



SIMONI HELENA AVANSINI

O PAPEL DOS microRNAs NAS DISPLASIAS CORTICAIS
FOCAIS

THE ROLE OF microRNAs IN FOCAL CORTICAL DYSPLASIAS

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

SIMONI HELENA AVANSINI

**O PAPEL DOS microRNAs NAS DISPLASIAS CORTICAIS
FOCAIS**

Orientadora / Supervisor: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Co-Orientador/Co-Supervisor: Prof. Dr. Fábio Rossi Torres

***THE ROLE OF microRNAs IN FOCAL CORTICAL
DYSPLASIAS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia médica. Área de concentração: Neurociências

Master Dissertation presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the MSc grade in Medical Pathophysiology. Area: Neuroscience

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA SIMONI HELENA AVANSINI E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Av15p Avansini, Simoni Helena, 1980 -
O papel dos microRNAs nas displasias corticais
focais / Simoni Helena Avansini. -- Campinas, SP : [s.n.],
2012.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes.
Coorientador : Fábio Rossi Torres
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Malformações do desenvolvimento cortical. 2.
Córtex cerebral. 3. Epilepsia. 4. Expressão gênica. 5.
Diferenciação celular. I. Cendes, Iscia Teresinha Lopes.
II. Torres, Fábio Rossi. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The role of microRNAs in focal cortical dysplasias.

Palavras-chave em inglês:

Malformations of cortical development

Cerebral cortex

Epilepsy

Gene expression

Cellular differentiation

Área de Concentração: Neurociências

Titulação: Mestra em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

André Luis Fernandes Palmini

Roger Frigério Castilho

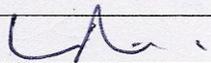
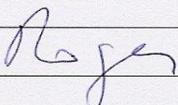
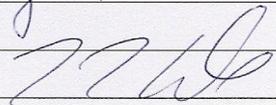
Data da defesa: 04-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Simoni Helena Avansini

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

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) André Luis Fernandes Palmini	
Professor (a) Doutor (a) Roger Frigério Castilho	
Professor (a) Doutor (a) Iscia Teresinha Lopes Cendes	

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

Data: 04/07/2012

DEDICATÓRIA

**Ao meu irmão Roni (*in memoriam*),
que sem dizer uma frase sequer
nesses mais de 20 anos de convivência,
me ensinou tudo o que acredito entender por Amor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Alto por ter me concedido infinitas oportunidades de crescimento, saúde e por me dar constantes provas do quanto sou protegida e abençoada!

À Profa. Iscia por ter me acolhido em seu laboratório e por ter acreditado no meu potencial, mesmo sabendo da minha completa ignorância neste mundo tão fascinante das neurociências!

Aos meus pais, principalmente minha mãe, que sem entender muito bem o que faço, me apoiou e tem apoiado nesta empreitada! Minha eterna GRATIDÃO, mãe! Aos meus irmãos: Edson, exemplo de honestidade e de trabalho; Roni, que sempre me fez sentir o ser humano mais importante e por sua alegria contagiante (“Saudade corta como aço de navalha!”). A minha cunhada Renata e meu sobrinho Miguel (“my little Japa”).

À minha família espiritual: Bete, Gi, Neiva, Carlos, Vó Antônia, Cidinha, Rô, Edmilton, Rita, Monica, Marlene, Tati, Dany, Roque, D. Maria, Rosário e tantos outros que sem eu pedir me envolvem em tanto carinho e afeto!

Aos amigos de TODAS as horas, não apenas das prazerosas, mas dos intermináveis finais de semana e feriados no laboratório, das risadas, das lágrimas e da cumplicidade: Patrícia e Fernando – como é grande o meu amor por vocês!

Aos meus pais científicos, Fábio e Dany, pela paciência, pela ajuda e presença constantes e por aturar minha teimosia! Agradeço também meu outro pai, Secolin, por fazer a bioinformática e a bioestatística ficarem mais claras e pela paciência para me ensinar a trabalhar com o R.

Às técnicas: Marilza pelos inúmeros desabafos, conselhos e por me abrir os olhos para que o aprendizado venha também com a percepção do outro! “Você pode me ouvir agora?”. A Madá que me faz sentir a loirinha mais linda do pedaço e me enche com seu carinho e seus abraços. Lu, você faz muita diferença na minha vida! Que sorte tem essa Rafinha!

A todos os amigos do laboratório de Genética Molecular, de Citogenética e do LabZeb: Marina, Zé-bola, Alexandre, Milena, Tânia, Ilária, Víncius, Tisco, Karina, Tatis, Marcela, Daniel, Fer, Rafael, Profa. Cláudia, Dani Lucon, Estelinha, Lidi, Lili, Lu, Renata, Camila, Gisele, Eduardo, Rafa, Laiara, Ju, Ana, Miriam, Profa. Vera, Prof. Carlos, Jair, Marília, André. Aos que estão distantes só fisicamente: Simone, Fábio Conte, Oni, Cris, Romênia, Marcelo. E me perdoem os que não foram lembrados.

Ao pessoal da Neuro, Prof. Fernando pelas inúmeras oportunidades de aprendizado nas reuniões de sexta-feira. Carol, sem palavras também para agradecê-la por todo o conhecimento que me transmitiu. Clarissa, André, Greize, Denise, Daniella, Tátilla, Marcondes, aos residentes e secretárias do ambulatório.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, meu carinho e respeito por me acolherem tão bem! Ao Prof. Luciano, por me apresentar com toda a paciência e entusiasmo os neurônios (espero que não se canse de mim tão cedo!), ao Fábio Rogério, sem palavras para agradecê-lo por tudo o que fez por mim!. Lu, pelos conselhos, conversas, risadas e por todo carinho. Claudinha, pelo acolhimento e disposição em ajudar. Ana, Arethusa, Felipe, Sergio, Flavia, Rita, Mayara, Vivi, Rafael, Verinha e residentes.

