

DANYELLA BARBOSA DOGINI

***QUANTIFICAÇÃO DE DIFERENTES *microRNAs* NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL: IMPLICAÇÕES NOS
MECANISMOS DE DESENVOLVIMENTO E PROCESSOS
FISIOPATOLÓGICOS***

CAMPINAS

2010

DANYELLA BARBOSA DOGINI

***QUANTIFICAÇÃO DE DIFERENTES *microRNAs* NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL: IMPLICAÇÕES NOS
MECANISMOS DE DESENVOLVIMENTO E PROCESSOS
FISIOPATOLÓGICOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, Área de Concentração
Neurociências.*

ORIENTADORA: PROF. DRA. ISCIA LOPES CENDES

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D678q Dogini, Danyella Barbosa
Quantificação de diferentes microRNAs no sistema nervoso central: implicações nos mecanismos de desenvolvimento e processos fisiopatológicos / Danyella Barbosa Dogini. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Iscia Lopes-Cendes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. MicroRNAs. 2. Epilepsia. 3. Neurogenética. I. Lopes-Cendes, Iscia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Quantification of microRNAs in the central nervous system: implications”

Keywords: • MicroRNA
• Epilepsy
• Neurogenetics

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Neurociências

Banca examinadora:

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes
Profa. Dra. Maria José da Silva Fernandes
Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Profa. Dra. Débora Amado Scerni

Data da defesa: 25-02-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado

Danyella Barbosa Dogini

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Débora Amado Scerni

2. Prof(a). Dr(a). Maria José da Silva Fernandes

3. Prof(a). Dr(a). Monica Barbosa De Melo

4. Prof(a). Dr(a). Maria De Fatima Sonati

5. Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/02/2010

Ao meu marido André, por continuar realizando meus sonhos,

A minha filha Lia, por existir,

Aos meus pais Evaldo e Ana Lúcia, pelo amor e apoio incondicionais

AGRADECIMENTOS

À Dra Iscia Lopes Cendes, por confiar em mim me dando o projeto de interferência por RNA nos camundongos com Huntington para estudar e depois, quando não foi mais possível continuar nesse projeto, confiou novamente me mostrando o mundo fascinante dos microRNAs.

Ao Dr. Tiago Campos Pereira, por facilitar minha entrada no laboratório, pelo fato de conhecer minha ex-orientadora, assim me indicando para a Dra Iscia. Pelos momentos preciosos de estudo e aprendizado, por sempre saber quais são as “novas” da *Nature* e *Science*, fazendo com que nós nos mantivéssemos atualizados; pelos primeiros dias no laboratório, pelas risadas e por sua amizade.

À Dra Cláudia Vianna Maurer-Morelli por compartilhar seus conhecimentos das epilepsias, pelas conversas, por estar sempre por perto para ouvir e aconselhar, por pegar os espécimes cirúrgicos quando eu não podia, por seu carinho e sincera amizade.

Ao pessoal do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela ajuda inestimável no meu primeiro projeto dos camundongos com Doença de Huntington: à Dra. Rosana Morandin, pela assistência e ensinamentos fundamentais no trato aos animais e na formulação e aplicação das anestésias; às técnicas Di (Edilene) e Li (Elizângela), pelo apoio e auxílio sem preço.

A todo o pessoal do laboratório de DNA, em especial à Luciana, pelas risadas, por ser sempre tão prestativa e por ter dado o primeiro presente da minha filha!!!

Aos meus grandes (e espero eu, para sempre!!!) amigos do RNAi, que propiciaram momentos tão únicos e divertidos. Ao Fábio Conte, por compartilhar seu detalhado e profundo conhecimento sobre a biologia molecular e por sua sincera amizade; ao Vinicius, por nos ensinar o significado real da palavra paciência; ao Oni (Rafael) por ser uma figura única; à Camila (Comela) pela ajuda com as células e pelas risadas; à Patrícia, pelas longas conversas, pela ajuda no começo do doutorado, pelas risadas e choros e a Mariana, que não é do RNAi, mas acha que é, pelas conversas e pela grande ajuda no fim da tese; às vocês duas, por acompanharem minha gravidez tão de perto me deixando mais tranquila e feito com que momentos tensos se tornassem momentos de muita risada.

Aos meus eternos amigos da graduação - Biologia/USP.

Ao André pela paciência eterna, pelo amor e por ter feito a Lia junto comigo!!

À minha família, Ana Lúcia, Evaldo, Danessa, Luciana e Raphael, que mesmo longe está tão perto!! À minha tia Rose e a minha avó Maria, pelo amor e carinho!!

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

SUMÁRIO

	<i>página</i>
<i>PREFÁCIO</i>	<i>19</i>
<i>RESUMO</i>	<i>23</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>27</i>
<i>CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica</i>	<i>31</i>
 <i>CAPÍTULO 2: artigo: MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development.</i>	 <i>97</i>
 <i>CAPÍTULO 3: Expressão de MicroRNAs em hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal.</i>	 <i>141</i>
 <i>CONCLUSÕES GERAIS</i>	 <i>199</i>
<i>ANEXO I</i>	<i>203</i>
<i>ANEXO II</i>	<i>207</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atrofia hipocampal
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Threshold Cycle</i> : Ciclo do limiar de detecção
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Drogas anti-epilépticas
DNA	ácido dextriribonucleico
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia lobo temporal
ELTL	Epilepsia lobo temporal lateral
ELTM	Epilepsia lobo temporal mesial
ELTME	Epilepsia lobo temporal mesial esporádica
ELTMF	Epilepsia lobo temporal mesial familiar
g	Gramma
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
Kb	Quilobase
L	Litro
miRNA	microRNA
miR	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificadores
nt	nucleotídeo

°C	Grau Celsius
pb	Pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
piRNA	piwiRNA
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
ra siRNA	repeat associated small interfering RNA)
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i> : Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA	ácido ribonucleico
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i>
siRNA	small interfering RNA
SNC	sistema nervoso central
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
UTR	<i>Untranslated region</i> : região não-traduzida
μ	Micro

PREFÁCIO

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de obtermos mais informações sobre o papel dos microRNAs (miRNAs) no sistema nervoso central em camundongos e em humanos.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores que regulam de modo sequência-específica e pos-transcricionalmente a expressão gênica por inibir a tradução ou por degradar o RNA mensageiro do gene alvo. Os miRNAs estão envolvidos em vários processos como diferenciação celular, apoptose e neurogênese. Muito pouco se conhece sobre o papel dos miRNAs nas doenças de origem neurológica e isso nos levou a pesquisar a importância desses pequenos RNAs reguladores no desenvolvimento do sistema nervoso central e na epilepsia de lobo temporal mesial.

No primeiro capítulo, apresentamos uma revisão bibliográfica detalhada sobre a descoberta dos miRNAs, bem como sobre sua biogênese. Mostramos o que a literatura nos apresenta sobre a função dos miRNAs em vários organismos e modulando vários processos biológicos.

No segundo capítulo são apresentados os resultados da investigação da regulação dos miRNAs durante o desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos, através do estudo de cérebros em diferentes idades. Esse trabalho gerou um artigo publicado no periódico *Journal of Molecular Neuroscience*.

No terceiro capítulo, mostramos os resultados de expressão dos miRNAs em tecido hipocampal de pacientes que sofreram cirurgia para controle de crises epiléticas refratárias à medicamentos e comparamos com tecido hipocampal obtido através de autópsia. No final da tese são apresentadas as conclusões gerais sobre os trabalhos.

Os estudos com miRNAs são recentes e mostram a grande variedade de processos nos quais eles estão envolvidos. Nossos estudos contribuem para esclarecer e acrescentar, provavelmente, mais uma função aos miRNAs: de reguladores de genes envolvidos no desenvolvimento e na epilepsia de lobo temporal.

RESUMO

MicroRNAs são moléculas recém-descobertas de RNA não-codificadores que possuem de 21 a 24 nucleotídeos e que regulam a expressão após a transcrição dos genes alvo. Essa regulação pode ser realizada através da inibição da tradução ou da degradação do RNA mensageiro. Os miRNAs estão envolvidos em vários processos biológicos como, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário, além de apresentarem expressão tecido e tempo-específica. Eles podem regular a expressão de pelo menos 1/3 de todos os genes humanos e estão envolvidos com a regulação do metabolismo e da apoptose. Os miRNAs são a chave como reguladores pós-transcricionais da neurogênese; estudos mostram que eles possuem a expressão associada com a transição entre proliferação e diferenciação e também tem expressão constitutiva em neurônios maduros, evidenciando o envolvimento dessas moléculas com o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Outros miRNAs estão sendo estudados e verifica-se que eles agem como reguladores de genes envolvidos em doenças como Alzheimer, Parkinson e, provavelmente, também devam possuir um papel na regulação das epilepsias. No primeiro trabalho, apresentado no segundo capítulo, investigamos o papel dos miRNAs no desenvolvimento do SNC através da quantificação de 104 miRNAs em cérebros em desenvolvimento de camundongos. No segundo trabalho, apresentado no terceiro capítulo, para analisarmos o papel dos miRNAs na epilepsia de lobo temporal, verificamos se havia presença de miRNAs com expressão diferenciada entre tecidos removidos de pacientes que se submeteram a cirurgia de hipocampectomia e tecidos normais provenientes de autópsias.

Para ambos os experimentos, foram extraídos os RNAs dos tecidos e quantificados por PCR em tempo real com o kit MicroRNA Assay baseado em iniciadores com estrutura em *stem loop*. Nos camundongos, análises de bioinformática encontraram quatro cluster de acordo com a expressão dos miRNAs. Um cluster (C1) com 12 miRNAs (miR-9; miR-17-5p; miR-124a; miR-125a; miR-125b; miR-130a; miR-140; miR-181a; miR-199a; miR-205; miR-214; miR-301) apresentou expressão com diferença significativa durante o desenvolvimento. Nos tecidos dos pacientes, após a análise de bioinformática, encontramos três miRNAs com expressão diferenciada entre pacientes e controle (miR-29b, miR-30d e let-7). Em ambos os experimentos analisamos os possíveis genes alvo desses miRNAs. Nos camundongos, nossos resultados sugerem a presença de um padrão específico de expressão no cluster C1, indicando que esses miRNAs possam ter um papel na regulação de genes envolvidos na neurogênese. Nos tecidos humanos, os genes alvo encontrados estão envolvidos, principalmente, em proliferação celular, neurogênese e apoptose, indicando uma provável atuação dos miRNAs na regulação de genes que estão envolvidos na epilepsia de lobo temporal.

ABSTRACT

MicroRNAs are a new class of small RNA molecules (21-24 nucleotide-long) that negatively regulate gene expression either by translational repression or target mRNA degradation. It is believed that about 30% of all human genes are targeted by these molecules. MiRNAs are involved in many important biological processes including cell differentiation, embryonic development and central nervous system formation, besides they showed specific temporal-space expression. They can regulate 1/3 of human genes and are involved in metabolism and apoptosis. miRNAs are the key as neurogenesis post-transcriptional regulation; studies previous indicates miRNA expression associate with proliferation and differentiation in development of central nervous system (CNS) and housekeeping expression in mature neurons. They are involved in several diseases as Alzheimer's and Parkinson and may have a role in epilepsy regulation. In second chapter, we analyze the miRNA expression in mouse brain during four stages of CNS development; in third chapter, we analyze hippocampal tissue of four patients who underwent selective resection of the mesial temporal structures for the treatment of clinically refractory seizures. In addition we used control samples from autopsy (n=4) for comparison. In both experiments, total RNA was isolated from tissues and used in real-time PCR reactions with TaqMan™ microRNA assays (Applied Biosystems) to quantify 104 (mouse brain) or 157 (human tissue) different miRNAs. In mouse brain analysis, we were able to identified four different clusters (C1, C2, C3 and C4) of miRNAs expression. Significant differences in expression during development were observed only in miRNAs included in C1. Our results suggest the presence of a specific expression pattern in C1, indicating that these miRNAs

could have an important role in gene regulation during neurogenesis. We found a significant decrease ($p < 0,05$) in expression of 12 miRNAs (miR-9; miR-17-5p; miR-124a; miR-125a; miR-125b; miR-130a; miR-140; miR-181a; miR-199a; miR-205; miR-214; miR-301) belonging to cluster C1 in latter stages of development. Computational target identification showed that 10 of the 12 miRNAs present in C1 could be involved in neurogenesis. In human tissues, bioinformatics analyzes identified three miRNAs species which were differently expressed in patients as compared to controls: let7a was over expressed in patients (4 fold increased), miR-29b and miR-30d were down-regulated in patients (2.5 fold and 0.5 fold decreased, respectively). Possible target genes for let-7a are *NME6* and *NCAM1* (which would be down-regulated in patients); for miR-29b is *MCL-1* and for miR30d are *CTNND2*, *LGII* and *SON* (which would be up-regulated in patients). We have identified three different miRNA species differently expressed in hippocampal sclerosis. Gene functions related to the possible miRNA targets are involved mainly with cell proliferation, neurogenesis, cell adhesion and apoptosis. Our results indicate new molecular targets which should be explored in additional studies addressing miRNA regulation in hippocampal sclerosis.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1.1 – RNAs não codificadores

Iniciado em 1990, o Projeto Genoma tinha como um dos objetivos identificar todos os genes da espécie humana (Collins *et al.*, 1998). O número estimado de genes era em torno de 100.000 ou mais e ao final do projeto, os dados revelaram a existência de 20.000 - 25.000 genes. Esses números representam 1,5% do genoma e revelou-se uma surpresa para todo o meio acadêmico. O restante do genoma, cerca de 98%, foi considerado “DNA-lixo”, pois era representado por regiões regulatórias ou geradoras de transcritos não codificadores de proteínas e assim não desempenhavam um papel importante nas células (Lander *et al.*, 2001). Essas conclusões se basearam no Dogma Central da Biologia Molecular (Crick, 1958), onde toda informação contida no DNA deve ser transcrita em RNA mensageiro (mRNA) e, posteriormente, ser traduzida em proteína. Assim, a questão era porque tanta informação em um genoma extenso, se essa informação não era utilizada? Já era de conhecimento acadêmico que os RNA eram divididos em duas classes: RNAs que eram traduzidos em proteínas e os RNAs não codificadores (ncRNAs), como o RNA transportador e o RNA ribossômico. Através do estudo denominado “RNômico experimental” verificou-se que os RNAs não codificadores são mais numerosos do que o esperado (Hüttenhofer *et al.*, 2005); através da análise desse estudo de *Escherichia coli* a *Homo sapiens* obteve-se vários ncRNAs, mas a função desses RNAs continuava incógnita. Através da figura 1 podemos verificar a porcentagem do genoma de vários organismos que corresponde a RNA transcrito e traduzido, RNA transcrito e não traduzido, predito para ser transcrito e sem evidência de transcrição (Hüttenhofer *et al.*, 2005).

