

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MYKAELLA ANDRADE DE ARAÚJO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO  
DIFERENCIAL DE MICRORNAS EM MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO  
TEMPORAL**

Maceió  
2014

MYKAELLA ANDRADE DE ARAÚJO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO  
DIFERENCIAL DE MICRORNAS EM MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO  
TEMPORAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de Alagoas,  
como requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai

Maceió  
2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária: Maria Auxiliadora G. da Cunha**

A663i Araújo, Mykaella Andrade de Araújo.  
Identificação de genes de referência e análise da expressão diferencial de microRNAs em modelo de epilepsia do lobo temporal / Mykaella Andrade de Araújo . – 2014.  
85 f. : il. Gráfs. e tabs.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitaí.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 76-85.  
Anexos: f. 86.

1. Epilepsia do lombo temporal . 2. RT-qPCR. 3. Genes de referência.  
4. MicroRNAs. I. Título.

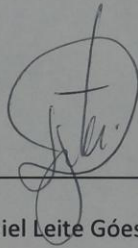
CDU: 616.853

## Folha de Aprovação

Mykaella Andrade de Araújo

Análise da expressão gênica diferencial de microRNAs em modelo de epilepsia do lobo temporal

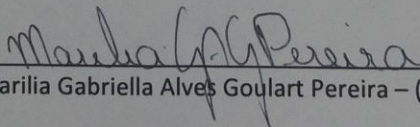
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 14 de março de 2014.



---

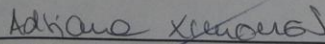
Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí (Orientador)

### Banca Examinadora



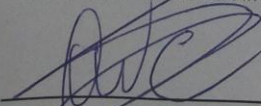
---

Prof.ª Dr.ª Marília Gabriella Alves Goulart Pereira – (UNIFAL-MG)



---

Prof.ª Dr.ª Adriana Ximenes da Silva – (UFAL)



---

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

## DEDICATÓRIA

*Ao Deus trino: Pai,  
Filho e Espírito Santo*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo Jesus, que possui um amor tão grande por minha vida que eu nunca conseguirei expressar, compreender e retribuir. Quando eu O conheci, aprendi o que, de fato, era felicidade. Ele me apresentou o motivo pelo qual a minha vida aqui na terra teria sentido, ensinou-me que há um propósito para tudo o que acontece comigo, inclusive que a minha formação acadêmica seria para o louvor do nome dEle. Hoje, eu carrego no peito uma gratidão indescritível. Sempre repito: Tudo é Ele, toda a glória é dEle, tudo o que eu venha realizar é para o louvor do nome dEle. Pois tenho convicção que toda a capacidade e as inteligências também são advindas dEle. Ele quem abre os caminhos e direciona ao centro da vontade dEle aqueles que desejam vivê-la. Obrigada, Jesus. Obrigada por não desistir de mim nunca. Obrigada por seu amor, bondade e misericórdia. Sem a sua presença eu não teria iniciado esse ciclo tão importante, e certamente, não o findaria. A minha eterna gratidão ao Deus Pai, Filho e Espírito Santo.

Aos meus pais, Nelson e Antonia, e à minha irmã Larissa. Obrigada pelo amor, atenção, demonstrações de cuidado com as repreensões. Obrigada pelo incentivo à busca pelo conhecimento, à perseverança. Obrigada pelos conselhos direcionados em concordância com palavra de Deus. Obrigada por me conhecerem tão a fundo e ainda assim me amarem. Muito obrigada pelo apoio, torcida, por sonharem, compartilhar comigo as angustias, alegrias, decepções. Todos os aconselhamentos foram cruciais para o meu amadurecimento e corroboraram para que esse projeto pudesse ser materializado. Eu os amo muito! Vocês são muito especiais pra mim.

Ao meu amigo e orientador, prof. Daniel Gitaí. Muito obrigada pela oportunidade. Obrigada porque mesmo sem me conhecer bem, confiou no meu potencial. Obrigada porque aquele “sim” na sala 201, que foi o início de uma gigantesca mudança na minha vida, mudanças que repercutem até hoje. O meu muito obrigada pela compreensão, pelos ensinamentos, pelos momentos que o Senhor sentava pra tirar uma dúvida, e acabava me dando uma aula sobre o tema em questão. O senhor, professor Daniel, é um pesquisador nato, que demonstra muito amor, dedicação e comprometimento com o que faz. Obrigada por me ensinar tão grandes valores. Obrigada por ter sido uma peça muito importante na realização deste sonho.

Aos meus amigos e colegas de turma do mestrado, em especial à Evelin Antoniele que foi minha companheira desde o início dessa jornada, onde compartilhamos nossas alegrias bem como as angustias quando os experimentos não davam certo. À Návyla Candeia, que tão naturalmente conquistou meu coração com a sua simpatia e amizade. Obrigada pela amizade, meninas.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: João Pedro, Carmem e Bruna pela disposição, companheirismo e amizade, em especial à Thalita Sales que me ensinou desde a fundamentação teórica à experimentação propriamente dita, muito obrigada,

“Thalits”. Ao João Born, Chiara, Yngrid, Ana Letícia, Isabele, Maísa, Fernanda, Heloísa e Tayana por tornarem o dia a dia mais agradável. Obrigada!

Aos meus amigos, meus presentes de Deus, pelo apoio, compreensão em inúmeros momentos, pela torcida. Amo cada um de vocês. Aos amigos do Pequeno Grupo Por Amor, em especial à Mile, minha amigona, que de uma maneira extremamente especial entrou na minha vida sendo um canal que me conduziu à vontade de Deus. Amo você, Milinha! Meu muito obrigada sempre. Ao Felipe, que foi muito presente na fase mais difícil do mestrado, que tirou muitas dúvidas e aliviou o meu coração em muitos momentos, proporcionando-me paz que vem de Deus para que eu pudesse prosseguir. Ao Daniel Coimbra e ao Oswaldo por participarem também, direta ou indiretamente dessa fase de transição. Obrigada pelas orações e cuidado ao me ensinarem as verdades da palavra de Deus. Eterna gratidão.

Ao meu amigo Igor Santana, obrigada pelo conforto nos momentos instáveis e orações.

À professora Janira Lúcia, minha orientadora durante a minha graduação em Biologia. Obrigada pela semente que foi plantada. Obrigada por me ensinar os primeiros passos da vida acadêmica. Devo muito a senhora por todos os ensinamentos a mim destinados. Obrigada sempre!

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, em especial ao Olagide de Castro e Adriana Ximenes, por todo o conhecimento da Neurociência compartilhado.

Ao professor Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva do Laboratório de DNA Forense da UFAL.

Aos professores Dra. Maria Luisa Paçó-Larson (Laboratório de Estrutura, Regulação e Função Gênica em Eucariotos – FMRP/USP) e Dr. Norberto García-Cairasco (Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental – FMRP/USP) pela contribuição científica

Aos funcionários do ICBS, que trabalham na coordenação, direção e limpeza, em especial ao “Galego” por ser tão solícito, comprometido e simpático. Tornaram os meus dias mais agradáveis no laboratório.

Às instituições CNPQ, CAPES, UFAL pelo apoio financeiro.

À todos os meus familiares, que torcem por mim de uma forma muito genuína. Amo muito vocês.

A todos que cooperaram, oraram, comigo e me incentivaram, o meu muito obrigada! Que Deus abençoe a todos vocês.

*Pois d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.*

*A Ele seja a glória para sempre! Amém.*

*(Romanos 11:36)*



## RESUMO

Epilepsia é uma desordem neurológica grave, caracterizada pela presença de crises epiléticas recorrentes, que acomete cerca de 1% da população mundial. Em decorrência da alta prevalência e gravidade, a epilepsia do lobo temporal é a mais estudada. Uma frente de estudo no campo da epileptologia que teve grandes avanços nas últimas décadas diz respeito às investigações de vias moleculares associadas ao processo epileptogênico. Estudos em modelo animal e em humanos, demonstram que o processo epileptogênico envolve uma reorganização global da expressão gênica no sistema nervoso central. Neste contexto, uma questão que se apresenta é: quais os mecanismos reguladores da expressão desses genes no tecido epilético? É provável que os microRNAs (miRs), moléculas importantes no processo de regulação pós-transcricional e traducional da expressão gênica, apresentem um papel fundamental na determinação de ambiente bioquímico compatível com a epileptogenicidade. Nosso grupo tem investigado esta questão em modelo animal de epilepsia do lobo temporal induzida através de injeção de pilocarpina. Inicialmente, identificamos os melhores genes de referência para serem utilizados como normalizadores endógenos da expressão dos miRs. Assim, investigamos cinco potenciais genes de referência através da expressão de estabilidade usando os *softwares* *geNorm* e *NormFinder*. Em seguida, como uma estratégia de validação, foi realizada a análise da expressão relativa do miR-146a, cujo padrão de variação de expressão é conhecido em epilepsia. Os resultados indicam que os genes endógenos snoRNA e U6SnRNA possuem níveis de expressão estáveis no hipocampo de ratos dos grupos experimentais e controle e que a combinação de ambos é necessária para uma normalização precisa. Posteriormente, utilizamos esses normalizadores para analisar o Perfil de expressão hipocampal dos sete microRNAs. O miR-196b apresentou níveis relativos de transcritos significativamente aumentados nos grupos 24h quando comparados com os animais naive. O miR-352 também apresentou superexpressão no grupo 24h quando comparado com o naive, 0h e crônico. Os demais miRs não apresentaram variação significativa em nenhum ponto do processo epileptogênico. Para compreender o significado biológico dessas alterações, faz-se necessário estudo adicional baseado em ensaios funcionais.

**Palavras-chave:** Epilepsia do lobo temporal. RT-qPCR. Genes de referência. microRNAs.

## ABSTRACT

Epilepsy is a serious neurological disorder, characterized by recurrent epileptic crisis that affects about 1% of world's population. Due to the high prevalence and gravity, the temporal lobe's epilepsy is the most studied. A kind of study in the field of epileptology that had great advances lately is about the investigation of the epileptogenic process, associated with molecular pathways. Studies in animals models and in humans have shown that the epileptogenic process involves a global reorganization of the gene's expression in the central nervous system. In this context, a raised question is: what are the expression's regulatory mechanisms of those genes on epileptic tissue? It's possible that the miRNAs, important molecules in post-transcriptional and translational regulation's process of the gene expressions, presenting a fundamental role in the determination of a compatible biochemical environment with the epileptogenicity. Our group has investigated this question in an animal model of temporal lobe epilepsy, induced by a pilocarpine injection. In a previous study, by using the approach of hybridization in microarray, we identified 77 microRNAs expressed in different ways in the hippocampus of those animals that were submitted to Status epilepticus (SE) by pilocarpine. In order to start the process of validating these data, we selected 7 microRNAs to evaluate the expression profile during the epileptogenic process. We used *Wistar* rats injected with pilocarpine (ip) and euthanized immediately and 24 hours after SE, and during the chronic phase (after the establishment of spontaneous recurrent seizures), as controls naïve rats were used. The analyzes were conducted by relative expression analysis by RT-qPCR using total RNA purified samples of hippocampus. First, we investigated five potential reference genes, performing a stability expression analysis using geNorm and NormFinder softwares. As a validation strategy, we used each one of the candidate reference genes to measure PILO-induced changes in microRNA-146a levels, a gene whose expression pattern variation in the PILO injected model is known. Our results indicated U6SnRNA and SnoRNA as the most stable candidate reference genes. Thereafter, we use these reference genes to analyze the profile of hippocampal expression of the seven microRNAs. The miR-196b showed relative levels of transcripts significantly increased in groups 24 compared to naïve animals. The overexpression of miR-352 also presented in 24h group when compared with naïve group, 0h and chronic. The other miRs showed no significant changes in any point of the epileptogenic process. To understand the biological significance of these changes, it is necessary to further study based on functional assays.

**Keywords:** Temporal lobe epilepsy. RT-qPCR. Reference genes. microRNAs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental.....	20
Figura 2- Esquema representativo da circuitaria básica hipocampal.....	20
Figura 3 – Biogênese de microRNAs.....	28
Figura 4 – Quantificação e gravidade das crises espontâneas e recorrentes dos animais do grupo crônico.....	35
Figura 5 - Figura 5- Esquema do ensaio TaqMAN.....	40
Figura 6 – Níveis de expressão dos cinco RNAs não codificadores candidatos a genes de referencia para análise de RT-qPCR de microRNAs em hipocampos de ratos experimentais e controle.....	45
Figura 7 - Seleção dos genes de referência mais estáveis para análises de RT-qPCR de microRNAs em modelo de pilocarpina sistêmica, usando o programa geNorm.....	46
Figura 8 – Determinação do melhor número de genes de referência para a normalização dos dados de RT-qPCR para análise de microRNAs no modelo de Pilocarpina sistêmica.....	47
Figura 9 – Seleção de genes de referência mais estáveis para análises de RT-qPCR de microRNAs em modelo de pilocarpina sistêmica, usando o programa <i>Normfinder</i> .....	48
Figura 10- Expressão relativa do miR-146a no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente.....	49
Figura 11 – Expressão relativa do miR-196b no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (naive).....	51
Figura 12 – Expressão relativa do miR-352 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (naive).....	52
Figura 13 – Expressão relativa do miR-352 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (naive).....	52

<b>Figura 14 – Expressão relativa do miR-10a-5p no hipocampo de ratos injetados com pilocapina intraperitonealmente e controle (naive).....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 15 – Expressão relativa do miR-128 no hipocampo de ratos injetados com pilocapina intraperitonealmente e controle (naive).....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 16 – Expressão relativa do miR-324-3p no hipocampo de ratos injetados com pilocapina intraperitonealmente e controle (naive).....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 17 – Expressão relativa do miR-376 no hipocampo de ratos injetados com pilocapina intraperitonealmente e controle (naive).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18 – Expressão relativa do miR-507 no hipocampo de ratos injetados com pilocapina intraperitonealmente e controle (naive).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 19 – Perspectivas .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1- Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).....</b>	<b>33</b>
<b>Quadro 2 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo 0h.....</b>	<b>37</b>
<b>Quadro 3 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo 24h.....</b>	<b>37</b>
<b>Quadro 4 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo Crônico.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de RNAs não codificadores.....	25
Tabela 2 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo experimental 0h.....	37
Tabela 3 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo experimental 24h.....	37
Tabela 4 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo controle (Naive).....	38
Tabela 5 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo controle (Naive).....	38
Tabela 6 - Genes, código do gene no miRbase/NCBI, código do ensaio na empresa Life Tech e sequência dos primers usados no estudo.....	40
Tabela 7- Genes alvos preditos para o miR-196b utilizando a ferramenta TargetScan..	55
Tabela 8 - Genes alvos preditos para o miR-196b utilizando a ferramenta TargetScan.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AGO** - argonautas

**bp** - pares de bases

**CERs** - crises espontâneas e recorrentes

**C<sub>T</sub>** - ciclo *threshold*

**DAEs** - Drogas antiepilépticas

**DGCR8** - DiGeorge syndrome critical region gene 8

**dsRBDs** - dsRNA-binding domains

**ELT** – Epilepsia do lobo temporal

**ELTM** - Epilepsia do lobo temporal mesial

**IBE** - International Bureau for Epilepsy

**ILAE** - International League Against Epilepsy

**lincRNAs** - large intergenic noncoding RNAs

**lncRNAs** - longos RNAs não codificadores

**miRNAs** – microRNAs

**ncRNAs** - RNAs não-codificadores

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**piRNAs** - PIWI-interacting RNAs

**pre-miRNAs** – microRNAs precursores

**pri-miRNAs** – microRNAs primários

**PTZ** -Pentilenotetrazol

**RISCs** - complexos de silenciamento induzidos por RNA

**RNAi** - mecanismo de interferência por RNA

**RNPs** - complexos de ribonucleoproteínas

**RT-qPCR** – *Quantitative Reverse-Transcription PCR*

**SE** - *Status epilepticus*

**snoRNA** - pequenos RNAs nucleolares

**TARBP2** - TAR RNA binding protein

**t-UCRs** - regiões ultraconservadas transcritas

**UTR** – Untranslated region



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 Considerações gerais – Epilepsia</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1.1 Conceito</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1.2 Epidemiologia</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1.3 Impactos socioeconômicos</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.4 Tratamento</b> .....	<b>24</b>
<b>1.1.5 Classificação</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2 Epilepsia do lobo temporal (ELT)</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3 Modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3.1 Modelo de ELT induzido por pilocarpina</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4 Reorganização da expressão gênica</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5 MicroRNAs (RNAs não codificadores)</b> .....	<b>32</b>
<b>1.5.1 microRNAs: descoberta e conceito</b> .....	<b>33</b>
<b>1.5.2 Mecanismo de ação e biogênese</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6 MicroRNAs e epilepsia</b> .....	<b>35</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.1 Indução do <i>status epilepticus</i> e análise das crises induzidas através de injeção intraperitoneal de pilocarpina</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.2 Avaliação das crises epiléticas</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 Dissecção do hipocampo</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3 Extração de RNA total de hipocampo de rato</b> .....	<b>43</b>

3.3.1	Quantificação das amostras de RNA total.....	43
3.4	Experimentos de RT-qPCR .....	46
3.4.1	Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	46
3.4.2	Reação de amplificação .....	46
3.5	Análise da estabilidade de expressão dos genes utilizando os programas <i>NormFinder</i> e <i>geNorm</i> .....	48
3.5.1	<i>geNorm</i> .....	49
3.5.2	<i>NormFinder</i> .....	49
3.6	Análises da expressão relativa do miR-146a .....	50
3.7	Análise de genes alvos dos miRs diferencialmente expressos .....	50
3.8	Análises estatísticas .....	50
4	RESULTADOS .....	51
4.1	Identificação de genes de referência para análise de expressão de microRNAs em modelo de ELT induzido por injeção intraperitoneal de pilocarpina .....	51
4.2	Análise pelo programa <i>GeNorm</i> .....	53
4.3	Análise pelo programa <i>Normfinder</i> .....	55
4.4	Validação dos genes de referência .....	55
4.5	Avaliação da Expressão relativa dos microRNAs 10a-5p, 128 <sup>a</sup> , 196b, 324-3p, 352, 376c e 507 .....	57
4.6	Predição de genes-alvo de microRNAs diferencialmente expressos em hipocampus de ratos epiléticos.....	63
5	DISCUSSÃO .....	67
5.1	Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica diferencial de microRNAs em modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina .....	67
5.2	Análise do perfil de expressão dos microRNAs.....	69
6	CONCLUSÕES .....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

<b>ANEXO A- Aprovação do Comitê De Ética Em Pesquisa.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO B- Aprovação do Comitê De Ética Em Pesquisa.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é o termo dado para o grupo de doenças que têm em comum crises epilépticas que sucedem na ausência de condições febris, tóxicas ou metabólicas. As crises epilépticas, por sua vez, refletem atividade elétrica anormal e paroxística acometendo uma ou várias áreas do sistema nervoso central e que pode ser causada por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (CHANG e LOWENSTEIN, 2003;). Os sintomas clínicos de uma crise são úteis na classificação, e refletem anormalidades temporárias de conjuntos de neurônios de uma região do cérebro (crises focais) ou de áreas mais extensas, envolvendo sincronicamente ambos os hemisférios cerebrais (crises generalizadas). O tipo mais comum de epilepsia focal no adulto é a epilepsia cuja origem se dá na porção mesial do lobo temporal, denominada epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal. Esse tipo de epilepsia está associada a um dano inicial do sistema nervoso central, insulto precipitante, dentre os eventos, pode-se destacar episódios febris prolongados, hipóxia neonatal, meningite.. Após esse insulto, ocorre uma reorganização neural característica que culmina em mecanismos adaptativos para a reparação cerebral e que, de certa maneira, estão associados à epileptogênese. Um dos grandes desafios da epileptologia é compreender os mecanismos envolvidos na epileptogênese.

