsia*. 2018;59(6):1148–53.
 18. U.S. National Library of Medicine. Juvenile myoclonic epilepsy [Internet]. 2015 [citado 21 de dezembro de 2018]. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.142299>
 19. Syvertsen M, Fløgstad I, Enger U, Landmark CJ, Koht J. Antiepileptic drug withdrawal

- in juvenile myoclonic epilepsy. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2018;0–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30378684><http://doi.wiley.com/10.1111/ane.13042>
20. Atakli D, Senadim S, Baslo SA, Güveli BT, Daryan MD, Sari H. Misdiagnosis in JME: Still a problem after 17 years? *Seizure* [Internet]. 1 de março de 2016 [citado 21 de dezembro de 2018];36:27–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26874858>
 21. Ferrie CD. Preventing misdiagnosis of epilepsy. [citado 24 de novembro de 2018]; Available at: www.bpna.org.uk
 22. Uldall P, Alving J, Hansen LK, Kibaek M, Buchholt J. The misdiagnosis of epilepsy in children admitted to a tertiary epilepsy centre with paroxysmal events. *Arch Dis Child* [Internet]. 2006 [citado 24 de novembro de 2018];91:219–21. Available at: <http://www.uhl-tr.nhs.uk/news/>
 23. Juarez-Garcia A, Stokes T, Shaw B, Camosso-Stefinovic J, Baker R. The costs of epilepsy misdiagnosis in England and Wales. *Seizure* [Internet]. 1 de dezembro de 2006 [citado 10 de janeiro de 2019];15(8):598–605. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17011217>
 24. Oto M (Meritxell). The misdiagnosis of epilepsy: Appraising risks and managing uncertainty. *Seizure* [Internet]. janeiro de 2017 [citado 25 de novembro de 2018];44:143–6. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131116302977>
 25. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Helen Cross J, Elger CE, et al. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* [Internet]. 2014 [citado 24 de novembro de 2018];55(4):475–82. Available at:

- <https://www.ilae.org/files/dmfile/Definition2014-RFisher.pdf>
26. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* [Internet]. 2017 [citado 24 de novembro de 2018];58(4):512–21. Available at: <http://www.ilae.org/Visitors/Docume>
 27. Engel J, Jr. Why is there still doubt to cut it out? *Epilepsy Curr* [Internet]. setembro de 2013 [citado 2 de janeiro de 2019];13(5):198–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348103>
 28. Berg AT, Vickrey BG, Testa FM, Levy SR, Shinnar S, DiMario F, et al. How long does it take for epilepsy to become intractable? A prospective investigation. *Ann Neurol* [Internet]. julho de 2006 [citado 28 de fevereiro de 2019];60(1):73–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685695>
 29. Ma Y. The Challenge of microRNA as a Biomarker of Epilepsy. *Curr Neuropharmacol*. 2017;
 30. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet]. 3 de dezembro de 1993 [citado 11 de junho de 2019];75(5):843–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>
 31. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* [Internet]. 2 de novembro de 2000 [citado 11 de junho de 2019];408(6808):86–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081512>
 32. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *ALS* [Internet]. 2016 [citado 2 de novembro de 2018];10:175–86.

- Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>
33. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 3 de agosto de 2018 [citado 2 de novembro de 2018];9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00402/full>
 34. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 29 de junho de 2015 [citado 11 de junho de 2019];87:3–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979468>
 35. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 4 de março de 2014 [citado 21 de dezembro de 2018];11(3):145–56. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2014.5>
 36. Henshall DC, Kobow K. Epigenetics and Epilepsy. 2015;1–17.
 37. Sheinerman KS, Umansky SR, Pak TR, Murashov AK. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. 2013 [citado 2 de novembro de 2018]; Available at: www.frontiersin.org
 38. McNeill E, Van Vactor D. microRNAs Shape the Neuronal Landscape. [citado 18 de novembro de 2018]; Available at: <http://www.mirbase.org>
 39. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 4 de outubro de 2013 [citado 11 de junho de 2019];7:172. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00172/abstract>
 40. Guo Z, Maki M, Ding R, Yang Y, zhang B, Xiong L. Genome-wide survey of tissue-

- specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci Rep* [Internet]. 3 de maio de 2015 [citado 3 de maio de 2019];4(1):5150. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep05150>
41. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. junho de 2008 [citado 11 de junho de 2019];141(5):672–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318758>
 42. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 7 de junho de 2007 [citado 11 de junho de 2019];9(6):654–9. Available at: <http://www.nature.com/articles/ncb1596>
 43. Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum: Update on potential prognostic and diagnostic value in diseases excluding fetal medicine and oncology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:236–42.
 44. Raoof R, Jimenez-Mateos EM, Bauer S, Tackenberg B, Rosenow F, Lang J, et al. Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci Rep*. 2017;
 45. Zhang Z, Yang T, Xiao J. Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *EBioMedicine* [Internet]. 2018 [citado 2 de novembro de 2018];34:267–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.07.036>
 46. Leggio L, Vivarelli S, L’Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, et al. microRNAs in Parkinson’s Disease: From Pathogenesis to Novel Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* [Internet]. 13 de dezembro de 2017 [citado 28 de fevereiro

- de 2019];18(12). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29236052>
47. Chen C, Zhou Y, Wang J, Yan Y, Peng L, Qiu W. Dysregulated MicroRNA Involvement in Multiple Sclerosis by Induction of T Helper 17 Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [citado 28 de fevereiro de 2019];9:1256. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29915595>
 48. Riancho J, Vázquez-Higuera JL, Pozueta A, Lage C, Kazimierczak M, Bravo M, et al. MicroRNA Profile in Patients with Alzheimer's Disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in Raw and Exosome Enriched Cerebrospinal Fluid Samples. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 21 de março de 2017 [citado 28 de fevereiro de 2019];57(2):483–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28269782>
 49. Avansini SH, De Sousa Lima BP, Secolin R, Santos ML, Coan AC, Vieira AS, et al. MicroRNA hsa-miR-134 is a circulating biomarker for mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2017;
 50. Wang X, Luo Y, Liu S, Tan L, Wang S, Man R. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment with valproic acid for epilepsy patients. *Oncotarget*. 2017;
 51. Wang J, Tan L, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan C-C, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Sci Rep* [Internet]. 18 de maio de 2015 [citado 13 de dezembro de 2018];5:10201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984652>
 52. Yan S, Zhang H, Xie W, Meng F, Zhang K, Jiang Y, et al. Altered microRNA profiles in plasma exosomes from mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Oncotarget*. 2017;
 53. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* [Internet]. 2012 [citado 11

- de janeiro de 2019];7(7):e41561. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859996>
54. Wang W-T, Sun Y-M, Huang W, He B, Zhao Y-N, Chen Y-Q. Genome-wide Long Non-coding RNA Analysis Identified Circulating LncRNAs as Novel Non-invasive Diagnostic Biomarkers for Gynecological Disease. 2016 [citado 2 de novembro de 2018]; Available at: www.nature.com/scientificreports/
 55. Pitkänen A, Löscher W, Vezzani A, Becker AJ, Simonato M, Lukasiuk K, et al. Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *Lancet Neurol* [Internet]. 1 de julho de 2016 [citado 9 de janeiro de 2019];15(8):843–56. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442216001125?via%3Dihub>
 56. Jimenez-Mateos EM, Bray I, Sanz-Rodriguez A, Engel T, McKiernan RC, Mouri G, et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am J Pathol* [Internet]. 1 de novembro de 2011 [citado 10 de janeiro de 2019];179(5):2519–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945804>
 57. Bot AM, Dębski KJ, Lukasiuk K. Alterations in miRNA Levels in the Dentate Gyrus in Epileptic Rats. Biagini G, organizador. *PLoS One* [Internet]. 11 de outubro de 2013 [citado 10 de janeiro de 2019];8(10):e76051. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076051>
 58. Kaalund SS, Venø MT, Bak M, Møller RS, Laursen H, Madsen F, et al. Aberrant expression of miR-218 and miR-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis-Convergence on axonal guidance. *Epilepsia* [Internet]. dezembro de 2014 [citado 16 de março de 2019];55(12):2017–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410734>