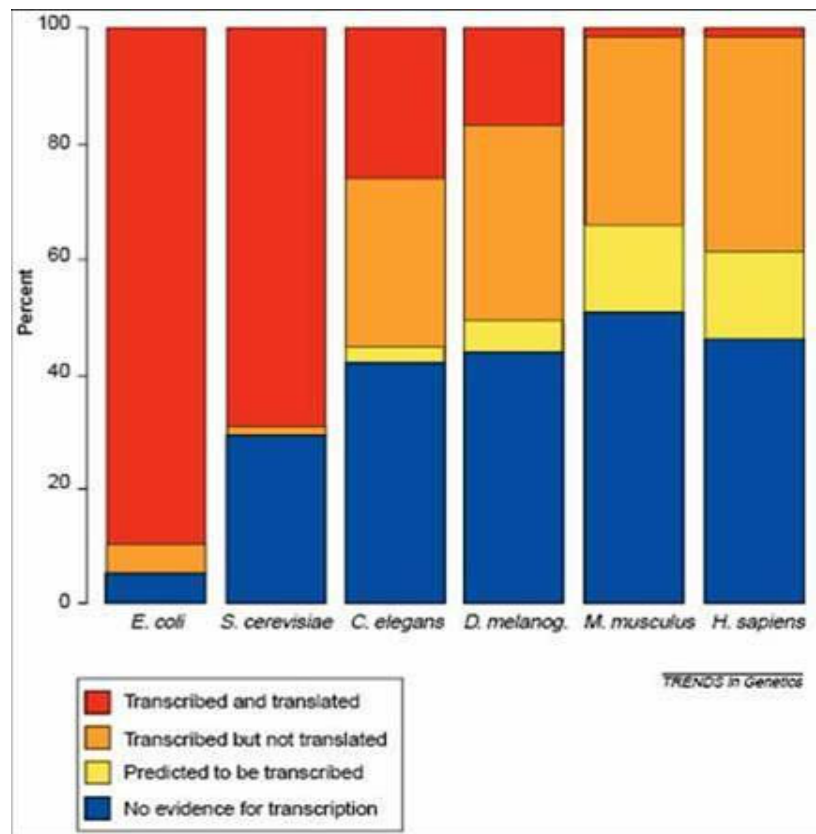


Figura 1: Divisão do genoma de vários organismos em porcentagem de acordo com a transcrição e tradução. Figura modificada de Hüttenhofer e colaboradores, 2005.

Os ncRNAs possuem de 21 a 100000 nucleotídeos (nt) e podemos dividi-los em longos ou grandes RNAs, como o RNA transportador, o RNA ribossômico e o XIST RNA e os pequenos RNAs (small ncRNAs), como os siRNA (*small interfering RNA*), o rasiRNA (*repeat associated small interfering RNA*), snoRNA (*small nucleolar RNA*), snRNA (*small nuclear RNA*), os piRNA (piwiRNA) e os miRNAs (microRNAs).

O XIST RNA possui 17kb e está envolvido no *start* para a inativação do cromossomo X (Pauler *et al.*, 2007). Esse RNA só é encontrado em determinado momento do desenvolvimento em células embrionárias iniciais e em progenitores específicos da hematopoiese (Pauler *et al.*, 2007).

Os siRNAs possuem cerca de 21nt e são produzidos pela quebra de duplas-fitas de RNA pela enzima DICER. Eles formam complexos com as proteínas argonautas e estão envolvidos na regulação gênica, controle de transposon e defesa contra vírus (Malone *et al.*, 2009; Ghildiyal *et al.*, 2009). Os rasiRNAs possuem cerca de 24-27nt e direcionam a formação da heterocromatina nos centrômeros (Theurkauf *et al.*, 2006; Josse *et al.*, 2007). Os snoRNAs possuem cerca de 80nt e guiam uridilações e/ou metilações sítio-específicas nos RNAs ribossômicos maduros (Dieci *et al.*, 2009; Taft *et al.*, 2009), mas há evidências que também possam desempenhar um papel como reguladores de gene (Matera *et al.*, 2007). Os snRNAs estão envolvidos com o complexo do spliciossomo (Tazi *et al.*, 2008; Peters e Robson, 2008) e catalisam a remoção de íntrons dos pré-RNA mensageiros (Valadkhan, 2005). Os piRNAs possuem de 26 a 30nt, são restritos a células germinativas e células somáticas que ficam ao redor das germinativas, são associados com as proteínas da classe PIWI da família das argonautas, regulam a atividade de transposon e o estado da cromatina (Malone *et al.*, 2009; Ghildiyal *et al.*, 2009) e tem sua expressão aumentada em mamíferos na fase de paquíteno (Megosh *et al.*, 2006). Os miRNAs serão objetos de estudo desse trabalho. A figura 2 apresenta a estrutura secundária de quatro RNAs: RNA mensageiro, RNA transportador, RNA ribossômico e de um microRNA, evidenciando a diferença de complexidade entre eles.

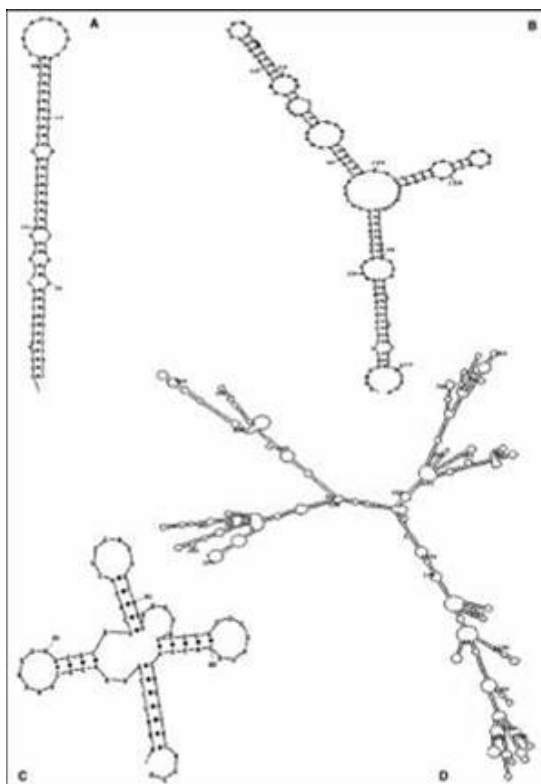


Figura 2: Estrutura secundária de: A) microRNA; B) RNA ribossômico; C) RNA transportador e D) RNA mensageiro.

1.2 – Descoberta dos microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não codificadores que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente de forma sequência – específica (Bartel, 2004).

Em 1993, Victor Ambros e colaboradores cultivando *Caenorhabditis elegans*, notaram uma linhagem mutante que perdia a capacidade de formar a vulva, assim como também apresentava falhas durante as fases de desenvolvimento de larva para o animal adulto. Quando esses mutantes geravam ovos, os mesmos não conseguiam sair e eclodiam

dentro do animal, o consumindo em seguida. Aprofundando os estudos sobre esses mutantes, Ambros e colaboradores denominaram o gene responsável pelas alterações de *lin-4* e verificaram que esse gene possuía dois transcritos, um mais abundante de 22nt e outro de 61nt, e não codificava proteína alguma, além de estar numa região intrônica do genoma do animal. Posteriormente, foi demonstrado pelo mesmo grupo, que o transcrito de 22nt pareava por complementaridade com a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14* e regulava de forma negativa a expressão deste gene. Esse gene codifica uma proteína nuclear que participa da regulação da transição do primeiro (L1) para o segundo (L2) estágio larval do *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993; Ruvkun e Giusto, 1989). Essa descoberta não teve muita repercussão, uma vez que os cientistas acreditavam ser característica somente de *C. elegans*. Em 2000, outro grupo clonou outro miRNA, também em *C. elegans*, denominado de *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000). Esse novo miRNA tinha a mesma característica de se parear à região 3'UTR, mas de outro gene, o *lin-41* e inibir sua tradução. A sequência do *let-7* mostrou-se ser altamente conservada na maioria dos organismos (Pasquinelli *et al.*, 2000), o que evidenciava a não exclusividade dos miRNAs aos nematóides.

Agora se sabe da importância desses pequenos RNAs não codificadores e de sua existência em insetos e mamíferos (Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Ambros *et al.*, 2003; Mattick, 2005). Atualmente, o banco de dados de miRNAs registra mais de 10.000 sequências descritas em 32 organismos entre vertebrados, invertebrados, plantas e vírus (<http://www.mirbase.org/>).

1.3- Biogênese dos miRNAs

A maioria dos miRNAs está em regiões intergênicas (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001), mas cerca de 25% dos miRNAs descritos em humanos estão localizados em íntrons de pré-RNA mensageiros e no mesmo sentido de transcrição, isto é, esses miRNAs podem utilizar a região promotora destes RNAs mensageiros para serem transcritos (Aravin *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003).

A via utilizada para a biogênese dos miRNAs para regular a tradução e/ou pós-transcrição dos mRNAs é a via utilizada pelas células como defesa contra ácidos nucleicos intrusos, ou seja, a via de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Fire *et al.*, 1998), onde fitas duplas de RNAs (dsRNA) levam a clivagem ou inibição da tradução de RNAs mensageiros (Hamilton e Baulcombe, 1999). Esses dsRNAs são clivados em moléculas menores, denominadas *small interfering RNA* (siRNA) e esses siRNAs agrupados ao complexo protéico RISC leva ao silenciamento gênico. Foi de extrema importância o conhecimento da via de silenciamento gênico dos siRNAs para o entendimento mais profundo da atuação dos miRNAs.

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II a partir de genes MIRs em moléculas com estrutura em *hairpins* (figura 3, parte A) denominados pri-miR. Assim como os RNAs mensageiros, esses transcritos sofrem o capeamento da extremidade 5' e poliadenilação da extremidade 3' (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002; Kim, 2005). Diferente da maioria dos RNAs, a maturação dos miRNAs começa no núcleo e termina no citoplasma. Em animais, o processamento no núcleo começa com a atividade endonucleolítica da DROSHA, uma enzima tipo RNase III, que em associação com

PASHA (Lee *et al.*, 2003), reconhece a estrutura *hairpin* do pri-miR e o cliva gerando o pré-miR que possui de 60nt a 70nt (figura 3, parte B). Através da Exportina-5 e do co-fator Ran-GTP (Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2006) os pré-miRs são transportados para o citoplasma (figura 3, parte C) onde são clivados pela enzima DICER (figura 3, parte D), que gera dímeros de miRNAs com 22nt denominados miRNA:miRNA* (Hutvagner *et al.*, 2001). Mamíferos, normalmente, codificam um único tipo de DICER para gerar várias classes de pequenos RNAs; a exceção são as drosófilas e *C. elegans* que codificam dois tipos de DICER cada (Lee *et al.*, 2004). Por outro lado, as plantas precisam de várias DICERs. Por exemplo, *Arabidopsis* e arroz possuem quatro e seis diferentes DICER-like (Dcl), respectivamente. Em *Arabidopsis*, Dcl 2, 3, 4 estão envolvidas na formação de diferentes espécies de siRNAs enquanto a Dcl 1 é unicamente responsável pela biogênese dos miRNAs. (Bernstein *et al.*, 2001). A atividade de cada DICER produz siRNAs com tamanho específicos, por exemplo, Dcl2, Dcl3 e Dcl4 formam siRNAs com 22, 24 e 21nt, respectivamente (Deleris *et al.*, 2006; Blevins *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2005).

As clivagens realizadas pela DROSHA e pela DICER definem as extremidades do dímero miRNA:miRNA*; a fita que possuir a menor energia livre na extremidade 5' será incorporada pelo complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex), a outra fita será degradada (Khvorova *et al.*, 2003). O miRNA incorporado a estrutura RISC é guiado para o RNA mensageiro que contenha sequências complementares; se o pareamento for completo haverá a clivagem do mRNA, se o pareamento for parcial, haverá a inibição da tradução (Cannell *et al.*, 2008).

Um dos aspectos mais interessantes é observar que um microRNA pode regular a transcrição de vários mRNAs e um mRNA pode ter sua transcrição regulada por vários

miRNAs (Yanaihara *et al.* 2006). Em *C. elegans*, por exemplo, o miRNA lin-4 além de regular a expressão do gene lin-14, também regula a expressão do gene heterocrônico lin-28. Homólogos desse gene existem em animais, como camundongo e humanos. E esse gene é alvo dos miRNAs miR-125a e let-7b (Moss e Tang, 2003).

Uma das primeiras funções associada aos microRNA foi como reguladores do *timing* do desenvolvimento. Como descrito acima, o primeiro miRNA descoberto foi o lin-4 como um pequeno RNA que tem complementaridade com o gene lin-14 (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). A regulação pós-transcricional de maneira negativa do lin-14 pelo miRNA lin-4 é essencial para a formação de um gradiente temporal da proteína Lin-14 para garantir a correta transição entre os estágios larvais de *C. elegans*. O segundo miRNA descoberto, o let-7, também mostrou-se como um controlador-chave no padrão de desenvolvimento temporal em *C. elegans* (Abrahante *et al.*, 2003; Grosshans *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2003); outros miRNA pertencentes a família do let-7 desempenham um papel no controle da via do destino celular (Li *et al.*, 2005).

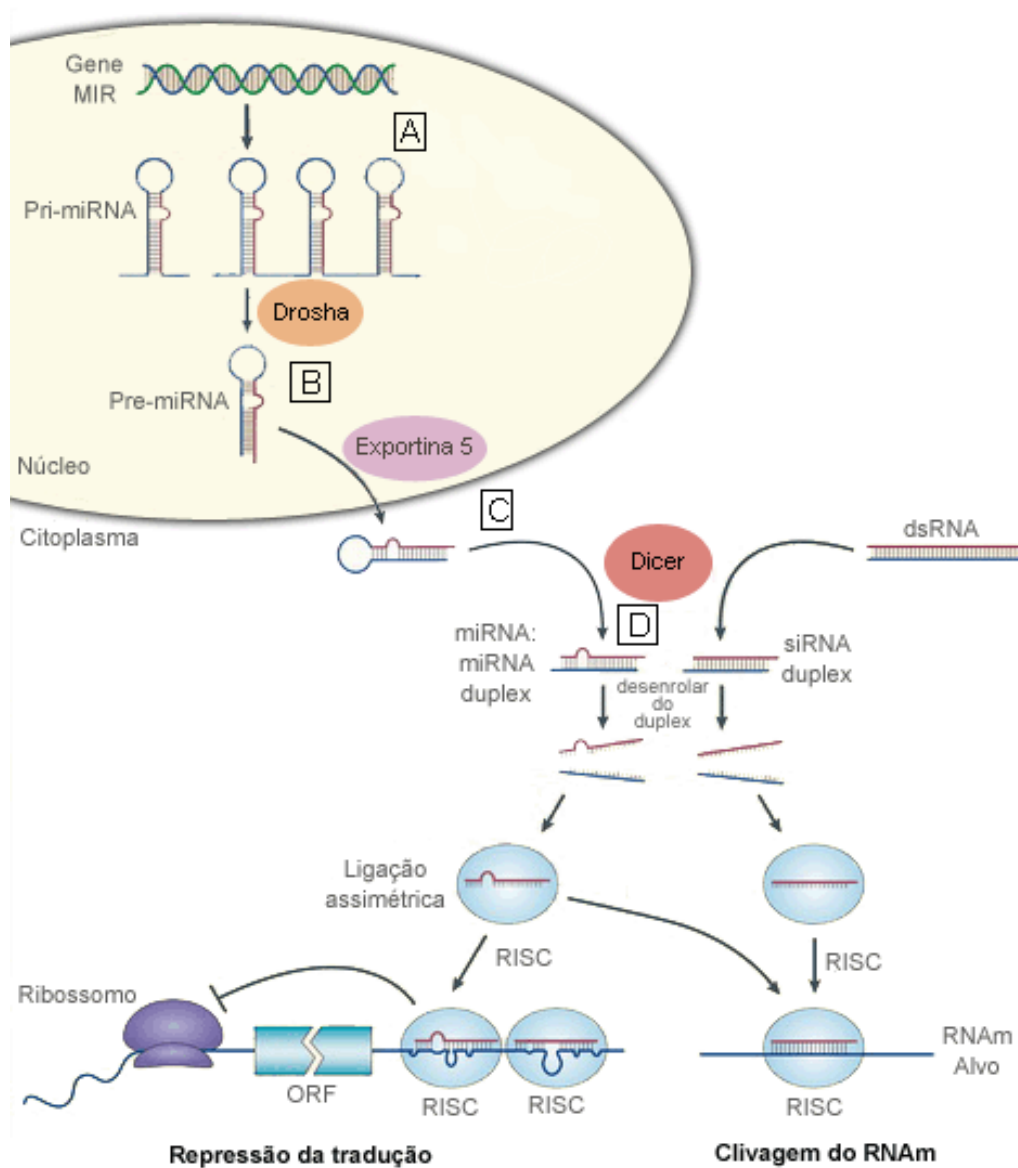


Figura 3: Biogênese dos microRNAs. A) Transcrição do gene MIR gerando o pri-miRNA com estrutura secundária em *hairpin*; B) Formação do pré-miRNA pela clivagem do pri-miRNA pela DROSHA; C) Transporte do pré-miRNA pela exportina-5 para o citoplasma; D) Clivagem pela DICER dos pré-miRNAs formando o complexo miRNA:miRNA*.

