UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA GATTÁS

**Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-
1225-5p em amígdalas, hipocampus e sangue de pacientes
com epilepsia do lobo temporal mesial**

**Ribeirão Preto
2017**

DANIELA GATTÁS

Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-1225-5p em amígdalas, hipocampus e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica-opção: Morfologia e Medicina experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

**Ribeirão Preto
2017**

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

Gattás, Daniela

Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-1225-5p em amígdalas, hipocampos e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial

92 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Tirapelli, Daniela Pretti da Cunha.

1. Epilepsia. 2. miRNAs. 3. Amígdala. 2. Hipocampo.
5. Lobo Temporal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Gattás

Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-1225-5p em amígdalas, hipocampus e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial

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

Opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido: **Fermino Sanches Lizarte Neto**. Você sempre foi meu maior incentivador em todas as etapas da minha dissertação. O motivo de ter entrado no Mestrado. A sua paixão pela USP e pela pesquisa me inspirou e inspira até hoje. A ciência necessita de pessoas com a sua capacidade e determinação. Continue assim meu amor. Você terá um caminho brilhante pela frente.

Aos meus pais: **Carmen Cecília Cantarella Gattás** e **Raul Gattás**. Vocês me deram toda a estrutura familiar, educação, valores, respeito, carinho, admiração... Toda a minha formação. Pai, gostaria que o senhor estivesse entendendo esse momento tão especial que estou passando, sei que teria orgulho de mim, desculpe não poder ficar tão presente, mas estou com o senhor em pensamento em todos os momentos. A melhor parte do meu dia é quando recebo um sorriso do senhor ao visitá-lo, vejo que ainda o senhor me reconhece e que gosta muito de mim... O senhor será sempre reconhecido como um grande médico psiquiatra, formado pela FMRP-USP, mesmo não atuando mais. Seus pacientes te admiram muito.

Aos meus sogros: **Melana** e **Vanderlei**. Vocês me deram o melhor presente que eu já pude ganhar em toda a minha vida: seu filho! Obrigada de coração!

Ao meu irmão Marcelo, ao cunhado Vando, a cunhada Renata, aos sobrinhos Gabriela, Gustavo, Eduardo e Sophia. Obrigada por me apoiarem e torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço também a todos os familiares e amigos por nunca me deixarem desistir, obrigada pela paciência, carinho e compreensão, principalmente durante essa jornada. Vinte anos de formada em fisioterapia e iniciando nas atividades de pesquisa, foi uma mudança muito grande em minha vida. Um grande desafio.

Amo demais vocês!!! Meu simples, mas sincero, muito obrigada!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli**, agradeço por ter compartilhado comigo durante a realização deste trabalho o seu conhecimento, experiência, sabedoria ... Admiro imensamente o seu trabalho, a sua carreira, sua competência, seu respeito, sua dedicação, sua elegância Grata por sempre me incentivar, proteger, cuidar de mim, por toda a paciência, pelo carinho, pelo meu crescimento pessoal, profissional e principalmente pela amizade em mim depositada durante toda essa jornada. Não tenho palavras suficientes para agradecê-la. Muito obrigada mesmo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, inteligência, capacidade e fé para que chegasse até aqui .

A Universidade de São Paulo pela oportunidade e por oferecer-me todas as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

A todo corpo docente da pós-graduação da FMRP-USP pelos ensinamentos durante a realização de suas disciplinas.

Ao **Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior**, pelos constantes incentivos e apoio científico durante a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Silvio Tucci Junior** e **Profa Dra Fernanda Maris Peria** por terem participado e me apoiado durante o processo de avaliação da minha qualificação de mestrado .

Ao **Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli**, pelos constantes incentivos, apoio científico e amizade.

Ao **Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi**, pela colaboração, constantes incentivos, apoio científico e amizade.

A secretária **Juliana** pelo profissionalismo e dedicação .

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Em especial a **Priscila**, ao **Neto**, ao **Ricardo** e a **Renata** por me ajudarem na realização dos experimentos. Sem essa equipe maravilhosa, não teria alcançado os meus objetivos nessa jornada. Muito obrigada.

RESUMO

GATTÁS, D. **Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-1225-5p em amígdalas, hipocampus e sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial.** 92f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

INTRODUÇÃO: Epilepsia do lobo temporal (ELTM) é a forma mais comum de epilepsia parcial, ocorrendo em cerca de 40% dos pacientes. Na ELTM as crises epiléticas podem ter origem na região cortical, o que é menos comum, porém ocorrem frequentemente em estruturas mesiais do lobo temporal, representadas basicamente pelo hipocampo e/ou amígdala. Com intuito de incluir novas possibilidades de tratamento e diagnóstico, torna-se necessário uma maior compreensão das bases moleculares da ELTM. Dentro desta perspectiva, um dos grandes desafios para a Neurociências na atualidade é o desenvolvimento de biomarcadores que facilitem o diagnóstico e prognóstico para a epilepsia. Recentemente, com o desenvolvimento de algumas pesquisas e novas técnicas no campo da biologia molecular demonstram que microRNAs circulantes no sangue são biomarcadores sensíveis e específicos para várias doenças, incluindo doenças neurológicas, podendo ser obtido de forma não invasiva, representando assim um método de eficiente detecção e custo baixo. **OBJETIVOS:** Analisar o perfil de expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p na amígdala, hipocampo e sangue de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia do lobo temporal mesial refratários ao tratamento medicamentoso e investigar se os mesmos podem auxiliar como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para a epilepsia. **PACIENTES E MÉTODOS:** Foram utilizadas amostras de amígdalas, hipocampus e sangue de 20 pacientes com ELTM, sendo 10 com boa evolução pós-operatória (Engel I) e 10 com evolução pós-operatória insatisfatória (Engel III e IV), e para controle foram utilizados 10 amostras de amígdalas e 10 de hipocampus de necrópsias, assim como 10 amostras de sangue de indivíduos saudáveis. A análise de expressão dos miRNAs foi feita utilizando a técnica de RQ-PCR. **RESULTADOS e CONCLUSÕES:** Os miRNAs miR-629-3p, miR-1202 e miR-1225-5p apresentaram-se hiperexpressos no sangue de pacientes com ELTM, podendo sugerir um possível papel de biomarcadores auxiliando no diagnóstico da ELTM. Os miRNAs-629-3p, 1202 e 1225-5p apresentaram aumento nos níveis de expressão sanguíneos progressivos entre os grupos controle, Engel I e Engel III e IV respectivamente, apresentando também possível potencial de biomarcadores no prognóstico cirúrgico entre Engel I e Engel III e IV.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial, microRNAs, Amígdala. Hipocampo.

ABSTRACT

GATTÁS, D. **Expression of microRNAs miR-629-3p, miR-1202 and miR-1225 in amygdala, hippocampus and blood of patients with mesial temporal lobe epilepsy.** 92f. Medical School of Ribeirao Preto/USP, 2017.

INTRODUCTION: Epilepsy of the temporal lobe is the most common form of partial epilepsy, occurring in about 40% of patients. In TLE epileptic seizures may originate in the cortical region, which is less common. However they occur more frequently in temporal lobe mesial structures, represented primarily by the hippocampus and / or amygdala. A greater understanding of the epilepsy molecular basis is necessary when aiming to implement new treatments possibilities. Within this field of study, one of the major challenges for neuroscience today is the development of biomarkers that facilitate the diagnosis and prognosis for epilepsy. Recently, with the development of some researches and new techniques in the field of molecular biology, it demonstrate that microRNAs circulating in the blood are sensitive and specific biomarkers for various diseases, including neurological diseases and they can be obtained noninvasively, thus representing a low cost method of efficient detection.

OBJECTIVES: To analyze the expression profile of miR-629-3p, miR-1202, miR1225-5p microRNAs in the amygdala, hippocampus and blood of patients operated to treat the mesial temporal lobe epilepsy refractory to drug treatment and investigate whether they can be used as biomarkers for epilepsy diagnosis and prognosis.

PATIENTS AND METHODS: Amygdala, hippocampus and blood samples of 20 patients with MTLE were used; 10 with good postoperative outcome (Engel I) and 10 with poor postoperative outcome (Engel III and IV), and for the control group 10 amygdalas and 10 hippocampus of necropsy, as well as, 10 samples blood from healthy individuals. The analysis of the expression of miRNAs was performed using RQ-PCR. **RESULTS AND CONCLUSION:** MiRNAs miR-629-3P, miR-1202 and miR-1225-5P were hyper-expressed in the blood of patients with MTLE, and may suggest a possible role of biomarkers in the diagnosis of MTLE. miR-629-3p, miR-1202 and miR-1225-5p were progressively expressed in the blood of patients in the control, Engel I and Engel III and IV groups respectively, representing also potential biomarkers for surgical prognosis between Engel I and Engel III and IV.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy, microRNAs, Amygdala, Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrando a biogênese do MicroRNA, que se inicia no núcleo da célula e depois de ser transportado para o citoplasma, associa-se ao complexo protéico RISC com o qual irá modular a expressão do gene alvo36

Figura 2: Análise qualitativa global da expressão de 723 miRNAs humanos e 76 miRNAs virais em amostras de hipocampo e sangue provenientes de controles e pacientes com ELTM por meio da técnica de *microarray*.....49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia	56
Gráfico 2: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III Eiv	56
Gráfico 3: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia	57
Gráfico 4: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.....	57
Gráfico 5: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV	58
Gráfico 6: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia.	58
Gráfico 7: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV	59
Gráfico 8: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia	59
Gráfico 9: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III e IV.....	60
Gráfico 10: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia	60
Gráfico 11: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.....	61
Gráfico 12: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV	61
Gráfico 13: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia	62

Gráfico 14: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV	62
Gráfico 15: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia	63
Gráfico 16: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III e IV	63
Gráfico 17: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia	64
Gráfico 18: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia.....	64
Gráfico 19: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV	65
Gráfico 20: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia	65
Gráfico 21: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de Engel.....	23
Tabela 2: Dados dos pacientes com ELTM	47

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
cm	centímetro
µl	microlitro
ml	mililitro
min	minuto
ng	nanograma
aC	antes de Cristo
ATP	trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
BDNF	Brain - derived neurotrophic factor
CA	Corno de Amon
cDNA	DNA complementar
CEMEL	Centro de Medicina Legal
CIREP	Centro de Cirurgia de Epilepsia
CPC	Crise parcial complexa
CT	Cycle Threshold
DAEs	Drogas anti-epilépticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose hipocampal

ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	ácido glutâmico
ILAE	International League Against Epilepsy
IPI	Injúria precipitante inicial
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
miRNA	MicroRNA
NT	Neurotransmissores
NMDA	N-metil-D-aspartico
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RISC	RNA induced silence complex
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RQ-PCR	Transcrição reversa quantitativa da PCR
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de Fold calculados para as amostras de sangue de pacientes com epilepsia e sangue de indivíduos saudáveis (controles).	90
Apêndice 2. Valores de Fold calculados para as amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia e hipocampo de necropsias (controles).....	91
Apêndice 3. Valores de Fold calculados para as amostras de amígdala de pacientes com epilepsia e amígdala de necropsias (controles).	92

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Epilepsia.....	21
2.2 Epilepsia do lobo temporal mesial.....	24
2.2.1 Hipocampo e epilepsia do lobo temporal mesial	26
2.2.2 Amígdala e epilepsia do lobo temporal mesial	27
2.3 Neurotransmissores e epilepsia	29
2.4 microRNase epilepsia	35
2.4.1 microRNAs-629-3p, -1202, -1225-5p.....	39
2.5 Biomarcadores e miRNAs:	40
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivos gerais.....	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 PACIENTES E MÉTODOS	46
4.1 Pacientes.....	46
4.1.1 Dados dos pacientes.....	47
4.2 Seleção dos alvos	48
4.3 Métodos.....	50
4.3.1 Extração do RNA.....	50
4.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA.....	51
4.3.3 RQ-PCR dos microRNAs: miR-629-3p , miR-1202 , miR-1225-5p.....	52
4.3.4 Análise estatística	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p.....	55
5.1.1 miR-629-3p.....	56
5.1.2 miR-1202.....	59
5.1.3 miR-1225-5p.....	63
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é a condição neurológica crônica não infecciosa relativamente comum nos dias atuais, acometendo cerca de 6,38 por 1000 pessoas no mundo, sendo considerada a segunda desordem neurológica mais prevalente (Fiest *et al.*, 2017; Ngugi *et al.*, 2011). Anualmente milhares de pessoas no mundo são impossibilitadas de exercerem suas profissões, estudos e outras atividades cotidianas, devido a ocorrência de crises epiléticas em suas vidas. Entre as síndromes epiléticas, destaca-se a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM), sendo esta freqüentemente associada à refratariedade ao tratamento medicamentoso e excelente resposta ao tratamento cirúrgico (Wieser e Epilepsy, 2004).