Ao pessoal do SAM, Fabrício, Anderson, Lu, Sérgio e tantos outros que não me recordo o nome.

À todos os amigos e a família que construí na Universidade Federal de São Carlos – Profas. Sandra, Silvana e Lucinha.

À minha professora de inglês, Sueli, minha eterna incentivadora!

Ao Laboratório da Profa. Sarita e principalmente a Laure.

Ao Laboratório de Microarranjo do Laboratório Nacional de Biociências – LNLS e principalmente a Maria Eugênia.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	23
3.2. CASUÍSTICA	23
3.3. IMUNOHISTOQUIMICA	28
3.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	29
3.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL	30
3.6. MICROARRANJOS DE miRNAS	31
3.7. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)	34
3.8. SELEÇÃO DOS GENES ALVOS POR ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	35
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE qPCR	35
3.10. MICRODISSEÇÃO A LASER	36
4. RESULTADOS	
4.2.1. EXTRAÇÃO DE RNA: QUANTIDADE E QUALIDADE	37
4.2.2. MICROARRANJOS DE miRNAS	40
4.2.3. VALIDAÇÃO DE MICROARRANJOS DE miRNAs POR qPCR	47
4.2.4. SELEÇÃO DOS GENES ALVOS POR ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	49
4.2.5. VALIDAÇÃO DOS GENES ALVOS POR qPCR	50
4.2.6. GENES <i>DROSHA</i> e <i>DICER1</i>	53
4.2.7. qPCR DO hsa-miR-31 EM CÉLULAS EM BALÃO	54
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS	63
8. ANEXOS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

miRNA microRNA

miR microRNA

DCF Displasia Cortical Focal

MCC Malformações do Córtex Cerebral

DAE Drogas anti-epilépticas

DNA ácido dextribonucléico

RNA ácido ribonucléico

RT Transcriptase Reversa

cDNA DNA complementar

Ct Threshold Cycle: Ciclo do limiar de detecção

miR microRNA

mRNA RNA mensageiro

nt nucleotídeo

pb Pares de bases

PCR reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction)

RISC RNA Induced Silencing Complex: Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

SNC sistema nervoso central

UTR Untranslated region: região não-traduzida

μ Micro

RM Ressonância Magnética

FDR False Discovery rate

FC Fold Change

FF Fresh Frozen

FFPE Formalin fixed paraffin embedded

TSC1 gene da esclerose tuberosa

GFAP Glial fibrillary acidic protein

p *p-value*

pc *p-value corrigido*

LISTA DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1. Biogênese dos miRNAs	19
Figura 2. Lâmina <i>Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays</i> e exemplo de uma imagem de microarranjo de miRNA após o escaneamento	31
Figura 3. Esquema ilustrativo dos procedimentos de <i>Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays</i>	32
Figura 4. RM mostrando cortes axial e coronal de uma paciente com DCF, tipo 2a	37
Figura 5. Citoarquitetura de um córtex normal e de um com DCF tipo 2a	38
Figura 6. RM mostrando cortes axial e sagital e de uma paciente com DCF, tipo 2b	38
Figura 7. Achados histopatológicos de um paciente com DCF tipo 2b	39
Figura 8. Tecido cerebral de paciente com DCF tipo 2b, antes e após a microdissecção	55
Figura 9. Modelo proposto para falha na diferenciação glioneuronal na DCF tipo 2	61

LISTA DE TABELAS

PÁG.

Tabela 1. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado grupo caso e controle	42
Tabela 2. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2a e controle	43
Tabela 3. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2b e controle	43
Tabela 4. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2a versus 2b	44
Tabela 5. Lista dos miRNAs selecionados para serem validados por qPCR	46
Tabela 6. miRNAs validados por qPCR e os genes alvos selecionados	50

LISTA DE QUADROS

PÁG.

Quadro 1. Informação clínica dos pacientes com Displasia Cortical Focal	25
Quadro 2. Informação clínica dos indivíduos pertencentes ao grupo controle	27
Quadro 3. Valores de qualidade e quantidade do RNA total oriundos de tecido cerebral FFPE	40

LISTA DE GRÁFICOS

PÁG.

Gráfico 1. Box plot dos valores de RIN de pacientes e controles	41
Gráfico 2. Volcano plot com panorama da expressão dos miRNAs	42
Gráfico 3. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-31, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b	48
Gráfico 4. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-34a, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b	48
Gráfico 5. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-let-7f, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b	49
Gráfico 6. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene <i>NEUROG2</i> , comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b	52
Gráfico 7. Valores de expressão relativa (RQ) do gene <i>NEUROG2</i> nos grupos controle, caso (2a e 2b) e 2a	52
Gráfico 8. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene <i>DICER 1</i> , comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b	53
Gráfico 9. Valores de expressão relativa (RQ) do gene <i>DICER 1</i> no grupo controle e no caso (2a e 2b)	54
Gráfico 10. Valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-31, comparando-se células em balão e neurônio microdissecados	56