Recentemente, um novo e emergente conceito para a biogênese dos miRNAs vem sendo proposto em animais. Nesse novo modelo, sequências de íntrons são capazes de produzir miRNAs. Essa hipótese surgiu através da análise derivada de *pool* de sequências de células em fase S2 do ciclo celular de drosófilas, onde alguns duplex miR:miR* foram mapeados. MiRNAs originados de íntrons são denominados mírtrons (Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007). Catorze miRNAs de drosófilas e quatro miRNAs de *C. elegans* foram identificados até agora. Sabe-se que tanto o gene que codifica proteína como os que não codificam possuem íntrons, então é suposto que mais de 80% dos miRNAs sejam derivados dessas sequências (Rodriguez *et al.*, 2004; Kim e Kim, 2007).

A formação de mírtrons diferencia-se da biogênese conhecida dos miRNAs, principalmente, por ela não utilizar as proteínas DROSHAs, que removem as sequências próximas à região principal do pri-miRNA (Han *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Esse achado vai na contra-mão das observações correntes onde a enzima DROSHA foi demonstrada por agir no íntron antes do seu *splicing* (Kim e Kim, 2007). Estudos com expressão demonstram que íntrons podem originar miRNA maduros, assim como os genes dos miRNAs. Além disso, assim como os miRNAs, os mírtrons precisam de AGO 1 para maturação e têm a expressão específica para cada tipo de célula (Okamura *et al.*, 2007).

1.4- Função dos miRNAs

Os miRNAs apresentam expressão tecido e tempo-específica, ou seja, eles têm suas funções específicas em determinadas órgãos e tecidos e em determinadas épocas do desenvolvimento (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Mehler e Mattick, 2006; Schratt *et al.*, 2006). Os miRNAs podem regular a expressão de pelo menos 1/3 de todos os genes humanos e são conhecidos por terem grande importância em uma variedade de processos biológicos incluindo: regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário entre outros (Ketling *et al.*, 2001; Ambros, 2004; Bartel, 2004; Wienholds e Plasterk, 2005; Wienholds *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). Os miRNAs estão, frequentemente, associados a regulação do câncer em humanos (Lu *et al.* 2008; Volinia *et al.* 2006) e podem ativar tanto potenciais oncogenes como genes supressores de tumores (Esquela-Kersher *et al.* 2006).

Por serem altamente conservados e terem um padrão de expressão específico, fica claro que os miRNAs desempenham um papel importante no desenvolvimento e, certamente, animais sem miRNAs não conseguiriam viver ou se reproduzir. (Bernstein, *et al.* 2003 Ketling *et al.*, 2001; Wienhold *et al.*, 2003). Camundongos deficientes em DICER morrem com sete dias e meio de vida embrionária e perdem a pluripotência de suas células-tronco (Bernstein *et al.*, 2003). Experimentos com drosófilas mutantes em DICER-1 mostram que a via dos miRNAs é essencial para a divisão celular e para a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Hatfield *et al.*, 2005).

Há evidências do envolvimento dos miRNAs no metabolismo e na apoptose. Em moscas, o miRNA *bantam* acelera a proliferação e previne a apoptose através da regulação

do gene proapoptótico *hid* (Brennecke *et al.*, 2003). Similarmente, há o miR-14 que é um supressor da morte celular, embora seu alvo ainda não seja conhecido. Entretanto, em moscas mutantes do miR-14 há o aparecimento de outro fenótipo: elas são obesas e têm elevado nível de triacilglicerol, evidenciando o papel desse miRNA no metabolismo de gorduras (Xu *et al.*, 2003). Em vertebrados, o miR-375 é expresso nas ilhotas pancreáticas e suprime a secreção de insulina que é induzida pela glicose (Poy *et al.*, 2004). Outro papel importante desempenhado pelos miRNAs está no seu envolvimento na miogênese e na cardiogênese. O miR-1 tem sua sequência conservada desde vermes até mamíferos; ele é altamente expresso nos músculos de moscas e nos músculos e coração de camundongos (Aboobaker *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Mas, de forma interessante, o efeito *knockdown* desse miRNA em *Drosophila* não afeta a formação e a função da musculatura larval, mas a má formação dos músculos e a morte é provocada somente durante o crescimento, no animal já adulto (Sokol e Ambros, 2005). Assim, alguns miRNAs podem não ser essenciais para a formação de um tipo de tecido, mas são fundamentais para o subsequente crescimento e manutenção do mesmo.

Os estudos sobre miRNAs começaram com mais força em pesquisas relacionadas ao câncer. Uma das evidências iniciais de que os miRNAs desempenhavam um papel junto aos oncogenes, veio dos estudos em leucemia linfocítica crônica. (Calin *et al.*, 2002). Estudos seguintes, mostram que uma característica comum dos miRNAs humanos é sua localização em regiões do genoma envolvidas no câncer, como regiões de *breakpoint* e sítios frágeis (Calin *et al.*, 2004). Depois de vários estudos, ficou claro que a expressão diferencial dos miRNAs está associada com a formação do tumor (Calin *et al.*, 2004, 2005; Michael *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005). Lu e colaboradores verificaram em 2005 que tanto o estado de

diferenciação quanto a linhagem de desenvolvimento do tumor são refletidos no padrão de expressão dos miRNAs; outro achado interessante desse estudo foi a evidência de que a maioria dos miRNAs têm seus níveis de expressão baixo nos tecidos com o tumor em relação aos tecidos normais. Pode-se dizer que a redução dos níveis de expressão dos miRNAs está associada com a perda da diferenciação celular (Calin *et al.*, 2004).

1.5 – Os miRNAs no Sistema Nervoso Central (SNC)

O sistema nervoso central é um dos sistemas mais complexos do corpo humano. Para entender o SNC, cientistas vêm investigando uma variedade de moléculas como, proteínas, lipídeos e várias pequenas moléculas. A origem da diversidade celular durante o desenvolvimento requer coordenação da regulação da expressão gênica tanto positiva como negativamente em nível pós-transcricional (Wienholds e Plasterk, 2005; Kloosterman e Plasterk, 2006). Assim, é aceitável dizer que os miRNAs atuam de forma temporal-espacial no padrão de expressão gênica e possivelmente desempenham um papel importante na morfogênese do cérebro e no destino das células nervosas, processos que são chaves no desenvolvimento do sistema nervoso central (Mansfield *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004; Vo *et al.*, 2005; Krichevsky *et al.*, 2003; Krichevsky *et al.*, 2006; Conaco *et al.*, 2006; Wulczyn *et al.*, 2007).

A neurogênese é definida como um processo no qual há a proliferação das células precursoras e diferenciação dessas células em neurônios que são capazes de se conectar num circuito nervoso funcional. Depois de completado o desenvolvimento embrionário inicial, a neurogênese fica restrita à zona subventricular dos ventrículos laterais e à zona subgranular do hipocampo (Keller 2005; Zhao *et al.* 2008a). A presença da neurogênese nessas duas regiões persiste durante a idade adulta e tem sido demonstrada em muitas espécies incluindo os primatas (Kornack and Rakic 2001; Pencea *et al.* 2001) e humanos (Curtis *et al.* 2007; Eriksson *et al.* 1998).

Os três principais tipos de células no SNC são originados a partir das células-tronco neurais numa sequência temporal definida, iniciada pelo aparecimento dos neurônios, seguidos dos astrócitos e então dos oligodendrócitos (Temple, 2001). Células-tronco neurais são encontradas em várias regiões do cérebro (Palmer *et al.*, 1997). Vários estudos vêm sendo realizados para mostrar o controle molecular dessa sequência. Fatores de transcrição (Gritti *et al.* 1999) e metilação do DNA (Shimozaki *et al.* 2005) são alguns elementos que estão envolvidos nesse processo. Experimentos sugerem que as células-troncos neurais são originadas, na sua maioria, a partir do neuroepitélio embrionário.

Vários estímulos intrínsecos e extrínsecos podem afetar a neurogênese, como: hormônios, (Cameron *et al.* 1998), fatores de transcrição como o Tlx (Shi *et al.* 2004) e Sox2 (Ferri *et al.* 2004; Graham *et al.* 2003) e doenças incluindo as epilepsias (Parent *et al.* 1997), acidente vascular-cerebral (AVC) (Jin *et al.* 2006; Sun *et al.* 2005) e depressão (Kempermann and Kronenberg 2003).

Em uma revisão realizada por Liu e Zhao em 2009, eles relatam que nos últimos anos, vários RNAs não codificadores foram identificados no cérebro e exibem diversos papéis no desenvolvimento e nas funções do cérebro normal. Entre eles, os miRNAs são os melhores estudados e, provavelmente, são a chave como reguladores pós-transcricionais da neurogênese. A supressão da biogênese dos miRNAs pelo *knockdown* da enzima DICER em *zebrafish* é a primeira evidência de que os miRNAs são necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central. (Giraldez *et al.*, 2005). Um grande número de miRNAs foi isolado do cérebro e de linhagens de células neuronais (Lagos-Quintana *et al.* 2002). Experimentos usando *zebrafish* como modelo mostram que os miRNAs têm uma diversidade de padrão de expressão em células neuronais, incluindo a expressão em

precursores neuronais (como o miR-92b); expressão associada com a transição entre proliferação e diferenciação e expressão constitutiva em neurônios maduros (como o miR-124) e expressão específica por tipo de célula (como o miR-218a que tem a expressão predominantemente em neurônios motores; miR-26 e o miR-29 com expressão nos astrócitos) (Kapsimali *et al.* 2007). Estudos confirmam a presença de miRNAs específicos do sistema nervoso central como o miR-29b, que pertence a uma família de miRNAs que está ausente nos tecidos embrionários, mas é altamente expresso no córtex adulto. Muitos desses miRNAs estão envolvidos com polirribossomos, sugerindo uma ligação no envolvimento desses miRNAs com a regulação de proteínas associadas à tradução (Fiore *et al.* 2008).

Kawase-Koga e colaboradores (2009) mostraram em cultura de células humanas, que a retirada da função dos miRNAs, através da deleção de DICER, afeta a sobrevivência e diferenciação dos progenitores cortical resultando em paredes corticais estreitas e ventrículos largos; o mesmo experimento realizado em camundongos, mostrou que os oligodendrócitos no cordão espinal ficaram muito reduzidos durante o estágio de gliogênese final. Assim esses resultados identificam o papel essencial da DICER no desenvolvimento do SNC. Recentemente, Maller Schulman e colaboradores verificaram que a perda do gene alvo do let-7, o *Mlin-41*, causa defeitos no tubo neural em camundongos, indicando um papel no fechamento do tubo neural nesse modelo animal (Maller Schulman *et al.*, 2008)

Uma revisão atualizada feita por Kocerha e colaboradores (2009) menciona que alterações na expressão dos miRNAs podem ter consequências diretas nas doenças ou podem acontecer como resultado da perda da especificidade de uma população de células

(Wang *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2007). A expressão alterada de miRNAs tem sido observada na Doença de Alzheimer (Cogswell *et al.*, 2008), na doença de Parkinson (Wang *et al.*, 2008b), na doença de Huntington (Packer *et al.*, 2008) e em neurodegenerações induzidas por príons (Saba *et al.*, 2008). Vários estudos têm se concentrado na regulação de miRNAs específicos na Doença de Alzheimer (DA). Em um dos trabalhos, Lukiw e colaboradores (2008) verificaram que o miRNA miR-146a (que apresenta alta expressão no cérebro) tem a expressão aumentada em cérebros com DA e essa regulação é mediada pela cascata do sinalizador NF- κ B. Respostas inflamatórias como essa mediada pela cascata de sinalização NF- κ B é uma patologia clássica característica de cérebros com DA (Sastre *et al.*, 2008). Foi mostrado que o miR-146a pode influenciar na resposta inflamatória presente na doença pela ligação à região 3'UTR do RNAm do fator complemento H (CFH). Esse fator tem sua expressão significativamente reprimida em células neurais humanas injuriadas com peróxido de hidrogênio, uma substância química produzida durante a resposta inflamatória.

Um estudo recente montou um perfil com 224 miRNAs de cérebros de pacientes com doença de Parkinson e encontrou vários miRNAs com expressão alterada, consistente com um grande papel desempenhado pelos miRNAs na função e patogênese do sistema nervoso central (Kim *et al.*, 2007). O miRNA miR-133b, que tem expressão elevada em neurônios do mesencéfalo, foi identificado como um dos miRNAs com expressão significativamente reduzida em tecidos de pacientes com doença de Parkinson. Um estudo recente indica que o miRNA miR-9 e miR-29a são expressos diferentemente em cérebros de pacientes que faleceram pela doença de Huntington (Packer *et al.*, 2008).

Outros processos relacionados às doenças, como inflamação, também alteram a expressão dos miRNAs e podem ser um caminho para terapia mediada por manipulação desses miRNAs (Urbich *et al.*, 2008; Sheedy *et al.*, 2008). Doenças como depressão e distúrbios mentais como esquizofrenia também parecem envolver alterações da expressão de miRNAs (Beveridge *et al.*, 2008). Nesse estudo, o miR-181b tem a expressão elevada nos tecidos analisados e esse miRNA pode regular a expressão de vários genes alvo com potencial significativo para o desenvolvimento da doença.

Até o presente momento, não temos conhecimento de estudos na área das epilepsias com presença de atrofia hipocampal e sua regulação pelos miRNAs. Nosso grupo estuda pacientes com epilepsia de lobo temporal com especial interesse nos pacientes que apresentam refratariedade medicamentosa e são submetidos à cirurgia de remoção do hipocampo para controle das crises.

1.6 - Referências bibliográficas

Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM, Lai EC. Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005; USA 102, 18017–18022.

Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE. The Caenorhabditis elegans hunchback- like gene lin-57/hbl-1 controls developmental time and is regulated by microRNAs. Dev. Cell 2003; 4, 625–637.

Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell. 2001; 107(7):823-6.

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, *et al.* A uniform system for microRNA annotation. RNA. 2003; 9(3):277-9.

Ambros, V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004; 431:350-355.

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, *et al.* The small RNA profile during Drosophila melanogaster development. Dev Cell. 2003; 5(2):337-50.

Beveridge NJ, Tooney PA, Carroll AP, Gardiner E, Bowden N, Scott RJ, Tran N, Dedova I, Cairns MJ. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. Hum Mol Genet 2008; 17(8):1156–68.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and functions. Cell, 2004; 23:281-297.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001; 409: 363-366.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, *et al.* DICER is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 2003; 35, 215–217.

Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS. *et al.* Four plant DICERs mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(21):6233-46

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated micro-RNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell.* 2003; 113, 25–36.

Cai X, Hagedorn C, Cullen B. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004; 10(12):1957-66

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99, 15524–15529.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD. *et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101, 11755–11760.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE *et al.* A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353, 1793–1801.

Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience.* 1998; 82, 349–354

Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 6):1224-31.

Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science.* 1998; 282(5389):682-9.

Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(7):2422-2427.

Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, *et al.* Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis.* 2008; 14(1):27-41.

Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958; 12:138-63.

Curtis MA, Kam M, Nannmark U., Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C *et al.* Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science.* 2007; 315, 1243-1249.

Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant DICER-like proteins in antiviral defense. *Science.* 2006;303(5783):68-71.

Dieci G, Preti M, Montanini B. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics.* 2009; 94(2):83-8.

Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P *et al.* Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS* 2008; ONE, 3, e1959.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. 1998; 4, 1313–1317.

Ferri ALM, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, *et al.* Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 2004; 131, 3805–3819.

Fiore R, Siegel G, Schratt G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*. 2008; 1779, 471–478.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669):806-11.

Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 2009;10:94–108.

Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S *et al.* MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*. 2005; 308, 833–838.

Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 2003; 39, 749–765.

Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF *et al.* Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19, 3287–3297.

Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, Gerstein M, Slack FJ. The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev. Cell*. 2005; 8, 321–330.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional genesilencing in plants. *Science*. 1999; 286(5441):950-2.

Han J, Lee Y, Yeom KH. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the DROSHA-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887-901

Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*. 2005; 435, 974–978.

Hutchison ER, Okun E, Mattson MP. The therapeutic potential of microRNAs in nervous system damage, degeneration, and repair. *Neuromolecular Med*. 2009;11(3):153-61.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme DICER in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001; 293(5531):834-8.

Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends in Genetics* 2005; 21(5):289-97.

Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M *et al.* Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*. 2008; 11, 1153–1161.

Jin KL, Wang XM, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y *et al.* (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103, 13198–13202.

Josse T, Teyssset L, Todeschini AL, Sidor CM, Anxolabéhère D, Ronsseray S. Telomeric trans-silencing: an epigenetic repression combining RNA silencing and heterochromatin formation. *PLoS Genet.* 2007; 3(9):1633-43.

Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes and Development.* 2005; 19, 1129–1155.

Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RHA, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biology.* 2007; 8, R173.

Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T. Different timings of DICER deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn.* 2009 Nov;238(11):2800-12.

Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons—Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biological Psychiatry.* 2003; 54, 499–503.

Ketting R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. DICER functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001; 15, 2654–2659.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003; 115(2):209-16.

Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, *et al.* A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science.* 2008; 317, 1220–1224.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 2007;26(3):775-83

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(5):376-85.

Kloosterman WP and Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. Dev Cell. 2006 11(4):441-450.

Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C. microRNAs in CNS disorders. Neuromolecular Med. 2009;11(3):162-72.

Kornack DR and Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. Proc. Nat. Acad. Sci.USA. 2001; 98, 4752–4757.

Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. RNA. 2003; 9(10):1274-1281.

Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. Stem Cells. 2006; 24(4):857-864.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001; 294(5543):853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, & Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Current Biology. 2002; 12, 735–739.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. RNA. 2003; 9(2):175-9.

Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of Drosophila microRNA genes. Genome Biol. 2003; 4(7):R42.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822):860-921. International Human Genome Sequencing Consortium.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 294(5543):858-62.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002; 21(17):4663-70.

Lee Y, Ahn C, Han J. *et al.* The nuclear RNase III DROSHA initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956):415-9.

Lee YS, Nakahara K, Pham JW. *et al.* Distinct roles for *Drosophila* DICER-1 and DICER-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117(1):69-81

Lin SY, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, *et al.* The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev. Cell*. 2003; 4, 639–650.

Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, Bartel DP, Rougvie AE. Regulatory mutations of *mir-48*, a *C. elegans* *let-7* family microRNA, cause developmental timing defects. *Dev. Cell*. 2005; 9, 415–422.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437-41.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005; Jul;7(7):719-23.

Liu C e Zhao X. MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis. *Neuromolecular Med.* 2009;11(3):141-52.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435, 834–838.

Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH & LI Y 2008. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene.* 31 4373-4379.

Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2008; 283, 31315–31322.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004;303(5654):95-8.

Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, Slack FJ. The let-7 microRNA target gene, Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle.* 2008;7, 3935–3942.

Malone C, Hannon G. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* 2009;136:656–668.

Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenauer J, Srineel J, Chaudhuri *et al.* MicroRNA-responsive ‘sensor’ transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet.* 2004; 36(10):1079-1083.

Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:209–220.

Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 Spec No 1:R121-32.

Mehler MF, Mattick JS. Non-coding RNAs in the nervous system. *J Physiol.* 2006; 575:333-41.

Megosh HB, Cox DN, Campbell C, Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol.* 2006; 16(19):1884-94.

Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003; 1, 882–891.

Moss EG and Tang, L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev. Biol.* 2003; 258, 432–442.

Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq. QMR. The Fascinating World of RNA Interference. *Int J Biol Sci* 2009; 5:97-117.

Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP: mRNA association in polyribosome in a human neuronal cell line. *RNA.* 2004; 10(3):387-394.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *drosophila*. *Cell.* 2007;130(1):1-12.

Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2008; 28(53):14341–6.

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1997;8, 389–404.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 1997; 17, 3727–3738.

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*. 2000; 408(6808):86-9.

Pauler FM, Koerner MV, Barlow DP. Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? *Trends Genet*. 2007; 23(6):284-92.

Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental Neurology*. 2001; 172, 1–16.

Peters J, Robson JE. Imprinted noncoding RNAs. *Mamm Genome*. 2008; 19(7-8):493-502.

Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*. 2007; 26(5):611-623.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000; 403(6772):901-6.

Rodriguez A, Griffith-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(104):1902-10

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass DROSHA processing. *Nature.* 2007;448(7149):83-6

Ruvkun G, Giusto J. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature.* 1989; 338(6213):313-9.

Sastre M, Walter J, Gentleman SM. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *Journal of Neuroinflammation.* 2008; 5: 25.

Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 2006; 439(7074):283-9.

Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2008 Dec;67:iii50–5.

Shi YH, Lie DC, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT. *et al.* Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature.* 2004; 427: 78–83.

Shibata S, Sasaki M, Miki T. *et al.* Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(17):4711-21

Shimozaki K, Namihira M, Nakashima K, Taga T. Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *Journal of Neurochemistry.* 2005; 93: 432–439.

Sokol NS, Ambros V.. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* 2005; 19: 2343–2354.

Sun YJ, Jin KL, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2005; 25: 485–492.

Taft RJ, Glazov EA, Lassmann T, Hayashizaki Y, Carninci P, Mattick JS. Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA.* 2009; 15(7):1233-40.

Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(1):14-26.

Temple S. The development of neural stem cells. *Nature.* 2001; 414: 112–117.

Theurkauf WE, Klattenhoff C, Bratu DP, McGinnis-Schultz N, Koppetsch BS, Cook HA. rasiRNAs, DNA damage, and embryonic axis specification. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:171-80.

Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 79(4):581–8.

Valadkhan S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; 9, 603–608.

Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(45):16426-16431.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 2257–2261.

Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, *et al.* The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci*. 2008a; 28:1213–1223.

Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Züchner S, Scott WK, *et al.* Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet*. 2008b;82:283–289.

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2007;39(3):380-5

Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS*. 2005; 597(26):5911-5922.

Wienholds E, Koudijs MJ, van Eeden FJ, Cuppen E, Plasterk, RH. The microRNA-producing enzyme DICER1 is essential for zebrafish development. *Nat. Genet*. 2003; 35, 217–218.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75, 855–862.

Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, *et al.* Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *FASEB J*. 1997; 21(2):415-426.

Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC. DICER-like 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(36):12984- 9.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol*. 2003; 13: 790–795.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumanoto K, Yi M, *et al*. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006; 9:189-198.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; 17(24):3011-6.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005; 436: 214–220.

Zhao CM, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008; 132:645–660.

CAPÍTULO 2

MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development

Artigo publicado no
Journal of Molecular Neuroscience

J Mol Neurosci
DOI 10.1007/s12031-008-9068-4

MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development

Danyella B. Dogini • Patrícia A. O. Ribeiro •
Cristiane Rocha • Tiago C. Pereira • Iscia Lopes-Cendes

Received: 20 February 2008 / Accepted: 13 March 2008
© Humana Press 2008

MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development

Danyella B. Dogini, Patrícia A. O. Ribeiro, Cristiane Rocha, Tiago C. Pereira and Iscia

Lopes-Cendes

Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Running Title: miRNA Expression profile during brain development

Corresponding author:
Ischia Lopes-Cendes, MD, PhD.
Associate Professor
Department of Medical Genetics
Faculty of Medical Sciences
University of Campinas – UNICAMP
Tessália Vieira de Camargo, 126
Campinas, SP, BRAZIL 13084-971
Tel: +55 19 3521 8907
Fax: +55 19 3289 1818
E-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression in a post-transcriptional sequence-specific manner. In order to better understand the possible role of miRNAs in central nervous system (CNS) development, we examined the expression profile of 104 miRNAs during murine brain development. We obtained brain samples from animals at embryonic days (E) E15, E17 and postnatal days (P) P1 and P7. Total RNA was isolated from tissue and used to obtain mature miRNAs by reverse transcription. Our results indicate that there is a group of 12 miRNAs that show a distinct expression profile, with the highest expression during embryonic stages and decreasing significantly during development. This profile suggests key roles in processes occurring during early CNS development.

Keywords: miRNA, quantitative RT-PCR, mouse, brain development.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small endogenous noncoding RNAs that negatively regulate gene expression in a post-transcriptional sequence-specific manner (Bartel *et al.*, 2004). In drosophila, miRNAs associate with argonaute proteins in complexes that repress protein synthesis by a double interaction with target messenger RNA (Peters and Meister, 2007). MiRNAs are predicted to regulate expression of at least one-third of all human genes and are known to be of great importance in a wide variety of biological processes, including cell cycle regulation, apoptosis, cell differentiation, maintenance of stemness and imprinting (Ketling *et al.*, 2001; Ambros, 2004; Bartel, 2004; Wienholds and Plasterk, 2005; Wienholds *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004).

Generation of cellular diversity during development requires coordination of gene expression mediated by both positive and negative post-transcriptional regulation (Wienholds and Plasterk, 2005; Kloosterman and Plasterk, 2006). Therefore, it is reasonable to predict that miRNAs characteristic temporal- and spatial-restricted expression pattern probably plays a role in brain morphogenesis and neuronal fate, which are key biological processes in central nervous system (CNS) development (Mansfield *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004; Vo *et al.*, 2005; Krichevsky *et al.*, 2003; Krichevsky *et al.*, 2006; Conaco *et al.*, 2006).

In order to investigate the possible role of miRNAs in murine CNS development, we examined the expression profile of 104 miRNAs during this process.

MATERIALS AND METHODS

Programmed matings were carried out using specific pathogen free BALB/c/UNI mice (*Mus musculus*), in order to obtain embryos at specific developmental stages. Brains of three animals at the following ages were collected and frozen in liquid nitrogen: embryonic day (E) E15, E17, postnatal day (P) P1 and P7. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the University of Campinas (Campinas, Brazil).

Total RNA was isolated from tissue using Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) and pools of three samples were used for each age studied. We obtained mature miRNAs by stem-loop reverse transcription as previously described (Chen *et al.*, 2005), using the Human Panel Early Access™ kit (Applied Biosystems - Foster City, USA), which contains 104 of the 489 miRNAs listed in Sanger miRBase database (www.microrna.sanger.ac.uk). This kit uses stem-loop primers to produce cDNAs from each expressed miRNA, by annealing to their specific 7-nucleotide seed regions. The *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) gene was used as an endogenous control and all experiments were performed in duplicates. An overview of the methodology is illustrated in figure 1.

The relative quantification (RQ) of the miRNAs expression was calculated by the comparative threshold cycle, which is determined using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). The values of relative gene expression were dispersed in a Gauss curve and the ANOVA test was used to access differences in gene expression among different developmental stages. Statistical analysis was carried out using the BioEstat 3.0 software (Ayres *et al.*, 2003).

Bioinformatics studies were performed using two cluster analysis tools: the self-organizing map (SOM) (Rojas, 1996) and the hierarchical cluster, both using R - The R Project for Statistical Computing (R Development Core Team, 2007). The SOM represents the result of a vector quantization algorithm that places a number of reference vectors into a high-dimensional input data space to approximate to its data sets in an ordered fashion and it is used to visualize metric ordering relations of input samples (Kohonen, 1997). In hierarchical clustering the data are not partitioned into a particular cluster in a single step, but instead a series of partitions takes place, which may run from a single cluster containing all objects to n clusters each containing a single object (Herrero & Dopazo, 2002).

Prediction of potential mammalian miRNAs targets was carried out using three different programs simultaneously (TargetScans, miRanda and PicTar, in <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>, Sethupathy *et al.*, 2006). Only targets identified in the three programs used were recorded.

RESULTS

We determined the expression profile of 104 miRNAs during four stages of murine CNS development (table 1). Values are presented as the fold change in gene expression normalized to the endogenous control and relative to the calibrator (Livak and Schmittgen, 2001), which was chosen arbitrarily in our study as the expression of let7a sample in E15 stage.

Subsequently, we used the raw data obtained in the quantitative RT-PCR experiments to sort miRNAs according to their expression profile by hierarchical cluster programs. They classified them into three distinct groups depicted in figure 2. At the bottom section of figure 2, five miRNAs with the highest expression during embryonic stages can be found: miR214, miR130a, mi125a, miR9 and miR125b. In the mid-portion of figure 2 miRNAs with low expression in all developmental stages are depicted; the top section comprises miRNAs whose relative expression is not as high as the group represented at the bottom, but is higher than those represented in the middle section: miR301, miR200a, miR205, miR199a, miR17-5p, miR181a, miR140 and miR124a.

The SOM analysis identified four distinct clusters of miRNA according to their expression profile (C1, C2, C3 and C4, figure 3). However, only cluster C1 showed a significant difference ($p < 0.01$) in relative expression among the different ages examined. Cluster C1, which has 12 miRNAs (miR-9; miR-17-5p; miR-124a; miR-125a; miR-125b; miR-130a; miR-140; miR-181a; miR-199a; miR-205; miR-214; miR-301), has a very specific expression profile, showing high expression during embryonic stages (E15), decreasing progressively as the animals reach more mature posnatal stages (P7). The

predicted mammalian targets for the 12 miRNAs in cluster 1 as well as data on their expression during development are summarized in table 1.

DISCUSSION

Post-transcriptional mechanisms such as alternative mRNA splicing, mRNA trafficking and translational control are believed to play important roles in the regulation of neural gene expression (Tiedge *et al.*, 1999; Musunuru & Darnell, 2001; Manatis & Tasic, 2002; Steward & Schuman, 2003). It is becoming clearer that miRNAs are an important part of a novel regulatory pathway which needs further exploration.

The nervous system is a rich source of miRNAs that are involved in regulation of biological processes in neuronal cell culture (Krichevsky *et al.*, 2006; Miska *et al.*, 2004). A specific region of embryonic cells first assumes a neuronal identity at the stage known as neural induction. There is still little evidence that miRNAs are involved in this early stage of neural induction (Zhang *et al.*, 2006). Nevertheless, the specific expression of certain miRNAs in stem cells, where they might have a role in differentiation by negatively regulating the expression of key genes, suggests that neural induction might be a rich development point for more studies (Kosik, 2006; Kosik and Krichevsky, 2005). Following neural induction, the evidence for a role of miRNAs in the development of the nervous system is rather strong (Zhang *et al.*, 2006; Kosik, 2006).

We reported here the expression profile of 104 miRNAs, which are distributed according to specific temporal expression patterns during murine brain development. We want to draw special attention to the 12 miRNAs identified in cluster C1, due to their distinct expression pattern: high expression during embryonic stage and decreasing as the brain develops. This profile is indicative of possible key roles in processes occurring during early CNS development. Many of these miRNAs, such as miR-124a and miR-125a, have

already been reported to be up-regulated during neuronal maturation. Smirnova *et al.* (2005) verified in embryonic stem cells significant differences in the temporal expression pattern of a panel of highly expressed neural miRNAs. They have shown that neuron-specific miRNAs (miR-124a, miR-125a and miR-128) gradually accumulated in parallel to neuronal maturation.