Para uma melhor compreensão da ELTM, tem se destacado na literatura pesquisas utilizando tecido epiléticos humanos provenientes da remoção cirúrgica da zona epileptogênica, assim como estudos experimentais com animais submetidos a diferentes modelos experimentais de epilepsia. Recentemente, com o desenvolvimento de novas técnicas no campo da biologia molecular, foram descobertas pequenas moléculas de RNA, denominadas de microRNAs (miRNA), presentes no citoplasma das células de animais e vegetais, que atuam no silenciamento pós-transcricional da síntese protéica. Estudos tem relacionado os miRNAs à modulação de algumas funções neuronais (Kosik, 2006). No sistema nervoso central, a maioria das pesquisas tem se concentrado em doenças degenerativas e esquizofrenia, sendo dada menor atenção aos microRNAs associados à epilepsia (Lukiw, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Wang e Lee, 2009).

Portanto, o presente estudo tem como proposta avaliar a expressão dos microRNAs-623-3p, 1202 e 1225-5p em sangue, amígdalas e hipocampus de pacientes portadores de ELTM, submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epilepsia

A palavra epilepsia tem origem do verbo Grego “*epilambanein*” que significa “capturar, possuir ou afligir”. A epilepsia é uma condição médica tão antiga quanto a existência humana. A primeira descrição de uma crise epiléptica data de 2000 anos a.C, na região da Mesopotâmia, sendo considerada inicialmente como uma doença divina ou possessão demoníaca, provavelmente devido a impressionante manifestação da crise convulsiva. Foi posteriormente descrita por Hipócrates, que contestou sua origem divina, ao realizar a primeira descrição formal da epilepsia como uma doença atribuída à disfunção cerebral (Magiorkinis *et al.*, 2010). Hoje compreende-se que a epilepsia é uma síndrome caracterizada por crises espontâneas e recorrentes devido à hiperatividade neuronal, sendo considerada uma importante causa de incapacidade e mortalidade aos indivíduos acometidos por esta doença (Ngugi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

Há poucos estudos sobre a incidência mundial de epilepsia, estima-se que essa doença atinja quase 70 milhões de pessoas no mundo, apresentando-se diferencialmente prevalente em países de baixa e média renda em comparação aos países de alta renda, sendo duas vezes maior nos países de baixa e média renda. A incidência média mundial de epilepsia é de 50,4 casos para 100.000 habitantes/ano, sendo de 45 casos para países de alta renda e de 81,7 casos para países de baixa e média renda (Ngugi *et al.*, 2011).

De acordo com a última revisão da Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy*, ILAE), a crise epiléptica é uma ocorrência

transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade anormal excessiva ou hipersíncrona de neurônios cerebrais. Já a epilepsia é um distúrbio cerebral caracterizado pela predisposição em gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais causadas por essa condição (Chang et al, 2017).

Crises epiléticas são classificadas de acordo com o esquema proposto pela International League Against Epilepsy (ILAE) de 1981, que as divide em 3 grandes grupos:

- Crises parciais (Simples, Complexas e com evolução para crises generalizadas)
- Crises Generalizadas;
- Crises não classificáveis (Wyllie e Luders, 1997).

Outra classificação utilizada para avaliar e comparar os resultados cirúrgicos em relação as crises epiléticas é baseada na avaliação das crises epiléticas (ou ausência das crises) em pacientes submetidos à cirurgia, sendo classificados em ENGEL I a ENGEL IV, conforme descrito na tabela:

Tabela 1. Classificação de Engel sobre o controle de crises epiléticas no pós-cirúrgico de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia, segundo Engel (Engel *et al.*, 1993).

Classificação de Engel

Classe I. Livre de crises incapacitantes

- A. Completamente livre desde a cirurgia;
- B. Crises parciais simples não incapacitantes desde a cirurgia;
- C. Algumas crises incapacitantes após a cirurgia, mas livre de crises incapacitantes por > 2 anos;
- D. Crises generalizadas com descontinuidade de DAE apenas.

Classe II. Crises incapacitantes raras

- A. Inicialmente livre de crises incapacitantes, mas ainda apresenta raras crises;
- B. Raras crises incapacitantes desde a cirurgia;
- C. Crises incapacitantes ocasionais desde a cirurgia, mas crises raras nos últimos 2 anos.

Classe III. Melhora evidente

- A. Redução evidente das crises;
- B. Intervalos prolongados livre de crises somando mais de 50% do período de seguimento, mas inferior há 2 anos.

Classe IV. Sem melhora evidente

- A. Redução significativa das crises;
 - B. Sem alteração evidenciada;
 - C. Piora das crises.
-

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) realizou revisão dos conceitos, terminologias e abordagens para a classificação de crises epiléticas e epilepsia. Apesar das novas classificações estabelecidas em 2017 pela ILAE, encontra-se com frequência na prática clínica as classificações de crises de 1981 e as classificações de síndromes de 1989, que foram vigentes por muitos anos. Neste contexto, definiu-se como crise epilética uma ocorrência transitória de sinais e sintomas causados por hiperexcitabilidade anormal e/ou descargas neuronais hipersíncronas envolvendo o córtex cerebral. Algumas crises epiléticas podem ocorrer devido a insultos cerebrais, tais como: trauma de crânio, ingestão excessiva de álcool, alterações metabólicas, entre outros (Berg *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2005).

De acordo com a classificação das epilepsias de 1989 pela ILAE, não existe uma estrutura organizacional específica proposta para epilepsia, em vez disso, as diversas formas de epilepsia são organizadas de acordo com as dimensões que são mais relevantes para uma finalidade específica. Cada síndrome e paciente são caracterizados de acordo com: idade de início, antecedentes cognitivos e de desenvolvimento, exames sensoriais e motores, características do eletroencefalograma (EEG), entre outras características. Ainda, no último relatório da ILAE, a epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal foi admitida como uma síndrome epilética específica (Berg *et al.*, 2010; Berg e Scheffer, 2011).

2.2 Epilepsia do lobo temporal mesial

Epilepsia do lobo temporal é considerada a forma mais comum de epilepsia parcial, ocorrendo em cerca de 40% dos pacientes. Na ELT as crises epiléticas podem ter origem na região cortical, o que é menos comum, ou mais

frequentemente em estruturas mesiais do lobo temporal, representadas basicamente pelo hipocampo e amígdala, cuja incidência não apresenta predileção por sexo ou hemisfério afetado (Margerison e Corsellis, 1966; Babb e Brown, 1986; Hauser, 1992; Blümcke *et al.*, 2012).

Crises associadas à ELTM originam-se na amígdala e no hipocampo, que são estruturas constituintes do sistema límbico. O hipocampo juntamente com a amígdala, constitui a estrutura central do Sistema Límbico e desempenha um papel importante na regulação do comportamento emocional e sexual e na memória declarativa, ou seja, a memória semântica para fatos e conceitos, memória episódica e memória espacial (El-Falougy e Benuska, 2006; Fanselow e Dong, 2010; Blümcke *et al.*, 2012).

Epilepsia do lobo temporal mesial é considerada a causa mais freqüente das epilepsias focais refratárias ao tratamento medicamentoso. São crises que geralmente acontecem antes dos cinco anos de idade, precipitadas por algum tipo de injúria precipitante inicial (IPI) como traumatismo craniocéfálico, meningoencefalites e hipóxia. Após o início, as crises diminuem ou são facilmente controladas por drogas antiepilépticas, ocorrendo novamente em torno da primeira ou segunda década de vida, tornando-se cada vez mais frequentes e refratárias ao tratamento medicamentoso (Blümcke *et al.*, 2012).

Na maioria dos casos, as crises epiléticas são do tipo parcial complexa (CPC), seguindo uma sequência relativamente fixa de eventos. Em cerca de 90% dos pacientes, as crises tem início com fenômenos sensoriais conscientes (auras), tais como psíquicos (medo, irritabilidade e raiva), perceptivos (sensação de calor ou desconforto epigástrico, náuseas, alucinações olfativas e gustativas, palidez, sudorese e taquicardia) ou dismnésticos (*déjà vu*, *jamais vu*). Outros sintomas como

a reação de parada com comprometimento da consciência, capacidade de resposta e fixação do olhar com dilatação pupilar são comuns no início de uma convulsão. As convulsões podem parar nesta fase ou movimentos motores coordenados semi-espontâneos podem seguir (automatismos orais, automatismos manuais e postura distônica das mãos). Normalmente estes sintomas tem duração de menos de 2 minutos, e o quadro pós-ictal pode durar vários minutos, incluindo usualmente a desorientação, déficit de memória recente, amnésia e disfasia (Engel, 2001; Blümcke *et al.*, 2012)

2.2.1 Hipocampo e epilepsia do lobo temporal mesial

A palavra hipocampo tem origem de duas palavras gregas: *hippos* (“cavalo”) e *kampos* (“monstro do mar”) fazendo uma referência à sua estrutura anatômica dos cornos temporais dos ventrículos laterais a um cavalo marinho (Pearce, 2001; Duvernoy, 2005). Outros termos foram sugeridos posteriormente, como “*Silkworm*” por Duvernoy (1729) e “*Ram’s horn*” por Winslow (1732). Nesta época, os anatomistas tinham a tendência de associar as estruturas anatômicas aos símbolos mitológicos, sendo mudada a nomenclatura por De Garengeot (1742) de “*Ram’s horn*” para *Cornu Ammonis*, fazendo referência ao Deus egípcio Amon, sendo esta nomenclatura utilizada até os dias atuais (Lewis, 1923).

A literatura contemporânea considera o hipocampo como o conjunto morfofuncional composto pelo corno de Amon e giro denteado, dispostos em duas lâminas em forma da letra U, interlocadas e encaixadas, separadas apenas pelo sulco hippocampal. Já o termo “formação hippocampal” refere-se ao complexo formado pelas seguintes estruturas: giro denteado, Corno de Amon, complexo

subicular (subículo, para-subículo e pré-subículo) e córtex entorrinal (El-Falougy e Benuska, 2006).

O hipocampo situa-se na porção média do lobo temporal e apresenta 4,0 a 4,5 cm de comprimento, sendo dividido em três segmentos: cabeça, corpo e cauda. O Corno de Amon (CA) está dividido em quatro regiões nomeadas de CA1, CA2, CA3 e CA4 (Duvernoy, 2005).

Na ELTM o achado anatomopatológico mais comum descrito é a esclerose hipocampal (EH), podendo ser encontrada em cerca de 45 a 85% dos casos. O critério mínimo para a definição histopatológica da esclerose hipocampal é a perda neuronal e gliose dos setores CA1 e CA4. Outras alterações incluem a perda neuronal e gliose dos demais setores do Corno de Amon, brotamento axonal, reorganização sináptica e dispersão das células granulares do giro denteado (Wieser e Epilepsy, 2004; Nelson *et al.*, 2013).