RESUMO

A displasia cortical focal (DCF) é uma malformação do córtex cerebral humano que ocorre na fase de proliferação e diferenciação neuronal e está frequentemente associada com a refratariedade das crises epiléticas. É designada como um espectro de anormalidades da estrutura laminar do córtex, associada com características citopatológicas que incluem neurônios gigantes, dismórficos e células em balão e, sua etiologia é pouco conhecida. Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs de fita simples não codificadores de proteínas que regulam a expressão gênica pós-transcricional. Há evidências que indicam que eles estão envolvidos em importantes processos do sistema nervoso e que os mesmos podem ter um papel nas DCF. A elucidação das vias moleculares desta malformação pode permitir uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes e levar a novas estratégias de tratamento, melhora na conduta clínica e identificação de novos alvos terapêuticos, bem como a descoberta de biomarcadores que possam ser associados ao diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento. Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de expressão dos miRNAs em tecidos com DCF obtidos através de cirurgia para o controle de crises refratárias, verificar os prováveis genes alvos para esses miRNAs diferencialmente expressos e comparar a assinatura molecular baseada nos miRNAs em tipos distintos de DCF do tipo 2. Foi utilizado para isso o RNA total de 17 pacientes com DCF e de 20 controles oriundos de autópsia. Os experimentos de microarranjos de miRNAs revelaram 39 miRNAs diferencialmente hipoexpressos e um miRNA hiperexpresso. Utilizou-se a técnica de qPCR para validação desses miRNAs e foi possível identificar uma diferença na expressão de três miRNAs: hsa-miR-31, hsa-miR-34a e hsa-let-7f em pacientes com DCF tipo 2 em relação ao grupo controle. Além disso, o hsa-miR-31 foi identificado como um possível biomarcador para o subtipo 2b de DCF. Na busca por genes alvos foi encontrado hiperexpresso o *NEUROG2*. Também foi verificada a desregulação do gene *DICER1*, encontrado hipoexpresso, o que justifica a predominância de miRNAs com expressão diminuída encontrados. E por fim, observou-se que o padrão diferencial de expressão dos três miRNAs e os dois genes identificados em nosso estudo fornecem subsídios importantes para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na falha da diferenciação neuroglial em DCF tipo 2.

ABSTRACT

Focal cortical dysplasia (FCD) is a malformation of human cerebral cortex that occurs during proliferation and neuronal differentiation frequently associated with drug-resistant epilepsy. It is designated as a spectrum of abnormalities of laminar structure of the cortex, associated with cellular abnormalities that consist of giant and dysmorphic neurons and balloon cells; however, its etiology is poorly understood. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs which regulate post-transcriptional gene expression. There is evidence that they are involved in important processes in the nervous system and that they may play a role in FCD. The elucidation of the molecular pathways involved in FCD may allow a better understanding of the underlying mechanisms and may lead to new treatment strategies, improvement in clinical management and identification of new therapeutic targets, as well as the discovery of biomarkers that may be associated with the diagnosis, prognosis and response to treatment. Thus, the aim of this study was to investigate miRNAs expression pattern in tissue with FCD obtained at surgery for control of refractory seizures. In addition, we aimed to identify target genes for these miRNAs differentially expressed, as well as to compare the molecular signature based on miRNAs in different types of FCD. We used total RNA isolated from brain tissue obtained after surgery for the treatment of medically refractory seizures from 17 patients with DCF and 20 controls from autopsy. Microarray analysis revealed 39 miRNAs differentially downregulated and only one miRNA overexpressed. Decreased expression of three miRNAs was confirmed by qPCR when patients with type 2 FCD were compared with controls: hsa-miR-31, hsa-miR34a and hsa-let-7f. In addition, we found that hsa-miR-31 could be a potential biomarker for type 2b FCD. In the search for target genes, *NEUROG2* was found upregulated and *DICER1* was found underexpressed, which explains the predominance of miRNAs with decreased expression. Finally, we observed that the differential pattern of expression of three miRNAs, and the two genes identified in our study provide important information which may help to clarify the molecular mechanisms involved in the failure of neuroglial differentiation in type 2 FCD.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX CEREBRAL HUMANO

O desenvolvimento do córtex cerebral humano pode ser subdividido em três fases que se sobrepõem (Lui et al, 2011). Durante a primeira fase, as células-tronco localizadas nas zonas ventricular e subventricular do telencéfalo proliferam e diferenciam-se em precursores neuronais ou células da glia (Kriegstein et al, 2006).

Durante a segunda fase, os neurônios migram radial ou tangencialmente. A maioria dos neurônios migra radialmente de seu local de origem em direção à superfície pial, utilizando para isto as fibras das células radiais gliais como suporte (Manzini & Walsh, 2011) para formar uma estrutura laminar ordenada (Kriegstein et al, 2006). O córtex cerebral maduro é organizado em seis camadas (Molyneaux et al., 2007).

Após a conclusão da migração neuronal, a terceira e última fase do desenvolvimento cortical envolve uma série de eventos apoptóticos e sinaptogênicos destinados a regular o número de neurônios maduros e as suas ligações, levando a formação de circuitos corticais (Bozzi, 2012).

O desenvolvimento embrionário do córtex cerebral é um processo complexo, controlado por uma série de vias bioquímicas que são submetidas a um refinado controle da expressão gênica (Guillemot et al., 2006). Alterações nos genes reguladores destas vias, especialmente durante o desenvolvimento pode levar a malformações do córtex cerebral (Guerrini e Parrini, 2010).

1.2. MALFORMAÇÕES CORTICAIS: DISPLASIA CORTICAL FOCAL

Em humanos, uma das classes mais importantes de distúrbios do sistema nervoso central é a de malformações do córtex cerebral (MCC) (Kuzniecky, 2001). As MCC têm sido frequentemente apontadas como a causa de epilepsia (Chung et al., 2005) e existem pelo menos três mecanismos principais pelos quais as MCC podem se desenvolver e que refletem as etapas embriológicas de formação do córtex: (1) anormalidades da proliferação e diferenciação de neurônios e da glia; (2) anormalidades na migração neuronal e (3) distúrbios pós-migracionais. Um dos distúrbios que ocorre na fase de proliferação e diferenciação neuronal é a displasia cortical focal (DCF) (Barkovich et al., 2012).