During oogenesis, the egg is loaded with several messenger RNAs which are needed for early development of the embryo. MiR-430 is the only abundant miRNA in the first 4-8 hours after fertilisation, promoting the down-regulation of maternal transcripts and allowing the zygotic genome expression. Lack of this miRNA causes a mix between the two sets of transcripts (maternal and zygotic), leading to the generation of embryos with subtle defects in gastrulation and brain morphogenesis (Cohen and Brennecke, 2006). These abundant and early expressions of miR-430 are conserved among vertebrates and indicate that miR-430 function in the maternal-zygotic transition may be a feature of vertebrate embryogenesis.

Strauss *et al.* (2006) show for the first time that cells express a miRNA signature characteristic of their developmental stage. Using RNA from mouse embryonic stem cells (ES), embryoid bodies (EBs), day 11 mouse embryos and mature somatic tissues (heart, brain, kidney, liver, lung), they showed that both ES/EB present a less complex miRNA expression signature than do cells that are developmentally advanced and highly restricted. They observed that the brain expressed the most complex miRNA signature and liver the least one. Since the miRNA expression signature is correlated to a particular stage of differentiation, it seems that specific miRNA expression signatures reflect commitment to particular developmental lineages.

Computational analysis for target identification revealed that 10 of the 12 miRNAs present in cluster C1 have been reported to be involved in related processes as cell differentiation and cell adhesion. However, neurogenesis is a major biological process which was identified in our target search and is directly related to CNS development. According to table 1, 10 of the 12 miRNAs in C1 are predicted to regulate genes whose functions could be related to different pathways involved in neurogenesis. It is interesting to note that the decrease in expression of the 12 miRNAs in cluster C1 in the latter stages of development correlate with the increase in expression of the target genes listed in table 1.

Nevertheless, it is important to point out that although the evidence exists, no clear functional role for miRNAs in mammalian neurogenesis has been proved at the experimental level. In 2006, Krichevsky *et al.* demonstrated simultaneous high expression of miR-9 and miR-124a induced in the transition from neural precursor (NP) to neural differentiation (ND) cell stage transition. Since miR-124a is preferentially expressed in embryonic neurons, whereas miR-9 is expressed in both neurons and glia, these results suggest that early overexpression of miR-124a in NPs prevents gliogenesis, whereas miR-9 expression contributes to neurogenesis. In addition, an inhibition of miR-9 alone or in combination with miR-124a caused a reduction of neuronal differentiation from precursor cells. These observations are indications that indeed miRNAs could be important in gene regulation at this early neuronal differentiation stage.

It is also important to consider that miRNAs that are induced during CNS development could have multiple targets and interconnected combinatorial effects. In addition, several miRNAs may cooperatively target mRNAs with similar functions, and these events may imply unlimited number of regulatory combinations created by a network

of co-expressed miRNAs that contribute to a highly complex cell response. By contrast, it is also conceivable that some of these miRNAs could have the same target gene (Kim, 2005).

In conclusion, we identified a cluster of 12 miRNAs with a specific expression profile in CNS during mouse development. Further studies should be carried out addressing the specific role of these miRNAs in gene regulation of biological processes involved in CNS development.

TABLE AND FIGURES LEGENDS

Figure 1: Overview of the methodology used for microRNA quantification. Each stem loop RT primer amplifies a specific miRNA using a 7-nucleotide complementary sequence. Generated cDNAs are quantified through Real Time PCR.

Figure 2: Results of hierarchical cluster analysis with dendrogram. Each column represents an age: E15 (embryonic day 15); E17 (embryonic day 17); P1 (postnatal day 1); P7 (postnatal day 7). MiRNAs with the highest relative expression at E15 are at the bottom section. MiRNAs with low relative expression in all developmental stages are represented in the middle portion and miRNAs whose expressions are not as high as the bottom group, but higher than those represented in the middle section, are on the top section.

Figure 3: Results of self organization map (SOM) which generated four different clusters of miRNA expression: A) cluster 1 (12 microRNAs); B) cluster 2 (21 miRNAs); C) cluster 3 (13 miRNAs); D) cluster 4 (57 miRNAs). The standard deviation (SD) curve is represented in red (1SD).

Table 1: Putative biological functions to target genes for microRNAs in cluster C1, according to three different programs (TargetScans, miRanda and PicTar - <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>). Only targets identified in the three programs used were recorded.

This paper was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP).

Figure 1

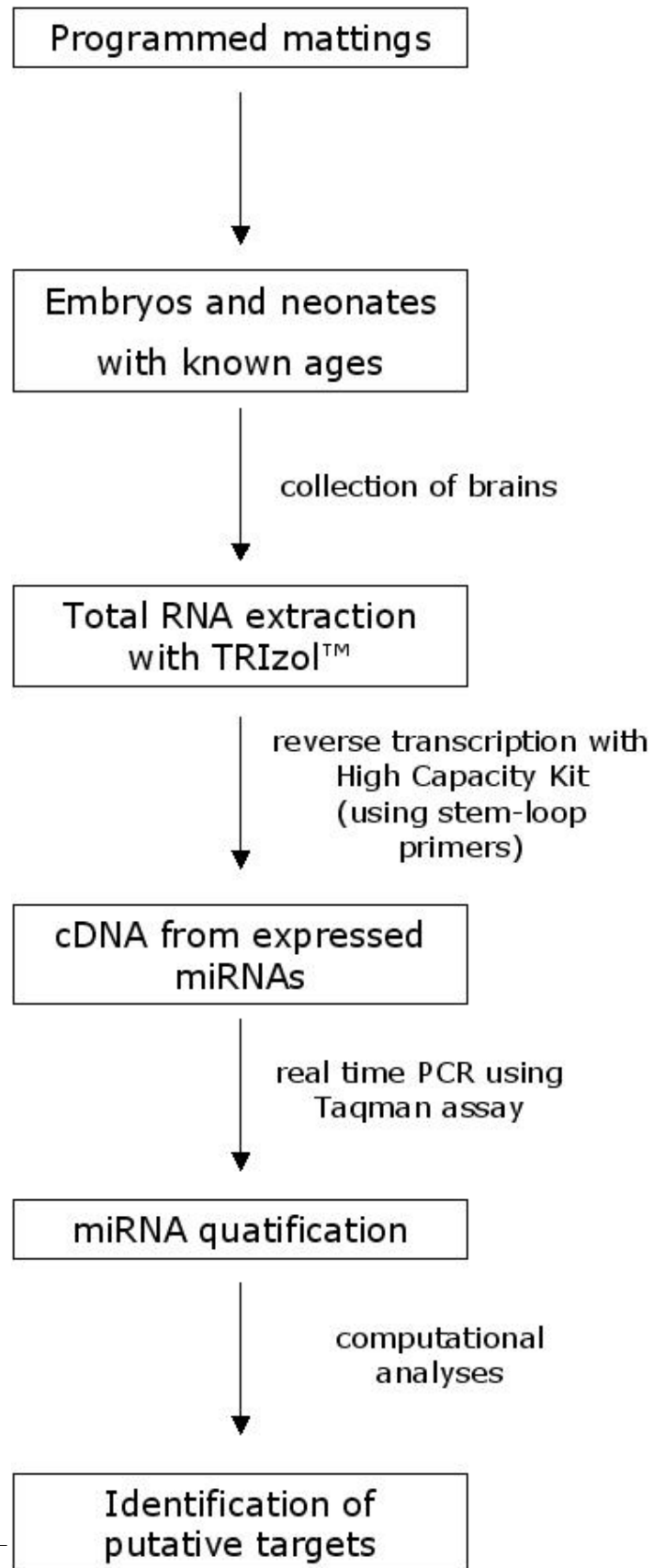


Figure 2

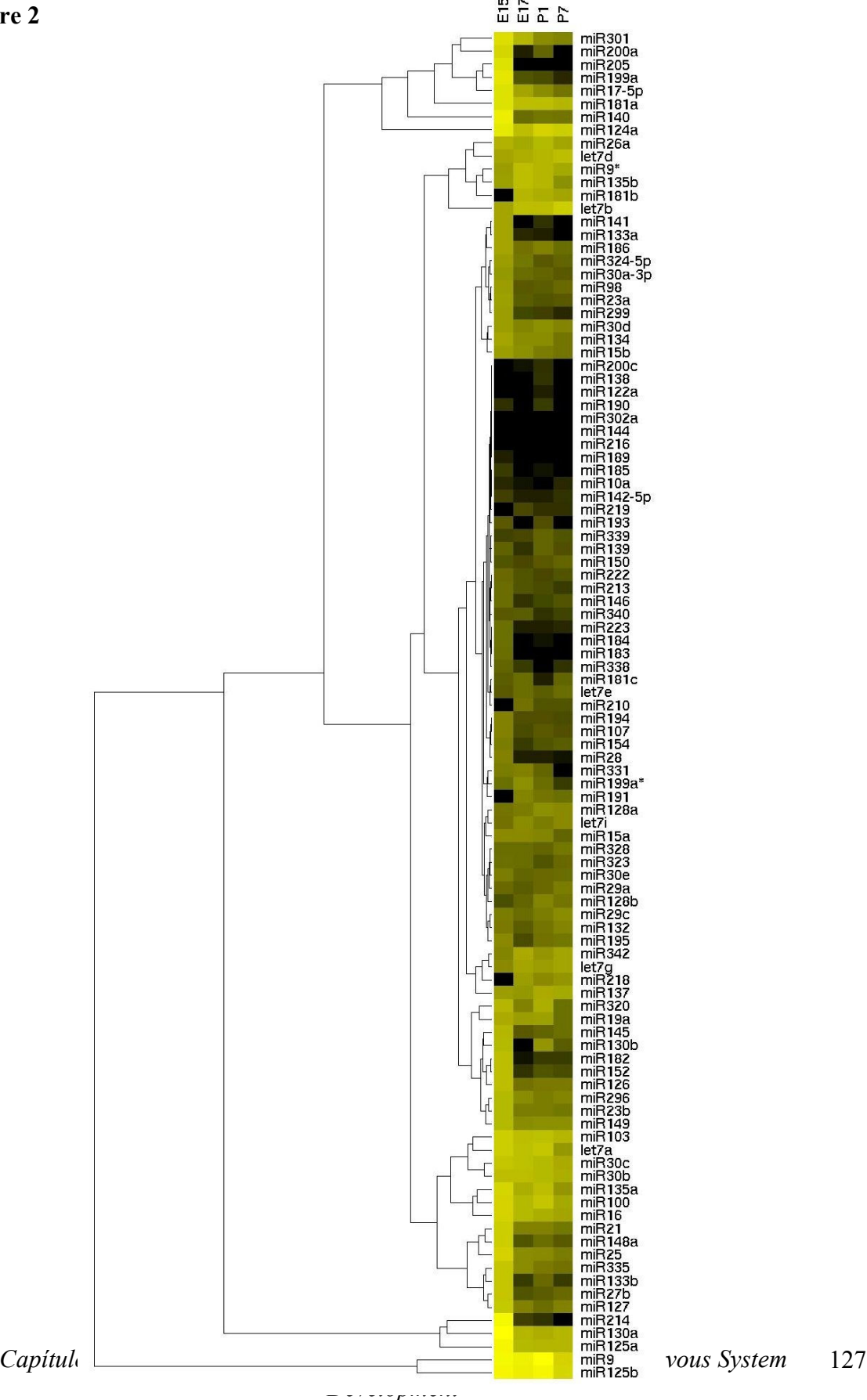


Figure 3

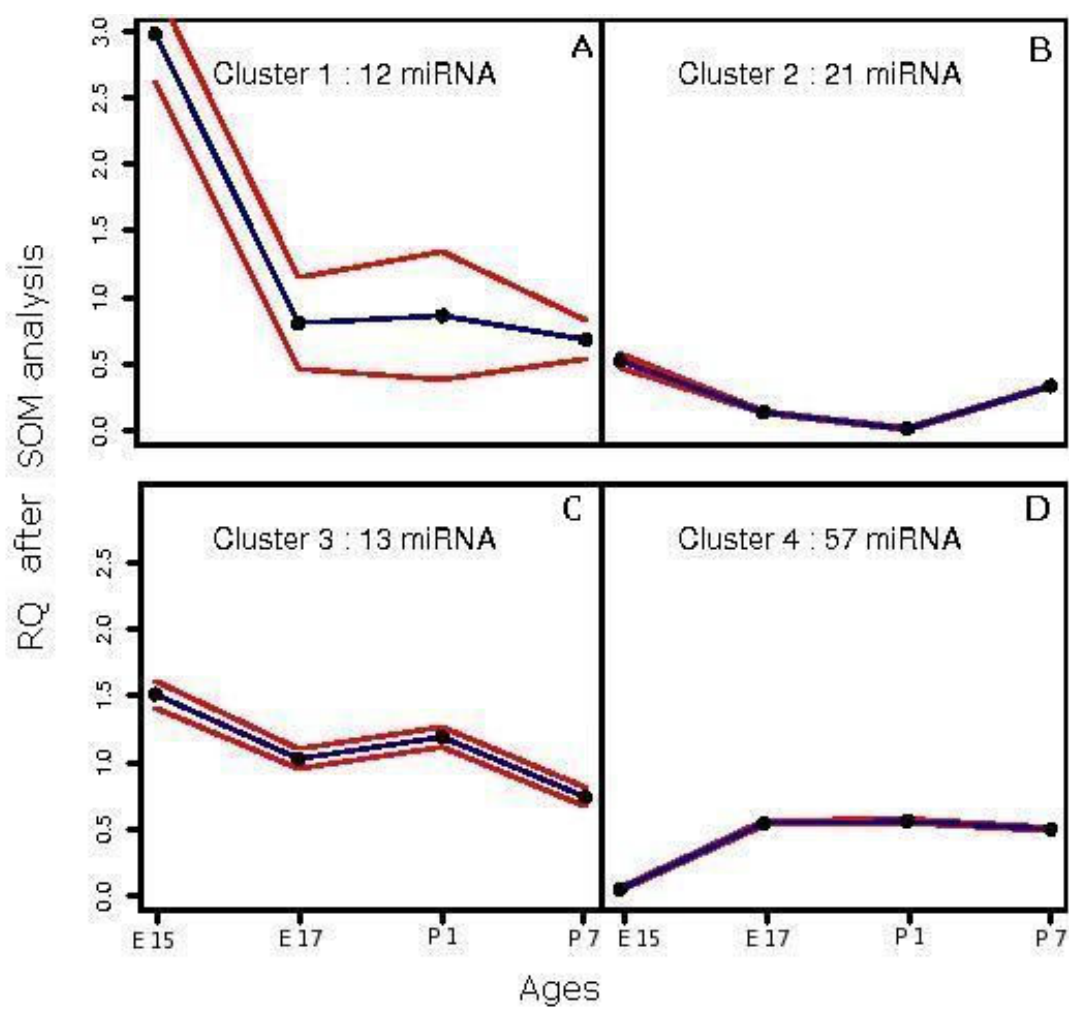


Table 1 Putative biological functions to target genes for microRNAs in cluster C1, according to three different programs (TargetScans, miRanda and Pic Tar – <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>)

miRNA	Possible target gene	Targeted gene functions	Expression profile
miR-124a	NEUROD1 (Neurogenic differentiation factor 1)	Cell differentiation; neurogenesis.	During cortical development (Przyborski, 2000); in humans, peak expression occurs in gestational week 19 (Franklin <i>et al.</i> , 2001).
miR-125a	MYT1 (Myelin transcription factor 1)	Transcription factor activity; neurogenesis.	Restricted to the developing nervous system - marker of primary neurogenesis (Bellefroid <i>et al.</i> , 1996).
miR-125b	BAI1 (Brain-specific angiogenesis inhib. 1)	Inhibition of angiogenesis and neuronal differentiation; neurogenesis.	Peak level in postnatal day 10, expressed in most neurons of cerebral cortex and hippocampus. (Koh <i>et al.</i> , 2001).
miR-130	GAP43 (Axonal membrane protein GAP-43)	Regulation of cell growth; neurogenesis.	High expression in developing and regenerating nerve cells (Margolis <i>et al.</i> , 1991).
miR-140	JAG1 (Jagged-1 precursor)	Regulation of cell migration; neurogenesis; control of cell specification and differentiation; DNA binding protein.	In granule/germinate layer of neonatal mice (Gazit <i>et al.</i> , 2004).
miR-205	NCAM1 (Neural cell adhesion molecule 1)	Cell-cell signaling; cell adhesion; neurogenesis.	In neuronal precursor cells (Shanley <i>et al.</i> , 2007).
miR-9	CNTFR (Ciliary neurotrophic factor rec. alpha)	Enhances adult CNS neurogenesis; signal transduction; cytokine	Throughout the adult nervous system (Emsley and Hagg, 2003).
miR-181a	SEMA4G (Semaphorin-4G precursor)	Cell differentiation; receptor activity; neurogenesis.	During developing central and peripheral nervous systems as well as in several somatic tissues (Li <i>et al.</i> , 1999).
miR-199a	ATXN7 (Spinocerebellar ataxia type 7 protein)	Nuclear organization; histone acetylation; neurogenesis.	In adult mouse tissues, high expression level in brain (Strom <i>et al.</i> , 2002)
miR-301	SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25)	Neurotransmitter uptake and secretion; neurogenesis.	Highly expressed in adult brain (Zhao <i>et al.</i> , 1994)

REFERENCES

- Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431:350-355.
- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D.L., Dos Santos, A.S. 2003. BioEstat 3.0: *Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade civil Mamirauá, Brasília.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and functions. *Cell*, 23:281-297.
- Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C., Pieler, T. 1996. X-MyT1, a Xenopus C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell*. 87(7):1191-1202.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J., Guegler, K.J. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33(20):e179.
- Cohen, S.M., Brennecke, J. 2006. Developmental biology. Mixed messages in early development. *Science*. 312(5770):65-6.
- Conaco, C, Otto, S, Han, JJ, Mandel, G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(7):2422-2427.
- Emsley, JG e Hagg, T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol*. 2003; 183(2):298-310.
- Franklin, A., Kao, A., Tapscott, S., Unis, A. 2001. NeuroD homologue expression during cortical development in the human brain. *J Child Neurol*. 16(11):849-853.