2.2.2 Amígdala e epilepsia do lobo temporal mesial

Grupos celulares da amígdala são derivados de regiões distintas, podendo ser diferenciados funcionalmente por suas conectividades e distribuição de neurotransmissores dentro de cada grupo (Aggleton e Saunders, 2000). Portanto, Johnston propôs que a amígdala fosse dividida em dois grupos: um grupo primitivo de núcleos, que estariam associados com o sistema olfatório (núcleos central, medial, cortical e núcleo do trato olfatório lateral) e um grupo filogeneticamente mais recente, composto pelos núcleos basal e lateral. O complexo amigdalóide é composto por aproximadamente 13 núcleos e a maioria dos núcleos pode ter ainda, duas ou mais subdivisões, possuindo assim extensa comunicação internuclear e

intranuclear. Podendo ser distinguidos entre si, baseando-se nos aspectos citoarquitetônicos, histoquímicos e de suas conectividades. De acordo com os aspectos anatômicos e a conectividade nuclear, derivados de diversos estudos realizados em ratos, podemos dividi-los em três grandes grupos (Pitkänen *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2003):

- Grupo basolateral ou grupo nuclear profundo;
- Grupo cortical ou grupo nuclear superficial;
- Grupo centromedial

Na epilepsia do lobo temporal o foco epiléptico reside na amígdala, hipocampo ou ambos. Nas últimas décadas, estudos tem demonstrado a associação do hipocampo a esse tipo de epilepsia, porém evidências sugerem que a amígdala também desenvolve um papel central nesse tipo de epilepsia, uma vez que, uma subpopulação de pacientes exibe extensas alterações neuropatológicas na amígdala e embora a ressecção do hipocampo em extensões variáveis seja necessária para o controle de crises epiléticas em muitos casos a amigdalectomia isolada é suficiente para eliminar as crises (Pitkänen *et al.*, 1997; Wieser, 2000; Mcnamara *et al.*, 2006; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008). Dentre os 13 núcleos existentes na amígdala, o grupo basolateral desenvolve o mais importante papel na iniciação e propagação das crises epiléticas. Estímulos elétricos prolongados desencadeiam estado de mal epilético prontamente quando o estímulo foi aplicado no grupo basolateral (Mohapel *et al.*, 1993; White e Price, 1993). Portanto, a amígdala tem um importante papel na patogênese e sintomatologia da ELT, sendo o complexo basolateral a região mais susceptível de gerar crises epiléticas.

O achado patológico mais observado na amígdala de pacientes acometidos pela epilepsia do lobo temporal mesial é a atrofia (redução do volume associado à perda neuronal e gliose), sendo mais frequentemente acometidos o núcleo basal e lateral. A intensidade da atrofia parece não estar associada com a frequência das crises, idade do paciente e idade de início da epilepsia (Cendes *et al.*, 1993; Zentner *et al.*, 1999).

2.3 Neurotransmissores e epilepsia

Décadas atrás, a maioria das explicações de uma crise epiléptica era baseada na noção de que se a região onde a crise se originou teria sido uma excessiva liberação de acetilcolina pela inervação colinérgica. Como a maioria desses estudos foram realizados com acetilcolina em animais de experimentação, pela injeção direta de substâncias excitatórias para obtenção de crises epiléticas, os resultados foram avaliados com cautela para que pudessem ser aplicados em seres humanos. Outra teoria do passado bastante discutida era a “desinibição” com perda crônica de GABA decorrente dos “*feedbacks*” inibitórios. Hoje, sabe-se que essa perda preferencial da inibição não ocorre e que embora vários neurotransmissores (NT) estejam relacionados à epilepsia, somente o glutamato e o GABA com seus respectivos receptores apresentam evidências suficientes, tanto em estudos do tecido epilético humano como no campo experimental, para serem considerados os principais NT associados à epilepsia (Babb *et al.*, 1989; During *et al.*, 1995).

O sistema glutamatérgico está amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) e estudos demonstram o seu envolvimento em funções cognitivas

fundamentais, tais como a memória e aprendizado, sendo o glutamato considerado o maior neurotransmissor excitatório do SNC (Bressan e Pilowsky, 2003). O glutamato é sintetizado através de três precursores (glutamina, glicose e ornitina), sendo armazenado nos terminais pré-sinápticos em vesículas e são liberadas na fenda sináptica podendo ser recaptados. Também estimulam receptores pós-sinápticos que permitem a entrada de cálcio para o interior das células, em especial os receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartico) (Purves, 2005).

Além da presença de aminoácidos excitatórios, como o glutamato no fenômeno epiléptico, os aminoácidos inibitórios também atuam de maneira a amenizar os danos causados pela excitotoxicidade. Mecanismos gabaérgicos podem mediar alterações na excitabilidade neuronal, de uma maneira semelhante à plasticidade cortical normal, propriedade do sistema nervoso que permite o desenvolvimento de alterações estruturais em resposta à experiência, assim como em adaptação a condições mutantes e a estímulos repetidos (Hensch, 2005).

O Ácido Gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido constituído por quatro carbonos, formado no cérebro a partir da descarboxilação do ácido glutâmico pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Neste processo, a GAD utiliza o piridoxalfosfato como cofator e, uma vez que o cofator é derivado da vitamina B6, uma deficiência desta enzima leva à diminuição da síntese de GABA (Fariello *et al.*, 1991). O mecanismo de remoção do GABA nos receptores pós-sinápticos é semelhante ao do glutamato. Os neurônios como as células da glia possuem transportadores de alta afinidade capazes, após a sua retirada, de transformarem o GABA em succinato, que em seguida é metabolizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, transformando-se em ATP. As enzimas necessárias para que ocorra

essa degradação são a GABA amino-transferase e a desidrogenase do semi-aldeído succínico presentes nas mitocôndrias (Purves, 2005).

O GABA foi descrito no tecido cerebral na década de 1950, sendo atualmente considerado o principal NT inibitório. O GABA inibe a atividade neuronal por três diferentes mecanismos: hiperpolarização da membrana pós-sináptica devido à abertura de canais iônicos, principalmente por canais de cloro; diminuição da resistência da membrana, permitindo ligação de outro NT que realizarão concorrência com os potenciais excitatórios; inibição pré-sináptica por despolarização excitatória no terminal pré-sináptico que leva a um decréscimo na entrada de cálcio com consequente decréscimo na liberação do NT excitatório (Fariello *et al.*, 1991).

Os receptores GABA podem ser de 2 tipos: GABA_A (ionotrópicos) e GABA_B(metabotrópicos) (Macdonald e Olsen, 1994). São comumente inibitórios porque apresentam canais associados permeáveis ao cloro, capazes de tornar o potencial de inversão mais negativo, ou seja, promovem hiperpolarização da membrana, ao invés de despolarização como ocorre nas sinapses excitatórias. Os receptores GABA_A são constituídos por uma combinação de cinco subunidades, sendo identificadas atualmente 16 subunidades: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π), além de 3 subunidades ρ (1-3). A combinação mais comum descrita na literatura dos receptores GABA_A são de duas subunidades $\alpha 1$, duas $\beta 2$ e uma $\gamma 2$ (Olsen *et al.*, 2007). Os receptores GABA_B são compostos por heterodímeros das subunidades GABA_B R1 e GABA_B R2 e se apresentam também amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central, possuem sua ação inibitória através da ação intermediária da proteína G e de outras moléculas de sinalização intracelular, que atuam sobre

canais de potássio e cálcio, capazes de levar à hiperpolarização das células pós sinápticas (Yamada *et al.*, 1999).

No hipocampo epiléptico humano a neurotransmissão excitatória ocorre quando o glutamato é liberado pelo axônio terminal e despolariza as membranas pós-sinápticas. Como as sinapses estão reorganizadas no giro denteado e no hipocampo, uma hiperinervação dos dendritos previamente lesados ocorre devido ao brotamento anômalo das fibras musgosas durante o processo de perda celular da esclerose hipocampal. Fibras musgosas originadas das células granulares, secretam glutamato e criam de maneira aberrante um circuito monossináptico excitatório de “*feedback*” nos dendritos das próprias células granulares além de um circuito monossináptico excitatório sobre os dendritos das células piramidais de todas as regiões do hipocampo. Esses circuitos anormais promovem um aumento de axônios glutamatérgicos como aumento na densidade de receptores ionotrópicos AMPA, culminando a uma exacerbação na quantidade e no sincronismo excitatório dos circuitos glutamatérgicos (Babb *et al.*, 1996). Alguns subtipos de receptores de glutamato (mGluRs), desempenham um importante papel na propagação da atividade epileptiforme em cérebros de mamíferos. A expressão do receptor de glutamato classe I (mGluR1) tem sido demonstrada aumentada na região do giro denteado do hipocampo humano e de espécies de ratos (Blümcke *et al.*, 2000). Sabe-se também que receptores de glutamato do tipo NMDA das células granulosas do giro denteado estão aumentados nos circuitos epilépticos reorganizados, aumentando assim a duração da excitação pós-sináptica (Mathern *et al.*, 1996). A despolarização prolongada permite uma somatória maior, tanto espacial como temporal, desses grupos de neurônios disparando em sincronismo e que favorece a geração de descargas epiléticas. Recentes estudos em amígdala epilética de

humanos demonstraram um aumento da expressão da subunidade NR1 do NMDA, comprovando a hipótese da hiperexcitabilidade existente na amígdala de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (De Moura *et al.*, 2012).

Já a neurotransmissão inibitória no hipocampo epilético está paradoxalmente bem preservada ou aumentada, por duas razões: mesmo número de fibras GABAérgicas inervam poucos neurônios numa região, terminando mais densamente em cada neurônio; proliferação de novas fibras, para que um número maior de terminais GABAérgicos se conectem com um número semelhante de neurônios e dendritos excitatórios (Babb *et al.*, 1989). Uma variedade de estudos anatômicos e fisiológicos tem demonstrado axônios contendo GABA hiperinervando os receptores GABA na esclerose hipocámpal. Cada neurônio GABA é capaz de inervar e inibir mais células em condições normais, entretanto, ao término do período inibitório uma maior quantidade de células está apta a despolarizar simultaneamente à chegada do estímulo excitatório, favorecendo dessa forma o hipersincronismo, que é uma condição necessária para a ocorrência das crises epiléticas (Babb e Brown, 1986; Babb *et al.*, 1989; Mathern *et al.*, 1996). Crépel e Mulle em 2015, revisaram recentemente o papel dos receptores de cainato na fisiopatologia da epilepsia. Receptores de cainato estão localizados pre-sinápticamente tanto em sinapses glutamatérgicas como GABAérgicas, controlando a liberação dos neurotransmissores, envolvidos na plasticidade ou em várias regiões pós-sinápticas envolvidas na epilepsia, incluindo o córtex, o hipocampo e a amígdala (Crépel e Mulle, 2015).

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal mesial, alguns estudos utilizando tecido epilético humano provenientes da remoção cirúrgica tem se destacado na literatura, assim como estudos em tecidos

cerebrais de animais submetidos a diferentes modelos experimentais de epilepsia, onde os resultados relatam nas amostras de tecidos epiléticos uma diminuição da inibição mediada por GABA, da atividade do glutamato descarboxilase (GAD), assim como no número de interneurônios GABAérgicos e ligação dos ligantes a receptores GABA. Loup et al, ao avaliarem a expressão dos três principais subtipos de receptores GABA_A por imunohistoquímica em amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), observaram uma diminuição na expressão dos principais subtipos de receptores GABA_A nas amostras de hipocampo dos pacientes epiléticos quando comparado a amostras de hipocampo controle provenientes de necrópsias (Loup *et al.*, 2000). Mellios et al. (2009), avaliaram em amostras de córtex pré-frontal de necrópsias de pacientes com esquizofrenia, receptores GABAérgicos e o miR-195 por meio do PCR em tempo real, entre os resultados obtidos foi observado uma correlação inversa do miRNA-195 com uma expressão reduzida de receptores GABAérgicos, além de uma forte correlação positiva com a neurotrofina BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), sugerindo um possível papel regulador desse miRNA na expressão Gabaérgica em pacientes com esquizofrenia (Mellios *et al.*, 2009). Nomura et al., 2014 observaram em pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso que o resfriamento do foco epileptogênico cerebral do córtex humano previamente a ressecção do cortical ou hipocampectomia foi responsável por reduzir as descargas epiléticas através da diminuição significativa dos níveis de glutamato no córtex e/ou hipocampo durante as convulsões (Nomura *et al.*, 2014).