A DCF é designada como um espectro de anormalidades da estrutura laminar do córtex, associada com características citopatológicas que incluem neurônios gigantes, dismórficos e células em balão (Palmini, 2004; Guerrini, et al., 2008)

Essa malformação esta associada com a refratariedade das crises que afetam de 70 a 90 % dos pacientes com DCF sendo necessária intervenção cirúrgica (Sisodiya et al., 2009). Bast et al. (2006) relatam que a incidência de DCF pode ser maior que 25% considerando-se todos os pacientes submetidos à cirurgia para tratamento da epilepsia.

A DCF pode se estender da lâmina cortical I para a substância branca subcortical e sua classificação envolve características etiológicas, clínicas, patológicas e de neuroimagem (Sisodiya et al., 2009). Os critérios de ressonância magnética (RM) que são sugestivos de DCF incluem alterações da espessura, tamanho, forma e orientação dos giros e sulcos, espessamento do córtex e perda da definição da transição cortico-subcortical (Barkovich et al., 1997).

Em 2004, Palmini et al. propuseram um sistema de classificação para DCF, baseado em anormalidades citomorfológicas e citoarquiteturais e em 2011 um consenso da Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE) propôs uma atualização a classificação (Blüncke et al., 2011):

Tipo 1: Malformação caracterizada por anormalidades na laminação cortical

- Tipo 1A: laminação radial anormal
- Tipo 1B: laminação tangencial anormal
- Tipo 1C: laminação radial e tangencial anormais

Tipo 2: Malformação apresentando-se irregularidades na laminação cortical e anormalidades citológicas

- Tipo 2A: anormalidades arquiteturais com neurônios dismórficos sem células em balão;
- Tipo 2B: anormalidades arquiteturais com neurônios dismórficos e células em balão.

Tipo 3: Lesão principal associada a anormalidades na laminação cortical

- Tipo 3A: Lesão cortical no lobo temporal associada à esclerose hipocampal
- Tipo 3B: Anormalidade adjacente a tumor glial ou glioneural
- Tipo 3C: Anormalidade adjacente à malformação vascular
- Tipo 3D: Anormalidade adjacente a qualquer lesão adquirida na infância: trauma, isquemia, encefalite.

1.2.1. DISPLASIA CORTICAL FOCAL TIPO 2

A DCF tipo 2 é diagnosticada em 29-39% de todos os pacientes com DCF e está relacionada com um amplo espectro de manifestações clínicas que depende do tamanho da lesão, da localização da mesma e da idade do início das crises epiléticas. A etiologia da DCF é pouco conhecida (Crino et al., 2002). Um modelo de desenvolvimento de linhagens foi proposto, onde tanto as células em formato de balão quanto os neurônios dismórficos seriam derivados de células radiais gliais do telencéfalo (Guerrini & Parrini, 2009).

As células em balão não recebem contatos sinápticos, ocorrendo uma alteração no padrão dos circuitos excitatórios e inibitórios (Guerrini et al., 2008). Essas células são imaturas, com características tanto de neurônio quanto de glia (Crino et al., 2002) e, uma análise nos filamentos intermediários demonstra expressão preferencial de vimentina, nestina e GFAP-delta, além de marcadores conhecidos de células tronco ou de células precursoras como CD133 e CD34, sugerindo diferenciação anormal ou manutenção de pluripotência com destinação celular anormal (Englund, et al., 2005).

Neurônios dismórficos são células malformadas com orientação, tamanho e estrutura citoesquelética anormais (Palmini et al., 2004), demonstram imunofenótipo diferenciado por apresentarem intensa marcação de proteínas neurofilamentares, em geral expressão de NeuN, uma marcador de maturidade neuronal (Sisodiya et al., 2009). Um aumento nos receptores de neurotransmissores também tem sido observado em neurônios displásicos, juntamente com uma perda de controle da homeostase iônica, podendo ambos estarem relacionados com a alta epileptogênese dos tecidos displásicos (Cepeda, et al., 2003).

Poucos estudos tem associado mecanismos genéticos como causa para DCF, no entanto, Guerrini et al. (2008) sugeriu que o gene *TSC1*, envolvido na esclerose tuberosa (ET), poderia ter alguma relação com a origem patológica de DCF, já que os túberes encontrados nos pacientes com ET são histologicamente muito semelhantes à alguns tipos de DCF. No entanto nenhuma mutação germinativa ou somática foi encontrada no gene *TSC1* em pacientes com DCF (Gumbinger et al., 2009; Schonberger et al., 2009).

1.3. MiRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs de fita simples não codificadores de proteínas que regulam a expressão gênica pós-transcricional. Possuem em torno de 22 nucleotídeos e já foram identificados nos genomas de invertebrados, plantas e vertebrados.

Muitos estudos têm provado que os miRNAs são reguladores finos de vários processos biológicos e que contribuem para a complexidade desses organismos (Barbato et al., 2008).

O primeiro miRNA, denominado de lin-4, foi descoberto por Ambros e colaboradores em 1993 em *Caenorhabditis elegans* e atua como regulador endógeno de genes do controle de desenvolvimento larval (Bartel & Chen, 2004).

As moléculas de miRNAs atuam de forma negativa na expressão dos genes ao se ligarem a região 3' não traduzida (3'-UTR) complementar ao RNA mensageiro (RNAm) alvo. Essa ligação pode ocasionar a degradação do RNAm ou a inibição da tradução. Essas moléculas são tecido-específicas e agem de forma temporal-espacial durante o desenvolvimento (Ambros, et al., 2003; Kim, 2005; Dogini et al., 2008; Ghildiyal & Zamore, 2009). Os miRNAs possuem funções importantes em várias vias regulatórias, tais como as de desenvolvimento, diferenciação, proliferação celular e apoptose (Ambros, 2004; Erson & Petty, 2008).