Recentemente, estudos em modelo animal e em humanos, demonstram que o processo epileptogênico envolve alteração na expressão de miRNAs no sistema nervoso central, indicando que essas moléculas estão associadas ao estabelecimento e/ou manutenção das crises epilépticas. Os microRNAs (miRNAs) consistem em pequenos RNAs não codificadores, que regulam a expressão gênica a nível pós transcricional. Neste trabalho, investigamos esta questão em modelo animal. Sendo assim, foram identificados e validados genes de referência para análise de expressão gênica diferencial de miRNAs nos modelos de ELT baseados na administração intraperitoneal (i.p) de pilocarpina. Para isso, avaliamos a expressão de cinco potenciais genes de referência comercializados para análise de expressão gênica de miRs (U6SNRNA, SnoRNA, Y1, 4.5(S)1 e 4.5(S)5). Através de RT-qPCR, obtivemos o perfil dos seus transcritos no hipocampo de animais eutanasiados imediatamente, 24 horas e na fase crônica após o *status epilepticus* (SE) e do grupo controle (Naive).

Posteriormente, foi avaliada a estabilidade de expressão desses genes através dos programas *geNorm* e *NormFinder*.

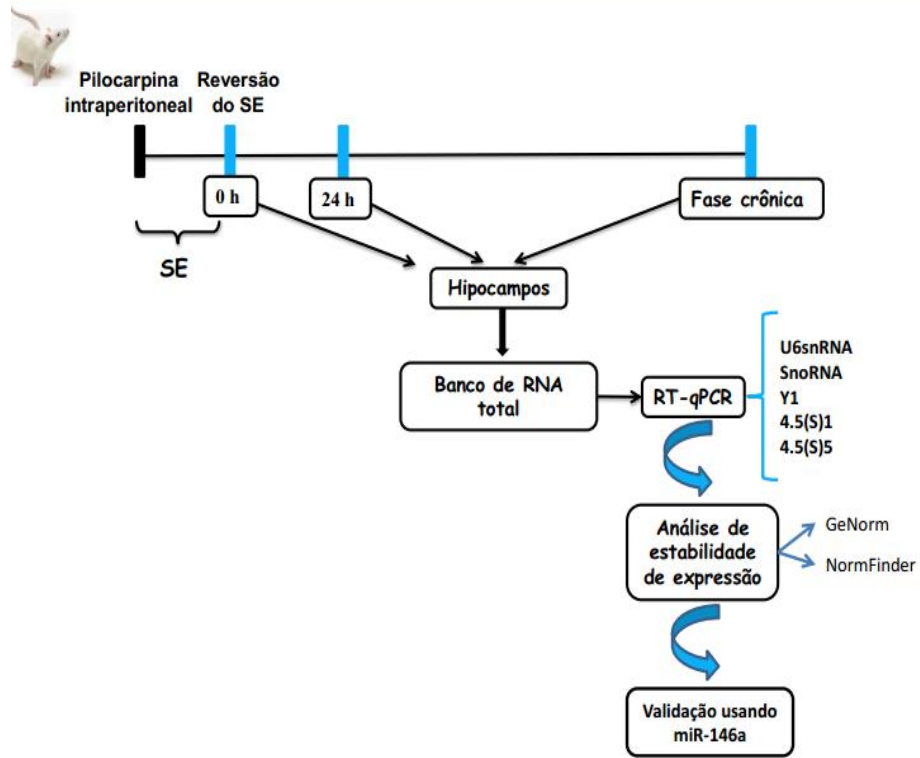
Como estratégia de validação, foi avaliado o impacto do uso de diferentes genes de referência na expressão relativa do gene *miR-146a*, cujo perfil de expressão na epileptogênese é bem conhecido. Através dessas análises identificamos um painel de genes que são adequados para a normalização de dados de expressão.

Após a obtenção dos melhores genes de referência, a partir de dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando-se a abordagem de hibridação em microarranjo, identificamos 77 miRNAs diferencialmente expressos no hipocampo de animais submetidos a *Status epilepticus* (SE) por pilocarpina. Com o objetivo de iniciar o processo de validação desses dados, selecionamos 7 miRs, 10a-5p, 128a, 196b, 324-3p, 352, 376 e 507, para avaliar o perfil de expressão durante o processo epileptogênico. Utilizamos ratos *wistar* injetados com pilocarpina 300mg/kg (i.p.), eutanasiados imediatamente e 24 horas após o SE; e durante a fase crônica (após o estabelecimento das crises espontâneas e recorrentes); como controles, foram utilizados ratos *Naives*. As análises de expressão relativa foram feitas através de RT-qPCR, utilizando amostras de RNA total purificados de hipocampus.

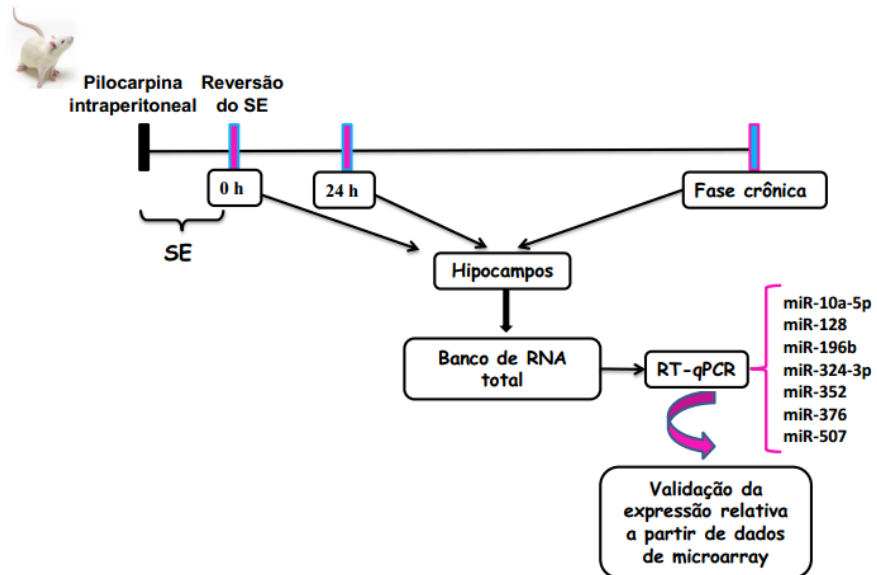
Outro aspecto do trabalho diz respeito à realização de uma análise *in silico*, utilizando o programa TargetScan com o objetivo de identificar genes alvos para os miRNAs que apresentaram expressão alterada por análises de RT-qPCR.

**Figura 1 – Delineamento experimental**

A)



B)



C)



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais – Epilepsia

#### 2.1.1 Conceito

HAUSER *et al* (1996) afirma que a epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por episódios paroxísticos, espontâneos e recorrentes que se expressam em diversos fenômenos clínicos, destacando-se: nível de consciência alterado, movimentos involuntários, fenômenos sensoriais anormais, alterações autonômicas e distúrbios transitórios de comportamento. Segundo a *International League Against Epilepsy* (ILAE), a epilepsia é definida como uma desordem cerebral caracterizada pela predisposição à geração de crises epiléticas e suas consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais. Engel (1995) afirma que a epilepsia é caracterizada por crises recorrentes, convulsivas ou não, decorrentes de atividade anormalmente excessiva ou hipersincrônica dos neurônios cerebrais, usualmente auto-limitadas.

Há, portanto, uma diferença no que diz respeito à definição entre epilepsia e crise epilética. Em geral, o diagnóstico de epilepsia implica numa anormalidade epileptogênica constante do cérebro, provocando crises recorrentes e espontâneas (CREs). Em contrapartida, as crises em pacientes não epiléticos são provocadas por atividade elétrica anormal que reflete resposta isolada do cérebro a um insulto temporário ou a perda de equilíbrio homeostático (ENGEL, 2001; GITAI *et al.*, 2008). A ILAE em conjunto com a *International Bureau for Epilepsy* (IBE) asseveram que uma crise epilética é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido a uma atividade neuronal anormal (excessiva ou sincrônica) do cérebro. Já epilepsia conjectura a existência de uma anormalidade epileptogênica intrínseca, endógena ao próprio cérebro e que está presente mesmo entre as crises, independente de qualquer condição ou insulto agudo. Esta propriedade do “cérebro epilético” pode gerar crises recorrentes durante um período de tempo relativamente curto, ou durante muitos anos, ou mesmo durante toda a vida do indivíduo (ENGEL, 2006).

#### 2.1.2 Epidemiologia

A epilepsia é frequente, afetando cerca de 1% da população mundial (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2005). Em países em desenvolvimento, a prevalência é ainda



maior, ocorrendo em 1-2% (SANDER, 2003). Estima-se que até  $\frac{3}{4}$  de todos os pacientes com epilepsia vivam em países em desenvolvimento. A maior prevalência de epilepsia nesses países é atribuída a uma combinação de fatores, tais como, alta incidência de doenças infectocontagiosas, agravos perinatais e acesso limitado da população a serviços de saúde e a tratamento adequados (THOMAS *et al.*, 2001; SANDER, 2003).

Na América Latina, observou-se uma prevalência mediana de 17.8 casos (variando 6-43.2) por 1.000 pessoas e uma variação para incidência de 77.7-190 casos por 100.000 pessoas por ano (BURNEO *et al.*, 2005).

No Brasil, há poucos dados sobre prevalência. Uma análise de 3 estudos independentes, mostrou prevalência variando entre 11.9 e 18.6 afetados por 1.000 pessoas (BURNEO *et al.*, 2005). Em Maceió, capital de Alagoas, um único estudo aponta que a prevalência de casos de epilepsia ativa é de 2,42% (CALVANO *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Impactos socioeconômicos

Em decorrência de fatores como alta prevalência, morbidade, e uso intenso de recursos médicos, o impacto econômico associado à epilepsia é muito alto, com custo anual estimado em 100 a 2.000 dólares por paciente com epilepsia inativa e de 900 a 3.000 dólares para os casos de epilepsia ativa (BRAZIL, 2004).

Um componente importante da condição epiléptica é o impacto na qualidade de vida. Jacobs (1996) afirma que pessoas com epilepsia relatam problemas familiares, círculo social restrito, redução de oportunidades, baixa auto-estima, além de ansiedade e depressão. Corroborando com esse estudo, Specht (2001) relata que aproximadamente 20% dos pacientes, mesmo com crises controladas, sofrem consequências psicossociais e emocionais negativas, como: menor adequação social, dificuldades emocionais, auto-estima baixa, ansiedade, problemas no emprego e/ou nas atividades diárias, entre outras.

De modo geral, a epilepsia é a segunda causa mais comum de problemas mentais, particularmente quando consideramos adultos jovens. Estimativas do Banco Mundial mostram que a epilepsia é responsável por 9% do ônus total gerado por doenças mentais e neurológicas (EISENBERG, 2008).

Portanto, pode-se considerar que epilepsia acarreta grandes prejuízos socioeconômicos que são comparáveis aos provocados pelo câncer de mama em mulheres e pelo câncer de pulmão em homens (HAUSER *et al.*, 1996; REYNOLDS, 2000)

#### 2.1.4 Tratamento

O tratamento clínico da epilepsia baseia-se fundamentalmente no uso de drogas antiepilépticas (DAEs). No entanto, esta abordagem tem enfrentado dois desafios: a remissão completa das crises e os efeitos colaterais dos fármacos. De fato, na epilepsia do lobo temporal (ELT), por exemplo, o controle completo das crises é alcançado em cerca de 70-80% dos pacientes (SANDER 1993; MATTSON 1994). Além disso, em pacientes submetidos a DAE, é muito comum a ocorrência de distúrbios cognitivos, do sono e de humor como consequência do uso dos fármacos (SIDDHARTHA *et al.*, 2005). Em determinados casos, os pacientes farmacorresistentes são indicados à intervenção cirúrgica para remover a área do cérebro afetada (ENGEL, 2001). A estimulação do nervo vago e a dieta cetogênica também têm sido utilizadas como alternativas ao tratamento (LEFREVE, 2000; MIN e BAO, 2012).

#### 2.1.5 Classificação

A classificação de crises e síndromes epilépticas está em contínua atualização. Atualmente, há pelo menos 40 síndromes epilépticas distintas, classificadas de diferentes modos (ENGEL, 2006).

Há vários critérios para a classificação das epilepsias. No que concerne à etiologia, a epilepsia é classificada, segundo a ILAE (1989), em: a) idiopáticas, em que a ocorrência das crises não está associada a alterações estruturais específicas, b) sintomáticas, que estão associadas a alterações na estrutura cerebral ou metabolismo; e c) criptogênicas, em que a causa da epilepsia é desconhecida (ENGEL, 2006). Em 2010, no entanto, a ILAE fez uma nova proposta, recomendando que a classificação etiológica utilizasse o conceito de epilepsia de causa estrutural/metabólica (ao invés de sintomática), de causa desconhecida (ao invés de criptogênica) ou de causa genéticas (ao invés de idiopática) (BERG *et al.*, 2010).

Com relação às crises epiléticas, a comissão de classificação e terminologia da ILAE classifica basicamente em focais ou generalizadas mediante as suas manifestações clínicas, eletrográficas e achados de neuroimagem (BERG *et al.*, 2010). As crises pertencentes a categoria focal são aquelas que há comprometimento de apenas uma região cerebral, podendo ou não haver generalizações posteriores. Por outro lado, as crises generalizadas são aquelas originadas em múltiplas áreas do córtex cerebral, simultaneamente, envolvem ambos os hemisférios cerebrais desde o início (LURDERS *et al.*, 1998; ROSENOW e LUDERS 2001; ILAE, 1989).

## **2.2 Epilepsia do lobo temporal (ELT)**

A ELT, é a causa mais frequente de epilepsia em adolescentes e adultos (ENGEL e WIESER, 1997; ENGEL, 2001; GASTAUT *et al.*, 1975). Além disso, cerca de 30% dos pacientes portadores de ELT são refratários ao tratamento farmacológico disponível atualmente, mesmo quando utilizada uma combinação de dois ou mais anticonvulsivantes. Nestes casos, a remoção cirúrgica da área epileptogênica (lobotomia) é a única alternativa para a remissão ou controle das crises, sendo que 20% dos pacientes continuam apresentando crises (ENGEL, 2001). De acordo com a ILAE, a ELT é classificada como uma condição epilética que apresenta crises parciais ou complexas, podendo estar associadas a generalizações posteriores. Durante crises parciais simples, há preservação da consciência e os pacientes costumam apresentar manifestações psíquicas, gustativas, olfativas e sintomas autonômicos. Já nas crises complexas, a consciência é comprometida e, normalmente, os indivíduos apresentam olhar imóvel, acompanhado de automatismos de forma estereotipada, repetitiva e movimentos involuntários (WIEBE *et al.*, 2001). A partir da semiologia e origem das crises, foi possível subdividir a ELT em epilepsia mesial e lateral (também conhecida como neocortical),

Em torno de 60% dos casos de ELT correspondem à epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), sendo que a forma associada à esclerose hipocampal é a mais comum, presente em 50-70% dos pacientes fármaco-resistentes (ANDRADE-VALENÇA *et al.*, 2006).

O processo epileptogênico em pacientes portadores desse tipo de epilepsia consiste tipicamente de 3 fases: a) um insulto inicial (tais como injúria cerebral decorrente de

convulsão febril); b) um período de latência (epileptogênese); e c) período crônico, caracterizado pela ocorrência de CREs (MATHERN *et al.*, 1996).

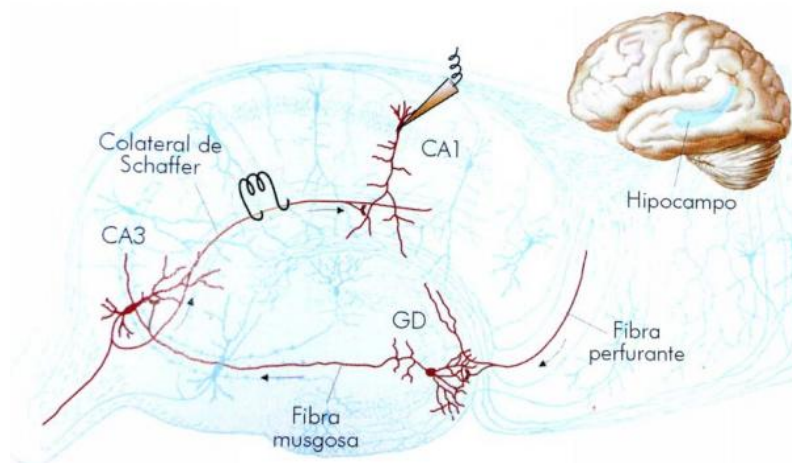
No que diz respeito à histopatologia, cerca de 70% dos pacientes com ELTM associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH) apresentam lesões que incluem degeneração neuronal, astrogliose, neurogênese, dispersão das células granulares e rearranjos axonais, como brotamento da fibra musgosa (SHARMA *et al.*, 2007).

Desde que a formação hipocampal é um órgão crítico na gênese, manutenção e disseminação das crises, vários autores têm reportado alterações neuroquímicas nesta estrutura.

A formação hipocampal é constituída de quatro regiões: o giro denteado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e córtex entorrinal. Tal estrutura é composta por uma camada principal, a camada de células granulares e piramidais, e camadas moleculares compostas por dendritos basais e apicais dos neurônios principais. Os neurônios principais são excitatórios, utilizando glutamato como principal neurotransmissor (COSTA, 1998; AMARAL 1989; ROCKENBACH, 2010).

As células granulares do giro denteado recebem aferência importante do córtex entorrinal que inerva os dendritos apicais das células granulares. Os axônios das células granulares, as fibras musgosas, estabelecem sinapses com neurônios piramidais do segmento proximal de CA3. Os neurônios piramidais de CA3 e seus axônios, colaterais de Schaffer, inervam dendritos apicais de CA1. As células piramidais de CA3 também estabelecem um circuito de fibras recorrentes que inervam outras células de CA3, facilitando a geração de atividade sincronizada. Das células piramidais de CA1 emergem colaterais axônicos que terminam em neurônios de CA3 via conexões de associação. A região de CA1 também recebe conexões diretas do córtex entorrinal (via temporo-amônica) (MCNAMARA, 1994 *apud* ROCKENBACH, 2010) (Figura 2).