Para uma melhor compreensão da ELTM, tem se destacado na literatura pesquisas que visam a melhor compreensão das vias moleculares associadas a regulação dos receptores de neurotransmissores. Neste contexto, com o

desenvolvimento de novas técnicas no campo da biologia molecular, foram descobertas pequenas moléculas de RNA, denominadas de microRNAs (miRNA), que tem importante papel no controle das vias moleculares de receptores de neurotransmissores, em especial, os receptores gabaérgicos, que foram o alvo desse estudo em questão.

2.4 microRNase epilepsia

Os microRNAs (miRNA) fazem parte do grupo de pequenas moléculas de RNAs, que apresentam fita simples, constituídos de aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos que atuam como importantes reguladores da expressão de gênica, atuando a nível pós-transcricional por meio do bloqueio da síntese protéica ou indução da degradação do mRNA (Hammond, 2006; Ricarte Filho e Kimura, 2006; Cowland *et al.*, 2007)

O processo de formação e atividade do miRNA, como demonstra a figura 1, é iniciado com a transcrição de seu gene pela RNAPolimerase II, gerando um transcrito de miRNA primário (pri-miRNA). O pri-miRNA apresenta uma estrutura *hairpin* que é clivada, ainda no núcleo pela RNase III (*Drosha*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III (*Dicer*), gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos, cujo produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), que inclui proteínas argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a

expressão pós-transcricional de genes-alvo. Quando uma ligação perfeita entre um miRNA e seu alvo mRNA ocorre, o RISC induz a degradação do mRNA. Quando uma ligação imperfeita ocorre, a produção da proteína final é bloqueada (Lawler e Chiocca, 2009).

Figura 1 – Esquema ilustrando a biogênese do MicroRNA, que se inicia no núcleo da célula e depois de ser transportado para o citoplasma, associa-se ao complexo protéico RISC com o qual irá modular a expressão do gene alvo (Ricarte Filho e Kimura, 2006).

Funcionalmente os miRNAs estão relacionados a processos celulares fundamentais, que incluem desde a regulação do ciclo celular, morte celular, diferenciação hematopoiética, câncer, respostas imunes, morfologia celular e metabolismo celular (Gauthier e Wollheim, 2006; Matsubara *et al.*, 2007; Hatfield e Ruohola-Baker, 2008; Bi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Os miRNAs atuam regulando

uma ampla variedade de genes no organismo humano, sendo que, foram identificados vários miRNAs no sistema nervoso central que desempenham um importante papel em uma variedade de processos biológicos, tais como: apoptose, proliferação, desenvolvimento axonal, plasticidade sináptica e também estão associados a patogênese de várias doenças do sistema nervoso tais como: tumores, doença de Alzheimer, síndrome de Down, epilepsia do lobo temporal Mesial, esquizofrenia, doença de Parkinson, autismo, síndrome de Tourette e acidente vascular cerebral, entre outras (Abelson *et al.*, 2005; Brennan e Henshall, 2017; Kim *et al.*, 2007; Lukiw, 2007; Beveridge *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Na literatura atual, estudos de epilepsia, apresentam os microRNAs como prováveis reguladores de genes alvos associados a microestrutura neuronal, morte celular, gliose, inflamação e resposta imune. Dessa forma, um melhor entendimento dos microRNAs permitiria uma melhor compreensão da patogênese da epilepsia (Jimenez-Mateos e Henshall, 2013). Entretanto, poucos destes estudos demonstram a relação dos microRNAs com epilepsia em humanos. Algumas pesquisas recentes realizaram análises em larga escala da expressão dos microRNAs em amostras de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial. Kan *et al.*, 2012 encontraram, pela técnica de *microarrays*, 165 microRNAs que estavam hiperexpressos e hipoexpressos em epilepsia do lobo temporal mesial. Os autores analisaram amostras de hipocampos e foram selecionados randomicamente 11 destes microRNAs e os mesmos foram validados por PCR em tempo real. Os miRNAs miR-190, miR-20a, miR-32, miR-374a, miR-26b, miR-92b e miR-193a-3p demonstraram altos níveis de expressão no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal, enquanto os miRNAs: miR-184, miR-138, miR-221 e miR-222 demonstraram baixa expressão no hipocampo dos mesmos

pacientes. Estes achados nos mostram que alguns miRNAs estão envolvidos diretamente na patogênese da epilepsia do lobo temporal mesial, sugerindo que alterações na expressão dos microRNAs representariam causa ou consequência do acontecimento da doença (Li *et al.*, 2014; Alsharafi *et al.*, 2015).

Ainda que um único miRNA é capaz de regular centenas de genes, a identificação de miRNAs que atuam de maneira específica em alguma condição patológica cerebral, pode contribuir assim para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para doenças específicas, desempenhando portanto, um papel regulatório decisivo. Em outro estudo recente, Zucchini *et al.*, 2014 realizaram também uma análise global de expressão de miRNAs em amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal com ou sem células granulares hipocampais. Os resultados demonstraram a identificação de 12 miRNAs diferencialmente expressos (miR-1234, miR-1281, miR-30c-1, miR-92b, miR-191, miR-1238, miR-3607-5p, miR-219-5p, miRNA-338-3p, miR-590-5p, miR-487a, miR-3659) em amostras de hipocampo de pacientes com esclerose hipocampal associado com patologia granular celular quando comparado com amostras de hipocampo de pacientes com esclerose hipocampal sem patologia granular celular (Alsharafi *et al.*, 2015, Zucchini *et al.*, 2014).

Embora as evidências encontradas na literatura demonstrem que a neurotransmissão encontra-se alterada no complexo amigdalóide e no hipocampo de pacientes com ELT, poucos estudos tem relacionando os miRNAs com epilepsia. Portanto, propomos a pesquisa com a finalidade de avaliar os miRNAs-629-3p, 1202, 1225-5p, associados as vias moleculares dos receptores GABA, na esclerose mesial do lobo temporal.

2.4.1 microRNAs-629-3p, -1202, -1225-5p

Embora as evidências encontradas na literatura demonstrem que a neurotransmissão encontra-se alterada no complexo amigdalóide e no hipocampo de pacientes com ELTM, poucos estudos tem relacionando os miRNAs com epilepsia. Foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) um estudo pela técnica de microarray, onde foram avaliados microRNAs, sendo que alguns se expressaram diferencialmente em pacientes com ELTM classificados de acordo com a classificação de Engel. Foram selecionados a partir da análise do resultado do microarrays, três microRNAs, associados a vias moleculares de receptores de neurotransmissores GABA, que se apresentaram hiperexpressos em hipocampus e sangues de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico da ELTM.

Com relação ao miRNA-629-3p, já foram demonstrados na literatura dados relatando sua expressão em outras doenças, como por exemplo, a depressão, sendo observado sua expressão aumentada no sangue de pacientes submetidos a tratamento com antidepressivos (Maffioletti *et al.*, 2014). Além disso, a hiperexpressão do miRNA-629-3p em glioblastoma tem sido associado a um aumento da sobrevida global dos pacientes submetidos à quimioterapia com temozolomida, sugerindo esse miRNA como um biomarcador preditivo para a resposta à temozolomida em pacientes portadores deste tipo de tumor (Hui-Yuan *et al.*, 2014).

O miRNA-1202 em alguns estudos da literatura apresenta sua expressão reduzida, contribuindo assim na fisiopatologia da depressão, uma vez que, controla

negativamente a expressão do receptor de Glutamato do tipo 4 (Lopez *et al.*, 2014; Dadkhah *et al.*, 2017).

A expressão do miRNA-1225-5p foi avaliado em diversas doenças, como por exemplo, doença de Alzheimer, sendo observado diferencialmente expresso por sequenciamento de última geração em amostras de hipocampo de pacientes portadores da doença (Lau *et al.*, 2013). Em outro estudo, Zheng *et al.*, 2016 demonstraram que o miRNA-1225-5p se apresenta hipoexpresso em câncer gástrico, sendo considerado responsável pelo desenvolvimento e progressão do câncer gástrico, pois atua na inibição da sinalização de IRS1 (Substrato 1 do receptor de insulina) e p-catenina (Zheng *et al.*, 2016).

2.5 Biomarcadores e miRNAs:

O uso de miRNAs como biomarcadores tem ganhado interesse crescente nos últimos anos. Seu papel na regulação de uma grande variedade de alvos, torna estes pequenos RNAs uma ferramenta promissora na detecção precoce de doenças, que pode ser explorada na avaliação de riscos, prognóstico e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (De Smaele *et al.*, 2010).

Os miRNAs podem ser uma possibilidade de novos alvos moleculares na epilepsia, auxiliando na predição e tratamento dessa doença. Um alvo molecular ou biomarcador trata-se de uma molécula capaz de caracterizar um processo biológico normal e patológico, cuja expressão é estabelecida ou se diferencia apenas em estado patológico (Engel *et al.*, 2013).

Biomarcadores podem em teoria facilitar o desenvolvimento de novas intervenções para prevenir ou reverter a progressão da epilepsia (Galanopoulou e

Moshé, 2011). O perfil de expressão dos miRNAs e algumas de suas características tornam essas moléculas importantes na busca por biomarcadores em algumas doenças, inclusive na epilepsia (Wang *et al.*, 2015).

Os microRNAs (miRNAs) estão sendo utilizados como biomarcadores tanto para fins de diagnóstico e prognóstico, como para orientar decisões terapêuticas em várias doenças (Hui *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2011). Os miRNAs podem ser detectados não só a partir de tecidos frescos ou congelados, mas também a partir vários fluidos corporais, tais como líquido cefalorraquidiano e sangue (Dogini *et al.*, 2013).

Li *et al.*, 2016 apresentaram evidências de miRNAs circulantes no plasma de pacientes com epilepsia como possíveis biomarcadores. Foram encontrados dois miRNAs hipoexpressos (miR-153 e miR-494) em pacientes com epilepsia em comparação com controles saudáveis. Entre estes miRNAs, miR-153 teve o melhor valor diagnóstico para a epilepsia, sendo este miRNA um possível biomarcador não invasivo com potencial para melhorar o diagnóstico atual da epilepsia refratária aos medicamentos (Li *et al.*, 2016).

A dificuldade de acesso ao tecido cerebral 'in vivo', é considerado um real empecilho no estudo da coexpressão do encéfalo-sangue nas doenças do SNC. Todavia, muitas pesquisas foram realizadas identificando assinaturas por miRNAs apenas com a utilização de sangue periférico. Por exemplo, De Felice *et al.* (2012) utilizando a fração leucocitária do sangue de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA), identificaram oito miRNAs diferencialmente expressos, sendo sete hipoexpressos (miR-451, miR-1275, miR-328-5p, miR-638, miR-149, miR-665 e miR-583) e um hiperexpresso (miR-338-3p). Destes, o miR-338, único hiperexpresso, foi

previamente descrito em ELA e considerado um possível biomarcador da doença (De Felice *et al.*, 2012).

Podemos sugerir que os miRNAs reúnem as principais características de um biomarcador: especificidade tissular, expressão diferencial nas doenças, facilidade de detecção e presença em fluídos corporais, resistência a degradação com maior estabilidade quando comparados aos mRNAs (Etheridge *et al.*, 2011; Weiland *et al.*, 2012). Com base nessas informações, é de suma importância avaliar a expressão do miRNA-629-3p, 1202 e 1225-5p na epilepsia, pois essas moléculas regulam importantes proteínas envolvidas no desenvolvimento dessa doença.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

A proposta desse trabalho foi investigar a expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p na amígdala, hipocampo e no sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p no hipocampo, amígdala e no sangue de pacientes com ELTM por PCR em tempo real.
- Avaliar a coexpressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p no hipocampo, amígdala e no sangue de pacientes com ELTM.
- Avaliar as diferenças de expressão desses microRNAs nos grupos Engel IA e Engel III e IV, afim de verificar seus potenciais como biomarcadores na ELTM.