Os genes de miRNAs representam de 1 a 2% de todo o genoma eucarioto conhecido (Lindow & Gorodkin, 2007). Predições computacionais sugerem que cada miRNA pode atuar em até 200 transcritos diferentes e um RNAm pode ser regulado por milhares de miRNAs (Kim, 2005; Barbato et al., 2008).

A biogênese dos miRNAs envolve em um primeiro momento a transcrição do gene de microRNA, havendo a formação de um pri-miRNA (transcrito primário), passando pela adição de uma estrutura cap e de uma cauda poliA (Lee et al., 2003). Em seguida o pri-miRNA é processado pela RNase III Drosha, formando uma estrutura em formato de hairpin com um tamanho aproximado de 60-70 nucleotídeos chamado de pré-miRNA (Kim, 2005). O pré-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma com o auxílio da enzima exportina 5 (Lee et al., 2003). Uma vez no citoplasma o pré-miRNA é submetido a um segundo processamento realizado pela enzima Dicer (outra RNase III) que remove a alça da estrutura *hairpin* e forma um miRNA dupla fita. O duplex é então separado e uma das fitas será selecionada como miRNA maduro, enquanto a fita complementar será removida e degradada (Kim, 2005). A perfeita complementaridade entre o miRNA e o RNAm alvo resulta no silenciamento gênico pela degradação do RNAm, enquanto que o imperfeito pareamento resulta na repressão da tradução (Barbato et al., 2008). (Figura 1)

A inibição da tradução do RNAm ocorre após a ligação complementar com pelo menos seis dos oito nucleotídeos da região 5' do miRNA. Essa região composta pelos oito

primeiros nucleotídeos é conhecida como seed region (ou região semente) e tem sido descrita como crucial para inibição do RNAm alvo (Lewis, 2005; Carthew & Sontheimer, 2009; Mencía, et al., 2009; Shen & Temple, 2009).

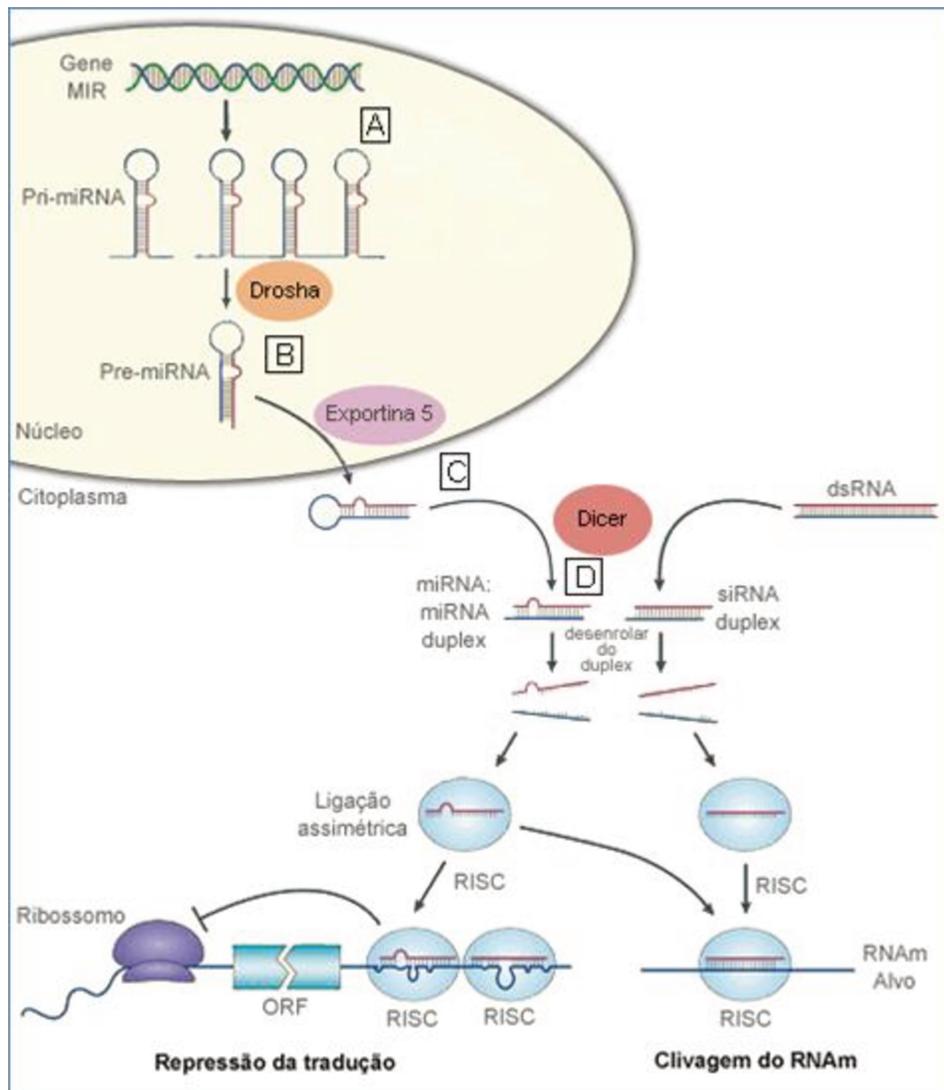


Figura 1. Biogênese dos miRNAs. A) Transcrição do gene MIR gerando o pri-miRNA com estrutura secundária em *hairpin*; B) Formação do pré-miRNA pela clivagem do pri-miRNA pela Drosha; C) Transporte do pré-miRNA pela exportina-5 para o citoplasma; D) Clivagem pela Dicer dos pré-miRNAs formando o complexo miRNA:miRNA*. Perfeita complementaridade entre o miRNA e o RNAm alvo resulta em degradação do RNAm, enquanto que o imperfeito pareamento resulta na repressão da tradução.