**Figura 2- Esquema representativo da circuitaria básica hipocampal**



Fonte:Lent, 2004.

A rede hipocampal apresenta um baixo limiar de susceptibilidade à atividade epileptiforme, sendo altamente reativa a uma variedade de insultos (MORIMOTO *et al.*, 2004). Descargas epileptiformes repetidas induzem uma série de danos neuronais e reorganização axonal que são mais, ou menos, graves dependendo do tipo de crise límbica em questão. As ELTM-EH estão associadas a um padrão bem definido de perda neuronal, infiltração de células da glia (astrogliose) e plasticidade sináptica. A formação hipocampal apresenta perda neuronal pronunciada no segmento CA1, perda razoável no segmento CA3, enquanto que células dos segmentos CA2 e as células granulares do giro dentado parecem ser mais resistentes (BABB *et al.*, 1984). A principal reorganização axonal é caracterizada por brotamentos de colaterais axonais das células granulares, as fibras musgosas, na região da camada molecular interna do giro dentado (ANDRADE-VALENÇA *et al.*, 2006).

Um dos grandes desafios da epileptologia é trazer esclarecimentos acerca dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo epileptogênico. Estudos dos pacientes com epilepsia submetidos à ressecção cirúrgica ou autópsia permitiram um melhor conhecimento do papel das alterações nas estruturas mesiais temporais, particularmente no

complexo hipocampal e amígdala na gênese das crises. Entretanto, grandes avanços nesse tipo de conhecimento tem sido obtidos a partir de estudos em modelo animal.

### **2.3 Modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal**

Uma grande variedade de modelos para o estudo das epilepsias vem sendo desenvolvido, cada um mimetizando aspectos distintos da patologia do fenômeno em humanos (PITKANEN, 2006; GARCIA e CAIRASCO, 2006). Dentre os modelos mais explorados, estão os estabelecidos para a ELT. Esses modelos em roedores podem ser agrupados em três classes: i) abasamento através de estímulos elétricos, químicos e sensoriais de estruturas límbicas, ii) crises agudas, pela estimulação elétrica ou sensorial direta, injeção local ou sistêmica de convulsivantes químicos (e.g. Pentilenotetrazol -PTZ) e lesões eletrolíticas e iii) crises crônicas ou epilepsia, que são baseadas na indução de *Status epilepticus* (SE), principalmente através de injeção de convulsivantes químicos (e.g. ácido caínico e pilocarpina) (ELLIOT e LOWESTEIN, 2004). É importante ressaltar que não há um modelo ideal e sim modelos que representam determinados aspectos do tipo de epilepsia em estudo.

O modelo de nosso particular interesse para estudo da ELT é o de SE induzido pelo quimioconvulsivante pilocarpina. Veremos, portanto, esse modelo mais especificamente, já que as características neuropatológicas da ELTM-EH estão presentes, também, no hipocampo dos animais tratados com pilocarpina. É um modelo considerado isomorfo à doença humana, e vem sendo utilizado em muitos laboratórios desde a sua primeira descrição há um quarto de século (TURSKY *et al.*, 1983).

#### **2.3.1 Modelo de ELT induzido por pilocarpina**

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas da planta jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), a qual possui propriedades colinérgicas capazes de induzir SE, tanto administrada diretamente no encéfalo como por via intraperitoneal, culminando com lesões encefálicas específicas e movimentos estereotipados. A pilocarpina é um agonista muscarínico colinérgico, e a capacidade de produzir SE, depende da ativação do subtipo do receptor M1, já

que em camundongos *knockout* para esses receptores, os mesmos não desenvolvem convulsões em resposta à pilocarpina (HAMILTON, 1997).

Inicialmente, a atividade epiléptica se deve a ação estimulatória da pilocarpina sobre o sistema colinérgico, enquanto a manutenção da crise se deve a ativação do sistema glutamatérgico (MCDONOUGH e SHIH, 1997).

De modo geral, a injeção de pilocarpina induz SE, que é caracterizado por crises tônico-clônicas generalizadas autossustentadas. Após várias horas de SE, os animais tratados com pilocarpina apresentam remissão espontânea e entram em um período livre de crises, conhecido como período de latência. Após esse período, os animais passam a exibir crises espontâneas e recorrentes (CERs), o que caracteriza a fase crônica (CURIA *et al.*, 2008).

- *Status epilepticus*

Os estudos iniciais forneceram uma descrição qualitativa das consequências comportamentais, eletroencefalográficas e histopatológicas de indução de SE por pilocarpina. Nestes experimentos, a dose de pilocarpina usada era de 400 mg / kg, intraperitonealmente, em ratos *Wistar* machos e adultos, e a evolução progressiva de crises foi semelhante a que foi classificada por Racine (1972) no modelo de abrasamento (CURIA *et al.*, 2009).

De acordo com Turski *et al.*, (1983), os animais permaneceram imóveis por em torno de cinco à dez minutos após a administração da pilocarpina, e posteriormente exibiram movimentos oro-mandibulares, salivação, piscar de olhos, contrações de vibrissas, e bocejo. Essas atividades persistiram por até 45 minutos. Em seguida, crises epiléticas descontínuas foram observadas por aproximadamente 30 minutos após a injeção de pilocarpina e duraram de noventa à cento e cinquenta minutos, antes do início do SE, caracterizado por convulsões límbicas motoras, com salivação intensa, clonias de patas superiores, e queda atônica. Após a injeção de pilocarpina, cerca de 60% dos ratos desenvolveram SE (CAVALHEIRO *et al.*, 1991).

- Período de latência

O Período latente, conhecido como epileptogênese, consiste na fase silenciosa, com a ocorrência das inúmeras alterações a níveis celular e molecular, e antecede a ocorrência de CERs. A epileptogênese, portanto, envolve uma combinação de alterações nas propriedades neuronais, aumento da transmissão excitatória ou redução da transmissão inibitória e aumento

na conectividade interneural (JACOBS *et al.*, 2009). Tais alterações levam a uma predisposição anormal do cérebro à atividade hipersincrônica e, assim, ao desencadeamento de crises epilépticas espontâneas.

O período de latência varia de acordo com o tempo que o animal permaneceu em SE e precede a fase crônica (LEITE, *et al.*, 2002). Através de vídeo monitoramento, ratos Wistar machos adultos (300-320 mg/kg PILO i.p) apresentaram um período de latência médio de 14 dias (ARIDA *et al.*, 1999; CAVALHEIRO *et al.*, 1991; CAVALHEIRO *et al.*, 1996; LEMOS E CAVALHEIRO, 1996). Na fase aguda do período de latência, até 24 horas, há liberação de neurotransmissores, particularmente glutamato, seguida de ativação de canais iônicos, influxo de cálcio e aumento de modificações pós-traducionais, como fosforilação proteica. Em muitos casos, ocorre ainda injúria excitotóxica acompanhada de morte celular (JACOBS *et al.*, 2009). Tais danos cerebrais não se restringem às primeiras horas e dias após SE e tende a se expandir progressivamente a outras áreas do cérebro nos dias/meses seguintes. (SCORZA e ARIDA, 2009). Durante o período de latência, ocorre exacerbação de transcrição gênica, desencadeando respostas inflamatórias, gliais e vasculares, superexpressão de fatores de crescimento e morte de células neuronais (JACOBS *et al.*, 2009). Na fase tardia deste período também ocorrem eventos de remodelamento, como redirecionamento axonal, sinaptogênese, neurogênese, gliose, angiogênese, reorganização nos circuitos cerebrais e aumento da predisposição à atividade sincrônica (JACOBS *et al.*, 2009).

Em contrapartida, é interessante notar que alguns autores questionam a existência do tempo de latência. Em um estudo baseado em gravações de vídeo-EEG contínuo, o período de latência médio foi de cerca de 7 dias após o SE (GOFFIN *et al.*, 2007).

- Período crônico

Essa fase é caracterizada pela ocorrência de CREs. Do ponto de vista comportamental, essas crises em ratos tratados com pilocarpina foram recentemente reclassificadas por (VELISKOVA e MOSHE, 2006), de acordo com os seguintes critérios: 1. Olhar fixo e clonia de boca; 2. Automatismos; 3. Clonias monolaterais de membros posteriores; 4. Clonias de bilaterais de membros posteriores; 5. Clonias bilaterais de membros superiores com elevação e queda e 6. Crise tônico-clônicas. Ratos *Wistar* machos adultos (300-320 mg/kg PILO i.p), apresentaram uma frequência de 2,8 crises por semana (ARIDA *et al.*, 1999; CAVALHEIRO *et al.*, 1991; CAVALHEIRO *et al.*, 1996; LEMOS e CAVALHEIRO, 1996). As crises



espontâneas podem começar com crises parciais, agravando-se para crises generalizadas nos dias seguintes (GOFFIN *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Arida *et al.*, (1999), os animais foram mantidos num ciclo de 12h claro/escuro e a frequência das crises foi maior durante o período diurno (07h00 – 19h00).

Com o objetivo de investigar as vias moleculares associadas à epileptogênese e fase crônica, muitos grupos de pesquisa vêm realizando estudos de expressão gênica diferencial ao longo do processo epileptogênico.

## **2.4 Reorganização da expressão gênica**

Uma importante alteração induzida pelos insultos epileptogênicos é a mudança no padrão de expressão gênica. Uma consequência desse fenômeno é a presença de quantidades alteradas de moléculas (RNA ou proteínas) no tecido afetado que, com efeito, devem contribuir para um ambiente bioquímico patofisiologicamente compatível com o processo epileptogênico (GITAÍ, 2007).

Esses tipos de alterações podem envolver os diferentes níveis de controle da expressão gênica. As alterações transcricionais e pós-transcricionais causam impactos diretos nos níveis de transcritos (RNAs) e indiretos nos níveis de proteínas (GITAÍ, 2007).

A identificação dessas moléculas, cuja expressão é modulada durante o processo epileptogênico, é de fundamental importância para o entendimento das vias moleculares associadas tanto a patogênese quanto à alterações secundárias às crises recorrentes. De fato, através de estudo de expressão diferencial direcionada para genes candidatos ou em larga escala, tem-se observado que diferentes processos, tais como, resposta imune, neuroplasticidade e angiogênese estão envolvidos em aspectos patofisiológicos da epilepsia (GITAI, *et al.* 2008; PITKANEN e LUKASIUK, 2011).

Além do mais, esses achados indicam que os mecanismos regulatórios envolvidos no controle da expressão gênica devem estar alterados no processo epileptogênico. O conhecimento das bases moleculares desta alteração se constitui, portanto, de grande relevância para uma melhor compreensão da epileptogênese, e poderá contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos (GITAÍ, 2008). Neste sentido, os miRNAs,

moléculas importantes no processo de regulação pós-transcricional e traducional da expressão gênica, têm se apresentado como alvos de estudos para o entendimento da epileptogênese.

## 2.5 MicroRNAs (RNAs não codificadores)

Os RNAs não-codificadores (ncRNAs) controlam muitos aspectos da função celular, tais como proliferação celular, resposta imune, morfogênese. Com o projeto ENCODE (*Encyclopedia of coding elements*), projeto que iniciou em setembro de 2013, logo após o término do projeto genoma humano, confirma que o material genético que está entre os genes é muito importante, e não sem função, como outrora pensando. Viu-se que não podiam classificá-lo como DNA-lixo. Tornou-se cada vez mais evidente que compreender as inúmeras funções de ncRNA poderiam transformar a nossa compreensão da biologia e melhorar nossa capacidade para o tratamento das doenças em geral (PENNISI, 2012).

Uma série de ncRNAs já foram identificados: pequenos RNAs de interferência (RNAi), PIWI-interacting RNAs (piRNAs), pequenos RNAs nucleolares (snoRNA), regiões ultraconservadas transcritas (t-UCRs), *large intergenic noncoding* RNAs (lincRNAs) e outras espécies (MERCER *et al.*, 2009). Os ncRNAs podem ser subdivididos em duas classes com base no tamanho do transcrito, pequenos RNAs não codificadores e longos RNAs não codificadores (lncRNAs), conforme mostrado na (Tabela 1). Os snoRNAs são intermediários em tamanho, possuindo em torno de 60 à 300pb. Os pequenos RNAs apresentam até 200 nucleotídeos e esta classe inclui os microRNAs (miRs), os mais bem estudados, siRNAs, piRNAs e os tiRNAs. Os lncRNAs consistem em um grupo muito heterogêneo de RNA que está envolvido em um amplo espectro de processos celulares (HUANG *et al.*, 2013).

**Tabela 1 – Tipos de RNAs não codificadores**

Nome	Peso	Funções
<b>Pequenos ncRNA</b>		
Mirna	19-24pb	Inibição da tradução, degradação do RNAm
piRNAs	26-31pb	Modificação epigenética
tiRNAs	17-18pb	Retrocesso RNAPII, marcação do nucleossomo e regulação gênica
TSSa-RNAs	20-90pb	Manutenção da transcrição

PROMPTs	>200pb	Ativação da transcrição
snacRNA	89-135pb	... E diferenciação
<b>Intermediários</b>		
snoRNA	60-300pb	Síntese e processamento do RNA ribossomal citoplasmático, modificação pós transcricional do rRNA e snRNA através da 2' o' metilação e pseudouridylation
<b>Longos ncRNAs</b>		
lincRNAs	>200pb	Modificação epigenética
T-UCRs	>200pb	Regulação de microRNAs e mRNAs ?
<b>Outros</b>		
lncRNAs	>200pb	Inativação de cromossomos, regulação dos telômeros

Fonte Huang et al., 2013 – modificado

### 2.5.1 miRNAs: descoberta e conceito

Em 1993, Vitor Ambros e colaboradores ao cultivar *Caenorhabditis elegans*, perceberam uma linhagem mutante que perdia a capacidade de formar vulva, bem como apresentava falhas durante as fases de desenvolvimento de larva para o animal adulto. Quando esses mutantes geravam ovos, os mesmos não conseguiam sair e eclodiam dentro do animal, consumindo-o posteriormente. Continuando os estudos acerca desses mutantes, Ambros e colaboradores nomearam o gene responsável pelas alterações de *lin-4* e perceberam que esse gene possuía dois transcritos, um mais abundante de 22nt e outro de 61nt, e não codificava proteína, além de estarem localizado numa região intrônica do genoma do organismo. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o transcrito de 22nt parecia por complementariedade com a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14* e regulava negativamente a expressão desse gene. Esse gene é responsável por codificar uma proteína nuclear que participa na regulação da transcrição de genes associados à transição dos estágios larvais de *C. elegans* (de L1 para L2) (LEE, FEINBAUM e AMBROS, 1993; RUVKUN e GIUSTO, 1989). Inicialmente, essa descoberta não teve muita repercussão, já que acreditavam ser característica peculiar de *C. elegans*. Em 2000, no entanto, outro grupo de cientistas clonou outro miRNA de *C. elegans* e o denominou de *let-7* (REINHART *et al.*, 2000). O *let-7* possuía a mesma característica de se ligar à região 3'UTR (Untranslated region), no entanto, em outro gene, o *lin-41* e inibir a sua tradução. A sequência do *let-7* mostrou-se ser altamente conservada nos organismos, fato que evidenciava a não exclusividade dos miRs aos nematódeos (PASQUINELLI *et al.*, 2000).

Os miRs representam uma família de pequenos RNAs endógenos, que apresentam de 18 à 24 nt, não codificadores que regulam a expressão de genes a nível pós transcricional e traducional em plantas e animais (JIMENEZ-MATEOS e HENSHALL, 2013).

No decorrer de vários anos de pesquisas, já foram identificados aproximadamente 1500 miRs em humanos e mais de 700 em camundongos. A versão mais recente do banco de dados de miRs – miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) (versão 19) lista mais de 25.000 sequências descritas em mais de 190 espécies. Em mamíferos, os miRs são preditos como reguladores de mais de 60% de genes codificadores de proteínas (EBERT e SHARP, 2012). Entre os inúmeros processos regulados por miRs, a diferenciação celular é particularmente crítico. Os miRs parecem ser a chave para estabelecer e manter o fenótipo, e isso é particularmente evidente no cérebro, onde os miRs são conhecidos por regular a diferenciação neuronal e morfologia (SCHRATT, 2009; MCNEILL e VAN VACTOR, 2012). Outros processos fortemente regulados por miRs incluem, a resposta imune, organização neuronal e desenvolvimento,

### 2.5.2 Mecanismo de ação e biogênese

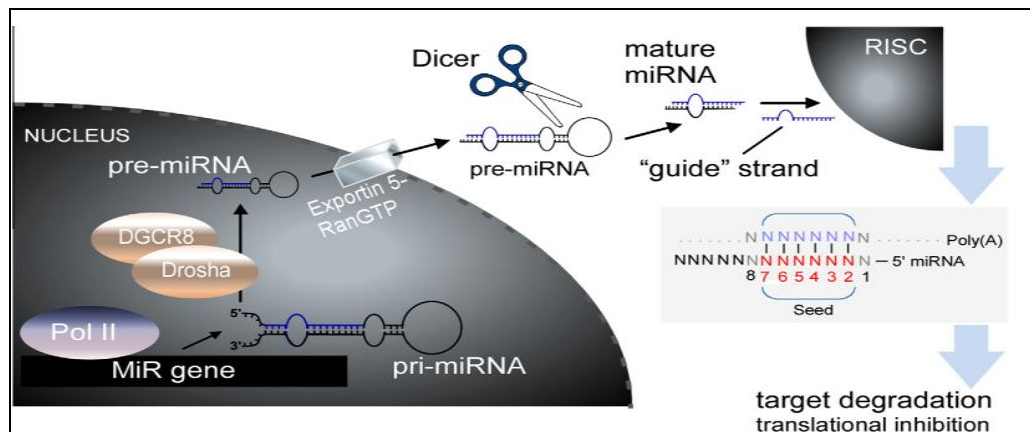
Os miRs exercem seus efeitos regulatórios através de ligação, por complementaridade de bases à sequências presentes na região 3'UTRs (não traduzidas) dos mRNA alvos. Dependendo do grau de complementariedade entre o miR e o RNAm alvo, a ação regulatória envolve a ativação de repressor traducional (quando o pareamento é incompleto) ou a degradação do RNAm alvo (BARTEL, 2004; PRESUTTI *et al.* 2006)

O processo de biogênese de miRNAs se inicia a partir da produção de moléculas precursoras, os pri-miRNAs (miRNAs primários) através de transcrição dos genes específicos. Os pri-miRNAs são posteriormente dobrados, admitindo estruturas em forma de grampos. Um único pri-miRNA, pode conter sequências pertencentes a vários miRs diferentes que serão separadas após seu processamento. O pri-miRNA é processado em basicamente duas etapas catalisadas pelas Drosha e Dicer. Ambas as enzimas são parte de complexos envolvendo proteínas que contém domínios de ligação a RNA de fita dupla ( dsRNA-binding domains) também conhecidos como dsRBDs. A Drosha forma um complexo com a proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), convertendo os pri-miRNAs em RNA com em torno de 70 nucleotídios chamados pre-

miRNAs (miRNAs precursores). Há ocasiões em que os íntrons removidos por *splicing* correspondem diretamente aos pre-miRNAs (mirtrons), não havendo o processamento pelo complexo Drosha-DGCR8. Posteriormente, os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma por meio da exportina-5 onde são clivados pela Dicer, formando um complexo com a proteína TARBP2 (TAR RNA binding protein). A clivagem proporciona a formação de pequenos RNAs de dupla fita com cerca de 20 bp. Em geral, uma das fitas se torna o miRNA maduro enquanto a outra é degradada (FILIPOWICZ *et al.*, 2008) (Figura 3).