PACIENTES E MÉTODOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram utilizadas amostras de amígdalas, hipocampos e sangue de 20 pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia do lobo temporal refratária ao tratamento medicamentoso. A cirurgia foi realizada pela equipe da Divisão de Neurocirurgia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). As amostras encontravam-se armazenadas em freezer 80°C alocado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram abordados para a obtenção de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Esses pacientes foram acompanhados pelo Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) e avaliados quanto à evolução pós-operatória, dividindo-se em dois grupos: um constituído por 10 pacientes com boa evolução pós-operatória (Engel IA) e o outro constituído por 10 pacientes com má evolução pós-operatória (Engel III e IV).

Para amostras controles das peças cirúrgicas, foram utilizados 10 hipocampos e amígdalas oriundos de 10 indivíduos autopsiados pelo Centro de Medicina Legal (CEMEL) da FMRP-USP, sem doença neurológica ou psiquiátrica, extraídas em até 8 horas após o óbito. Para amostras controles de sangue, foram utilizadas 10 amostras coletadas de indivíduos saudáveis.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo, segundo processo HCRP nº8166/2016.

4.1.1 Dados dos pacientes

Na Tabela 2 estão apresentadas as informações a respeito dos pacientes selecionados para esse trabalho.

Tabela 2. Dados dos pacientes com ELTM.

PACIENTE	INICIAIS	SEXO	IDADE	ENGEL
SNC 349	S.R.S	FEM	37 ANOS	I
SNC 375	J.V.T.A	FEM	35 ANOS	I
SNC 380	E.M.S	MASC	44 ANOS	I
SNC 392	J.G.S.	FEM	29 ANOS	I
SNC 440	L.F.M.	MASC	41 ANOS	I
SNC 454	E.H.G.G.	FEM	37 ANOS	I
SNC 460	M.A.P.S.	FEM	39 ANOS	I
SNC 500	A.J.B. J.	FEM	25 ANOS	I
SNC 563	E.T.V	MASC	52 ANOS	I
SNC 690	L.B.B.	FEM	37 ANOS	I
SNC 346	N.M.H.	FEM	32 ANOS	III ou IV
SNC 355	C.A.G.Z.	MASC	54 ANOS	III ou IV
SNC 363	S.A.S.	MASC	41 ANOS	III ou IV
SNC 385	C.S.	MASC	40 ANOS	III ou IV
SNC 443	M.R.O.A.	FEM	45 ANOS	III ou IV
SNC 446	Z.F.	FEM	45 ANOS	III ou IV
SNC 484	M.R.	MASC	48 ANOS	III ou IV
SNC 539	S.M.S	FEM	41 ANOS	III ou IV
SNC 741	L.N.S.R.	FEM	44 ANOS	III ou IV
SNC 787	R.G.S.	FEM	28 ANOS	III ou IV

A idade média do grupo Engel I é de 37,6 e Engel III e IV é de 41,8.

4.2. Seleção dos alvos

Em um estudo prévio desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa da Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, foi realizada uma análise global da expressão de miRNAs com a plataforma comercial *Human Microarray Kit V3* (Agilent, G4470C), sendo avaliada a expressão de 723 miRNAs humanos e 76 miRNAs virais em amostras de hipocampo e sangue de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia do lobo temporal mesial. A análise da expressão diferencial foi realizada em R utilizando os pacotes *limma* e *AgiMicroRna*. A normalização foi realizada utilizando a função “*rma MicroRna*” (Lopez-Romero, 2017).

Neste estudo foi obtido um panorama da expressão dos miRNAs, associados a vias moleculares do receptores de neurotransmissores GABA, no hipocampo e sangue, tanto de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial versus grupo controle, assim como do grupo de resposta cirúrgica favorável (Engel IA) quanto com resposta desfavorável (Engel III-IV) versus grupo controle. Os miRNAs diferencialmente expressos que exibiam coexpressão sangue-hipocampo entre os grupos de estudo foram estimados por modelo linear utilizando o modelo empírico de Bayes como moderador da variação da expressão (Smyth *et al.*, 2005). Foram considerados miRNAs diferentemente expressos aqueles com $\log_2$ da variação maior que 1, o valor de $p < 0.05$ e o valor de p ajustado pelo FDR (do inglês *False Discovery Ratio*) menor que 0.05. A análise de clusterização hierarquizada não supervisionada foi realizada utilizando o método Ward.D e a distância foi baseada no valor de 1- correlação utilizando o pacote “*heatmap3*”.

Os miRNAs selecionados foram analisados pela ferramenta *MirPath* V.3, disponível online no Diana Tools (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Esta ferramenta identifica as vias de sinalização da base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) que potencialmente são reguladas pela expressão dos miRNAs. Consideramos as vias significantes para os valores de p ajustado pelo FDR menor que 0.05. Assim, foram identificados na análise 3 miRNAs: miR-629-3p; miR-1202; miR-1225-5p que apresentavam como alvos genes de receptores gabaérgicos (Figura 2). Os alvos foram confirmados baseado no banco de dados do miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/download.php>).

Figura 2: Clusterização hierarquizada não supervisionada de 723 miRNAs humanos e 76 miRNAs virais em amostras de hipocampo e sangue provenientes de controles e pacientes com ELTM por meio da técnica de *microarray*.

A técnica de PCR em tempo real foi empregada para validação dos 3 miRNAs identificados pelo *microarray*.

4.3 Métodos

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP. Para análise da expressão dos miRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p foram realizadas as seguintes etapas: extração de RNA, síntese de cDNA e RQ-PCR.

4.3.1 Extração do RNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA em quantidade aproximada de 4 mL e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. O precipitado (hemácias e buffy coat) foi transferido para tubo falcon estéril e livre de RNase de 50 mL e a esse foi acrescentado 20 mL de tampão para lise de glóbulos vermelhos. Após manter 15 min em gelo, centrifugou-se novamente por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, obtendo-se o pellet que foi ressuspenso em 250 µL de PBS (phosphate-buffered saline) e 750 µL de Trizol® (Invitrogen, EUA) e transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

Às amostras de amígdalas e de hipocampus congeladas de todos os grupos foram adicionados 250 µL de PBS (phosphate-buffered saline) e 750 µL de Trizol® (Invitrogen, EUA). Os fragmentos de tecido foram homogeneizados com a utilização de um aparelho chamado Politron® e posteriormente transferidos para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

A partir de então, sangue e tecidos (amígdala e hipocampo) foram processados da mesma maneira, foi acrescentado 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4° C por 15

minutos a 13.200 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500 µl de álcool isopropílico 100% e permanecendo a – 20° C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 70% seguido de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm, novamente desprezando-se o sobrenadante. O pellet foi seco por inversão, permanecendo em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir a amostra foi ressuspensa com água tratada com DEPC com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquoteado, identificado e armazenado a - 80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido das amostras foi utilizado um equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

4.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA

Foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para a síntese do cDNA do miRNA para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer, 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC para um volume final de 7,5µl. As amostras foram levadas para um termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e resfriadas a 4°C, posteriormente as

amostras foram armazenadas em freezer -20°C. Antes de utilizar o cDNA sintetizado na reação de PCR em tempo real, foi realizada uma diluição 1:4 em água DEPC.

4.3.3 RQ-PCR dos microRNAs: miR-629-3p , miR-1202 , miR-1225-5p

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos miRNAs. Para a análise quantitativa da expressão, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de Threshold cycle (Ct) determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O Ct determinado para uma amostra (para um determinado miRNA) foi subtraído do Ct determinado para um house-keeping (neste caso o U6) na mesma amostra, originando o chamado ΔCt . Assim, o número de ciclos que separa o ΔCt de uma amostra do ΔCt do calibrador, neste caso utilizará a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta Ct$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

As reações de amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR) foram realizadas em duplicata numa placa de 96 poços, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A reação teve um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA diluído. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Fast Real Time PCR System (Applied

Biosystems) foi utilizado juntamente com o software 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para a obtenção dos valores de Ct.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi estabelecido um threshold de 0,1 para o endógeno e também para os miRNAs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5.

4.3.4 Análise estatística

As amostras independentes, submetidas ao teste de normalidade, não projetaram populações normais. Portanto, para a avaliação da expressão dos microRNAs-629-3p,1202,1225-5p utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* na comparação do grupo Controle x Epilepsia e o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns* na comparação entre Controle x Engel I x Engel III e IV. O programa *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), foi utilizado para a análise estatística, sendo considerado estatisticamente significante valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p

A expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p foi analisada em todas as amostras de amígdala, hipocampo e sangue dos pacientes, assim como dos respectivos grupos controles previamente descritos (Apêndice 1 e 2).

Os gráficos e resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p quando comparados hipocampo de necrópsia (controle) com hipocampo de pacientes com epilepsia estão demonstrados nos gráficos 4, 11 e 18. A comparação entre hipocampo de necrópsia (controle) com hipocampo de pacientes Engel I com hipocampo de pacientes Engel III e IV estão apresentados nos gráficos 5, 12, 19.

Os gráficos e resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p quando comparados amígdala de necrópsia (controle) com amígdala de pacientes com epilepsia estão demonstrados nos gráficos 6, 13 e 20. A comparação entre amígdala de necrópsia (controle) com amígdala de pacientes Engel I com amígdala de pacientes Engel III e IV estão apresentados nos gráficos 7, 14 e 21.

Para o sangue, os gráficos 1, 8 e 15 demonstram sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes com epilepsia. Já a comparação entre sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel I com sangue de pacientes Engel III e IV estão nos gráficos 2, 9 e 16.

Os gráficos e resultados dos cálculos estatísticos dos valores de expressão dos microRNAs miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p quando comparados sangue,

hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia estão demonstrados nos gráficos 3, 10 e 17.

5.1.1 miR-629-3p

Gráfico 1: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p < 0,0001$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 2: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III e IV. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p = 0,0005$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 3: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia. O miRNA-629-3p teve sua expressão significativamente aumentada no sangue em comparação ao hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia ($p < 0,0001$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 4: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,4303$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 5: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p=0,4983$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 6: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p=0,1628$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 7: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-629-3p na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p = 0,0606$, teste *Kruskal-Wallis*).

5.1.2 miR-1202

Gráfico 8: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1202 no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,0125$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 9: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III e IV. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1202 no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA ($p=0,0317$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 10: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia. O miRNA-1202 teve sua expressão significativamente aumentada no sangue em comparação a amígdala de pacientes com epilepsia ($p=0,0003$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 11: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miR-1202 no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,3869$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 12: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miR-1202 no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p = 0,6652$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 13: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1202 na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,0741$ teste *Mann Whitney*).

Gráfico 14: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1202 na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel III-IV ($p = 0,0423$, teste *Kruskal-Wallis*).

5.1.3 miR-1225-5p

Gráfico 15: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) e sangue de pacientes com epilepsia. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1225-5p no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p < 0,0001$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 16: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue de indivíduos saudáveis (controle) x sangue de pacientes Engel IA x sangue de pacientes Engel III e IV. Houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1202 no sangue de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p < 0,0001$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 17: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no sangue, hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia. O miRNA-1225-5p teve sua expressão significativamente aumentada no sangue em comparação ao hipocampo e amígdala de pacientes com epilepsia ($p < 0.0001$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 18: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1202 no hipocampo de necrópsia (controle) e hipocampo de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miR-1225-5p no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,1643$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 19: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p no hipocampo de necrópsia (controle) x hipocampo de pacientes Engel IA x hipocampo de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miR-1225-5p no hipocampo de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p = 0,3707$, teste *Kruskal-Wallis*).

Gráfico 20: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p na amígdala de necrópsia (controle) e amígdala de pacientes com epilepsia. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-1225-5p na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e epilepsia ($p = 0,2302$, teste *Mann Whitney*).

Gráfico 21: Representação da média ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1225-5p na amígdala de necrópsia (controle) x amígdala de pacientes Engel IA x amígdala de pacientes Engel III e IV. Não houve diferença estatística significativa da expressão do miRNA-629-3p na amígdala de pacientes com epilepsia quando comparados os grupos controle e Engel IA, controle e Engel III-IV ($p= 0,3083$, teste *Kruskal-Wallis*).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da epilepsia atualmente tem um elevado custo e não fornece dados precisos, pois está baseado principalmente em evidências radiológicas, eletroencefalográficas e clínicas. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos para simplificar e aperfeiçoar o diagnóstico dessa doença (Wieser e Epilepsy, 2004; Wang *et al.*, 2015).