59. Wang J, Yu JT, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep*. 2015;
60. Roncon P, Soukupová M, Binaschi A, Falcicchia C, Zucchini S, Ferracin M, et al. MicroRNA profiles in hippocampal granule cells and plasma of rats with pilocarpine-induced epilepsy – comparison with human epileptic samples. *Sci Rep* [Internet]. 18 de novembro de 2015 [citado 10 de janeiro de 2019];5(1):14143. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep14143>
61. Yan T, Zhang F, Sun C, Sun J, Wang Y, Xu X, et al. miR-32-5p-mediated Dusp5 downregulation contributes to neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1 de janeiro de 2018 [citado 10 de janeiro de 2019];495(1):506–11. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17321903?via%3Dihub>
62. Hicks SD, Ignacio C, Gentile K, Middleton FA. Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC Pediatr* [Internet]. 2016 [citado 10 de janeiro de 2019];16:52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27105825>
63. Wang J, Yu J-T, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan C-C, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep* [Internet]. 31 de março de 2015;5:9522. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep09522>
64. Costain G, Lionel AC, Fu F, Stavropoulos DJ, Gazzellone MJ, Marshall CR, et al. Adult neuropsychiatric expression and familial segregation of 2q13 duplications. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 1 de junho de 2014 [citado 25 de março de 2019];165(4):337–44. Available at:

- <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.32236>
65. Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen Y-W, Boshnjaku V, et al. Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* [Internet]. 19 de novembro de 2010 [citado 10 de janeiro de 2019];285(47):36922–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833714>
 66. Hinton A, Hunter SE, Afrikanova I, Jones GA, Lopez AD, Fogel GB, et al. sRNA-seq Analysis of Human Embryonic Stem Cells and Definitive Endoderm Reveals Differentially Expressed MicroRNAs and Novel IsomiRs with Distinct Targets. *Stem Cells* [Internet]. 1 de setembro de 2014 [citado 10 de janeiro de 2019];32(9):2360–72. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1739>
 67. Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, et al. MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science* [Internet]. 6 de dezembro de 2013 [citado 10 de janeiro de 2019];342(6163):1254–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311694>
 68. Hu K, Zhang C, Long L, Long X, Feng L, Li Y, et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium–pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* [Internet]. 25 de janeiro de 2011 [citado 10 de janeiro de 2019];488(3):252–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094214>
 69. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, Engel T, Brennan GP, Sano T, et al. Reduced Mature MicroRNA Levels in Association with Dicer Loss in Human Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. Andrabi SA, organizador. *PLoS One* [Internet]. 15 de maio de 2012 [citado 10 de janeiro de 2019];7(5):e35921. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615744>