Após o processamento, os miRs são unidos a complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) ou complexos de silenciamento induzidos por RNA (RISCs), formando miRNPs ou miRISCs, Cujas proteínas principais são proteínas da família das argonautas (AGO). Em mamíferos, quatro argonautas (AGO1 à AGO4) estão envolvidas no processo de regulação por miRs, entretanto, apenas AGO2 age também no mecanismo de interferência (RNAi). AGO2, tem função de endonuclease, agindo através da clivagem do mRNA alvo (FILIPOWICZ *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2004).

**Figura 3 – Biogênese de microRNAs**



Esquema mostrando o caminho canônico da biogênese de miRNAs. A Biogênese começa com a transcrição da miRNA pela polimerase II. Isso gera um transcrito primário que é ainda processado pelo complexo microprocessador Drosha em um pré-miRNA. Esta é embalada para exportação para o citosol e, em seguida, passa por mais uma clivagem, pela Dicer, para formar um RNA de cadeia dupla a partir do qual uma vertente é incorporada à RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) A caixa cinza no canto inferior direito mostra o alinhamento do RNAm (topo) com a miRNA (abaixo).

## 2.6 M

**Fonte:** Jimenez-Mateos, 2013

Um grande número de miRs foi isolado do cérebro e de linhagens de células neuronais (LAGOS e QUINTANA *et al.* 2002). Experimentos usando *zebrafish* como modelo mostram que os miRs têm uma diversidade de padrão de expressão em células neuronais, incluindo a expressão em precursores neuronais (KAPSIMALI *et al.*, 2007)

Tanto em modelos de epilepsia como em pacientes epiléticos, há uma ampla reorganização da expressão gênica. Uma questão que vem despertando a atenção dos pesquisadores diz respeito aos gatilhos moleculares envolvidos nesta reorganização. Neste sentido, alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de investigar o envolvimento de miRNAs no processo epileptogênico (CHENG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2010; JIMENEZ-MATEOS *et al.*, 2011).

O primeiro relato sobre a expressão de miRNA após convulsões foi feito por Nudelman e colaboradores (NUDELMAN *et al.*, 2010). Eles estudaram a expressão hipocampal do miR-132, um miRNA regulado por CREB, que está envolvido no crescimento dendrítico e na morfologia neuronal (VO *et al.*, 2005; WAYMAN *et al.*, 2008). Foi observado um aumento nos níveis do pri-miR-132 bem como nos transcritos maduros do mesmo após o SE induzido por injeção de pilocarpina. (NUDELMAN *et al.*, 2010). Pouco depois, Liu e colaboradores usaram ensaios de PCR array para avaliar o perfil na mudança da expressão de miRs, após a indução de crises por ácido cáfnico em ratos (LIU *et al.*, 2010). Eles encontraram 21 miRs com os níveis aumentados 1,5 vezes e a diminuição dos níveis de 3 à 9x de miRNAs no cérebro. A importância da imunidade adaptativa e inata é reconhecida na patogênese e manutenção da epilepsia (VEZZANI *et al.*, 2011; MARCHI *et al.*, 2012). Os miRs têm emergido como reguladores potentes da inflamação. O miR-132 confere um efeito anti-inflamatório através do seu alvo acetilcolinesterase. O primeiro miR associado a inflamação estudado na epilepsia foi o miR-146a (ARONICA *et al.*, 2010). Em cérebros normais, o miR-146a foi encontrado mais expresso em neurônios que em células da glia. Após o SE, os níveis hipocampais desse miR estavam elevados em ratos "jovens e maduros", bem como em hipocampus advindos de crianças e adultos com ELT intratável (ARONICA *et al.*, 2010; OMRAM *et al.*, 2012)

miR-146a tem sido implicado na regulação da resposta inflamatória mediada por astrócitos (LYER *et al.*, 2012). No modelo de epilepsia induzido por estimulação elétrica, este mesmo miR foi encontrado superexpresso no subcampo CA3 do hipocampo uma semana (fase latente) e 3 meses (fase crônica) após status epilepticus.

O miR-34a foi o primeiro miR descrito como mediador dos efeitos pró apoptóticos nas células. É um gene regulado por p53 e pertence a uma família conservada de miR. A superexpressão desse miR promoveu apoptose numa variedade de células não neuronais (CHANG *et al.*, 2007). A superexpressão do miR-34a regulada por crise foi relatada em hipocampos de ratos 24h após serem submetidos a injeção de pilocarpina (HU *et al.*, 2011). A regulação do miR 34-a não é observada em modelo de ácido caínico, nem em pacientes epiléticos (SANO *et al.*, 2012; KAN *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que o miR em questão é mais importante durante a injúria inicial/precipitante.

Em modelos de epilepsia do lobo temporal, a depleção *in vivo* dos níveis hipocampais de miR-132 e miRNA134 reduziu a morte neuronal induzida pelas crises (JIMENES-MATEOS, 2011).

### **3 OBJETIVOS**

#### **Geral**

Estabelecer estratégia de normalização da expressão de miRNAs durante a epileptogênese e identificar miRs com expressão modulada durante o processo epileptogênico em modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina.

#### **Específicos**

- Identificar genes de referência adequados para normalização da expressão relativa de miRs no processo epileptogênico em modelo de epilepsia do lobo temporal;
- Avaliar a expressão relativa através de RT-qPCR dos miRs: 10<sup>a</sup>-5p, 128,196b, 324-3p, 352, 376 e 507 durante a epileptogênese;
- Identificar genes alvos preditos para os miRs diferencialmente expressos.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle

Foram utilizados 30 ratos *Wistar*, machos, de 90-100 dias, pesando entre 200 e 250g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos à 22°C, em grupos de quatro indivíduos por gaiola, submetidos a ciclo claro-escuro 12h/12h (as luzes eram acesas às 8h), com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, processo: 011462/2010-83 (Anexo 1). Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações normativas para experimentação animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais utilizados nos experimentos.

Neste estudo, foram utilizados grupos experimentais baseados no modelo de SE induzidos por pilocarpina intraperitoneal. Os animais foram distribuídos para 3 grupos experimentais e 1 grupo controle, da seguinte forma: a) animais submetido a SE e eutanasiados imediatamente após o SE (Grupo 0hora, n = 6); b) animais submetidos ao SE e eutanasiados 24 horas após o SE (Grupo 24horas, n = 6); c) animais submetidos ao SE e eutanasiados após a detecção de crises espontâneas (Grupo crônico, n = 6) e d) Grupo naive: animais não-manipulados (Grupo Naive, n = 6). Vale ressaltar que dos 30 animais, 6 morreram durante o SE e portanto, os grupos experimentais e controle foram estabelecidos com 24 animais, conforme distribuição supracitada. Os grupos foram estabelecidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas.

#### 4.1.1 Indução do *status epilepticus* e análise das crises induzidas através de injeção intraperitoneal de pilocarpina

Para indução do SE, inicialmente, os animais receberam butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p). Trinta minutos após, foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de Pilocarpina (320mg/kg). Logo em seguida, os animais foram monitorados utilizando-se uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). O critério utilizado para marcar o início

do SE foi a ocorrência de crises contínuas, autossustentadas, durante o tempo mínimo de cinco minutos após a administração da Pilocarpina (LOWENSTEIN E ALLDREDGE, 1998; SHORVON, 1994). Após período de 90 minutos em SE, os animais foram submetidos a injeção de diazepam, (15-30mg/kg, i.p), com o objetivo de interromper o SE. Para que o quadro de crises epiléticas fosse abortado completamente, alguns animais receberam até 3 doses adicionais de diazepam em intervalo de 1 hora. Quando necessário, nos 3 dias seguintes ao SE foi realizada a reposição hidroeletrólítica e nutritiva através da injeção intraperitoneal de soro fisiológico a 0,9% e soro glicosado a 5%. Os 60 primeiros minutos de SE foram monitorados. Esse tempo foi dividido em 12 períodos de cinco minutos para a avaliação das crises que foi feita de acordo com a escala arbitrária de crises límbicas estabelecida por Racine (1972) (quadro 1). Nos quadros 2 à 4 estão expostas a quantidade e gravidade das crises ocorridas durante o SE, dos três grupos experimentais estabelecidos. Pode-se observar que o tempo médio de latência para o início das crises foi de 42,17 minutos para o grupo 0h, 16,83 minutos para o grupo 24h e 23,17 minutos para o grupo crônico. Para a maioria dos animais as crises mais prevalentes em cada janela de 5 minutos foram de nível 2 à 4, e poucos animais apresentaram crise nível 5.

**Quadro 1- Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).**

<b>Nível</b>	
<b>0</b>	Imobilidade
<b>1</b>	Automatismos faciais
<b>2</b>	Mioclonias de cabeça
<b>3</b>	Clonias uni ou bilaterais das patas anteriores
<b>4</b>	Clonias das patas anteriores com elevação sobre as patas posteriores
<b>5</b>	Elevação das patas anteriores e queda atônica com crises clônicas generalizadas

Fonte: Racine, 1972 (Adaptado)

**Quadro 2 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo 0h**

		Avaliação do GRUPO 0H											
RATO	Latência	NÍVEL MÁXIMO (ESCALA DE RACINE - Crises Límbicas)											
		1ºT	2ºT	3ºT	4ºT	5ºT	6ºT	7ºT	8ºT	9ºT	10ºT	11ºT	12º T
1	50	2	2	2	2	2	4	3	3	2	2	2	2
2	30	2	2	2	2	2	4	3	2	2	2	2	3
3	45	2	2	2	2	2	2	3	3	5	3	3	2
4	25	2	2	2	2	3	5	4	1	2	2	3	3
5	43	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3
6	60	2	1	1	1	2	2	3	5	2	1	2	2

**Quadro 3 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo 24h**

		Avaliação do GRUPO 24H											
RATO	LATÊNCIA	NÍVEL MÁXIMO (ESCALA DE RACINE - Crises Límbicas)											
		1ºT	2ºT	3ºT	4ºT	5ºT	6ºT	7ºT	8ºT	9ºT	10ºT	11ºT	12º T
1	17	1	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
2	12	2	5	3	2	2	4	4	3	4	3	3	3
3	28	0	0	1	4	2	2	2	2	2	3	4	4
4	14	1	2	3	2	2	2	3	3	3	3	3	4
5	10	2	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3
6	20	2	3	4	3	3	3	3	2	3	3	3	3

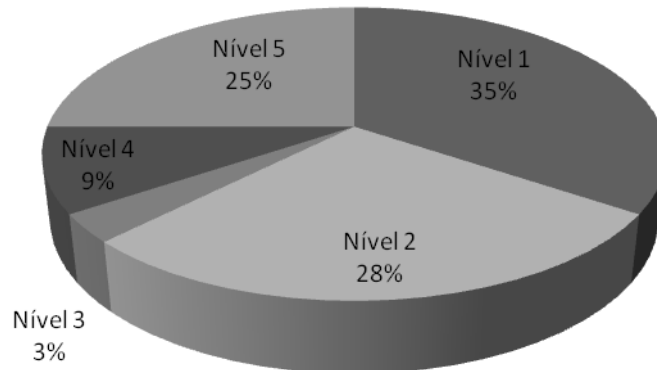
**Quadro 4 –Gravidade das crises límbicas durante o SE – Grupo Crônico**

		Avaliação do GRUPO CRÔNICO											
RATO	LATÊNCIA	NÍVEL MÁXIMO (ESCALA DE RACINE - Crises Límbicas)											
		1ºT	2ºT	3ºT	4ºT	5ºT	6ºT	7ºT	8ºT	9ºT	10ºT	11ºT	12º T
1	26	2	2	1	3	4	3	3	3	3	3	4	4
2	17	2	2	3	4	3	2	2	3	2	3	3	3
3	35	2	2	1	1	2	4	5	4	2	2	2	2
4	25	2	1	3	2	4	4	2	2	2	2	2	3
5	21	1	1	1	3	3	2	2	3	3	3	3	3
6	15	1	2	4	5	2	2	2	2	3	4	4	4

#### 4.1.2 Avaliação das crises epiléticas

Ao terceiro dia, após a reversão do SE, os animais destinados ao grupo crônico foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico e o seu comportamento foi monitorado e gravado, em média 6 horas por dia, utilizando uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). A fase crônica foi caracterizada pela presença de pelo menos duas crises epiléticas espontâneas com gravidade maior ou igual a 3, de acordo com a escala de Racine (1972). Na figura 4, encontram-se o tipo e frequência das crises espontâneas e recorrentes detectadas. Dentre as crises observadas, nível 1 (35%), foi a que mais prevaleceu, seguidas das de nível 2, 5, 4 e 3.

**Figura 4 – Quantificação e gravidade das crises espontâneas e recorrentes dos animais do grupo crônico**



Fonte: Autora, 2014.

#### 4.2 Dissecção do hipocampo

Os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico (mantidos na câmara até queda e perda motora total) e decapitados para remoção do cérebro. Os hipocampos foram imediatamente dissecados sobre superfície fria e posteriormente congelados em nitrogênio líquido (-180°C). Os tecidos foram mantidos a -80°C até a etapa de processamento.

### 4.3 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações.

Os hipocampos esquerdos dos ratos foram transferidos do *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para nitrogênio líquido. A cada tubo contendo um hipocampo, foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  de Trizol, à temperatura ambiente, e o conteúdo foi macerado com pistilos para tubos. Em seguida, foi adicionado 140  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (proporção de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para 1mL de Trizol) e os conteúdos foram homogeneizados por inversão e mantidos à temperatura ambiente por cerca de 3 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas (Heal Force® - High speed refrigerated bench) a 12000g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa (fase contendo RNA) foi transferida para tubos novos. O restante do conteúdo, interfase e fase orgânica, foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Aos tubos contendo as fases aquosas, foram adicionados 175 $\mu\text{L}$  de isopropanol (proporção de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol para cada 1mL de Trizol). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 12000g por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após essa etapa, o *pellet* de RNA foi visualizado. O isopropanol foi então removido cuidadosamente por inversão dos tubos e foi adicionado 1mL de etanol 75% para lavagem dos *pellets*, que foram deslocados com auxílio do vórtex. Os conteúdos foram novamente centrifugados a 12000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi então desprezado, preservando o *pellet*. Os *pellets* foram, em seguida, novamente lavados com 1mL de etanol 75% e centrifugados a 12000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esse processo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram mantidos invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* foram ressuspensos em 30  $\mu\text{L}$  de água milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e durante 40 minutos em gelo para completa dissolução dos *pellets*. Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC.

#### 4.3.1 Quantificação das amostras de RNA total

A concentração e a pureza dos RNAs foram avaliadas através de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir

da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza desses RNAs foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorvância nos comprimentos de onda 260nm e a 280nm.

As tabelas 2, 3 4 e 5 expõem a quantidade total de RNA obtido e a razão  $OD_{260}/OD_{280}$  das amostras purificadas. Pode-se observar que a concentração dos RNAs purificados variou entre 1,216 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e 3,616 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , com média de  $2,07\pm 0,44\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (média $\pm$ D.P.). Observa-se também que a média dos valores obtidos pela razão  $OD_{260}/OD_{280}$  foi de  $1,74\pm 0,05$ , com valores mínimo e máximo de 1,66 e 1,88, respectivamente. Esses dados indicam que as amostras estão adequadas para utilização nos experimentos por RT-qPCR.

**Tabela 2 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo experimental 0h.**

Amostras	Quantificação de RNA OD260 ( $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ )	Quantidade de RNA usado -
		1 $\mu\text{g}$
1	2,312	0,432525952
2	2,42	0,41322314
3	2,384	0,419463087
4	2,152	0,464684015
5	1,844	0,542299349
6	1,708	0,585480094

Fonte: Autora, 2014.

**Tabela 3 – Concentração e quantidade de RNAtotal usado, extraído de hipocampos esquerdos do grupo experimental 24h.**

Amostras	Quantificação de RNA OD260 ( $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ )	Quantidade de RNA usado -
		1 $\mu\text{g}$
1	2,376	0,420875421
2	1,416	0,706214689
3	2,024	0,494071146
4	1,984	0,504032258
5	1,216	0,822368421

6 1,456 0,686813187

Fonte: Autora, 2014.

**Tabela 4 – Concentração e quantidade de RNA total usado, extraído de hipocampus esquerdos do grupo controle (Crônico).**

<b>Amostras</b>	<b>Quantificação de RNA OD260 (<math>\mu\text{g} / \mu\text{L}</math>)</b>	<b>Quantidade de RNA usado - 1<math>\mu\text{g}</math></b>
1	1,744	0,573394495
2	1,888	0,529661017
3	2,216	0,451263538
4	2,336	0,428082192
5	1,392	0,718390805
6	1,6	0,625

**Tabela 5 – Concentração e quantidade de RNA total usado, extraído de hipocampus esquerdos do grupo controle (Naive).**

<b>Amostras</b>	<b>Quantificação de RNA OD260 (<math>\mu\text{g} / \mu\text{L}</math>)</b>	<b>Quantidade de RNA usado - 1<math>\mu\text{g}</math></b>
1	1,416	0,706214689
2	3,616	0,276548673
3	2,096	0,47709923
4	1,916	0,52192066
5	2,928	0,341530055
6	2,304	0,434027778

Fonte: Autora, 2014.

## 4.4 Experimentos de RT-qPCR

### 4.4.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração do RNA total, seguiu-se o tratamento das amostras com DNase. Aos volumes das amostras correspondentes a 3µg de RNA total, foram adicionados tampão de DNase 1x (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de *RNaseOUT*<sup>TM</sup> (Invitrogen). As reações foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado EDTA 5 mM e as reações foram incubadas a 75°C por 10 minutos. Posteriormente, todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

A transcrição reversa específica para cada miR ou snoRNA foi realizada através do sistema TaqMan MicroRNA Transcription e TaqMan MicroRNA Assay (ambos da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Figura 5). Foi utilizado 1µg do RNA total das amostras. Seguindo as instruções do fabricante, as reações foram realizadas em volume final de 15µL (0,15µL de dNTPs 100mM, com dTTP, 1µL de MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µL), 1,5µL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0,19µL de RNase Inhibitor (20U/µL) e 4,16µL de água livre de nuclease, além de 3µL de iniciador específico para cada miRNA e 5µL da amostra de RNA (solução de 1µg de RNA em 5µL de água). As reações foram incubadas da seguinte forma: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 5 minutos à 85°C. As amostras foram armazenadas a -80°C.