Apesar da cirurgia para o controle de crises em pacientes com ELTM demonstrar resultados satisfatórios, cerca de 10% dos casos apresentam nenhuma ou baixa melhora no controle das crises epiléticas durante o controle no pós-operatório, sendo praticamente impossível prever o prognóstico do paciente antes da cirurgia (Cendes *et al.*, 2014; Savitr Sastri *et al.*, 2014).

Na atualidade, há poucos estudos analisando a expressão de miRNAs no sangue e hipocampo de humanos em epilepsia. Alguns estudos, porém, realizaram uma análise global da expressão dos microRNAs em modelos animais de epilepsia (Hu *et al.*, 2011). Os autores analisaram o perfil de expressão de miRNAs por *microarrays* de 113 miRNAs no hipocampo de ratos, 24 horas após a indução do estado epilético por lítio-pilocarpina, sendo identificados 26 miRNAs desregulados, entre os quais 19 estavam hiperexpressos e 7 hipoexpressos. Em seguida foi realizada a validação dos resultados e para isto foram selecionados randomicamente 4 destes microRNAs para serem quantificados no sangue e hipocampo por PCR-RT. Os miRNAs miR-34a, miR-22 e miR-125a demonstraram altos níveis de expressão tanto no sangue como no hipocampo dos animais, enquanto o miR-21 demonstrou baixa expressão no sangue periférico e no

hipocampo destes animais. Os autores concluem a coexpressão dos 4 miRNAs avaliados.

Liu *et al.*, 2010, avaliaram a expressão por *microarray* de 381 miRNAs no sangue e cérebro de ratos submetidos a isquemia cerebral, hemorragia cerebral e convulsões induzidas por ácido caínico, sendo constatado padrão específico de expressão para cada um dos tipos de doenças. Nos animais submetidos a convulsão foram identificados 104 hiperexpressos e 179 hipoexpressos no hipocampo, além de 47 hiperexpressos e 105 hipoexpressos no sangue. Dentre os miRNAs hiperexpressos, apenas o miR-298 se apresentou co-expresso no sangue e hipocampo, enquanto que entre os hipoexpressos, foi observado a coexpressão dos miRNAs-155, miR-29c, miR-34-3p, miR-98, miR-122, miR-203, miR-450a(Liu *et al.*, 2010). Estes achados nos mostram que alguns miRNAs estão envolvidos, em modelos experimentais de epilepsia, onde a expressão dos miRNAs se altera simultaneamente no tecido cerebral e no sangue periférico. Isso é de suma importância, pois sugere que os miRNAs podem futuramente ser utilizados como biomarcadores em pacientes com epilepsia.

Em estudo experimental, utilizando ratos como modelo, Risbud e Porter 2013, observaram que o miR-629-3p apresentou-se hiperexpresso no hipocampo dos animais após crise epilética induzidas por pilocarpina (Risbud e Porter, 2013). Embora as evidências encontradas na literatura demonstrem o miRNA-629-3p alterado no hipocampo de pacientes com ELTM, não foram encontrados na literatura outros estudos relacionando o miRNA-629-3p com patologias que acometem o Sistema Nervoso Central. Wang et al., 2017, estudaram que o miR-629-3p é um miRNA específico associado as metástases pulmonares em câncer de mama triplo negativo. Embora o miR-629-3p tenha sido relatado desempenhando

importante papel na invasão celular e metástases em vários tipos de câncer clinicamente agressivos, o papel oncogênico do miR-629-3p no câncer de mama ainda não está completamente elucidado, sendo observado que a supressão do miR-629-3p atenua a metástase pulmonar do câncer de mama experimental relacionado diretamente ao receptor do fator inibitório de leucemia (*LIFR*), que é um inibidor de inúmeras vias metastáticas. A identificação de um biomarcador sensível e específico que prevê a metástase letal no Tumor de mama triplo-negativo pode permitir a detecção precoce de uma recaída da doença, possibilitando um aumento da sobrevida dos pacientes com redução dos custos do tratamento (Wang *et al.*, 2017).

Shin *et al.*, 2015, realizaram um microarray demonstrando o envolvimento de 25 miRNAs regulados positivamente no plasma de pacientes com câncer gástrico em comparação aos pacientes controle (normais). Destes 25 miRNAs, apenas 6 foram considerados hiperexpressos, incluindo o miR-629-3p, sugerindo assim este miRNA como um biomarcador para detecção de câncer gástrico (Shin *et al.*, 2015). Salas-Huetos *et al.*, 2015, observaram em seu estudo que a expressão elevada do miR-629-3p está relacionado a uma maior motilidade de espermatozoides, embora nenhuma função ou alvos fortemente validados nesse miRNA tenham sido descritos até o presente momento, os resultados sugerem que o nível de expressão pode ser considerado um biomarcador da condição astenozoospermática (Salas-Huetos *et al.*, 2015). Regev *et al.*, 2017, ao avaliarem possíveis miRNAs séricos biomarcadores de esclerose múltipla (EM) para monitoramento da progressão da doença, que atuam como marcadores de processos de doenças subjacentes, identificaram entre esses miRNAs séricos, o miRNA 629-3p. O miRNA-623-3p foi apresentou uma correlação patogênica significativa com a atrofia cerebral observada em exame de Ressonância

magnética (Regev *et al.*, 2017). Em nossos resultados miR-629-3p apresentou uma hiperexpressão tanto no sangue quanto no tecido de pacientes com epilepsia, com diferença estatística significativa apenas no sangue. Nas amostras de sangue, foi observado diferença estatística significativa quando comparada a expressão do miR-629-3p no grupo controle versus grupo epilepsia, assim como entre o grupo controle quando comparado ao grupo Engel I e no grupo controle quando comparado ao grupo Engel III e IV. Observamos também em nossos resultados aumento progressivo nos níveis de expressão do miR-629-3p no hipocampo entre os grupos estudados, ou seja, controle, Engel I e Engel III e IV, apesar de não apresentarem diferença significativa.

A expressão do miRNA-1202 foi avaliado em diversas doenças, estudos em tumores como o de Chen *et al.*, 2017, avaliaram o perfil de expressão global de miRNAs por *microarray* em 15 amostras de tecido e sangue de pacientes portadoras de câncer de endométrio. Dentre os miRNAs foram identificados que 34 miRNAs estavam desregulados no sangue e tecido de pacientes portadoras desse câncer. Em seguida para validar os resultados, foram selecionados randomicamente 12 destes microRNAs para serem quantificados em amostras de tecido e sangue de pacientes dos diferentes grupos do estudo por PCR-RT. Os miRNAs: miR-5787, miR-6749-5p e miR-1202, demonstraram altos níveis de expressão em nas amostras de tecido e sangue. Estes achados demonstram que alguns miRNAs estão envolvidos na patologia do câncer de endométrio sugerindo que o miRNA-1202 podem futuramente ser utilizados como biomarcadores em para avaliar a eficácia do tratamento de pacientes portadores de câncer endométrio (Chen *et al.*, 2017). Dadkhah *et al.*, 2017, avaliaram em seu estudo 250 pacientes com depressão, demonstrando que o miRNA-1202 apresentava-se hipoexpresso, atuando dessa

maneira no controle negativo da expressão do receptor de Glutamato do tipo 4, contribuindo assim no desenvolvimento da fisiopatologia da depressão (Dadkhah *et al.*, 2017). Lopez *et al.* 2014, também estudaram em amostras de córtex pré-frontal de indivíduos com depressão obtidas por necrópsia o papel do microRNA-1202 no desenvolvimento da fisiopatologia do transtorno depressivo maior, demonstrando que o miRNA-1202 está diferencialmente expresso em indivíduos deprimidos, atuando na regulação negativa da expressão do gene do receptor metabotrópico de glutamato 4 (GRM4), sugerindo este miRNA como um possível marcador biológico para detecção e tratamento da Depressão (Lopez *et al.*, 2014). Em nosso estudo, observamos uma hiperexpressão do miRNA-1202 tanto no sangue quanto em amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia, com diferença estatística significativa apenas no sangue. Nas amostras de sangue, houve diferença estatística significativa quando comparada a expressão do miR-1202 versus epilepsia e entre o grupo controle quando comparado ao grupo Engel I. Em nossos resultados foi observado também um aumento progressivo nos níveis de expressão do miR-1202 no hipocampo entre os grupos estudados apesar de não observarmos diferença estatística significativa. Também constatamos, uma hipoexpressão dos níveis de expressão do miR-1202 em amígdalas quando comparadas com hipocampos e controles. Quando analisamos apenas amígdalas (Engel I e Engel III/IV) e amígdalas controles, observamos uma redução nos níveis de expressão do miR-1202 no grupo Engel III/IV. Estes últimos resultados, nos sugerem um possível envolvimento específico do miR-1202 em amígdalas.

A expressão do miRNA-1225-5p foi avaliado também em diversas doenças, como por exemplo, doença de Alzheimer, sendo observado diferencialmente expresso por sequenciamento de última geração em amostras de hipocampo de

pacientes portadores da doença (Lau *et al.*, 2013). O miRNA-1225-5p ainda é muito pouco estudado na literatura, estudos em tumores como o de Haman *et al.* 2016, avaliaram o perfil de expressão global de miRNAs por *microarray* em 23 amostras de câncer de mama, identificando que 18 miRNAs estavam desregulados em pacientes portadoras de câncer de mama. Em seguida para validar os resultados, foram selecionados randomicamente 9 destes microRNAs para serem quantificados em amostras de câncer de mama por PCR-RT. Os miRNAs: miR-4270, miR-1225-5p, miR-188-5p, miR-1202, miR-4281, miR-1207-5p, miR-642b-3p, miR-1290, e miR-3141, demonstraram altos níveis de expressão em pacientes nos estágios I, II e III, quando comparados aos pacientes no estágio IV, sugerindo assim o miR-1225-5p como potencial biomarcador para a detecção precoce e estratificação do câncer de mama (Haman *et al.*, 2016). Devadas *et al.*, 2016, analisaram a expressão diferencial de 352 miRNAs em células infectadas com HIV-1 e HIV-2 através da técnica microRNA PCR array, sendo identificados 20 miRNAs diferencialmente expressos. Em seguida para validar os resultados, foram selecionados randomicamente 9 destes microRNAs para serem quantificados por PCR-RT. Os miRNAs: miRNA-541-3p, miRNA-518f-3p e miRNA-195-3p se apresentaram hiperexpressos apenas em células infectadas por HIV-1, enquanto que os miRNAs-18a, miRNA-1225-5p e miRNA-335 demonstraram-se hipoexpressos tanto em células infectadas com HIV-1 quanto com HIV-2. Portanto, a identificação de miRNAs que modulam o ciclo de vida viral, a progressão da doenças e as respostas celulares a infecção pelo HIV-1 e HIV-2, podem revelar importantes informações sobre a patogênese viral, fornecendo novas ferramentas que podem servir como marcadores prognósticos e alvos para intervenção terapêutica dessa patologia (Devadas *et al.*, 2016). Já em relação a expressão do miRNA-1225-5p, nota-se em

nosso estudo que existe uma expressão aumentada tanto no sangue quanto no hipocampo de pacientes com epilepsia, com diferença estatística significativa apenas no sangue. Nas amostras de sangue, foi observado diferença estatística significativa quando comparada a expressão do miR-1225-5p versus epilepsia e entre o grupo controle quando comparado ao grupo Engel I e no grupo controle quando comparado ao grupo Engel III/IV. Em nossos resultados observamos, como foi descrito anteriormente para os miRNAs miR-629-3p e miR-1202 do presente estudo, um aumento progressivo nos níveis de expressão do miR-1225-5p no hipocampo entre os grupos estudados apesar de não observarmos diferença estatística significativa.