Gazit, R., Krizhanovsky, V., Ben-Arie, N. 2004. Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development*. 131(4):903-913.

Herrero, J. and Dopazo, J. 2002. Combining hierarchical clustering and self-organizing maps for exploratory analysis of gene expression pattern. *J Proteome Res*. 1:467-470.

Ketting, R.F, Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H. 2001. DICER functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in development timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 15(20):2654-2659.

Koh, J.T., Lee, Z.H., Ahn, K.Y., Kim, J.K., Bae, C.S., Kim, H.H., Kee, H.J., Kim, K.K. 2001. Characterization of mouse brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) and phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase-associated protein 1, a novel BAI1-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res*. 87(2):223-237.

Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(5):376-385.

Kloosterman, W.P. and Plasterk, R.H. 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 11(4):441-450.

Kohonen, T. 1997. Self-Organizing Maps. Springer-Verlag, New York, NY.

Kosik, K.S. 2006. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci*. 7(12):911-920.

Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K., Kosik, K.S. 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. 9(10):1274-1281.

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O., Kosik, K.S. 2006. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*. 24(4):857-864.

Li, H., Wu, D.K., Sullivan, S.L. 1999. Characterization and expression of sema4g, a novel member of the semaphorin gene family. *Mech Dev*. 87(1-2):169-173.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4):402-408.

Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W. 2004. Distinct roles for *Drosophila* DICER-1 and DICER-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 117(1):69-81.

Maniatis, T., Tasic, B. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*. 418(6894):236-243.

Mansfield, J.H., Harfe, B.D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., *et al.* MicroRNA-responsive ‘sensor’ transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*. 2004; 36(10):1079-1083.

Margolis, F.L., Verhaagen, J., Biffo, S., Huang, F.L., Grillo, M. Regulation of gene expression in the olfactory neuroepithelium: a neurogenetic matrix. *Prog Brain Res*. 1991; 89:97-122.

Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., Horvitz, H.R. 2004. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*. 5(9):R68.

Musunuru, K., Darnell, R.B. 2001. Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 24:239-262.

Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G., Mourelatos, Z. 2004. miRNP: mRNA association in polyribosome in a human neuronal cell line. *RNA*. 10(3):387-394.

Peters, L., Meister, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*. 26(5):611-623. 2007.

Przyborski, S.A., Morton, I.E., Wood, A., Andrews, P.W. 2000. Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur J Neurosci*. 12(10):3521-3528.

R Development Core Team. 2007. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (www.R-project.org/ent)

Sethupathy, P., Megraw, M., Hatzigeorgiou, A.G. 2006. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nature Methods*, 3:881-886.

Shanley, D.K., Sullivan, A.M. 2007. Expression of the cell surface markers mAb 2F7 and PSA-NCAM in the embryonic rat brain. *Neurosci Lett*. 424(3):165-169.

Smirnova, L., Grafe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., Wulczyn, F.G. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*. 21(6):1469-477.

Steward, O., Schuman, E.M. 2003. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*. 40(2):347-359.

Strauss, W.M., Chen, C., Lee, C.T., Ridzon, D. 2006. Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome*. 17(8):833-40.

Strom, A.-L., Jonasson, J., Hart, P., Brannstrom, T., Forsgren, L., Holmberg, M. 2002. Cloning and expression analysis of the murine homolog of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) gene. *Gene* 285: 91-99.

Tiedge, H., Bloom, F.E., Richter, D. 1999. RNA, whither goest thou? *Science*. 283(5399):186-187.

Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., Impey, S. 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(45):16426-16431.

Wienholds, E., Plasterk, R.H. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS*. 597(26):5911-5922.

Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S., Plasterk, R.H. 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*. 309(5732):310-311.

Wulczyn, F.G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R. 2007. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J*. 21(2):415-426.

Zhang, B., Pan, X., Anderson, T.A. 2006. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol*. 209(2):266-269.

Zhao, N., Hashida, H., Takahashi, N., Sakaki, Y. Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA. 1994. *Gene*. 145(2):313-31

CAPÍTULO 3

Expressão de MicroRNAs em tecido hipocampal de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial

3.1 - INTRODUÇÃO

3.1.1 – A EPILEPSIA

A epilepsia é um grupo de doenças que possui como característica comum a ocorrência de crises (Zielinski, 1988; Fisher *et al.*, 2005). É uma síndrome classificada como doença neurológica crônica e ocorre em função das alterações cerebrais associadas ou não a outras patologias neurológicas. Por terem uma grande variedade de manifestações clínicas as epilepsias podem ser tratadas como uma síndrome ou como um grupo de doenças (Guerreiro *et al.*, 2000). As crises epiléticas são manifestações clínicas que refletem disfunções temporárias de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo ou de área mais extensa envolvendo os dois hemisférios cerebrais (Guerreiro *et al.*, 2000).

A epilepsia possui alta prevalência na população geral, cerca de 1,5% a 2% e é considerada um problema de saúde pública por causar grande impacto social e econômico (Gomes, 1994; Gomes, 1997; Hauser, 1996, Annegers *et al.*, 1996, Borges *et al.*, 2004). Um fato que contribui para a gravidade da epilepsia é a refratariedade ao tratamento com drogas anti-epilépticas (DAE).

Segundo classificação da International League Against Epilepsy (ILAE), em relação ao tipo de crise, as epilepsias são classificadas em focais, generalizadas ou não-classificadas. As crises focais são aquelas nas quais, em geral, as primeiras manifestações clínicas e eletroencefalográficas indicam ativação de um sistema neuronal limitado a uma parte de um hemisfério cerebral. Quando a descarga epilética envolve a totalidade do córtex cerebral em ambos os hemisférios, a crise é denominada generalizada (ILAE, 1989). Em

relação à etiologia, a classificação das epilepsias é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, história familiar, achados eletroencefalográficos e prognóstico (Guereiro *et al.*, 2000). Dessa forma, as epilepsias podem ser divididas em três categorias: idiopáticas, que são aquelas transmitidas geneticamente; sintomáticas, que possuem etiologias conhecidas, e criptogênicas, que são as epilepsias de presumível base orgânica, mas sem etiologia definida (ILAE, 1989).

3.1.2 – Epilepsia de lobo temporal mesial

A epilepsia de lobo temporal (ELT) é uma alteração neurológica comum. O controle completo das crises, com tratamento medicamentoso, é alcançado em menos de 50% dos pacientes (Sander, 1993; Mattson, 1994).

A forma mais comum de ELT é a epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM), que será objeto de estudo deste trabalho e tem os sintomas gerados pelo acometimento das estruturas mediais do lobo temporal (Engel, 2001b). A resistência ao tratamento medicamentoso é um problema crucial nos pacientes com ELTM e a cirurgia para retirada da área afetada representa, em muitos casos, uma estratégia terapêutica de sucesso. Os espécimes retirados na cirurgia mostram duas patologias principais: esclerose hipocampal e lesões focais (Thom, 2004). A esclerose hipocampal é o achado neuropatológico mais comum nos pacientes com ELTM que se submetem aos procedimentos cirúrgicos para controle da ELTM refratária (figura 4). A esclerose hipocampal é a única condição patológica com características neuropatológicas específicas. Os critérios mínimos para o diagnóstico da esclerose hipocampal estão resumidos pela Liga Internacional contra a

Epilepsia (ILAE), e incluem principalmente perda seletiva de neurônios e gliose na região CA1 (Wieser 2004). Outras alterações são dispersão das células granulares do giro dentado, neurogênese das células granulares e reorganização sináptica das fibras musgosas (Thom 2004). Lesões focais e má formação do desenvolvimento cortical (displasia cortical) representam outros achados em pacientes com refratariedade medicamentosa com ELTM (Blumcke *et al.*, 2002; Thom 2004).

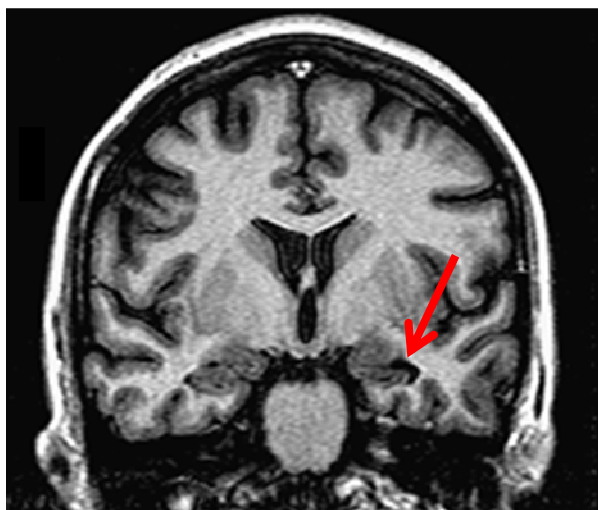


Figura 4: Imagem da atrofia no tecido hipocampal à esquerda (seta) de um pacientes com epilepsia de lobo temporal. Imagem coronal adquirida em T1.

A ELTM pode ser classificada em: epilepsia de lobo temporal mesial familiar (ELTMF), quando há recorrência na família ou epilepsia de lobo temporal esporádica (ELTME), quando o paciente for o primeiro a apresentar os sintomas da síndrome.

A princípio acreditava-se que somente as epilepsias ditas generalizadas poderiam ter etiologia genética, contudo, foram os estudos clínicos e eletrencefalográficos realizados por

Andermann nos anos 70 que chamaram a atenção para o envolvimento de fatores genéticos também nas epilepsias focais (Andermann, 1982).

Embora a epilepsia de lobo temporal tenha sido considerada uma condição adquirida, cresce a evidência que indica que uma predisposição genética pode ser um importante fator causal para a ELT (Ottman, 1989). Nessa linha, aumenta o reconhecimento de que a ELTM seja transmitida através de herança dominante autossômica e penetrância incompleta (Secolin *et al.*, 2009) e recentemente tenha sido incluída na nova proposta de classificação das síndromes epiléticas da ILAE (Engel, 2001).

Não é possível reconhecer diferenças clínicas entre pacientes com ELTM familiar ou esporádica; somente o histórico familiar permite o correto diagnóstico. Entretanto, é possível que muitos casos denominados esporádicos, isto é, quando o paciente é o primeiro na família com os sintomas, possam não ser, uma vez que os pacientes não sabem que há outros casos na família (Gambarella, 2009).

Baseando-se na semiologia das crises, no background genético e nos exames de ressonância magnética, duas principais síndromes são identificadas na epilepsia de lobo temporal: a mesial (ELTM) e a lateral (ELTL)(ILAE).

Com o avanço dos estudos em biologia molecular e em genética, vários *loci* e alguns genes já foram identificados para as epilepsias idiopáticas. Os genes identificados até o momento, em sua maioria, referem-se aos componentes moleculares da sinalização neuronal, como os canais iônicos (Lerche *et al.*, 2001; Meisler *et al.*, 2001). É também interessante notar que a forma de ELTL, também conhecida como epilepsia autossômica dominante parcial com características auditivas, foi associada com mutações no gene *LGII* no cromossomo 10 (Kalachikov *et al.*, 2002). Por outro lado, em nenhuma família com

ELTM familiar foram encontradas mutações do gene *LGII* (Striano *et al.*, 2008), o que nos leva a acreditar que a ELTL e a ELTM familiar são síndromes genéticas distintas. Cabe aqui ressaltar que o gene *LGII* não está ligado a canais iônicos, o que sugere novos rumos na pesquisa de genes responsáveis por epilepsias idiopáticas, pois corrobora a hipótese que outras regiões cromossômicas além daquelas que codificam componentes iônicos podem conter o gene responsável pela expressão da doença (Ribeiro *et al.*, 2008).

3.1.3 - Estudos de expressão gênica em tecido hipocampal

Na maioria das cirurgias para tratamento de epilepsias refratárias, o tecido hipocampal é a região retirada. Assim, este material tem sido usado em estudos moleculares, tais como: PCR em tempo real, SAGE (*Serial analysis of gene expression*) e *microarrays*. Essas técnicas permitem a análise simultânea de um grande número de transcritos possibilitando uma visão global da expressão gênica.

Becker e colaboradores (2002) através da técnica de *microarrays* analisaram amostras de tecidos hipocampus de pacientes submetidos à cirurgia e tecidos controle (amostras de pacientes sem atrofia hipocampal – pacientes com lesão extra hipocampal) e obtiveram 21 de 588 genes com expressão alterada entre os dois tecidos. Esses genes tinham a função relacionada à morte celular, gliose e plasticidade neuronal. Em 2005, de Lanerolle e Lee estudaram amostras da região CA1 do hipocampo de pacientes com atrofia hipocampal e tecidos controle (pacientes com lesão extra hipocampal) e encontraram 18 de 14500 genes com expressão alterada entre os tecidos. Esses genes tinham suas funções envolvidas com gliose e resposta imune. Em 2006, Ozbas-Gerceker e colaboradores usaram

amostras de tecido hipocampal e tecidos controle (hipocampo sem histórico de crises – autópsia) e através da técnica de SAGE encontraram 143 de 9599 genes com expressão diferenciada. Suas funções estavam relacionadas com síntese de proteínas, transdução de sinal, plasticidade sináptica, gliose e metabolismo de ferro.

Atualmente, não existem na literatura relatos sobre estudos do papel da regulação gênica por miRNAs nas epilepsias. Portanto, este trabalho é pioneiro no sentido de formular e explorar as relações entre os microRNAs e seus genes alvo no contexto das epilepsias, principalmente na epilepsia de lobo temporal mesial. Acreditamos que nossos resultados poderão ajudar a fornecer uma visão mais global do padrão de expressão gênica nos tecidos obtidos de pacientes com epilepsia de lobo temporal refratária.