### 4.4.2 Reação de amplificação

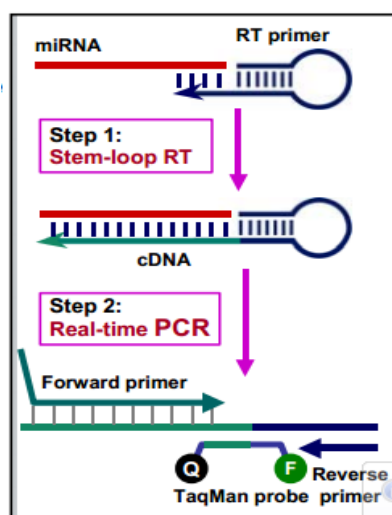
A obtenção dos perfis de expressão foi realizada através da metodologia RT-qPCR, utilizando o equipamento *StepOnePlus*<sup>TM</sup> *Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems).

As reações foram realizadas utilizando o TaqMan<sup>TM</sup> kit (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. As reações continham volume final de 10µL, contendo 5,0µL de Master Mix, 1,0µL de sonda (20X), 2,0µL de água Milli-Q e 2µL de cDNA. As condições de amplificação da reação foram: 50°C por 2 minutos para a atividade da UNG, 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, e 40 ciclos de 95°C por



15 segundos e 60°C por um minuto. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação – ciclo *threshold* ( $C_T$ ) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlus*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados em triplicatas (Desvio Padrão  $\leq 0,5$ ) com controles negativos (reações sem cDNA).

**Figura 5- Esquema do ensaio TaqMan**



Fonte: Applied, 2010.

**Tabela 6 - Genes, código do gene no miRbase/NCBI, código do ensaio na empresa Life Tech e sequência dos primers usados no estudo.**

Gene – RNA não codificador	miRbase ID/ NCBI ID	Código do ensaio - Life Tech	Sequência
<b>miRNAs investigados</b>			
miR-128a	rno-miR-128	2216	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
miR-376c	rno-miR-376c-3p	2450	AACAUAGAGGAAAUUUCACGU
miR-196-5p	rno-miR-196b-5p	2215	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG
miR-352	rno-miR-352	1339	AGAGUAGUAGGUUGCAUAGUA
miR-146a-5p	rno-miR-146a-5p	468	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-352	rno-miR-352	1339	AGAGUAGUAGGUUGCAUAGUA

miR-324-3p	rno-miR-324-3p	579	CCACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
miR-507	hsa-miR-507	1051	UUUUGCACCUUUUGGAGUGAA
miR-10a-5p	rno-miR-10a-5p	387	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
<b>Genes de referência</b>			
U6 snRNA	NCBI - NR_004394	1973	gtgctcgctt cggcagcaca taaactaaaa ttggaacgat acagagaagattagcatggc ccctgcgcaa ggatgacacg caaattcgtg aagcgttcca tatttt gccggttggtg gtggegcaaca ccggttaggat ttgctgaagg aggcagaggc aggaggatcacgagttcgag gccagcctgg gctacacatt t (variante 1 aaaaatgtgt agcccaggct ggcctcgaac tcgtgatcct cctgtctctgcctccttcagcaaatcctac cggcgtgctgc caccacaacc ggc tgagttatct caattgattg ttcacagtca gttacagatt gaactcctgt tctacactttcccccttct CACT agttgagtc acacgctggt cgatgaactc ctaagtgtag gtagtgtgct aaacgagcggcaag
4.5S RNA(1)	AY228147	1716	
4.5S RNA (5)	AY228151	1717	
Y1	U84683	1727	
snoRNA	U64702	1718	

Fonte: Autora, 2014.

#### 4.5 Análise da estabilidade de expressão dos genes utilizando os programas *NormFinder* e *geNorm*

Dada à ausência de estudos que indiquem genes de referência validados para a normalização da expressão de miRs em modelo de ELT, selecionou-se os genes U6, SnoRNA, Y1, 4.5(S)1 e 4.5(S)5 para avaliação da estabilidade de suas expressões ao longo da epileptogênese. Estes genes compõem o sistema TaqMan microRNA assay Control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) comercializado para normalização dos dados de expressão gênica de miRs.

As análises dos perfis de expressão desses genes foram realizadas com o auxílio dos programas *geNorm* (<http://medgen.ugent.br/~jvdesomp/genorm/>) e *NormFinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>).

#### 4.5.1 *geNorm*

O programa *geNorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) tem como funções ranquear os genes quanto a estabilidade de expressão e indicar o número mínimo de genes necessários para serem usados na normalização dos dados de expressão gênica. Para isso, os valores de  $C_T$  obtidos foram convertidos em quantidades relativas de expressão. E isto foi feito utilizando o método  $2^{-\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

O algoritmo matemático utilizado pelo *geNorm* parte do princípio que a razão das expressões de dois genes endógenos ideais são as mesmas em qualquer tecido e condição experimental, ou seja, a presença de um desvio na razão da expressão de dois genes endógenos em condições experimentais distintas reflete no fato de um, ou ambos os genes apresentarem variação na expressão (HIROTA *et al.*, 2010).

A partir deste princípio, para um conjunto de genes são feitas correlações ao pares. A média dos desvios padrão das razões de um determinado gene com todos os demais gera um índice de estabilidade denominado de valor  $M$ . O gene com menor valor  $M$  apresenta maior estabilidade (HIROTA *et al.*, 2010). Assim, quanto menor o valor de  $M$ , menor variabilidade de expressão e, portanto, mais estável é o gene. O programa *geNorm* recomenda que o valor de  $M$  seja menor que 1,5 para poder ser considerado com expressão estável (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

#### 4.5.2 *NormFinder*

Assim como no programa *geNorm*, a análise pelo programa *NormFinder* (ANDERSEN *et al.*, 2004) também requer que os valores de  $C_T$  sejam convertidos em quantidades relativas de expressão. E isto foi feito utilizando o método  $2^{-\Delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para o cálculo do valor de estabilidade dos genes, este programa, calcula as variações intra e intergrupo apresentada por cada gene (HEUSTON, LEMON

e ARCECI, 2011). Quanto menor a variação da expressão do gene dentre as amostras, menor é o seu índice de estabilidade e, logo, maior a estabilidade de expressão do gene.

#### **4.6 Análises da expressão relativa do miR-146a**

Para testar os dados gerados pelos programas *NormFinder* e *geNorm*, o perfil de expressão do miR-146a foi avaliado utilizando as melhores combinações de genes de referência investigados nesse estudo. A escolha do uso desse miR como marcador foi feita com bases em estudos que demonstraram uma modulação consistente na expressão desse gene nos modelos de pilocarpina e de cainato, bem como em pacientes epiléticos (ARONICA, 2012; IAN, 2013). As análises foram realizadas através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os experimentos foram realizados com 6 animais em cada grupo, em triplicatas (Desvio Padrão  $\leq 0,5$ ) e com controles negativos (sem cDNA).

#### **4.7 Análise de genes alvos dos miRs diferencialmente expressos**

Para identificação de genes alvos preditos para os miRs 196b e 352, seguiu-se uma análise utilizando as ferramentas de bioinformática *TargetScan* (<http://www.targetscan.org>) (LEWIS *et al.*, 2003; YOON e DE MICHELI, 2006; XIA *et al.*, 2009).

TargetScan realiza a predição de alvos para miRs baseada na complementaridade entre as sequências dos miRs e seus respectivos sítios alvos, com ênfase no perfeito pareamento de base entre a região 5' do miR (2-8 posições, também conhecida como 5'end ou seed region) e sequências 3'UTR conservadas de mRNAs (YOON e DE MICHELI, 2006).

#### **4.8 Análises estatísticas**

Os resultados das análises dos grupos experimentais e controle foram avaliados estatisticamente através de análise utilizando ANOVA e Kruskal-Wallis ou Bonferroni test e Test *t* (GraphPad Prism, versão 5.00).

## 5 RESULTADOS

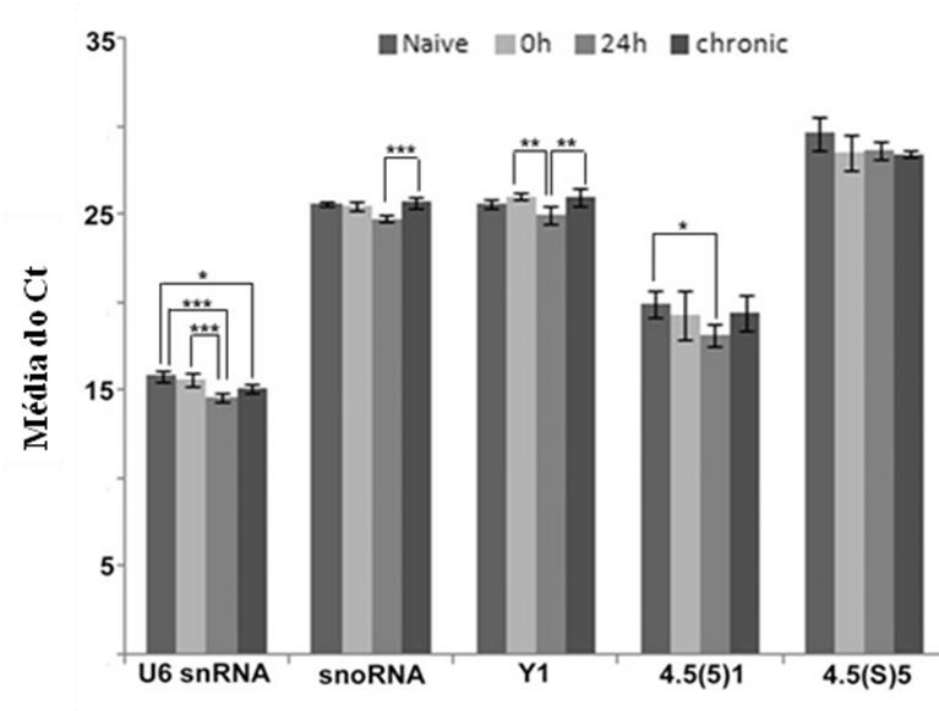
### 5.1 Identificação de genes de referência para análise de expressão de microRNAs em modelo de ELT induzido por injeção intraperitoneal de pilocarpina

Com o objetivo de identificar genes de referência para as análises de expressão de miRs em modelo de ELT, avaliamos os seguintes genes candidatos: SnoRNA (1718), U6SnRNA (1973), Y1 (1727), 4.5(S)1 (1716) e 4.5(S)5 (1717). Esta investigação foi realizada em 3 etapas sequenciais: a) análise dos níveis de expressão, b) análise da estabilidade de expressão e c) validação dos genes de referencia candidatos

#### A) Análise dos níveis de expressão:

Através da técnica RT-qPCR, avaliamos os níveis de expressão dos cinco potenciais genes de referência no hipocampo de ratos em diferentes fases do processo epileptogênico (0h, 24h e fase crônica) e dos animais controle (Naive). Na figura 6, estão expressas as médias dos Cts (*Cycle Threshold*) dos genes U6SnRNA, SnoRNA, Y1, 4.5(S)1 e 4.5(S)5 em cada condição experimental. Os valores de Cts apresentaram uma variação entre 14,58 (U6SnRNA) e 29,57 (4.5(S)5), sendo estes, portanto, os genes mais e menos expressos, respectivamente. Além disso, para cada um dos genes candidatos, observamos diferenças estatísticas significantes nas médias dos CTs entre os grupos experimentais, com exceção do gene 4.5(S)5, evidenciando a importância de normalização dos dados brutos – CTs - de expressão.

**Figura 6 – Níveis de expressão dos cinco RNAs não codificadores candidatos a genes de referencia para análise de RT-qPCR de microRNAs em hipocampos de ratos experimentais e controle**



Os valores estão expressos em forma de média dos CTs gerados a partir de ensaios de RT-qPCR, média+DP (n=6). ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

Fonte: Autora, 2014

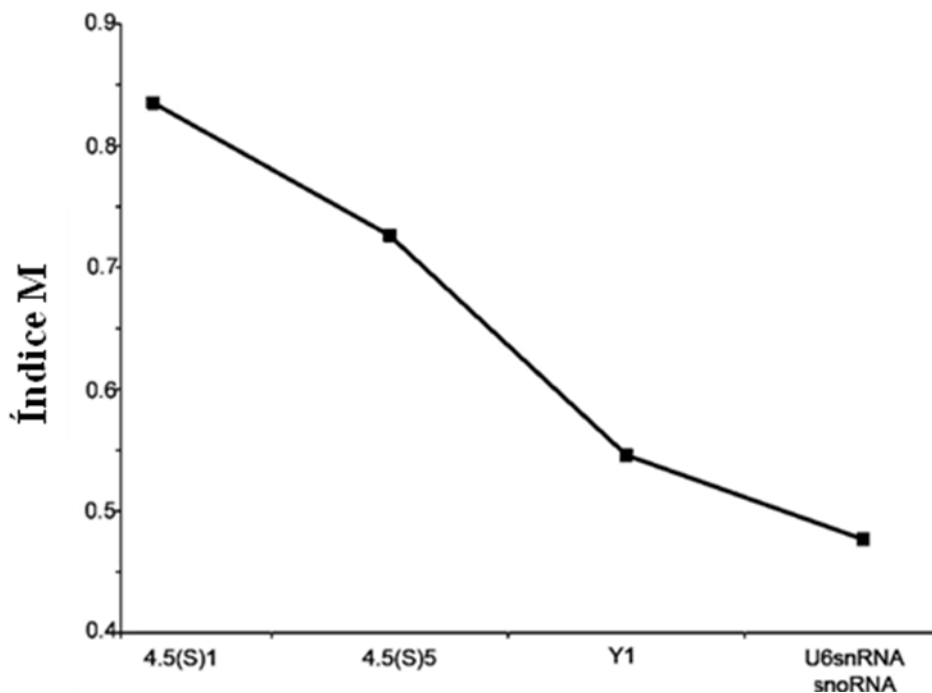
#### B) Análise da estabilidade de expressão:

Para determinar a estabilidade de expressão dos cinco genes candidatos, durante diferentes fases da epileptogênese, usou-se de maneira independente os programas *Genorm* e *Normfinder*.

## 5.2 Análise pelo programa *GeNorm*

A estabilidade de expressão dos genes selecionados foi inicialmente avaliada pelo programa *geNorm*. As médias de estabilidade de expressão (Índice M) dos cinco genes candidatos nas diferentes condições experimentais estão dispostas na figura 7. Partindo do gene mais estável para o menos estável, o ranqueamento foi o seguinte: snoRNA, U6SnRNA, Y1, 5.5(S)5 e 4.5(S)1, sendo snoRNA e U6SnRNA a combinação de dois genes com a maior estabilidade de expressão.

**Figura 7 - Seleção dos genes de referência mais estáveis para análises de RT-qPCR de microRNAs em modelo de pilocarpina sistêmica usando o programa *geNorm***



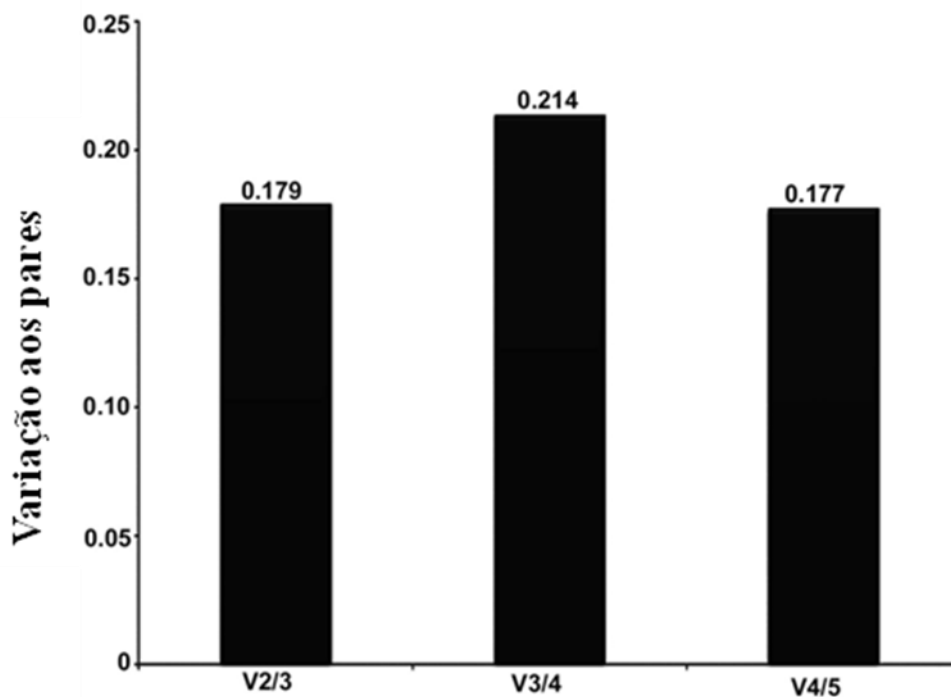
Estabilidade de expressão (M) para os cinco genes de referência analisados. O eixo-x da esquerda para a direita indica o ranking dos genes de acordo com a sua estabilidade de expressão, valores de M menores indicam maior estabilidade de expressão.

Fonte: Autora, 2014.

Através do *GeNorm*, investigamos também o número mínimo de genes necessários para uma normalização precisa de dados de expressão. Este cálculo define o número mínimo

de genes necessário para um fator de normalização robusto através do algoritmo  $V_n/n+1$ , onde  $v$  é a variação entre dois conjuntos de genes normalizadores e  $n$  a quantidade de genes normalizadores (figura 8). O programa estabelece um ponto de corte de 0.15, abaixo desse valor a inserção de um gene de referência é desnecessária (VANDESOMPELE et al., 2002). Neste trabalho, observa-se que o V2/3 foi 0.179, valor próximo a estimativa de corte, indicando que o uso de dois dos melhores genes de referência (SnoRNA e U6SnRNA) seria suficiente no processo de normalização.

**Figura 8 – Determinação da melhor combinação de genes de referência para a normalização dos dados de RT-qPCR para análise de microRNAs no modelo de Pilocarpina sistêmica**



O programa calcula o fator de normalização de pelo menos dois genes em que a variável  $V$  define a variação de pares entre os dois fatores de normalização sequenciais.