Apesar dos miRNAs apresentarem grande o potencial como biomarcadores ainda, são poucos os estudos dos mesmos como biomarcadores em pacientes com epilepsia (Weiland *et al.*, 2012). Wang *et al.*, 2015 foram os pioneiros ao demonstrarem evidências de miRNAs circulantes no soro de pacientes com epilepsia como possíveis biomarcadores, destacando o miR-106b-5p como o melhor para o diagnóstico da epilepsia. Portanto, o presente estudo adiciona, possíveis biomarcadores no sangue de pacientes com epilepsia os miRNAs: miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p, todos hiperexpressos no sangue desses pacientes. Os miRNAs-629-3p, 1202, 1225-5p apresentaram aumentos nos níveis de expressão sanguíneos progressivos entre os grupos controle, Engel I e Engel III/IV respectivamente, representando potenciais biomarcadores de prognóstico cirúrgico entre Engel I e Engel III/IV.

Embora os miRNAs demonstrem-se como biomarcadores promissores, até o presente momento não existem miRNAs sendo clinicamente utilizados em doenças neurológicas, sendo necessário ainda uma considerável quantidade de dados para

validar os miRNAs como biomarcadores (Tumilson *et al.*, 2014). Os miRNAs apresentam um provável papel regulatório sobre os neurotransmissores em pacientes portadores de epilepsia e baseado em outros estudos, os miRNAs demonstraram correlação entre os níveis de expressão no tecido cerebral e sangue periférico em modelos animais, assim a identificação de biomarcadores no sangue periférico de indivíduos com epilepsia pode colaborar futuramente tanto com uma melhor precisão diagnóstica e terapêutica de pacientes com epilepsia, alterando provavelmente o prognóstico desta doença. Todavia mais pesquisas em humanos se fazem necessárias para elucidar melhor o papel dos miRNAs na epileptogênese.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Todos os miRNAs avaliados, miR-629-3p, miR-1202, miR-1225-5p, apresentaram-se hiperexpressos no sangue de pacientes com ELTM comparado ao controle.
- Entre os miRNAs avaliados, o miR-629-3p e miR-1225-5p, apresentaram no sangue de pacientes um aumento nos níveis de expressão progressivo entre os grupos controle, Engel IA e Engel III-IV, respectivamente.
- Os miRNAs-629-3p e miRNA-1225-5p apresentaram-se hiperexpressos no sangue de pacientes com ELTM comparado as amostras de hipocampo e amígdala.
- O miR-1202 apresentou-se hipoexpresso na amígdala de pacientes Engel III-IV quando comparado ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, J. F. et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 317-20, Oct 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16224024>>.

AGGLETON, J. P.; SAUNDERS, R. C. The Amygdala-What's happened in the last decade ? New York: **Oxford University Press**, p. 1-30, 2000.

ALSHARAFI, W. A. et al. miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy. **Front Mol Neurosci**, v. 8, p. 59, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26528124>>.

ARONIADOU-ANDERJASKA, V. et al. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 78, n. 2-3, p. 102-16, Feb 2008. ISSN 0920-1211. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226499>>.

BABB, T. L.; BROWN, W. J. Neuronal, dendritic, and vascular profiles of human temporal lobe epilepsy correlated with cellular physiology in vivo. **Adv Neurol**, v. 44, p. 949-66, 1986. ISSN 0091-3952. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3706028>>.

BABB, T. L. et al. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 26, n. 1, p. 193-205, Dec 1996. ISSN 0920-1211. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985700>>.

BABB, T. L. et al. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. **J Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 2562-74, Jul 1989. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501460>>.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795>>.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, Jun 2011. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635233>>.

BEVERIDGE, N. J. et al. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 8, p. 1156-68, Apr 2008. ISSN 1460-2083. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184693>>.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 3, p. 467-72, Mar 2009. ISSN 1097-4652. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034913>>.

BLÜMCKE, I. et al. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 1, p. 1-10, Jan 2000. ISSN 0022-3069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10744030>>.

BLÜMCKE, I. et al. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Pathol**, v. 22, n. 3, p. 402-11, May 2012. ISSN 1750-3639. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497612>>.

BOZZI, Y.; PROVENZANO, G.; CASAROSA, S. Neurobiological bases of autism-epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. **Eur J Neurosci**, Apr 2017. ISSN 1460-9568. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28452083>>.

BRENNAN, G. P.; HENSHALL, D. C. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. **Neurosci Lett**, Jan 2017. ISSN 1872-7972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104433>>.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. [Glutamatergic hypothesis of schizophrenia]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25, n. 3, p. 177-83, Sep 2003. ISSN 1516-4446. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975693>>.

CENDES, F. et al. Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? **Ann Neurol**, v. 34, n. 6, p. 795-801, Dec 1993. ISSN 0364-5134. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8250528>>.

CENDES, F. et al. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 1, p. 21-37, Jul 2014. ISSN 1432-0533. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24823761>>.

CHEN, H. et al. Exploration of miR-1202 and miR-196a in human endometrial cancer based on high throughput gene screening analysis. **Oncol Rep**, v. 37, n. 6, p. 3493-3501, Jun 2017. ISSN 1791-2431. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28440476>>.

COWLAND, J. B.; HOTHER, C.; GRØNBAEK, K. MicroRNAs and cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1090-106, Oct 2007. ISSN 0903-4641. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042145>>.

CRÉPEL, V.; MULLE, C. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 20, p. 83-8, Feb 2015. ISSN 1471-4973. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25506747>>.

DADKHAH, T. et al. A genetic variant in miRNA binding site of glutamate receptor 4, metabotropic (GRM4) is associated with increased risk of major depressive disorder. **J Affect Disord**, v. 208, p. 218-222, Jan 2017. ISSN 1573-2517. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27792966>>.

DE FELICE, B. et al. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Gene**, v. 508, n. 1, p. 35-40, Oct 2012. ISSN 1879-0038. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903028>>.

DE MOURA, J. C. et al. Amygdala gene expression of NMDA and GABA(A) receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. **Hippocampus**, v. 22, n. 1, p. 92-7, Jan 2012. ISSN 1098-1063. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848605>>.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain Res**, v. 1338, p. 100-11, Jun 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380821>>.

DEVADAS, K. et al. Identification of Host Micro RNAs That Differentiate HIV-1 and HIV-2 Infection Using Genome Expression Profiling Techniques. **Viruses**, v. 8, n. 5, May 2016. ISSN 1999-4915. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27144577>>.

DOGINI, D. B. et al. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 172, Oct 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24109432>>.

DURING, M. J.; RYDER, K. M.; SPENCER, D. D. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 174-7, Jul 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603569>>.

DUVERNOY, H. M. The Human Hippocampus. Berlin: **Springer-Verlag**, p. 1-4, 2005.

EL-FALOUGY, H.; BENUSKA, J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. **Bratisl Lek Listy**, v. 107, n. 4, p. 103-6, 2006. ISSN 0006-9248. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796134>>.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-52, Aug 2001. ISSN 1073-8584. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488399>>.

ENGEL, J. et al. Epilepsy biomarkers. **Epilepsia**, v. 54 Suppl 4, p. 61-9, Aug 2013. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909854>>.

ENGEL, J. J.; VAN NESS, P. C.; RASMUSSEN, T. B. Outcome with respect to epileptic seizures. New York: **Raven Press**, p. 609-621, 1993.

ETHERIDGE, A. et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. **Mutat Res**, v. 717, n. 1-2, p. 85-90, Dec 2011. ISSN 0027-5107. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402084>>.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, Jan 2010. ISSN 1097-4199. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152109>>.

FARIELLO, R. G.; FORCHETTI, C. M.; FISHER, R. S. GABAergic functions in relation to seizure phenomena. New York: **Wyllie-Liss**: p. 77-93, 1991.

FIEST, K. M. et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology**, v. 88, n. 3, p. 296-303, Jan 2017. ISSN 1526-632X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986877>>.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939>>.

GALANOPOULOU, A. S.; MOSHÉ, S. L. In search of epilepsy biomarkers in the immature brain: goals, challenges and strategies. **Biomark Med**, v. 5, n. 5, p. 615-28, Oct 2011. ISSN 1752-0371. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003910>>.

GAUTHIER, B. R.; WOLLHEIM, C. B. MicroRNAs: 'ribo-regulators' of glucose homeostasis. **Nat Med**, v. 12, n. 1, p. 36-8, Jan 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397558>>.

HAMAM, R. et al. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. **Sci Rep**, v. 6, p. 25997, May 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180809>>.

HAMMOND, S. M. MicroRNAs as oncogenes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 16, n. 1, p. 4-9, Feb 2006. ISSN 0959-437X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361094>>.

HASHIMOTO, T. et al. Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. **Mol Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 147-61, Feb 2008. ISSN 1359-4184. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17471287>>.

HATFIELD, S.; RUOHOLA-BAKER, H. microRNA and stem cell function. **Cell Tissue Res**, v. 331, n. 1, p. 57-66, Jan 2008. ISSN 1432-0878. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987317>>.

HAUSER, W. A. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. **Epilepsy Res Suppl**, v. 5, p. 25-8, 1992. ISSN 0922-9833. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1418457>>.

HENSCH, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 877-88, Nov 2005. ISSN 1471-003X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261181>>.

HU, K. et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurosci Lett**, v. 488, n. 3, p. 252-7, Jan 2011. ISSN 1872-7972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094214>>.

HUI, A. et al. Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies. **BMC Cancer**, v. 11, p. 500, Nov 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22128797>>.

HUI-YUAN, C. et al. miR-629-3p Level Significantly Predicts Prognosis in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide Chemotherapy. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 9, p. 9-14, 2014.

JIMENEZ-MATEOS, E. M.; HENSHALL, D. C. Epilepsy and microRNA. **Neuroscience**, v. 238, p. 218-29, May 2013. ISSN 1873-7544. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485811>>.

KAN, A. A. et al. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 18, p. 3127-45, Sep 2012. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535415>>.

KIM, J. et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. **Science**, v. 317, n. 5842, p. 1220-4, Aug 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761882>>.

KOSIK, K. S. The neuronal microRNA system. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 12, p. 911-20, Dec 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115073>>.

KUHN, D. E. et al. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 370, n. 3, p. 473-7, Jun 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18387358>>.

LAU, P. et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 10, p. 1613-34, 10 2013. ISSN 1757-4684. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014289>>.

LAWLER, S.; CHIOCCA, E. A. Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. **J Neurooncol**, v. 92, n. 3, p. 297-306, May 2009. ISSN 1573-7373. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357957>>.

LEWIS, F. T. **The significance of the term hippocampus.** *J Comp Neurol.*, v. 35, p.213-231, 1923.

LI, M. M. et al. MicroRNAs dysregulation in epilepsy. **Brain Res**, v. 1584, p. 94-104, Oct 2014. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096213>>.

LI, Y. et al. Aberrant expression of miR-153 is associated with overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in refractory epilepsy. **Sci Rep**, v. 6, p. 32091, Aug 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554040>>.

LIU, D. Z. et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 1, p. 92-101, Jan 2010. ISSN 1559-7016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19724284>>.

LOPEZ, J. P. et al. miR-1202 is a primate-specific and brain-enriched microRNA involved in major depression and antidepressant treatment. **Nat Med**, v. 20, n. 7, p. 764-8, Jul 2014. ISSN 1546-170X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24908571>>.

LOPEZ-ROMERO, P. AgiMicroRna: Processing and Differential Expression Analysis of Agilent microRNA chips. R package version 2.26.0., 2017

LOUP, F. et al. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 20, n. 14, p. 5401-19, Jul 2000. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884325>>.

LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. **Neuroreport**, v. 18, n. 3, p. 297-300, Feb 2007. ISSN 0959-4965. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314675>>.

MACDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABAA receptor channels. **Annu Rev Neurosci**, v. 17, p. 569-602, 1994. ISSN 0147-006X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516126>>.

MAFFIOLETTI, E. et al. Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 75, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24653674>>.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 1, p. 103-8, Jan 2010. ISSN 1525-5069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963440>>.