3.2 – OBJETIVOS

- Determinar o perfil de expressão de miRNAs em tecido hipocampal de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial familiar comparado com tecidos normais provenientes de autópsia.
- Identificar os genes alvo regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos no tecido hipocampal de pacientes com ELTM familiar em relação aos controles.

3.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 – Tecidos humanos

Os tecidos de pacientes com epilepsia de lobo temporal foram obtidos através da cirurgia de amigdalahipocampectomia realizada no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Todas as cirurgias tiveram indicação clínica feita pela equipe de Cirurgia de Epilepsia chefiada pelo Prof. Dr. Fernando Cendes, após a investigação clínica completa (que inclui EEG seriados e exame de ressonância magnética de crânio) seguindo o protocolo local para a investigação de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento clínico. Foram utilizados espécimes cirúrgicos de quatro pacientes com ELTM familiar e quatro espécimes de tecido normal provenientes de autópsia. A ELTM familiar foi definida seguindo critérios previamente estabelecidos pelo nosso grupo (Kobayashi *et al.*, 2001).

A tabela 1 mostra resumidamente alguns dados dos pacientes incluídos nesse estudo. A lateralização da atrofia hipocampal foi obtida pela avaliação clínica pré-operatória dos pacientes e confirmada pelos exames de ressonância magnética pela presença de atrofia hipocampal. As cirurgias dos pacientes portadores de epilepsia foram todas realizadas por neurocirurgiões (Prof. Dr. Evandro Pinto da Luz de Oliveira e/ou Prof. Dr. Elder Tedeschi) com amplo treinamento e experiência em cirurgia de epilepsia e na técnica de amigdalohipocampectomia seletiva (Oliver, 2000). A tabela 2 mostra os dados dos espécimes provenientes de autópsia. A causa de óbito dos pacientes cujo material foi obtido na autópsia, não foi relacionada a evento neurológico ou trauma no sistema nervoso central. A autópsia em todos os casos foi realizada menos de 10 horas após o óbito, por um

neuropatologista experiente, o Prof. Dr. Luciano Queiroz.

Este projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição (processo 470/2003 – Anexo I) e os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (modelo no Anexo II).

Tabela 1: Dados dos pacientes que se submeteram a cirurgia para controle da epilepsia de lobo temporal mesial.

Paciente	Sexo	Idade na data da cirurgia	Lateralização da atrofia hipocampal (AH)
P1	masculino	37	AH esquerda
P2	masculino	48	AH esquerda
P3	masculino	32	AH direita
P4	feminino	40	AH direita

Tabela 2: Dados dos tecidos provenientes de autópsia.

Amostra	Idade
C1	58
C2	55
C3	60
C5	45

Imediatamente após a retirada do tecido pelo neurocirurgião no centro cirúrgico, o mesmo foi acondicionado em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -70°C até sua utilização para a extração de RNA. O mesmo procedimento foi realizado nos tecidos extraídos pelo patologista.

3.3.2. Extração de RNA e PCR em Tempo Real

O RNA total das células foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A determinação da concentração e pureza do material foi realizada com o auxílio do aparelho GeneQuant pro (Amersham Biosciences). A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com SYBR Safe (Invitrogen). O miRNA maduro foi obtido por transcrição reversa do RNA através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit e de iniciadores em *stem loop* como descrito por Chen *et al.*, 2005. A reação era feita com 100ng/μl de DNA para o controle endógeno e 2ng/μl de DNA dos tecidos estudados. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para ambas as reações foram utilizados o Human Panel Early Access™ kit (Applied Biosystems), que contém 157 dos 721 miRNAs humanos listados no banco de dados de microRNAs (www.mirbase.org). O gene 18S (TaqMan™-Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno das reações e todos os experimentos foram feitos em duplicata.

A quantificação relativa da expressão dos miRNAs foi calculada da comparação do valor do C_t (Threshold cycle), que é determinado pela equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Os valores da quantificação relativa estavam dispersos na curva de Gauss e o teste t foi realizado para a verificação de miRNAs que possuíssem a expressão diferenciada entre tecido hipocampal de pacientes e tecido hipocampal normal.

3.3.3. Análises *in silico*

Análises de bioinformática foram realizadas usando duas ferramentas: o SOM (self-organizing map) e o cluster hierárquico, ambos usando o R—The R Project for Statistical Computing (R Development Core Team 2007).

A predição de alvos potenciais para os miRNAs foi realizada através de três diferentes programas: TargetScans (Lewis *et al.*, 2005), miRanda (Griffiths-Jones *et al.*, 2006) e PicTar (Krek *et al.*, 2005), no link <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>, (Sethupathy *et al.*, 2006). Somente os alvos identificados nos três programas simultaneamente foram usados.

3.4 – RESULTADOS

Comparamos a expressão de 157 miRNAs no tecido hipocampal de pacientes com ELTM familiar e tecido hipocampal normal. O resultado dessas expressões e a comparação entre tecido normal e tecido com epilepsia estão resumidos na figura 5. Podemos notar neste dendograma que os miRNAs estão agrupados conforme seus padrões de expressão. Os miRNAs com baixa expressão estão em azul e os que têm maiores níveis de expressão estão em rosa. Esta figura nos fornece pouca informação a respeito da diferença entre tecido normal e tecido dos pacientes e seria necessário um maior número de miRNAs analisados para que tivéssemos um padrão (assinatura molecular) definido para o tecido normal e patológico.

Após a realização da análise estatística com o teste t, encontramos apenas três miRNAs diferentes: miR-29b, miR-30d e let-7. Eles apresentaram expressão significativamente diversa nos tecidos hipocampus de pacientes em comparação com os tecidos hipocampus controle. Essas diferenças de expressão entre os miRNAs estão representadas na figura 6. Nesse gráfico, notamos que os miRNAs miR-29b e let-7 apresentam aumento da expressão no tecido hipocampal dos pacientes em relação ao tecido normal; já o miRNA miR-30d apresenta diminuição da expressão no tecido dos pacientes.

Após a análise para detectarmos os possíveis genes alvo para esses três miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes, resumimos os genes alvos na tabela 3. Selecionamos os genes alvo que poderiam apresentar maior relevância biológica para o processo fisiopatológico envolvido na ELTM, principalmente, a esclerose mesial temporal.

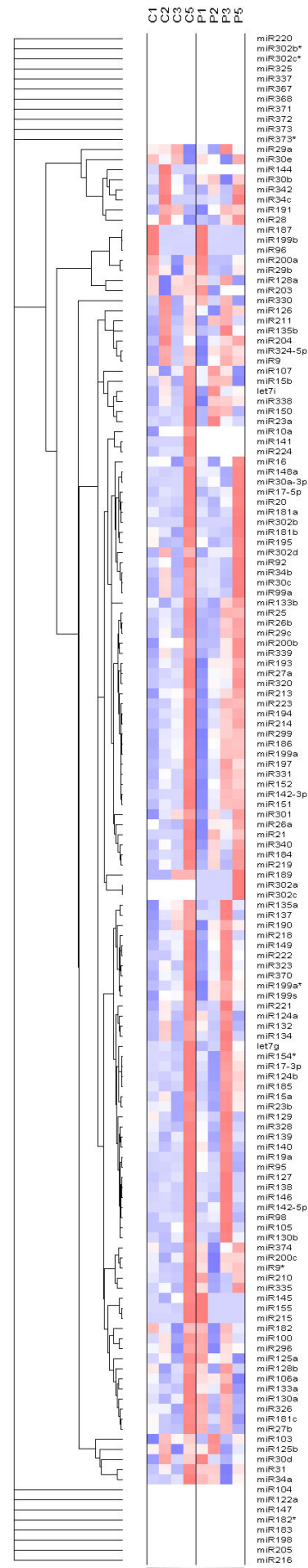
Para os miRNAs miR-29b e let-7, que tiveram aumento da expressão no tecido dos

pacientes, conseqüentemente os genes alvo têm a expressão diminuída nos tecidos dos pacientes. Para o miR-30d que tem a expressão diminuída, seus genes alvo têm a expressão aumentada.

Podemos observar que as funções dos genes alvo selecionados foram mais comumente relacionadas com apoptose, neurogênese e sinalização celular.

Figura 5: Cluster hierárquico da expressão dos miRNAs em tecido humano. Cada coluna representa um tecido específico: C1, C2, C3 e C4 são tecido hipocampais de autópsia; P1, P2, P3 e P4 são tecido hipocampais de pacientes que foram submetido à cirurgia para remoção das atrofias hipocampais.

■ miRNAs com baixa expressão
■ miRNAs com alta expressão



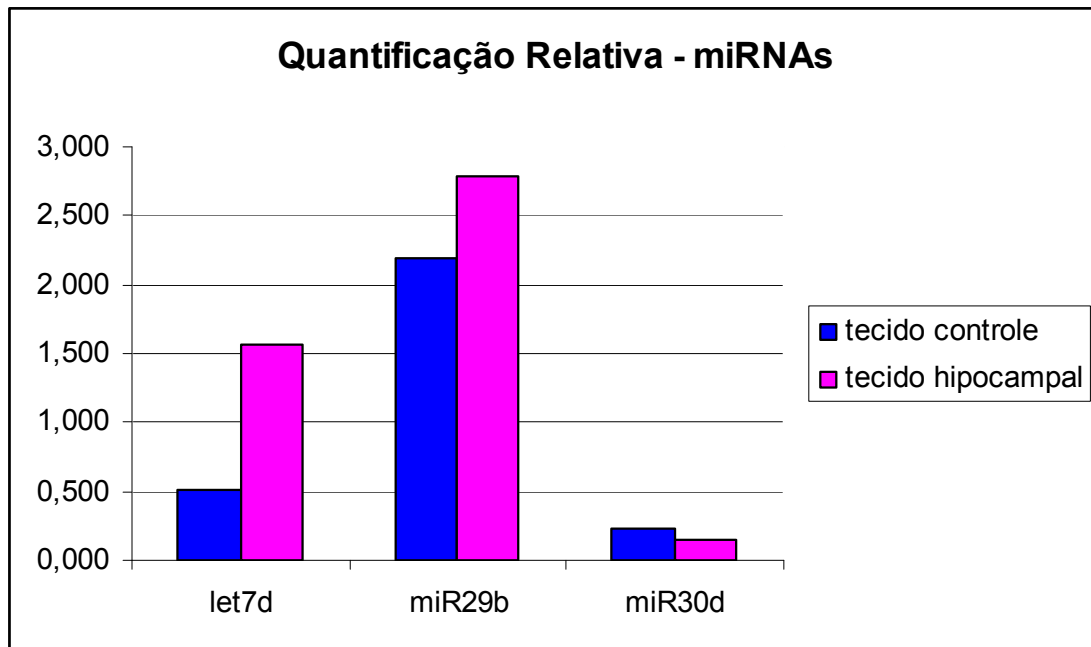


Figura 6: Expressão dos três miRNAs que apresentaram diferença significativa estatisticamente entre pacientes e controles.

Tabela 3: Possíveis genes alvo para os três miRNAs com expressão significativa diferente entre controles e pacientes com ELTM, de acordo com três diferentes programas: TargetScans, miRanda and PicTar - <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>.

microRNA	Provável Gene Alvo	Provável Função do Gene
 let-7d	<i>NME6</i> Nucleoside diphosphate kinase 6	Inibidor do p53, um indutor de apoptose alfa (IPIA-alfa).
	<i>NCAM1</i> Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isoform precursor	Diferenciação celular; Sinalizador célula-célula; ligante de proteína; transmissor de sinapse.
 miR-30d	<i>CTNND2</i> Catenin delta-2 (Delta-catenin) (Neural plakophilin-related ARM-repeat protein)	Regulador da transcrição; adesão neuronal; transdução de sinal; citoesqueleto.
	<i>LGII</i> Leucine-rich glioma-inactivated protein 1 precursor	Proliferação celular; neurogênese.
	<i>SON</i> SON protein (SON3) (Negative regulatory element-binding protein)	Ligante dupla-fita de RNA; ligante de DNA; anti-apoptose.
 miR29b	<i>Mcl-1</i> Myeloid leukemia cell differentiation protein (Bcl-2- related protein EAT/mcl1)	Anti-apoptótico da família BCL-2.

3.5 – DISCUSSÃO

Apesar do crescente reconhecimento da importante participação dos miRNAs na regulação gênica de inúmeros processos biológicos, não existem ainda estudos investigando o papel dessas moléculas na ELTM. Apesar de não podermos determinar se existe ou não uma assinatura molecular distinta em tecido hipocampal removido de pacientes com ELTM familiar em relação ao tecido de controles, nós identificamos três miRNAs diferentemente expressos no tecido hipocampal dos pacientes, são eles: let-7d, miR-30d e miR29b. Esses três miRNAs regulam pelo menos seis genes alvo de acordo com três programas computacionais utilizados: *NME6*, *NCAMI*, *CTNND2*, *LGII*, *SON* e *MCL-1*. As funções biológicas relacionadas a esses alvos estão, principalmente, envolvidas com proliferação celular, neurogênese, adesão celular e apoptose.

A epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) é a mais freqüente síndrome de epilepsia, afetando de um quarto a um terço de todos os pacientes com epilepsia e a esclerose hipocampal está presente na maioria desses pacientes (Gloor, 1991). Vários pacientes com ELT apresentam um histórico familiar de recorrências das crises de epilepsia, indicando a participação de fatores genéticos nessa síndrome (Andermman, 1982; Cendes *et al.*, 1998). Nosso grupo caracterizou a ELTM familiar (ELTMF) através do estudo de 68 pacientes de 22 famílias, onde pelo menos dois indivíduos tinham o diagnóstico de ELTM. A análise dos heredogramas evidenciou um padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta (Kobayashi *et al.*, 2001) que foi posteriormente também evidenciado pela análise de segregação (Secolin *et al.*, 2010). Em um estudo recente, a presença de um componente genético na determinação da ELTMF foi

confirmado, pois nosso grupo identificou um *locus* no cromossomo 18p para a ELTMF associada à atrofia hipocampal (Maurer-Morelli *et al.*, 2007).

Inicialmente demos prioridade para os experimentos em espécimes de pacientes com ELTMF dada a linha de pesquisa seguida em nosso laboratório. Porém existem hoje várias evidências apontando para um mecanismo fisiopatológico diferencial agindo na ELTMF e nos casos esporádicos. Em um estudo recente, nosso grupo mostrou que há diferença de expressão gênica entre pacientes com ELTMF e ELTME (Maurer-Morelli *et al.*, 2009). Além disso, existem observações prévias que demonstram diferenças histoquímicas em tecido coletado de pacientes com ELTM com recorrência familiar e daqueles sem esses antecedentes (casos esporádicos) (Andrade-Valença *et al.*, 2008).

Apesar de não totalmente esclarecidos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na esclerose mesial temporal (Pollard *et al.*, 1994; Wasterlain *et al.*, 2002), sabe-se que do ponto de vista celular dois mecanismos celulares podem contribuir para a perda neuronal: a necrose e a apoptose (Pretel *et al.*, 1997). A apoptose é um processo determinado geneticamente e é essencial para a diferenciação celular. Ela é caracterizada por mudanças morfológicas no núcleo e citoplasma, por quebra da cromatina em sítios regulares e quebra por endonucleases do DNA genômico (fragmentação do DNA). Esse modo de morte celular serve como equilíbrio para a mitose regular o tamanho de tecidos e mediar processos patológicos associados ao crescimento de tumores (Morrison *et al.*, 2003). A apoptose é um processo bioquímico extremamente complexo e tem a participação do P53, que é um importante gene supressor de tumores e pode induzir a apoptose (Bedi e Mookerjee, 1998; Morrison *et al.*, 2003). Estudos experimentais têm demonstrado que crises podem induzir a expressão do gene P53 em modelos animais (Tan *et al.*, 2002; Araki *et al.*, 2004).

Xu e colaboradores (2007) observaram células com alta expressão de P53 em espécimes com esclerose hipocampal.