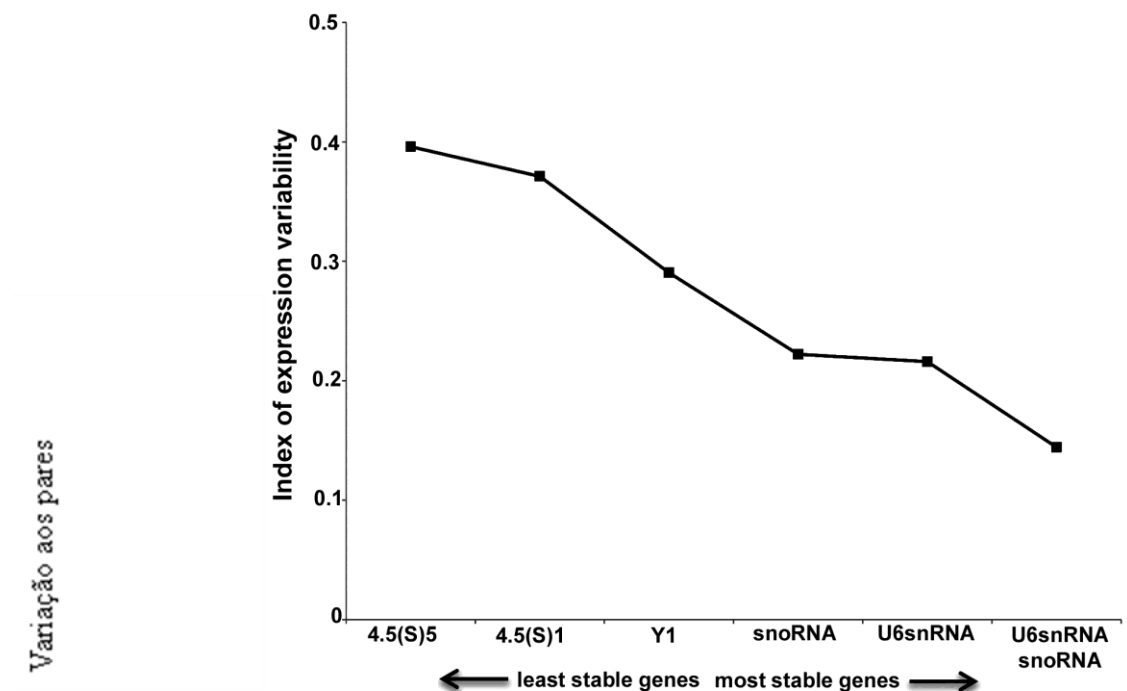
Fonte: Autora, 2014



### 5.3 Análise pelo programa *Normfinder*

Os valores de estabilidade para cada um dos genes candidatos foram também calculados pelo programa *Normfinder*, que utiliza uma abordagem baseada na variação da expressão gênica inter e intra grupo da amostra. Os resultados são mostrados na figura 9. O ranqueamento quanto estabilidade de expressão foi U6snRNA, snoRNA, Y1, 4,5 (S)1 e 1 e 4,5 (S)5, apresentando índice de estabilidade entre 0,216 (menor) e 0,396 (maior). A melhor combinação de genes de referência indicada também foi SnoRNA e U6snRNA. Esses conjuntos de dados são similares aos obtidos com o programa *geNorm*, apresentando apenas pequenas diferenças na ordem de classificação das variantes do gene 4.5(S).

**Figura 9- Seleção dos genes de referência mais estáveis para análises de RT-qPCR de microRNAs em modelo de pilocarpina sistêmica utilizando o programa *NormFinder***



Ranking of candidate reference genes based on stability values calculated by NormFinder software

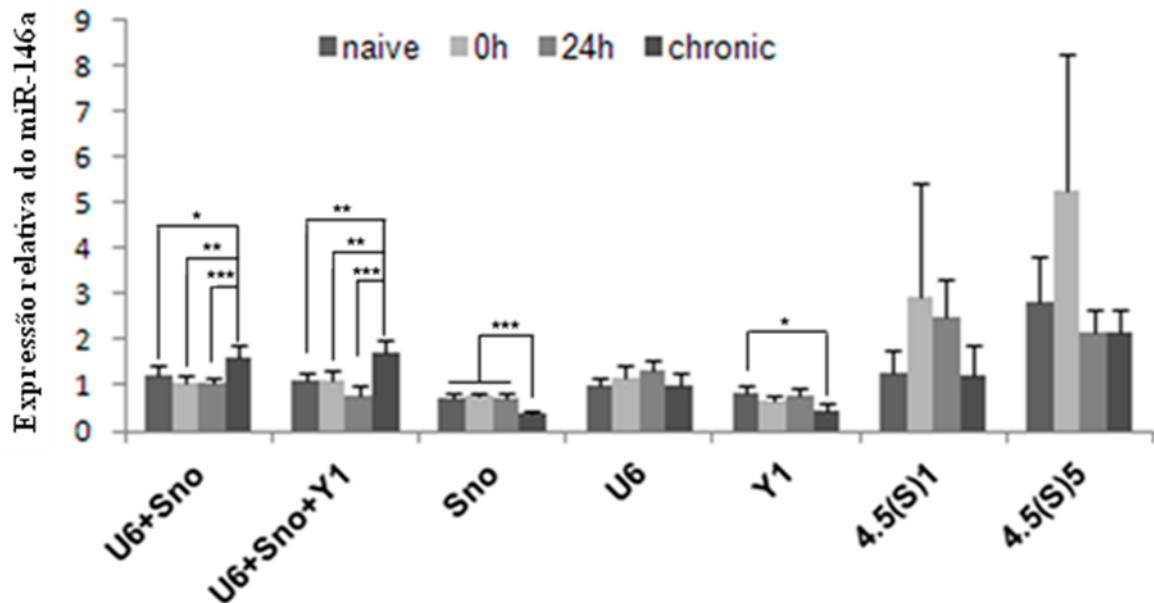
Fonte: Autora, 2014.

### 5.4 Validação dos genes de referência

Para a validação dos dados gerados pelos programas, selecionamos o gene miR-146a, cujo padrão de expressão é conhecido nas diferentes fases da epileptogênese em hipocampus de ratos (Figura 10). Nesta etapa, avaliou-se o impacto na expressão relativa de mir-146, decorrente de diferentes estratégias de normalização. Para isto, realizou-se, separadamente, normalização baseada na melhor combinação de dois (SnoRNA e U6SnRNA) e 3 (SnoRNA, U6SnRNA e Y1) genes indicados pelos programas *geNorm* e *Normfinder*, bem como nos cinco genes candidatos individualmente.

Observou-se que ao utilizar a melhor combinação de dois genes para normalização, os níveis de transcritos do miR-146a apresentaram um aumento significativo na fase crônica quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), grupo 0h ( $p < 0.005$ ) e grupo 24h ( $p < 0,001$ ). Quando a normalização foi realizada com a melhor combinação de três genes endógenos, também observou-se um aumento significativo nos níveis de miR-146 no grupo crônico em relação aos demais grupos experimentais e controle. Esses dados são consistentes com os relatados na literatura para diferentes modelos de epilepsia. Em contrapartida, quando a normalização foi conduzida com os genes de referência separadamente, não foi possível detectar o aumento dos níveis de transcritos do miR-146a de ratos na fase crônica. Além do mais, a normalização com o gene SnoRNA, resultou em diminuição significativa dos níveis de miR-146 na fase crônica, indicando uma inconsistência, provavelmente decorrente de uma normalização não adequada.

**Figura 10- Expressão relativa do miR-146a no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente**



Dados RT-qPCR foram normalizados pela melhor combinação de genes de referência obtidos a partir das análises do GeNorm e NormFinder bem como individualmente. (média  $\pm$  DP, n = 6). O diagrama mostra os níveis médios de transcritos do miR-146a em animais Naive, durante a epileptogênese (0h e 24 h) e período crônico. ANOVA, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

Fonte: Autora, 2014.

## 5.5 Avaliação da Expressão relativa dos miRNAs 10a-5p, 128<sup>a</sup>, 196b, 324-3p, 352, 376c e 507

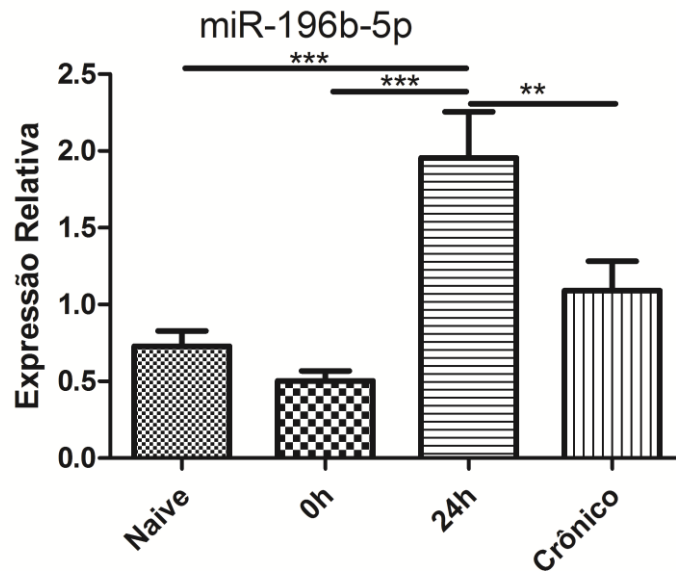
Em trabalho anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando-se a metodologia de hibridação em *microarray*, identificamos 77 miRs expressos diferencialmente no hipocampo de animais na fase aguda (24h pós SE) da epileptogênese induzida por pilocarpina. Com o objetivo de iniciar o processo de validação desses dados, selecionamos 7

miRs (miR-10a-5p, miR-128a, miR-196b-5p, miR-324-3p, miR-352, miR-376 e miR-507) para análises individuais da expressão relativa. Como critério de seleção, utilizamos os miRs cujo padrão de expressão nas hibridação em *microarray* era consistente nas diferentes amostras do mesmo grupo e que apresentaram as maiores diferenças de expressão entre grupo experimental e controle. As análises da expressão relativa desses miRs foram realizadas através de RT-qPCR, utilizando como normalizadores, a melhor combinação de dois e três genes de referência apontados em nosso estudo. Essa avaliação foi realizada em hipocampo de animais submetidos a SE através da injeção de pilocapirna e no hipocampo de animais Naives. Foram analisadas diferentes momentos da fase aguda da epileptogênese (0h e 24h após SE) e fase crônica.

Na figura 11, temos a expressão relativa do miR-196b. Observa-se que os níveis desses transcritos estão significativamente aumentados 24 h pós SE quando comparados com os animais Naive ( $p < 0,05$ ), grupo 0h ( $p < 0,05$ ) e grupo crônico ( $p < 0,05$ ). A figura 12 expõe a expressão relativa do miR-352. Observamos níveis significativamente aumentados na fase crônica da epileptogênese quando comparados com o grupo naive e 0h ( $p < 0,05$ ). Quando realizado uma análise comparativa entre os grupos 24h e naive (grupos utilizados nos experimentos de *microarray*) através do Test-t, observou-se um aumento significativo na fase aguda da epileptogênese (24h) (figura 13). Estes dados validam, portanto, a informação obtida a partir dos dados de *microarray*

Nas figuras 14 à 18, temos os resultados da expressão relativa dos miR-10a, miR-128a, miR-324-3p, miR-376, miR-507, respectivamente, durante a fase aguda da epileptogênese e período crônico do processo epileptogênico. Podemos observar que os níveis dos transcritos não foram significativamente diferentes entre os grupos analisados, indicando que esses miRs não sofrem modulação na expressão durante o processo epileptogênico. Os dados para esses genes, portanto, não confirmaram os resultados obtidas na hibridação em *microarray*.

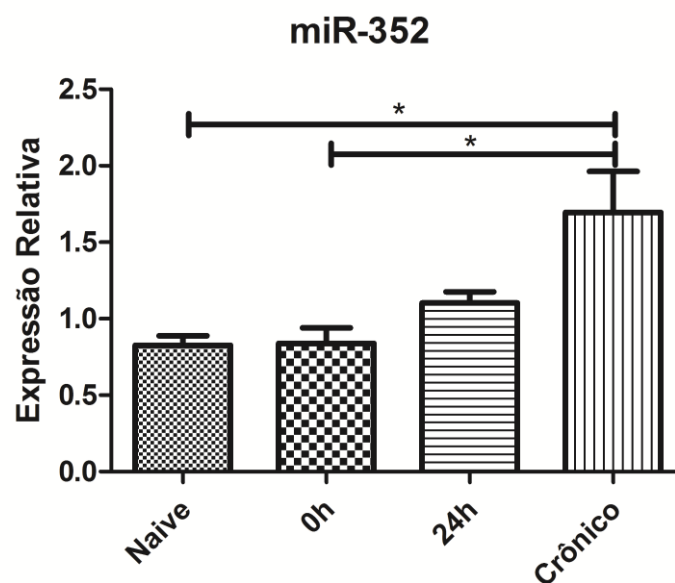
**Figura 11 – Expressão relativa do miR-196b no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (Naive)**



Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR-196b nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

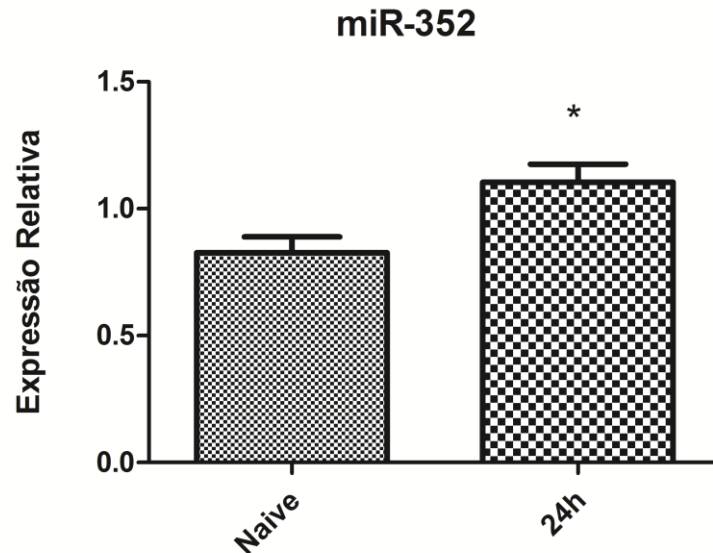
Fonte:Autora, 2014

**Figura 12 – Expressão relativa do miR-352 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (Naive)**

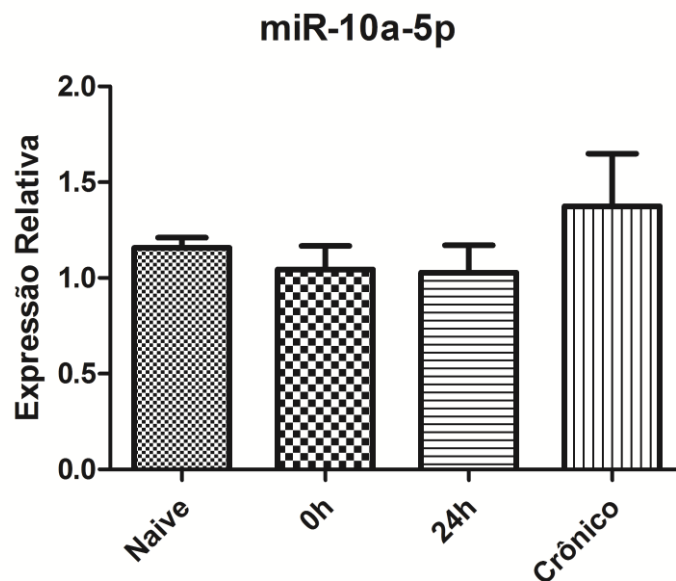


Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR- 352 nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Figura 13 – Expressão relativa do miR-352 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (Naive)**

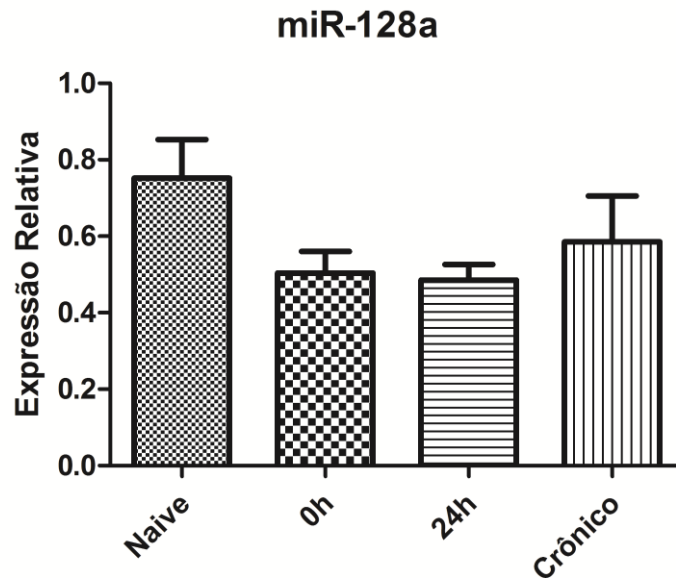


Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR- 352 nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. Teste-t, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

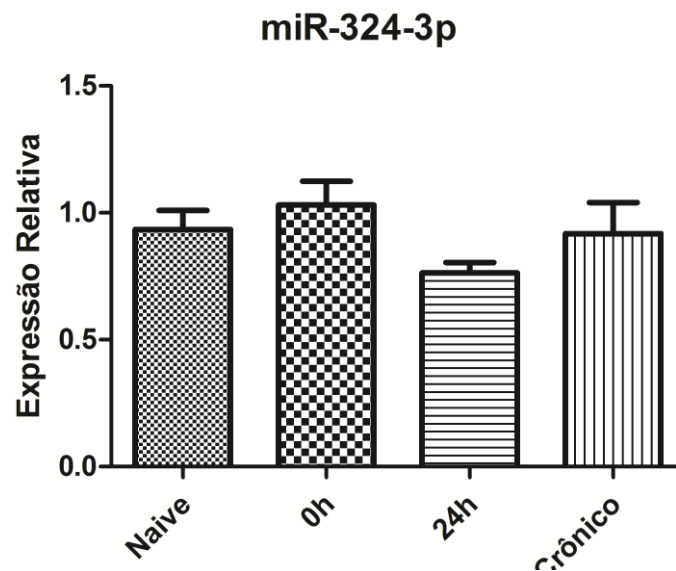


Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR- 10<sup>a</sup>-5p nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Figura 15 – Expressão relativa do miR-128 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (Naive)**