MARGERISON, J. H.; CORSELLIS, J. A. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. **Brain**, v. 89, n. 3, p. 499-530, Sep 1966. ISSN 0006-8950. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5922048>>.

MATHERN, G. W. et al. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. **Neuroreport**, v. 7, n. 5, p. 1029-35, Apr 1996. ISSN 0959-4965. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804045>>.

MATSUBARA, H. et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. **Oncogene**, v. 26, n. 41, p. 6099-105, Sep 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384677>>.

MCNAMARA, J. O.; HUANG, Y. Z.; LEONARD, A. S. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. **Sci STKE**, v. 2006, n. 356, p. re12, Oct 2006. ISSN 1525-8882. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033045>>.

MELLIOS, N. et al. Molecular determinants of dysregulated GABAergic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 12, p. 1006-14, Jun 2009. ISSN 1873-2402. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121517>>.

MOHAPEL, P. et al. Differential sensitivity of various temporal lobe structure in the rat to kindling and status epilepticus induction. **Epilepsy Research**, v. 23, p.179-187 p. 1993.

NELSON, P. T. et al. Hippocampal sclerosis of aging, a prevalent and high-morbidity brain disease. **Acta Neuropathol**, v. 126, n. 2, p. 161-77, Aug 2013. ISSN 1432-0533. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864344>>.

NGUGI, A. K. et al. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 77, n. 10, p. 1005-12, Sep 2011. ISSN 1526-632X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893672>>.

NOMURA, S. et al. Changes in glutamate concentration, glucose metabolism, and cerebral blood flow during focal brain cooling of the epileptogenic cortex in humans. **Epilepsia**, v. 55, n. 5, p. 770-6, May 2014. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779587>>.

OLSEN, R. W. et al. GABA_A receptor subtypes: The “one glass of wine” receptors. **Alcohol**, v. 41, p.201-209, 2007.

PEARCE, J. M. Ammon’s horn and the hippocampus. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. 71: 351 p. 2001.

PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 11, p. 517-23, Nov 1997. ISSN 0166-2236. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364666>>.

PURVES, D. Neurociências. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

REGEV, K. et al. Association Between Serum MicroRNAs and Magnetic Resonance Imaging Measures of Multiple Sclerosis Severity. **JAMA Neurol**, v. 74, n. 3, p. 275-285, Mar 2017. ISSN 2168-6157. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28114622>>.

RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, p.1102-1107, 2006.

RISBUD, R. M.; PORTER, B. E. Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53464, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308228>>.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843409>>.

SALAS-HUETOS, A. et al. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. **Fertil Steril**, v. 104, n. 3, p. 591-601, Sep 2015. ISSN 1556-5653. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143365>>

SAVITR SASTRI, B. V. et al. Clinico-pathological factors influencing surgical outcome in drug resistant epilepsy secondary to mesial temporal sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 340, n. 1-2, p. 183-90, May 2014. ISSN 1878-5883. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698526>>.

SHIN, V. Y. et al. A three-miRNA signature as promising non-invasive diagnostic marker for gastric cancer. **Mol Cancer**, v. 14, p. 202, Nov 2015. ISSN 1476-4598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607322>>.

SMYTH, G. K.; MICHAUD, J.; SCOTT, H. S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2067-75, May 2005. ISSN 1367-4803. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657102>>.

TUMILSON, C. A. et al. Circulating microRNA biomarkers for glioma and predicting response to therapy. **Mol Neurobiol**, v. 50, n. 2, p. 545-58, Oct 2014. ISSN 1559-1182. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696266>>.

WANG, J. et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. **Sci Rep**, v. 5, p. 9522, Mar 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825351>>.

WANG, J. et al. miR-629-3p may serve as a novel biomarker and potential therapeutic target for lung metastases of triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 19, n. 1, p. 72, Jun 2017. ISSN 1465-542X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28629464>>.

WANG, W. X. 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**, v. 28, n. 5, p. 1213-23, Jan 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234899>>.

WANG, Y.; LEE, C. G. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 12-23, Jan 2009. ISSN 1582-4934. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175697>>.

WEILAND, M. et al. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. **RNA Biol**, v. 9, n. 6, p. 850-9, Jun 2012. ISSN 1555-8584. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699556>>.

WENG, H. et al. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. **Biomed Res**, v. 32, n. 2, p. 135-41, Apr 2011. ISSN 1880-313X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551949>>.

WHITE, L. E.; PRICE, J. L. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. I. Patterns of 14C-2-deoxyglucose uptake and Fos immunocytochemistry. **J Neurosci**, v. 13, n. 11, p. 4787-809, Nov 1993. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229199>>.

WIESER, H. G. Mesial temporal lobe epilepsy versus amygdalar epilepsy: late seizure recurrence after initially successful amygdalotomy and regained seizure control following hippocampectomy. **Epileptic Disord**, v. 2, n. 3, p. 141-52, Sep 2000. ISSN 1294-9361. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022139>>.

WIESER, H. G.; EPILEPSY, I. C. O. N. O. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, Jun 2004. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144438>>.

WYLLIE, E.; LUDERS, H. Classification of seizures. Baltimore:Williams &Wilkins: **The Treatment of Epilepsy: Principles and Practices**, p.355-363, 1997.

YAMADA, K.; YU, B.; GALLAGHER, J. P. Different subtypes of GABAB receptors are present at pre- and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. **J Neurophysiol**, v. 81, n. 6, p. 2875-83, Jun 1999. ISSN 0022-3077. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368404>>.

ZENTNER, J. et al. Clinical relevance of amygdala sclerosis in temporal lobe epilepsy. **J Neurosurg**, v. 91, n. 1, p. 59-67, Jul 1999. ISSN 0022-3085. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10389881>>.

ZHENG, H. et al. MicroRNA-1225-5p inhibits proliferation and metastasis of gastric carcinoma through repressing insulin receptor substrate-1 and activation of β -catenin signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 4, p. 4647-63, Jan 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26684358>>.

ZUCCHINI, S. et al. Identification of miRNAs differentially expressed in human epilepsy with or without granule cell pathology. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105521, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25148080>>.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de Fold calculados para as amostras de sangue de pacientes com epilepsia e sangue de indivíduos saudáveis (controles).

	Amostra	miR-629-3p	miR-1202	miR-1225-5p
Controle	C 1 S	3,571019	2,555142	2,784795
	C 2 S	1,542831	0,7372614	1,087233
	C 3 S	0,7379488	0,7594471	0,3042123
	C 4 S	3,002525	1,275339	2,740184
	C 5 S	0,7358332	5,085177	3,092622
	C 6 S	2,047935	1,399091	0,634514
	C 7 S	0,2716168	0,09262544	0,1974232
	C 8 S	1,861049	0,607671	0,7632291
	C 9 S	0,5568386	1,720473	2,031643
	C 10 S	0,1931245	0,7955027	0,659567
Engel IA	SNC 349 S	22,95427	5,676511	55,28887
	SNC 375 S	5,235343	3,187811	126,1985
	SNC 380 S	1,356334	0,6625161	5,69863
	SNC 392 S	18,5765	1,826257	10,42515
	SNC 440 S	5,065295	4,637177	47,32451
	SNC 454 S	33,84205	3,90748	11,42495
	SNC 460 S	40,32412	3,081456	42,02011
	SNC 500 S	49,84837	5,363708	108,6876
	SNC 563 S	19,91685	2,432724	45,09175
	SNC 690 S	26,71256	5,002485	98,96188
Engel III e IV	SNC 346 S	11,47737	4,235154	33,41896
	SNC 355 S	2,784743	1,181923	17,78985
	SNC 363 S	1,695721	0,2130799	7,120278
	SNC 385 S	20,20046	2,206453	62,68522
	SNC 443 S	38,81404	1,210103	53,87769
	SNC 446 S	32,41247	3,910842	78,83002
	SNC 484 S	7,406493	2,168211	29,91763
	SNC 539 S	71,51443	10,48445	135,3884
	SNC 741 S	7,827751	3,996854	13,97537
	SNC 787 S	19,13767	2,960061	30,59446

Apêndice 2. Valores de Fold calculados para as amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia e hipocampo de necropsias (controles).

	Amostra	miR-629-3p	miR-1202	miR-1225-5p
Controle	A 448 H	0,8384122	0,4670311	0,3999651
	A 256 H	0,3437442	1,296189	1,096058
	A 451 H	0,9308957	2,131401	1,270109
	HC 146 H	1,876474	1,480392	1,819116
	A 178 H	0,3199812	0,1186803	0,08061645
	A 303 H	3,406231	6,801559	6,400424
	A 63 H	0,8575382	0,3494598	0,2614828
	A 166 H	0,9708154	0,6827881	0,6502565
	A 281 H	2,189147	0,3839743	1,389321
	A 866 H		7,078995	8,099907
Engel IA	SNC 349 H	0,9769828	0,1260556	0,3784997
	SNC 375 H	1,543942	2,083464	3,00865
	SNC 380 H	3,667078	0,5958127	1,18746
	SNC 392 H	7,247225	6,674466	2,711908
	SNC 440 H	0,7344894	0,5075486	1,221239
	SNC 454 H	0,5430845	0,564751	1,084961
	SNC 460 H	2,878422	12,26519	10,32558
	SNC 500 H	2,830753	1,397696	1,361303
	SNC 563 H	3,784919	19,41599	17,77217
	SNC 690 H	0,4891137	1,001542	2,366392
Engel III e IV	SNC 346 H	2,415083	1,468855	2,430201
	SNC 355 H	0,6891887	0,4687613	0,6550601
	SNC 363 H	4,339914	1,400245	1,098809
	SNC 385 H	0,7723768	0,3632767	0,7666
	SNC 443 H	0,870006	0,5791426	1,214998
	SNC 446 H	0,5454572	1,680613	3,837307
	SNC 484 H	2,646232	1,780197	3,158672
	SNC 539 H	0,2004568	18,2365	12,36433
	SNC 741 H	14,4469	25,19807	22,13226
	SNC 787 H	0,6889532	1,056424	0,7706158

Apêndice 3. Valores de Fold calculados para as amostras de amígdala de pacientes com epilepsia e amígdala de necropsias (controles).

	Amostra	miR-629-3p	miR-1202	miR-1225-5p
Controle	A 448 A	0,6519803	0,4655448	0,5673905
	A 256 A	0,434419	0,08851384	0,2226935
	A 451 A	0,3041892	3,781588	3,208604
	HC 146 A	0,8632848	2,242429	1,43072
	A 178 A	0,8196254	0,5183963	0,3314835
	A 303 A	4,863442	12,55905	5,555882
	A 63 A	1,367619	0,3707935	0,3528828
	A 166 A	0,3251452	0,1446628	0,3629077
	A 281 A	2,469473	1,237595	1,085778
	A 866 A	3,071518	6,621377	6,732202
Engel IA	SNC 349 A	1,649867	1,441626	1,21152
	SNC 375 A	0,6436998	0,8842869	0,8514855
	SNC 380 A	0,1418124	0,04195513	0,1230571
	SNC 392 A	0,5231412	10,14641	0,5422062
	SNC 440 A	0,421304	0,1114384	0,2867369
	SNC 454 A	0,2424208	0,2939139	0,9589328
	SNC 460 A	7,168437	13,25923	11,05738
	SNC 500 A	0,8132511	0,783821	0,8476817
	SNC 563 A	0,2186664	0,1441983	0,354398
	SNC 690 A	0,3064438	0,1221967	0,3531866
Engel III e IV	SNC 346 A	0,227543	0,1410038	0,2036613
	SNC 355 A	0,2586582	0,06546438	0,2915322
	SNC 363 A	0,8127905	0,1047677	0,389266
	SNC 385 A	0,4428582	0,1249873	0,4335735
	SNC 443 A	0,5596137	0,02691256	0,06227696
	SNC 446 A	1,569903	7,115685	6,182539
	SNC 484 A	2,231569	0,7139899	1,305539
	SNC 539 A	0,1160163	0,02629176	0,0731184
	SNC 741 A	0,6451218	0,3069895	1,2673
	SNC 787 A	0,06336863	0,01670761	0,05496053