70. Gan J, Cai Q, Qu Y, Zhao F, Wan C, Luo R, et al. miR-96 attenuates status epilepticus-induced brain injury by directly targeting Atg7 and Atg16L1. *Sci Rep* [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 10 de janeiro de 2019];7(1):10270. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860495>
71. Kinoshita C, Aoyama K, Matsumura N, Kikuchi-Utsumi K, Watabe M, Nakaki T. Rhythmic oscillations of the microRNA miR-96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels. *Nat Commun* [Internet]. 7 de dezembro de 2014 [citado 10 de janeiro de 2019];5(1):3823. Available at: <http://www.nature.com/articles/ncomms4823>
72. Gao S, Moreno M, Eliason S, Cao H, Li X, Yu W, et al. TBX1 protein interactions and microRNA-96-5p regulation controls cell proliferation during craniofacial and dental development: implications for 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet* [Internet]. 15 de abril de 2015 [citado 10 de janeiro de 2019];24(8):2330–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556186>
73. Ping L-Y, Chuang Y-A, Hsu S-H, Tsai H-Y, Cheng M-C. Screening for Mutations in the TBX1 Gene on Chromosome 22q11.2 in Schizophrenia. *Genes (Basel)* [Internet]. 22 de novembro de 2016 [citado 8 de junho de 2019];7(11). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27879657>
74. Eaton CB, Thomas RH, Hamandi K, Payne GC, Kerr MP, Linden DEJ, et al. Epilepsy and seizures in young people with 22q11.2 deletion syndrome: Prevalence and links with other neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* [Internet]. 11 de abril de 2019 [citado 8 de junho de 2019];60(5):epi.14722. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30977115>
75. Kretschmann A, Danis B, Andonovic L, Abnaof K, van Rikxoort M, Siegel F, et al.

- Different MicroRNA Profiles in Chronic Epilepsy Versus Acute Seizure Mouse Models. *J Mol Neurosci* [Internet]. fevereiro de 2015 [citado 10 de janeiro de 2019];55(2):466–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078263>
76. Lippi G, Fernandes CC, Ewell LA, John D, Romoli B, Curia G, et al. MicroRNA-101 Regulates Multiple Developmental Programs to Constrain Excitation in Adult Neural Networks. *Neuron* [Internet]. 21 de dezembro de 2016 [citado 12 de janeiro de 2019];92(6):1337–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939580>

8. ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: BIORREPOSITÓRIO ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS - FASE I.

Pesquisador: Iscia Teresinha Lopes Cendes

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 20

CAAE: 12112913.3.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.141.975

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto original.

Justificativa da Emenda:

Inclusão de novos membros na equipe de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Inclusão, na Plataforma Brasil (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1277595_E10.pdf 21/12/2018) de responsáveis por centros coparticipantes e novos alunos na equipe de pesquisa.

Responsáveis por centros coparticipantes:

- Profa. Dra. Katia Lin e Prof. Dr. Roger Walz do HU-UFSC, e

- Prof. Dr. Luiz Eduardo Betting da HCFMB-UNESP

Novos alunos :

- Amanda Morato do Canto,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.141.975

- Danielle do Carmo Ferreira da Silva,
- Danyella Barbosa Dogini,
- Estela Maria Bruxel,
- Fabiana dos Santos Oliveira,
- Jaqueline Cruz Geraldís,
- Maria Carolina Pedro Athié,
- Mariana Martin,
- Marina Coelho Gonsales,
- Murilo Guimarães Borges,
- Pedro Henrique Mello Magalhães,
- Vanessa Simão de Almeida,
- Welliton de Souza,
- Alexandre Barcia de Godoi e
- Douglas Cescon da Rosa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- carta_emenda_10.pdf 21/12/2018 : apresenta os nomes dos novos incluído na Plataforma Brasil.
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1277595_E10.pdf 21/12/2018 : justificativa da emenda.

Recomendações:

Solicitamos encaminhar, como NOTIFICAÇÃO, em formulário do CEP, relatório de acompanhamento do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o CEP –PRP – UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.141.975

pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1277595_E10.pdf	21/12/2018 16:28:16		Aceito
Outros	carta_emenda_10.pdf	21/12/2018 16:26:47	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	carta_anuencia_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:24:07	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:23:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.141.975

Justificativa de Ausência	TCLE_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:23:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_biorrepositorio.pdf	09/11/2018 10:22:54	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biorrepositorio_menores18.pdf	09/11/2018 10:22:36	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biorrepositorio_maiores18.pdf	09/11/2018 10:22:20	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE711_8.pdf	09/10/2018 13:10:43	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE1217_8.pdf	09/10/2018 13:10:23	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UFSC.pdf	09/10/2018 13:09:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	regulamento_biorrepositorio.pdf	13/08/2018 15:49:58	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/02/2013 11:21:13		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br