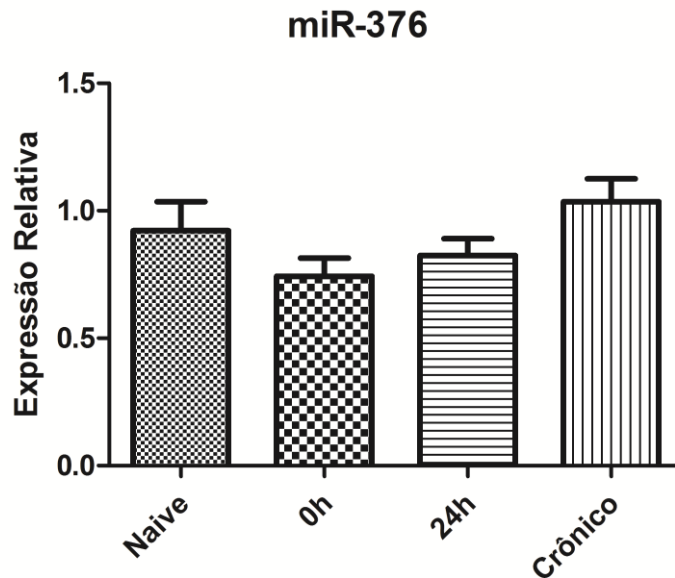


Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR- 128a nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

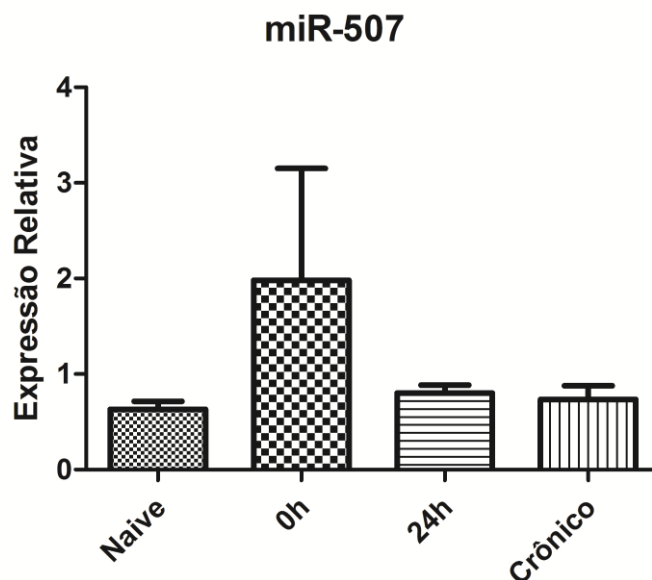


Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análise do genorm e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR- 10<sup>a</sup>-5p nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Figura 17 – Expressão relativa do miR-376 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (naive)**



**Figura 18 – Expressão relativa do miR-507 no hipocampo de ratos injetados com pilocarpina intraperitonealmente e controle (naive)**



Os dados de RT-qPCR foram normalizados com a melhor combinação de dois genes de referência (U6snRNA e SnoRNA) advindos das análises do genoma e normfinder (média ± DP, n=6). O gráfico expõe os níveis médios dos transcritos do miR-507 nos animais Naives, durante a epileptogênese (0h e 24h) e período crônico. ANOVA, \*P< 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



## 5.6 Predição de genes-alvo de microRNAs diferencialmente expressos em hipocampus de ratos epilépticos

A identificação de genes-alvo preditos auxilia na compreensão das funções biológicas de miRNAs diferencialmente expressos, uma vez que dentre os inúmeros miRs existentes, poucos possuem suas descrições na literatura. Desse modo, realizou-se uma busca por genes alvos preditos para mir 196 e mir 352, utilizando-se a ferramenta TargetScan. Em relação ao mir 196b, observou-se 39 genes alvos preditos (tabela 7), envolvidos em diferentes processos biológicos. Destes 2 já foram descritos como associados à epilepsia/crises. Em relação ao miR-352, encontrou-se 42 genes alvos preditos. Destes, 3 já foram descritos como associados à epilepsia (tabela 8).

**Tabela 7 – Análise *in silico* dos Genes alvos preditos para o miR-196b**

<b>ID - NCBI</b>	<b>Ortólogo humano do gene alvo</b>	<b>Simbolo</b>
NM_152739	homeobox A9	HOXA9
NM_001166058	relaxin/insulin-like family peptide receptor 2	RXFP2
NM_001170765	ligand dependent nuclear receptor corepressor	LCOR
NM_000108	dihydrolipoamide dehydrogenase	DLD
NM_001126054	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	CASK
NM_018332	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19 <sup>a</sup>	DDX19A
NM_001014449	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19B	DDX19B
NM_001199775	carboxypeptidase D	CPD
NM_001143970	chromodomain protein, Y-like	CDYL
NM_000115	endothelin receptor type B	EDNRB
NM_001082969	chromosome 11 open reading frame 57	C11orf57
NM_001127897	RPGRIP1-like	RPGRIP1L
NM_001202464	zinc finger, MYND-type containing 11	ZMYND11

NM_012388	pallidin homolog (mouse)	PLDN
NM_005184	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	CALM3
NM_001080 430	TOX high mobility group box family member 3	TOX3
NM_018566	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (S. cerevisiae)	YOD1
NM_014282	hyaluronan binding protein 4	HABP4
NM_005921	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP3K1
NM_001789	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	CDC25A
NM_002524	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	NRAS
NM_001197 026	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 8	PLEKHA8
NM_021110	collagen, type XIV, alpha 1	COL14A1
NM_025014	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15	ARHGEF15
NM_001142 861	SMAD family member 6	SMAD6
NM_004359	cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)	CDC34
NM_001004 317	lin-28 homolog B (C. elegans)	LIN28B
NM_022133	sorting nexin 16	SNX16
NM_015103	plexin D1	PLXND1
NM_003074	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	SMARCC1
NM_153686	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	LCORL
NM_032833	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15B	PPP1R15B
NM_012294	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	RAPGEF5
NM_001191 060	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	SLC25A22
NM_020850	RAN binding protein 10	RANBP10
NM_006788	ralA binding protein 1	<b>RALBP1</b>
NM_001163 278	odz, odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)	ODZ1
NM_016120	ring finger protein, LIM domain interacting	RLIM
NM_014643	zinc finger protein 516	ZNF516

**Tabela 8 – Análise *in silico* dos Genes alvos preditos para o miR-352**

<b>ID-NCBI</b>	<b>Ortólogo humano do gene alvo</b>	<b>Símbolo</b>
NM_144508	cancer susceptibility candidate 5	CASC5
NM_032217	ankyrin repeat domain 17	ANKRD17
NM_004263	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	SEMA4F
NM_000876	insulin-like growth factor 2 receptor	<b>IGF2R</b>
NM_031413	cat eye syndrome chromosome region, candidate 2	CECR2
NM_002880	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1
NM_004458	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	ACSL4
NM_001100409	SUMO1/sentrin specific peptidase 6	SEN6
NM_004209	synaptogyrin 3	SYNGR3
NM_000944	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme	PPP3CA
NM_001716	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	CXCR5
NM_015187	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)	SEL1L3
NM_015159	family with sequence similarity 168, member A	FAM168A
NM_021140	lysine (K)-specific demethylase 6A	KDM6A
NM_001168683	taxilin gamma	TXLNG
NM_001131008	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12
NM_007125	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked	UTY
NM_001621	aryl hydrocarbon receptor	<b>AHR</b>
NM_003483	high mobility group AT-hook 2	HMGA2
NM_016644	proline rich 16	PRR16
NM_014112	trichorhinophalangeal syndrome I	TRPS1
NM_001100398	RAP1 GTPase activating protein 2	RAP1GAP2
NM_001010942	RAP1B, member of RAS oncogene family	RAP1B
NM_021183	RAP2C, member of RAS oncogene family	RAP2C
NM_021202	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	TP53INP2
NM_024513	FYVE and coiled-coil domain containing 1	FYCO1
NM_025191	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	EDEM3

NM_033121	ankyrin repeat domain 13 <sup>a</sup>	ANKRD13 A
NM_001037 553	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	AGPAT3
NM_022039	F-box and WD repeat domain containing 4	FBXW4
NM_002214	integrin, beta 8	ITGB8
NM_030755	thioredoxin-related transmembrane protein 1	TMX1
NM_000381	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	MID1
NM_001114 600	chromosome 1 open reading frame 144	C1orf144
NM_001178 084	zinc finger protein, X-linked	ZFX
NM_001145 275	zinc finger protein, Y-linked	ZFY
NM_005955	metal-regulatory transcription factor 1	MTF1
NM_001884	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	<b>HAPLN1</b>
NM_001136 004	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3	MICAL3
NM_000831	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3	GRIK3
NM_001310	cAMP responsive element binding protein-like 2	CREBL2
NM_002943	RAR-related orphan receptor A	RORA
NM_020726	neurolysin (metallopeptidase M3 family)	NLN

Fonte: Aurora, 2014.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica diferencial de miRNAs em modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina

Em análises de expressão gênica diferencial, a etapa de normalização é indispensável por minimizar a interferência de erros metodológicos na interpretação dos dados. A não utilização de normalizadores apropriados podem levar a resultados duvidosos e conclusões equivocadas. Embora tal pressuposto seja de conhecimento universal, os estudos envolvendo análise da expressão de miRNAs em epilepsia tem utilizado normalizadores baseados em genes de referencia sem validação prévia da sua eficiência.

Um bom gene de referencia para normalização dos dados de expressão de miRNA deve apresentar uma expressão estável em diferentes condições experimentais (BUSTIN, 2000; SUZUKI, HIGGINS e CRAWFORD, 2000). Além do mais, eles devem compartilhar propriedades semelhantes com os miRNAs, tais como o tamanho e a estabilidade da molécula de RNA. Algumas classes de pequenos RNAs não-codificantes, tais como snRNA, são frequentemente expressas de forma abundante e estável, tornando-os bons genes candidatos a normalizadores (Wong *et al*, 2003). Assim, neste trabalho, selecionamos cinco genes não codificadores (SnoRNA, U6SnRNA, Y1, 4.5(S)1 e 4.5(S)5) para avaliar o potencial uso como genes de referência nas análises de expressão de miRs em modelo de ELT.

Inicialmente, avaliamos, a estabilidade de expressão em diferentes fases da epileptogênese (0h, 24h e crônica) através dos softwares GeNorm e Normfinder. Observou-se que snoRNA, U6SnRNA e Y1 foram os genes com expressão mais estável no hipocampo de animais experimentais e controle. Dependendo do software usado (geNorm ou Normfinder), o ranqueamento desses genes sofria uma discreta alteração. Essas diferenças no ranqueamento devem ser devido ao uso de diferentes algoritmos matemático usados pelos programas (ANDERSEN, JENSEN e ØRNTTOFT, 2004; VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Os dois programas também foram concordantes na indicação dos genes mais instáveis (4.5(S)1 e 4.5(S)5).

O cálculo do número mínimo de genes de referência necessário para uma normalização precisa mostrou um valor  $V2 / 3$  de 0,179 que é próximo ao ponto de corte utilizado pelo programa Genorm. Isto indica que o fator de normalização deve conter pelo

menos dois dos melhores genes de referência (snoRNA e U6SnRNA) indicado pelo programa.

Com o objetivo de avaliar o significado funcional dos resultados obtidos para os genes de referência, foi conduzida uma análise da expressão relativa do gene miR- 146<sup>a</sup>, utilizando diferentes estratégias de normalização. O miR-146a pode ser induzido por diferentes estímulos pró-inflamatórios e foi demonstrado que apresenta níveis aumentados em modelos experimentais de epilepsia, bem como na ELT. De fato, em modelos de pilocarpina e de estimulação elétrica, uma expressão aumentada do miRNA-146a foi evidente três semanas após SE e persistiu na fase crônica (ARONICA *et al.*, OMRAN *et al.*, RISBUD e PORTER, 2013). Em pacientes epiléticos, com esclerose hipocampal, a expressão aumentada do miR-146a nos astrócitos foi observada, principalmente nas regiões onde a perda da célula neuronal e gliose reativa ocorreram (ARONICA *et al.*, 2011). Similarmente, Lyer *et al.*, (2013) mostraram superexpressão do miR-146a em lesões glioneuronais associada à epilepsia (IYER *et al.*, 2012).

Neste trabalho, quando normalizados utilizando a melhor combinação de dois ou três genes de referência, observou-se que os níveis de miR- 146a foram significativamente aumentados na fase crônica. Curiosamente, em nossas condições experimentais, a normalização baseada em apenas um gene de referência gerou dados diferentes daqueles obtidos com as melhores combinações de genes e, provavelmente, imprecisos. Isto sugere, portanto, que uma estratégia de normalização apropriada para a expressão de miRNAs durante a epileptogênese requer o uso de dois ou mais genes de referência. Em concordância com o nosso estudo, Torres e colaboradores (2013) observaram que a combinação de três pequenos RNAs como normalizadores é o recomendado para análise de expressão diferencial de miRNAs para câncer de endométrio (TORRES *et al.*, 2013). Alguns autores também observaram em outras patologias que o fator de normalização para a análise da expressão de miRNA deve conter, preferencialmente, dois ou três dos melhores genes de referência candidatos (LIN E LAI, 2013). No entanto, isso não pode ser inferido como verdadeiro para outras condições experimentais.

Interessantemente, em estudo anterior nas mesmas condições experimentais, observamos que a normalização da expressão de genes codificadores de proteínas poderia ser feita apropriadamente utilizando apenas um único gene de referência (MARQUES *et al* 2013). Estas diferenças podem ser explicadas porque a manipulação de miRNAs exige

métodos para o processamento da amostra, desde a extração do RNA a ensaios de RT-qPCR, diferentes dos que são utilizados na manipulação de mRNA. Por exemplo, para a detecção específica de miRs maduros usando ensaios MicroRNA TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA), a etapa da síntese de cDNA é efetuada separadamente para cada gene, o que pode resultar em variações metodológicas. De fato, quando avaliamos os valores de Ct brutos, observou-se para todos os genes candidatos, diferenças significativas entre os grupos experimentais, com uma exceção para 4,5 (S)5.

Por outro lado, é importante considerar que dois estudos independentes utilizando RT-qPCR, mostraram uma superexpressão do miR-146a no hipocampo de ratos e pacientes com epilepsia, mesmo utilizando um método de normalização baseada em somente um gene de referência, o RNU6B (ARONICA *et al.*, 2010; OMRAM *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que uma estratégia de normalização para um modelo pode não ser apropriado em condições experimentais diferentes para a mesma patologia.

## 6.2 Análise do perfil de expressão dos miRNAs

Com o objetivo de identificar miRs associados a epileptogênese, nosso grupo realizou uma análise através de hibridação em microarray, onde observou-se que 77 miRs apresentaram expressão diferencial na fase aguda da epileptogênese (24h após SE) quando comparados com o grupo controle. Para iniciar o processo de validação desses dados, selecionamos 7 miRNAs (miR-10a-5p, miR-128a, miR-196b-5p, miR-324-3p, miR-352, miR-376 e miR-507) para análises individuais da expressão através de RT-qPCR. Observou-se que os miRs 196b e 352 apresentaram a expressão modulada durante a epileptogênese, enquanto que os miRs 10a-5p, 128a, 324-3p, 352, 376 e 507 apresentaram expressão inalteradas nas diferentes fases do processo epileptogênico.

De fato, em relação ao miR-196b, observamos níveis significativamente elevados na fase aguda da epileptogênese (24h após SE) quando comparados com os grupos Naive, 0h e crônico.

O gene Mir-196b localiza-se na região intergênica do agrupamento de genes da família Hox e é evolutivamente conservado entre os vertebrados. Embora sua função ainda não tenha sido caracterizada, há evidências de que esteja envolvido na regulação da expressão de genes do desenvolvimento. De fato, Yekta e colaboradores (2004) observaram que o mir-196 está

envolvido na regulação postranscricional de genes da família Hox. Eles observaram em embriões de camundongos fragmentos de RNA de Hoxb8, cuja clivagem foi direcionada pelo miR-196. Os mesmos autores também observaram em experimentos de cultura de células a diminuição da expressão de genes da família Hox mediada pelo miR-196 (YEKTA, SHIH e BARTEL, 2004).

Os genes Hox pertencem a uma grande família que codificam fatores de transcrição envolvidos na determinação da estrutura básica de um organismo durante o desenvolvimento, atuando na proliferação e sobrevivência celular, reparo do DNA e apoptose (KELLY et al., 2011). Uma vez que a função do miR está intimamente correlacionada aos genes alvo, é possível que o miR-196 esteja envolvido na modulação desses processos. De fato, o miR-196b tem sido considerado um oncogene, uma vez que é expresso em níveis mais elevados em linhagens celulares de tumores cerebrais (GAUR *et al.*, 2007; SZAFRANSKA *et al.*, 2007). Esses achados sugerem que aumento dos níveis de transcritos do miR-196 pode contribuir para a progressão tumoral.

O significado biológico da indução do miR-196 na fase aguda da epileptogênese em resposta ao SE precisa ser investigado. Mas, interessante, duas das características neuropatológicas que ocorrem na fase aguda da epileptogênese são neurogênese e recrutamento anormal de neurônios no hipocampo dos animais submetidos a SE (FERNANDES, 2013). Assim, é possível que o miR-196 esteja envolvido na regulação desses processos durante a epileptogênese. De fato, You e colaboradores (2012) observaram, através de hibridação em microarray, que os níveis de miR196 estão aumentados em gliomas de pacientes com crises epiléticas quando comparados com gliomas de pacientes não epiléticos (YOU *et al.*, 2012). Este dado é sugestivo de que o miR-196 é superexpresso no processo epileptogênico. Nossos dados obtidos em modelo experimental, portanto, corrobora esta hipótese.

Por outro lado, é interessante notar que na análise dos genes alvos preditos para miR-196, encontramos 2 (RALBP1, ZMYND11) como já associados, direta ou indiretamente à epilepsia. Desses, RALBP1 apresentou sua expressão diminuída no hipocampo de camundongos. De fato, Bae e colaboradores (2013) observaram que camundongos injetados intraperitonealmente com PTZ apresentaram uma diminuição na expressão do gene RALBP1 e a consequente diminuição do limiar de suscetibilidade a crises, através da diminuição da transmissão sináptica inibitória nos neurônios piramidais de CA1. O gene RALBP está



envolvido com processos apoptóticos e proliferativos (BAE *et al.*, 2013). Portanto o miR-196 poderia agir regulando negativamente o mesmo.

DeScipio (2012) a partir de mapeamento cromossômico, observou que o gene ZMYND11 foi um dos que mais se apresentaram deletados submicroscopicamente num grupo de 19 pacientes que compartilhavam entre si características clínicas comuns, interessante, todas elas eram relacionadas a deficiências no sistema nervoso, incluindo anomalias cerebrais, atraso motor, déficit na fala e desenvolvimento e crises epilépticas (DESCIPIO *et al.*, 2012). Embora, não há relatos do perfil de expressão deste gene na epileptogênese. É possível que ele sofra uma modulação negativa durante o processo epileptogênico. A indução da expressão de mir-196, aqui observada, poderia reforçar esta hipótese.