A maioria dos genes de miRNA é encontrada em regiões intergênicas e aproximadamente 50% dos miRNAs conhecidos estão localizados próximos, sugerindo que

esses miRNAs agrupados devem ser transcritos a partir de uma única unidade de transcrição policistrônica (Ambros, 2004; Kim, 2005).

Atualmente, o banco de dados de miRNAs registra mais de 20.000 sequências descritas em 168 organismos entre vertebrados, invertebrados, plantas e vírus e que o número de miRNAs humanos conhecidos é de 800. (<http://www.mirbase.org/>)

Existe um grande número de trabalhos que relatam a participação dos miRNAs nas patologias humanas e a sua atividade anormal tem sido sugerida na patogênese de uma ampla variedade de cânceres humanos (Caldas & Brenton, 2005; Calin & Croce, 2006) e distúrbios neurológicos (Bian e Sun, 2011).

1.4. MiRNAs E O DESENVOLVIMENTO NEURONAL

Os miRNAs, por desempenharem um importante papel na morfogênese do cérebro e no destino das células nervosas, são peças-chaves nos processos de desenvolvimento do sistema nervoso central (Nelson et al., 2008; Olsen et al., 2009; Shen & Temple, 2009).

Shen & Temple (2009) afirmam que o cérebro é o órgão com a mais complexa expressão de miRNAs e que miR-124, um dos mais conhecidos miRNAs expressos, está relacionado com a diferenciação e o desenvolvimento neuronal (Olsen, et al., 2009). MiR-132 é conhecido por participar da morfogênese neuronal e miR-219 juntamente com miR-132 modulam o ciclo circadiano (Davis et al., 2008).

Abelson e colaboradores (2005) identificaram uma mutação frameshift na região 3'UTR do gene *SLITRK1*, responsável pela síndrome de Tourette (ST), em um sítio de ancoragem do miRNA hsa-miR-189. Esta síndrome é um distúrbio neurológico que ocasiona anormalidades comportamentais e é caracterizada por tiques vocais e motores. Além disso, eles demonstraram que o mRNA do *SLITRK1* e hsa-miR-189 têm um padrão de expressão sobreposta em regiões do cérebro implicadas com ST, e que essa interação leva a uma repressão da expressão do gene *SLITRK1*.

Há também outros relatos do papel dos miRNAs na indução da diferenciação neuronal, Krichevsky et al. (2006) utilizaram células-tronco embrionárias de camundongos e demonstraram alta expressão simultânea de miR-9 e miR-124a na transição da célula precursora neuronal para neurônios diferenciados. Este trabalho mostrou que miR-124a é preferencialmente expresso em neurônios embrionários, e que miR-9 é expresso tanto em

neurônios quanto em células gliais, além disso, uma inibição apenas de miR-9 ou em combinação com a miR-124a causou uma redução no processo de diferenciação neuronal

Cheng et al. (2009) estudaram os efeitos do miRNA-124, e verificaram que o mesmo reprime a expressão do fator de transcrição Sox9, importante para a diferenciação de células-tronco em neurônios.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, Dogini et al 2008, trabalhando com camundongos, identificaram um grupo de 12 miRNAs, entre estes os miRNAs miR-9 e miR-124a, que mostrou um padrão de expressão diferente, com alta expressão durante os estágios de embriogênese e decréscimo significativo no decorrer do desenvolvimento cerebral, mostrando o papel crucial da regulação de miRNAs nos processos iniciais de formação do SNC.

Sabe-se que a enzima Dicer é fundamental para a formação do miRNA maduro (Davis et al., 2008). Kawase-Koga e colaboradores (2009) relatam que a ausência da enzima Dicer no córtex cerebral de camundongo, resultou em uma redução significativa na espessura cortical, causada por uma redução das células-tronco neurais e de progenitores neurais, com aumento da apoptose e diminuição na diferenciação neuronal. Experimentos utilizando drosófilas com mutações em *DICER1* mostraram que a via dos miRNAs é essencial para a divisão celular e para a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Hatfield et al, 2005). Desta forma, esses resultados mostram o papel essencial da *DICER* no desenvolvimento do SNC.

As evidências que indicam que os miRNAs estão envolvidos em importantes processos do sistema nervoso nos fazem acreditar que os mesmos tem um papel na etiologia das malformações do córtex. A elucidação das vias moleculares irá permitir uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a estas malformações, podendo levar a novas estratégias de tratamento, melhora na conduta clínica e identificação de novos alvos terapêuticos. O desenvolvimento em direção aos fatores citados acima também tem como objetivo a descoberta de biomarcadores que possam ser associados ao diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento (Wong, 2008).

É muito importante enfatizar que os dados moleculares disponíveis para DCF são escassos na literatura, fato que contrasta com a importância clínica da mesma como causa de epilepsia refratária, sendo assim a dissertação em questão se concentrou em estudar alguns mecanismos moleculares potencialmente envolvidos na DCF.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar o padrão de expressão dos miRNAs em tecidos de displasia cortical focal obtidos através de cirurgia para o controle de crises refratárias.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Verificar os prováveis genes alvos para os miRNAs diferencialmente expressos que forem identificados nas DCF tipo 2.
2. Comparar a assinatura molecular baseada nos miRNAs em tipos distintos de DCF do tipo 2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, protocolo 470/03 (Anexo 1). Todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular fosse confidencial, questionários clínicos e amostras de tecido e de RNA foram identificados por um código designado no momento em que o indivíduo entrou no estudo. Foi aprovada (Anexo 3), a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido para utilização de casos de arquivo de biópsias e de peças cirúrgicas conservadas em blocos de parafina do Departamento de Anatomia Patológica/HC/UNICAMP, assim como de indivíduos-controle que tiveram como causa de óbito outros fatores que não alterações do sistema nervoso central.