Alguns experimentos com modelos animais mostram a presença de células neurais apoptóticas no tecido hipocampal (Araki *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 1998), assim como a presença da expressão alterada de genes apoptóticos como o Bcl-2, P53 e Fas (Liu *et al.*, 1993; Tan, 2001; Ananth *et al.*, 2001). Entretanto, se ocorre apoptose na esclerose hipocampal ainda não há evidência sólida. Experimentos em modelos animais mostram que uma única crise, crises intermitentes e *status epilepticus* estão todos envolvidos com apoptose (Benzon *et al.*, 1997; Bengzoc *et al.*, 2002; Pretel *et al.*, 1997); outros trabalhos mostram que o *status epilepticus* resulta apenas em necrose neuronal (Fujikawa *et al.*, 1999 e 2000). Em humanos, Ulysal e colaboradores (2003), utilizando a técnica de TUNNEL, não observaram apoptose nas células neuronais de amostras com esclerose hipocampal retirada de 15 pacientes. Xu e colaboradores (2007) obtiveram o mesmo resultado analisando amostras com esclerose hipocampal de 24 pacientes, com a técnica de TUNNEL. Porém nos experimentos com eletromicroscopia, eles encontraram células com alterações morfológicas, indicando apoptose em três pacientes.

Utilizando uma abordagem mais molecular, nossos resultados podem contribuir para as discussões resumidas acima, já que a demonstração da regulação através de miRNAs de vias de sinalização envolvidas em necrose e/ou apoptose e sua subsequente validação em cultura celular podem contribuir para reforçar ou refutar essas teorias. Nesse sentido, a interpretação preliminar dos nossos achados já levanta algumas hipóteses interessantes. Em especial a regulação do gene Mcl-1 que é um gene anti-apoptótico da família do Bcl-2. Estudos mostram a provável regulação da expressão do gene Mcl-1 pelo miRNA miR-29b

(Mott *et al.*, 2007). Um próximo passo nos nossos estudos, seria a verificação da regulação da expressão do gene Mcl-1 pelo miR-29b em nível de RNA mensageiro, através de experimentos com cultura de células e moléculas anti-miR para promover a diminuição da expressão do miRNA miR-29b.

Nosso interesse recaí também no gene alvo LGI1, um gene muito estudado por nosso grupo tanto em nível molecular (Ribeiro *et al.*, 2008) como protéico (Torres, 2008) por ter sido descrito como o gene responsável pela epilepsia de lobo temporal lateral (Kalachikov *et al.*, 2002). Também pretendemos estudar a regulação do miR-30d sobre a expressão desse gene através de experimentos de anti-miR e análises com PCR em tempo real.

Quase nada se conhece sobre a regulação dos miRNAs nos genes envolvidos com as epilepsias de lobo temporal. Nossos resultados mostram que alguns miRNAs tem a expressão diferenciada entre tecidos normais e tecidos hipocampais com atrofia e essa diferença, provavelmente, modula a expressão dos genes alvos. Esses genes alvos estão envolvidos, principalmente, com diferenciação celular, neurogênese e apoptose. Assim, esses resultados indicam possíveis alvos que devem ser explorados em estudos posteriores para a verificação da regulação dos miRNAs sobre genes que coordenam os processos que direcionam a formação da esclerose hipocampal.

3.6 - Referências Bibliográficas

Ananth C, Thameem Dheen S, Gopalakrishnakone P, *et al.* Domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. J Neurosci Res 2001;15:177–90.

Andermann E. Multifactorial inheritance of generalized and focal epilepsy. *In*: Genetic basis of the epilepsies. Anderson VE, Penry JK, Sing CF. Editores. New York. Raven Press; 1982. p: 355-74.

Andrade-Valença LP, Valença MM, Velasco TR, Carlotti CG Jr, Assirati JA, Galvis-Alonso OY, *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy: clinical and neuropathologic findings of familial and sporadic forms. Epilepsia. 2008; 49(6):1046-54.

Annegers JF, Rocca WA, Hauser, WA. Causes of epilepsy - Contributions of the Rochester epidemiology project. Mayo Clinic Proceedings 1996; 71: 570-5.

Araki T, Simon RP, Taki W, Lan JQ, Henshall DC. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. J Neurosci Res 2002; 69:614–21.

Araki S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. Nat Genet 2001; 28(1):46-8.

Becker AJ, Chen J, Paus S, Normann S, Beck H, Elger CE *et al.* Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. Neuroreport. 2002; 13:1327–33.

Bedi A, Mookeriee B. Biological significance and molecular mechanisms of p53-induced apoptosis. Apoptosis 1998; 3:237–44.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10432–7.

Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res* 2002;135:111–9.

Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, *et al.* Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 2004; 55(4):550-7.

Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 2003; 126(Pt 2):462-9.

Borges MA, Li LM, Guerreiro CAM, Yacubian EM, Cordeiro JA, Tognola WA, *et al.* Urban Prevalence of Epilepsy: Populational Study in São José do Rio Preto – A Medium-Sized City in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62(2A):199-204.

Briellmann RS, Kalnins RM, Berkovic SF, Jackson GD. Hippocampal pathology in refractory temporal lobe epilepsy: T2-weighted signal change reflects dentate gliosis. *Neurology* 2002; 58(2):265-71.

Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* 2002; 12:199–211.

Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, *et al.* MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1993a; 43: 719-25.

Cendes F, Leproux F, Melanson D, Ethier R, Evans A, Peters T. *et al.* MRI of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1993b; 17 206-10.

Cendes F, Lopes-Cendes I, Andermann E, Andermann F. Familial temporal lobe epilepsy: a clinically heterogeneous syndrome. *Neurology*. 1998; 50:554–557.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT *et al.* Real-time quantification of micro- RNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(20), e179.

de Lanerolle NC, Lee TS. 2005. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2005; 7:190–203.

Engel J Jr. International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001a; 42(6):796-803.

Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 2001b; 7(4):340-52.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2.

Fujkawa DG, Shinmei SS, Cai B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur J Neurosci* 1999;11:1605–14.

Fujkawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 2000;98:41–53.

Gambardella A, Labate A, Giallonardo A, Aguglia U. Familial mesial temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia*. 2009; 50 Suppl 5:55-7

Gloor P. Mesial temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective. In: Luders H. Editor. *Epilepsy Surgery*. New York. Raven Press. 1991. p: 689-703.

Gomes MM. Epilepsias: uma prioridade nacional em cuidados de saúde. *Rev Bras Neurol* 1994; 30(5): 141-7.

Gomes MM. Frequência populacional da epilepsia. *Rev Bras Neurol* 1997; 33 (1): 3-7.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: D140–4.

Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Considerações Gerais. In: *Epilepsia*. 2000 Lemos, São Paulo: 1-10.

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F. *et al*. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002; 30: (3) 335-41.

Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2001; 56:166–172.

Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Andermann E, Dubeau F, Guerreiro CA, *et al.* Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2003; 44(8):1080-4.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005; 37: 495–500.

Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion channel and epilepsy. *Am J med Genet* 2001; 106: 146-159.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120: 15–20.

Liu W, Rong Y, Baudry M, Schreiber SS. Status epilepticus induces p53 sequence-specific DNA binding in mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;63:248–53.

Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet* 2000; 66(2):698-701.

Mattson RH. Current challenges in the treatment of epilepsy. *Neurolog* 199; 44: S4-9.

Maurer-Morelli CV, Secolin R, Domingues RR, Marchesini RB, Santos NF, Kobayashi E, *et al.* Identification of the Locus for Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Atrophy and Search for Candidate Genes. In: 59th Annual Meeting - American Academy of Neurology, 2007, Boston - MA. *Neurology*, 2007,68: A338-A338.

Maurer-Morelli CV; Rocha CS ; Domingues RR; Tedeschi H, Oliveira EPL, Cendes F, Lopes-Cendes I. Mesial temporal lobe epilepsy has differential gene expression pattern in familial and sporadic forms. In: 28th International Epilepsy Congress 2009, Budapest-Hungary. Maio de 2009.

Capítulo 3 – Expressão de miRNAs em tecido hipocampal de pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal 193

Meisler HM, Kearney J, Ottman R, Escayg A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Ann Rev Genet* 2001; 35: 567-88.

Metrakos K and Metrakos JD. Genetics of convulsive disorders. II. Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 1961; 11: 474-83.

Moore PM, Baker GA. The neuropsychological and emotional consequences of living with intractable temporal lobe epilepsy: implications for clinical management. *Seizure* 2002; 11(4):224-30.

Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007; 26(42):6133-40.

Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem Res* 2003;28:15–27.

Olivier A. Transcortical selective amygdalohippocampectomy in temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 2000; Suppl 1:S68-76; discussion S92-6.

Ottman R. Genetics of the partial epilepsies: a review. *Epilepsia*. 1989; 30:107–111.

Ottman R. Progress in the genetics of the partial epilepsies. *Epilepsia* 2001; 42 Suppl 5:24-30.

Ozbas-Gerceker F, Redeker S, Boer K, Ozguc M, Saygi S, Dalkara T, *et al*. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2006. 138: 457–74.

Paradiso S, Hermann BP, Blumer D, Davies K, Robinson RG. Impact of depressed mood on neuropsychological status in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70(2):180-5.

Pollard H, Cantagrel S, Charriaud-Marlangue C, Moreau J, Ben Ari Y. Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport*. 1994; 5:1053–5.

Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, *et al.* Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol* 1999; 45(2):182-8.

Pretel S, Applegate CD, Piekut D. Apoptotic and necrotic cell death following kindling induced seizures. *Acta Histochem* 1997; 99:71–9.

Primrose DC, Ojemann GA. Outcome of resective surgery for temporal lobe epilepsy. In: Lüders HO. Editor. *Epilepsy Surgery*. New York. Raven Press. 1991. p: 601-11.

Ribeiro PA, Sbragia L, Gilioli R, Langone F, Conte FF, Lopes-Cendes I. Expression profile of *Lgi1* gene in mouse brain during development. *J Mol Neurosci*. 2008 Jul; 35(3):323-9.

Robinson R, Gardiner M. Molecular basis of Mendelian idiopathic epilepsies. *Ann Med* 2004; 36, 89-97.

Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, *et al.* Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus *EJM1* on chromosome 6. *Neurology* 1997; 49:842-7.

Secolin R, Maurer-Morelli C, Cendes F, Lopes-Cendes, I. Segregation analysis in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal atrophy. *Epilepsia*. 2010; 51: 47-50.

Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou AG. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nature Methods*. 2006; 3, 881–886.

Tan Z, Levid J, Schreiber SS. Increased expression of Fas(CD95/APO-1) in adult rat brain after kainate-induced seizures. *Neuroreport* 2001;12:1979–82.

Thom M. Recent advances in the neuropathology of focal lesions in epilepsy. *Expert Rev Neurother.* 2004; 4:973–84.

Torres FR. Distúrbios do Desenvolvimento Cortical e Epilepsia Autossômica Dominante com Auras Auditivas: Estudos Genéticos e Moleculares [Tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade de Campinas; 2008.

Uysal H, Cevik IU, Soylemezoglu F, Elibol B, Ozdemir YG, Evrenkaya T, *et al.* Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? *Epilepsia* 2003; 44:778–84.

Wallace RH, Wang DW, Sing R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, *et al.* Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genetics* 1998; 19: 366-370.

Wasterlain CG, Niquet J, Thompson KW, Baldwin R, Liu H, Sankar R, *et al.* Seizure-induced neuronal death in the immature brain. *Prog Brain Res.* 2002;135:335–53.

Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2004; 45:695–714.

Xu S, Pang Q, Liu Y, Shang W, Zhai G, Ge M. Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurosci.* 2007; 14(9):835-40.

Zhang LX, Smith MA, Li XL, *et al.* Apoptosis of hippocampal neurons after amygdala kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 55:198–208.

Zielinski JJ. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw J, Richens A e Oxley J (eds) *A textbook of epilepsy*, 3a ed. Churchill livingstone, New York. 1988, p: 21-48.

Capítulo 3 – Expressão de miRNAs em tecido hipocampal de pacientes com Epilepsia 199 de Lobo Temporal

Conclusões gerais

4 – Conclusões Gerais

Conclusões Capítulo 2:

O cluster C1 (miR124a; miR125a; miR125b; miR130a; miR140; miR17-5p; miR181a; miR199a; miR205; miR214; miR301; miR9) apresenta um padrão de expressão específico e pelo menos 10 desse miRNAs estão, possivelmente, regulando genes envolvidos na neurogênese. A redução na expressão dos miRNAs deste cluster durante o desenvolvimento indica que seus genes alvos deixam de sofrer regulação negativa (via miRNA) e passam a atuar no desenvolvimento do sistema nervoso central no embrião.

Conclusões Capítulo 3

Nossos estudos vem para acrescentar informações sobre a atuação dos miRNAs na epilepsia de lobo temporal mesial familiar. Com esse resultados podemos indicar três miRNAs com expressão diferenciada entre tecidos hipocampais com atrofia e tecidos normais: o miR-29b; miR-30d e let-7. Os possíveis genes alvos desses miRNAs têm suas funções envolvidas na neurogênese, diferenciação celular e apoptose, sendo que essas funções parecem ser relevantes na esclerose mesial temporal que ocorre na epilepsia de lobo temporal mesial familiar.

ANEXO I

Parecer Comitê de Ética

FCM/UNICAMP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/04/09.
(PARECER CEP: Nº 470/2003)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO NEUROPATOLÓGICA E DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL FAMILIAR"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cláudia Vianna Maurer Morelli

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que inclui a aluna de doutorado Danyella Barbosa Dogini, a análise da expressão gênica em larga, nos mesmos espécimes cirúrgicos de pacientes com (ELTM). Também será incluído para análise da expressão gênica, pacientes com displasia cortical e que serão submetidos à excisão da região displásica como forma de tratamento. Os espécimes obtidos nestas condições serão usados para a quantificação dos microRNAs. Para essa quantificação de microRNAs utilizaremos a técnica de PCR em tempo real, realizado com o Kit Human Panel Early Access™. Além do tecido controle de autópsia para os hipocampus, será utilizado também uma fração de tecido cortical para fins de comparação com o tecido displásico, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de abril de 2009.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profª. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profª. Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com epilepsia. O objetivo geral do estudo é comparar se a lesão do tecido nervoso cerebral encontrada em pacientes com epilepsia familiar são iguais às aquelas encontradas em pacientes com epilepsia na forma esporádica (sem antecedentes familiares). Esse estudo pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento dessa doença. Tanto as amostras de tecido nervoso como a informação médica a meu respeito, bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo, que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. O meu consentimento se refere ao uso do material que será retirado durante a cirurgia para a realização de estudos científicos. É importante lembrar que a cirurgia mencionada acima, faz parte do tratamento médico. A pesquisa laboratorial utilizando as amostras de tecido poderá ser feita durante um período máximo de 30 anos após a coleta. Após o término desta pesquisa com prazo de duração de cerca de 4 anos, pretende-se armazenar este material durante no máximo 30 anos caso haja a necessidade de se dar continuidade a pesquisas complementares. Neste caso será feito novo protocolo para submissão à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa local e se necessário ao Conselho Nacional de Ética em Saúde (CONEP).

RISCO E DESCONFORTO:

Não há quaisquer riscos ou prejuízos adicionais para os sujeitos da pesquisa, já que o material utilizado para a pesquisa (pequena amostra de tecido nervoso) será obtido de pacientes submetidos à retirada cirúrgica do tecido lesado, como forma de tratamento.



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não terei nenhuma vantagem pessoal com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento de possíveis familiares com a epilepsia familiar ou esporádica não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Caso, no futuro, pesquisas com o material venham a trazer resultados com algum tipo de benefício aos familiares envolvidos, estes serão prontamente informados.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos estudos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, o que garante que os dados pessoais dos participantes não serão de livre acesso.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será revelado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.



Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data