Acerca do miR-352, os níveis de expressão se apresentaram aumentados na fase crônica da epileptogênese quando comparados com os grupos 0h e Naive, e no grupo 24h em relação aos animais Naive. A função do miR-352 também é desconhecida. Coincidentemente, o único trabalho disponível na literatura envolvendo este miR é baseado numa análise de expressão em larga escala no modelo de crises induzidas a partir de estimulação elétrica da amígdala. Diferente dos nossos dados, os autores observaram uma diminuição dos níveis do miR-352 no giro denteado, 30 dias após indução de crises (BOT, DEBSKI e LUKASIUK, 2013). Essa diferença pode ser explicada através de especificações do delineamento experimental empregados. De fato, os autores avaliaram em modelo e tecido diferentes, em contraste ao delineamento aqui realizado, modelo de pilocarpina e análise de todo o tecido hipocampal. Pode-se considerar que essas mudanças na expressão dos miRNAs observadas em diferentes áreas do cérebro, tanto em humanos quanto em modelos animais, são cruciais para a compreensão da fisiopatologia da doença, além de constituir alvos candidatos interessantes para terapia.

Buscando identificar genes alvos para o miR-352, utilizando a plataforma targetScan, encontramos alguns genes preditos que estão associados aos processos biológicos comuns na epileptogênese, bem como os que se expressam em tecidos nervosos na condição normal. Os genes SEMA4F que está envolvido com desenvolvimento do sistema nervoso central, e com a quimiotaxia axonal; SYNGR3 (Sinaptogirina 3) uma proteína de vesícula sináptica que interage principalmente com transportadores de dopamina; PTPN12, RAP1B e

RAP2C que estão envolvidos com proliferação celular, diferenciação e apoptose; e por fim, o GRIK3, receptor do neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro dos mamíferos, o glutamato.

De fato, dentre os genes preditos como alvos do miR-352, três deles foram associados ao processo epileptogênico (IGF2R, AHR e HAPLN1). O gene IGF2R tem seus níveis diminuídos em hipocampus (CA1 e células piramidais) de ratos adultos após 12h da administração de ácido caínico, sugerindo o possível envolvimento do fator de crescimento na cascata de eventos neurotróficos associados à reorganização da formação hipocampal, comum após as crises induzidas por cainato (JACOBS *et al.*, 2009). AHR, gene que influencia na suscetibilidade a crises audiogênicas em camundongos (DIROCCO *et al.*, 1998). E por fim o HAPLN1, gene cuja expressão está diminuída em torno das células hipocampais, deixando interneurônios suscetíveis ao aumento da organização sináptica. Nossos dados estão em concordância com esses relatos, uma vez que a superexpressão do mir-352 aqui observada, esteja envolvida com a modulação negativa dos genes IGF2R, AHR e HAPLN1.

Ensaio funcionais correlacionados com avaliação da expressão de genes alvos, durante a epileptogênese poderá contribuir para entendermos o papel do mir-196 e mir-352, respectivamente, na fase aguda da epileptogênese e período crônico. De fato, para um melhor entendimento das funções dos miRs é necessário validar as informações dos genes alvos preditos para o modelo em questão.

Os miRs 10a-5p, 128a, 324-3p, 376c e 507 não apresentaram os níveis de transcritos significativamente diferentes entre os grupos analisados neste trabalho, sugerindo que os mesmos não estão associados a alterações moleculares presentes no processo epileptogênico.

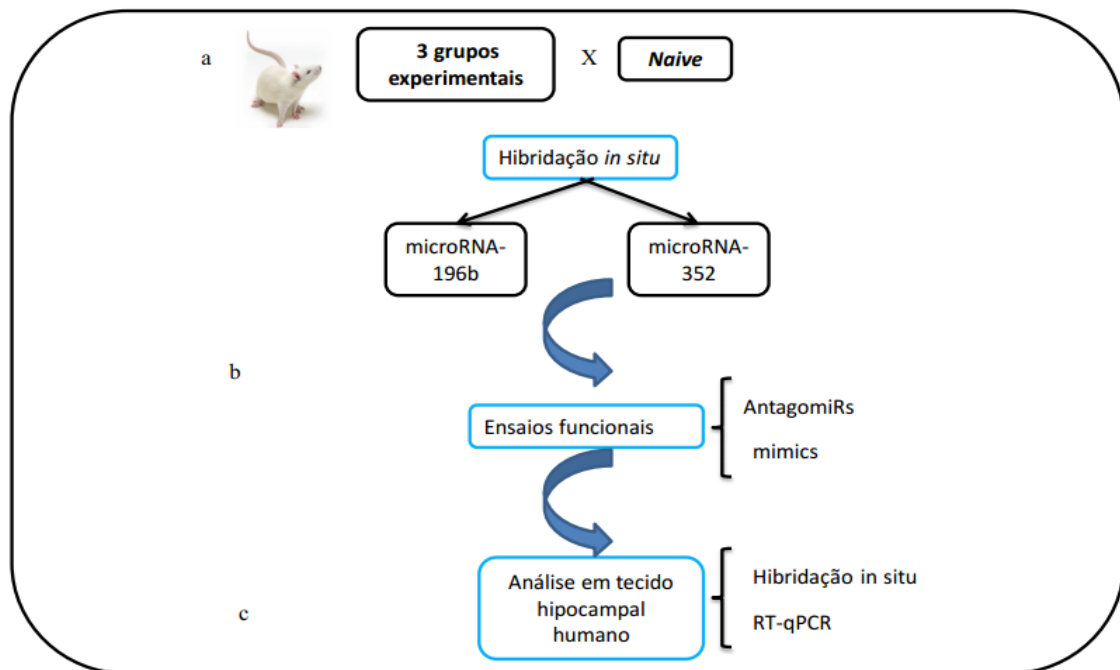
De qualquer forma, serão necessários estudos adicionais, envolvendo diferentes modelos experimentais para avaliar se esses miRs participam do processo epileptogênico de fato, já que os dados de hibridação em microarray não foram validados. A literatura assevera a necessidade de validação de dados oriundos de análises em larga escala, dada a grande ocorrência de dados falso-positivos nesse tipo de análise (GUINDALINI e TUFIK, 2007).

Experimentos *in vivo* para determinar o papel exato dos miRs que se apresentaram diferencialmente expressos neste trabalho podem contribuir para um melhor entendimento do processo epileptogênico bem como levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a conseqüente melhora na qualidade da vida dos pacientes.

## Perspectivas

Diante do exposto, é proposta do nosso grupo de pesquisa continuar as análises obtidas a partir dos dados obtidos desta dissertação. Inicialmente, continuaremos o processo de validação da expressão diferencial dos miRs modulados durante a epileptogênese por outra metodologia, *hibridação in situ*. Posteriormente, para compreender o significado funcional da expressão diferencial desses miRs, modularemos seus níveis em ratos experimentais e controles através da injeção intrahipocampal de antagomiRs e mimic, oligonucleotídeos que antagonizam e mimetizam, respectivamente, os miRNAs na célula (Figura 19). Por fim, avaliaremos, também, a expressão dos dois miRs em tecido hipocampal humano advindos de ressecção cirúrgica do banco de tecidos do Hospital das clínicas de Ribeirão Preto.

**Figura 19 – Perspectivas**



## 7. CONCLUSÕES

Através deste estudo, concluímos que:

- SnoRNA e U6SnRNA permitem uma normalização eficiente de expressão gênica de micRs durante a epileptogênese no modelo de ELT induzido por pilocarpina.
- O miR-196b sofre modulação em sua expressão na fase aguda da epileptogênese (24h).
- O miR-352 sofre modulação em sua expressão na fase aguda da epileptogênese (24h) e fase crônica.
- Não foi confirmado o dado de expressão diferencial obtido a partir de hibridação em microarray dos miRs. 10a, 128a, 324-3p, 352, 376c e 507.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. e ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

ARONICA, E. *et al.* Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. **The European journal of neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 1100–7, 2010.

AMARAL, D. G., WINTER, M. P. The Three-Dimensional Organization of the Hippocampal Formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, p.571-591, 1989.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., *et al.* Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, vol. 12, n.1. Feb. 2006.

ARIDA, R. M., *et al.* Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy research**, v.37, n.1, p.45-52, Oct. 1999.

BABB, T. L., BROWN, W. J., *et al.* Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy, **Epilepsia**, v. 25, n.6, p. 729-40, 1984.

BAE, Y.-S. *et al.* Down-regulation of RalBP1 expression reduces seizure threshold and synaptic inhibition in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, n. 2, p. 175–180, doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.056, 2013.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, Jan. 2004.

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—685, 2010.

BOT, A. M.; DEBSKI, K. J. e LUKASIUK, K. Alterations in miRNA Levels in the Dentate Gyrus in Epileptic Rats. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e76051, doi:10.1371/journal.pone.0076051, 2013.

BRAZIL, C. W. Comprehensive care of the epilepsy patient--control, comorbidity, and cost. **Epilepsia**, v. 45, n.6, p. 3-12, 2004.

BURNEO, J. G., *et al.* Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. **Epilepsy Res**, v.66 (1-3), p. 63-74, Jun. 2005.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

CALVANO, L.A. *et al.* Epidemiologia das Epilepsias na População da Cidade de Maceió – Alagoas. **Neurobiologia**, v. 73, n. 1, p. 55-60, 2010.

CAVALHEIRO, E. A., *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v.32, n.6, p.778-82, Nov-Dec. 1991.

CAVALHEIRO, E. A., *et al.* The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v.37, n.10, p.1015-9, Oct. 1996.

CHANG, T.C., *et al.* Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. **Mol Cell**, v. 26, p. 745–752, Jun. 2007.

COSTA, J., *et al.* Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. **São Paulo: Lemos Editorial**, 1998.

CURIA, G., *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of neuroscience methods**, v.172, n.2, p.143-57, Jul. 2008.

DESCIPIO, C. *et al.* Subtelomeric deletion of chromosome 10p15.3: clinical findings and molecular cytogenetic characterization. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 158A, n. 9, p. 2152–61, doi:10.1002/ajmg.a.35574, 2012.

DIROCCO, L. *et al.* Nonallelism for the audiogenic seizure prone (Asp1) and the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) loci in mice. **Journal of neurogenetics**, v. 12, n. 4, p. 191–203, doi:10.3109/01677069809108558, 1998.

EBERT, M. S., SHARP, P. A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes, **Cell**, v. 149, p.515–524, 2012.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v.7, p.340-52, 2001.

ENGEL, J., WIESER, H. G., SPENCER, D. Overview: Surgical Therapy. In: Engel, J.; Pedley, T. A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p 1673-1676.

FERNANDES, M. J. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estud. av.**, São Paulo , v. 27, n. 77, 2013.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v.9, n. 2, p. 102-114, Feb. 2008.

GAUR, A. *et al.* Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. **Cancer research**, v. 67, n. 6, p. 2456–2468, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2698, 2007.

GITAI, D. L., *et al.* [Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations]. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.3, p.272-8, May-Jun. 2008.

GITAI, D. L., Expressão gênica diferencial em Wistar Audiogenic Rats (WAR). 2007. 159f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007.

GOFFIN, K., *et al.* Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. **Exp Neurol**, v.205, n.2, p.501-5, Jun. 2007.

HAUSER, W. A., ANNEGERS, J.F., ROCCA, W.A. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. **Mayo Clin Proc**, v.71, p. 576-586, Jun. 1996.

HUANG, T., *et al.* Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells. **Chin J Cancer**, v.32, n.11, p. 582-93, Nov. 2013.

KELLY, Z. L. *et al.* HOX genes in ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**. [S.l: s.n.], 2011

ILAE. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v.30, n. 4, p. 389-99, 1989.

IYER, A. *et al.* MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44789, doi:10.1371/journal.pone.0044789, 2012.

JACOBS, M. P., *et al.* Curing epilepsy: progress and future directions. **Epilepsy & behavior : E&B**, v.14, n.3, p.438-45, Mar. 2009.

JIMENEZ-MATEOS, E. M., BRAY, I., SANZ-RODRIGUEZ, A., *et al.* miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. **Am. J. Pathol.** v. 1792519–, 2532.10.1016 2011.

JIMENEZ-MATEOS, E. M. e HENSHALL, D. C. Epilepsy and microRNA. **Neuroscience**, v. 238, p. 218–29, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.027, 2013.

JOVIČIĆ, A., *et al.* Comprehensive Expression Analyses of Neural Cell-Type Specific miRNAs Identify New Determinants of the Specification and Maintenance of Neuronal Phenotypes. **J Neurosci.** v.33, p. 5127-5137, Mar. 2013.

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, p. 3127–3145, Sep. 2012.

KAPSIMALI M., *et al.* MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. **Genome Biol**, v. 8, n. 8, R173, 2007.

KELLY, Z. L. *et al.* **HOX genes in ovarian cancer.** **Journal of Ovarian Research.** [S.l.: s.n.], 2011.

LAGOS-QUINTANA M., *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Curr Biol**, v. 12, n. 9, p. 735-739, Apr. 2002.

LEITE, J., *et al.* New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy research**, v.50, n.1-2, p.93-103, Jun. 2002.



LEMOS, T. ;CAVALHEIRO, E. A. Status epilepticus and the late development of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res Suppl**, v.12, p.137-441996.

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência . São Paulo, **Atheneu**, 2004.

LEE, R. C.;; FEINBAUM, R. L. e AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LIU, J., et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p.1437-1441, Sep. 2004.

LIU, D. Z., TIAN, Y., ANDER, B. P., XU, H.) Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures, **J Cereb Blood Flow Metab** v.30, p.92–101, 2010.

LIVAK, K., SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** , v.25, n.4, p.402-082001.  
LUDERS, H., *et al.* Semiological seizure classification. **Epilepsia**, v.39, n.9, p. 1006-1013, 1998.

MARCHI *et al.*, Blood–brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches, **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1877–1886, Nov. 2012.

MATTSON, R. H. Current challenges in the treatment of epilepsy. **Neurology**, v. 44, n 5, p. 4–9, 1994.

MATHERN, G. W., BABB, T. L., LEITE, J. P., *et al.* The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 151-161, 1996.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 3413–25, 1994.

MCNEILL, E., VAN, D. MicroRNAs shape the neuronal landscape. **Neuron**, v, 75, p.363–379, 2012.

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. **Nat Rev Genet**, v. 10, p. 155–159, Dec. 2009.

MORIMOTO, K., *et al.* Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol**, v.73, n.1, p.1-60, May. 2004.

NUDELMAN, A.S., *et al.* Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. **Hippocampus**, v. 20, n. 4, p. 492–498, Apr. 2010.

OMRAN, A., *et al.* Interleukin-1beta and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.53, p. 1215–1224, Jul. 2012.

PASQUINELLI, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86–89, doi:10.1038/35040556, 2000.

PENNISI, E. **ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA. Science.** [S.l: s.n.], 2012.

PITKANEN, A. New data suggest that discontinuation of status epilepticus is not necessary for antiepileptogenic effect in immature brain. **Epilepsy currents**, v.6, n.5, p.170-2, Sep-Oct. 2006.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet neurology**, v.10, n.2, p.173-86, Feb. 2011.

REINHART, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, doi:10.1038/35002607, 2000.

REYNOLDS, E. H. The ILAE/IBE/WHO Global Campaign against Epilepsy: Bringing Epilepsy “Out of the Shadows.” **Epilepsy & behavior: E&B**, v. 1, n. 4, p. S3–S8, doi:10.1006/ebch.2000.0104, 2000.

ROCKENBACH, I. **Expressão da proteína prion celular no modelo de pilocarpina de epilepsia do lobo temporal.** 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,Porto Alegre. 2011.

ROSENOW, F., LUDERS, H. Presurgical evaluation in epilepsy. **Brain**, v.124, n.9, p.1683-1700, 2001

RUVKUN, G. e GIUSTO, J. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. **Nature**, v. 338, n. 6213, p. 313–319, doi:10.1038/338313a0, 1989.

SANDER, J. W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. **Epilepsia**, v.34, p.1007–1016, 1993.

SANO, T., *et al.* MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. **Cell Death Dis**, v.3, p. 287, Mar. 2012.

SCHRATT, G. Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. **Curr Opin Neurobiol** v.19, p.213–219, 2009.

SCORZA, F. ;ARIDA, R. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 345-65, Sep. 2009.

SHARMA, A.K., *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicologic Pathology**, vol. 35, n. 7, p. 984-999, Dec. 2007.

SPECHT, U. Need for Comprehensive Care: patients with good epilepsy prognosis - Comprehensive Care for People with Epilepsy. In: Pfáffin, M., Fase, R., Thorbeck, R; Specht, U.; Wolf, P. England. John Libbery & Company Ltd, 2001.

SUZUKI, T.;; HIGGINS, P. J. e CRAWFORD, D. R. Control selection for RNA quantitation. **BioTechniques**, v. 29, n. 2, p. 332–337, 2000.

SZAFRANSKA, A. E. *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 26, n. 30, p. 4442–4452, doi:10.1038/sj.onc.1210228, 2007.

TORRES, A. *et al.* Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. **Gynecologic oncology**, v. 130, n. 3, p. 588–94, doi:10.1016/j.ygyno.2013.06.026, 2013.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VELISKOVA, J. ;MOSHE, S. L. Update on the role of substantia nigra pars reticulata in the regulation of seizures. **Epilepsy currents**, v.6, n.3, p.83-7, May-Jun. 2006.

VEZZANI, A. *et al.* The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v.7, n. 1, p. 31-40, Jan. 2011.

VO, M.E., *et al.* Impey A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n. 45, p. 16426–16431, Nov. 2005.




WAYMAN, G. A. *et al.* An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9093–9098, Jul. 2008.

WONG, L., *et al.* Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using TaqMan® MicroRNA. **J Cell Sci**, v.13, n.23, p.4689–4693, 2003.

YEKTA, S.;; SHIH, I.-H. e BARTEL, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5670, p. 594–596, doi:10.1126/science.1097434, 2004.

YOU, G. *et al.* Significance of miR-196b in tumor-related epilepsy of patients with gliomas. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e46218, doi:10.1371/journal.pone.0046218, 2012.

## ANEXO A- Aprovação do Comitê De Ética Em Pesquisa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 05/08/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Daniel Leite Góes Gitai  
Leila Rodrigues de Mendonça

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 05/08/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 011462/2010-83 sob o título, **Identificação de Genes de referência para estudos de expressão gênica em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.


Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(\*) Áreas temáticas especiais

  
 Prof. Dr. Walter Matias Lima  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

**Anexo B – Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Maceió, 02 de agosto de 2013

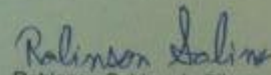
**ROTEIRO DE PARECER CONSUBSTANCIADO**

**Projeto de pesquisa:** Investigação genética e molecular em epilepsias (26/2013)

**Coordenador:** Profa. Daniel Leite Góes Gital, ICBS/UFAL

**Objetivo:** Identificar genes que apresentam uma expressão diferencial em modelo animal de epilepsia do lobo temporal.

**Situação:** Aprovado

  
Robinson Sabino da Silva  
Coordenador CEUA-UFAL

**Robinson Sabino da Silva**  
Coordenador da CEUA-UFAL  
Comissão de Ética no Uso de Animais