3.2. CASUÍSTICA

Todos os pacientes foram recrutados no ambulatório de epilepsia geral e epilepsia de difícil controle, diagnosticados e operados pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O estudo foi retrospectivo utilizando material de pacientes portadores de DCF conservados em blocos de parafina, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz do Departamento de Anatomia Patológica/HC/UNICAMP. Foi utilizado como controle, material (o córtex cerebral) também mantido em blocos de parafina, de indivíduos submetidos à autopsia, cuja causa de óbito não foi relacionada a evento neurológico ou trauma no sistema nervoso central. Esses blocos de parafina fazem parte do arquivo de biópsias e de peças cirúrgicas do Departamento de Anatomia Patológica/HC/UNICAMP.

Assim, foi realizado um levantamento junto ao Laboratório de Neuroimagem (LNI) do HC/UNICAMP onde identificamos 30 pacientes com diagnóstico prévio de DCF. Todos tiveram diagnóstico revisado por dois neuropatologistas do departamento de Anatomia Patológica do HC/UNICAMP (Drs. Luciano de Souza Queiroz e Fábio Rogério). Quando o diagnóstico não foi definitivo, um terceiro neuropatologista revisou as lâminas para que a caracterização citomorfológica trouxesse uma boa concordância com a classificação das DCF's antes que os ensaios moleculares fossem iniciados (Coras, et al. 2012).

Um total de 17 pacientes tiveram diagnóstico confirmado para DCF tipo 2. Os dados clínico-patológicos encontram-se resumidos no Quadro 1.

Os pacientes utilizados nesta casuística são em sua maioria do sexo masculino (71%, n=12/17), a idade da cirurgia para controle das crises epiléticas variou entre três e 52 anos (idade média = 21 anos), o paciente com início mais precoce desenvolveu crise com dois meses de idade e o mais tardio com 18 anos (idade média = seis anos). A frequência das crises antes da cirurgia era em média de dez eventos diários, ocorrendo um predomínio de crises parciais complexas (88%, n=15/17) seguida de crises tônico-clônicas generalizadas (70% n=12/17).

Pacientes diagnosticados com DCF subtipo 2a representam 53% (n=9/17), enquanto do subtipo 2b totalizam 47% (n=8/17) de nossa casuística. O lobo frontal foi a região com maior predomínio na ressecção cirúrgica (59%, n=10/17) seguida da região temporo-parieto-occipital (12%, n=2/17) e temporo-occipital (12%, n=2/17). A preponderância de peças cirúrgicas foi do hemisfério direito (59%, n=10/17).

Segundo escala de classificação Engel para controle de crises, dentro do grupo de pacientes que fazem parte de nossa casuística, 53% (n=9/17) apresentaram melhora significativa das crises, Engel I e II. Sendo que a maioria é composta por pacientes diagnosticados com subtipo 2b (75%, n=6/8) e metade deles tiveram remissão completa das crises (n=3/6), Engel IA.

Quadro 1. Informação clínica dos pacientes com Displasia Cortical Focal

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia	Região ressecada	Classificação DCF, Blüncke, (2011)	Início das crises	Frequencia das crises		Tipo de crise	Engel	Tecido
						antes	depois			
P1	M	40	Temporo-Parietal Occipital Direita	2b	6 anos	4-5 diárias	0	CPC/CPS/CTCG	IA	C e P
P2	M	26	Temporal Inferior Esquerdo	2a	7 anos	4-5 mês	0	CPS/CPC		C e P
P3	M	6	Temporo-Occipital Direito	2b	10 meses	6 diárias	3-4 diárias	CPC/CTCG	IVB	C e P
P4	F	33	Occipital Direita/ Hipocampo Direito	2b	8 anos	4-5 diárias	0	CPC/CTCG	ID	P
P5	M	52	Frontal direito	2b	18 anos	4-5 diárias	0	CPS/CPC/CTCG	IB	P
P6	M	3	Fronto-Parietal Esquerdo	2b	2 meses	7-8 diárias	0	CPC	IA	P
P7	M	15	Frontal Esquerdo	2b	2 anos	30 diárias	7 diárias	CPS/CTCG	IIA	P
P8	M	10	Frontal-Parietal Direita	2a	6 anos	20 diárias	8-12 diárias	CPC/CPS/CTCG	IVA	P
P9	M	9	Frontal Direito	2b	11 meses	15-20 diárias	0	CPC	IA	P
P10	F	15	Giro Frontal superior esquerdo	2a	4 anos	10-15 diárias	1 a cada 6 meses	CPC/CPS/CTCG	IIB	P
P11	M	12	Giro Frontal médio esquerdo	2a	2 anos	6 diárias	1 diária	CPS/CPC/CTCG	IVB	P
P13	M	29	Frontal Direito	2a	4 anos	3 diárias	1 diária	CTCG	IVA	C e P
P14	F	29	Frontal Direito	2a	7 anos	1 semana	1 a cada 6 meses	CPS/CPC/CTCG	IIB	P
P15	F	23	Frontal Direito	2a	9 anos	1-2 semana	crises frequentes	CPC/CTCG	IVC	C e P
P16	M	18	Frontal Esquerdo	2b	6 meses	3 diárias	0	CPC/CTCG	IA	C e P
P17	M	20	Occipital Esquerdo	2a	7 anos	1-2 semana	1 a cada 2 meses	CPS/CPC	IIIA	P
P18	F	25	Frontal Anterior Direita	2a	10 anos	10 diárias	crises frequentes	CPC/CTCG	IIIA	P

F: Feminino; M: Masculino; 2a, DCF tipo 2a; 2b: DCF tipo 2b. Frequência das crises antes e após a cirurgia; CPS= Crise Parcial Simples, CPC= Crise Parcial Complexa, CTCG= Crise Tônico-Clônicas Generalizadas, Engel: Escala de Classificação Engel para controle de crises. IA= sem crises; IB CPS, mas sem crises impactantes; IC =algumas crises incapacitantes após a cirurgia, mas livre de crises incapacitantes nos últimos dois anos; ID+ CTCG apenas com a retirada das DAE's; IIA =inicialmente livre de crises, mas agora com crises raras; IIB= raras crises incapacitantes desde a cirurgia; IIC= mais do que crises incapacitantes raras, mas raras crises nos últimos dois anos; IID= Somente crises noturnas; IIIA: redução significativa das crises; IIIB=Intervalo livre de crises prolongado, maior que 50% do período de seguimento, mas inferior a dois anos; IVA: com redução do número de crises; IVB: sem mudança apreciável; IVC: piora das crises após a cirurgia. Tecido utilizado para ensaios moleculares: C:Material congelado; P: material conservado em parafina

Os controles utilizados neste trabalho foram selecionados junto ao registro de obituários e no blocário do departamento de Anatomia Patológica do HC/UNICAMP. Os indivíduos deste grupo foram selecionados seguindo parâmetros como média de idade, sexo e tempo de estoque em bloco de parafina e pareados com os pacientes seguindo estes mesmos critérios. Todos tiveram história clínica e a análise anatomopatológica (H&E) revisadas por neuropatologista para descartar a presença de antecedentes clínicos como doenças neuropsiquiátricas e alterações citológicas e de citoarquiteturas do córtex cerebral.

A maior causa de morte deste grupo foi devido a problemas respiratórios. A idade variou entre um e 58 anos (idade média = 35 anos) e o predomínio foi de indivíduos do sexo masculino (60%, n=12/20) Os dados clínicos estão resumidos no Quadro 2.

Quadro 2. Informação clínica dos indivíduos pertencentes ao grupo controle

Código	Idade	Sexo	Antecedentes	Causa do óbito	Tecido
C1	58	M	Estenose grave da válvula aórtica, Esplenomegalia, nefrosclerose, doença diverticular do cólon	Choque cardiogênico	C e P
C2	33	F	Neurite óptica e Uveíte anterior do olho esquerdo	Insuficiência Respiratória. Edema e congestão pulmonar e linfoma difuso	C e P
C3	22	M	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda	Insuficiência Respiratória	P
C4	30	M	Síndrome Ictero-Hemorrágica	Pulmão de choque	P
C5	50	M	Diabetes melitus; nefropatia diabética; aterosclerose; HAS; necrose tubular aguda; adenocarcinoma ductal do pâncreas disseminado	Choque hipovolêmico e Hemorragia digestiva alta	P
C6	20	F	Esplenomegalia intensa. Hiperesplenismo. Hepatopatia sugestiva de bloqueio de efluxo venoso	Choque hipovolêmico hemorragia retroperitoneal e cervical	P
C7	29	M	Infarto pulmonar hemorrágico. Broncopneumonia bilateral abscedida. Necrose tubular aguda	Endocardite infecciosa	P
C8	1	M	Miocardite aguda de provável etiologia viral. Edema pulmonar difuso. Necrose tubular aguda	Insuficiência cardíaca congestiva	P
C9	29	M	Insuficiência renal crônica	Broncopneumonia bilateral	P
C10	39	F	Lupus eritematoso sistêmico	Dano alveolar difuso secundário a infecção pelo <i>P. carrini</i>	P
C11	24	F	Peritonite aguda secundária a deiscência de sutura de alça intestinal. Broncopneumonia	Choque septicêmico	P
C12	29	F	Mixoma atrial trombosado, trombose venosa profunda; HAS; esteatose hepática; necrose tubular	Hipóxia pulmonar	P
C13	49	M	Insuficiência renal crônica; aterosclerose; nefrosclerose; infarto do miocárdio	Broncopneumonia bilateral	P
C14	42	M	Celulite ; Hepatopatia crônica ; Esteatose hepatocítica ;alcoolismo; pancreatite crônica leve e coledocite	Choque séptico	P
C15	44	F	HSA; Hepatopatia aguda; Insuficiência Renal Aguda; Encefalopatia hepática; Linfonomegalia peri-pancreática ; Esplenomegalia	Hepatite aguda fulminante	P
C16	20	F	Pielonefrite aguda extensa bilateralmente; anasarca; congestão pulmonar; congestão hepática e baço congesto	Choque séptico	P
C18	45	M	Doença linfoproliferativa hepato-esplênica; HAS; Obeso; Hepatoesplenomegalia; linfomegalia peri-pancreática, peri-hepática e peri-hilar;	Congelamento intra-vascular disseminada	P
C19	47	M	Carcinoma epidermoide de esôfago com metástases pulmonares e hepáticas; Esteatohepatite	Insuficiência respiratória/ Broncopneumonia bilateral e tuberculose	P
C20	55	M	Broncopneumonia/ Peritonite bacteriana	Choque séptico	C
C21	37	F	Pancreatite crônica calculosa	Choque séptico/ Broncopneumonia/	C

F: Feminino; M: Masculino; HAS: hipertensão arterial sistêmica. Tecido utilizado para ensaios moleculares: C:Material congelado; P: material conservado em parafina

3.3.IMUNOHISTOQUIMICA

Todos os pacientes tiveram caracterização histológica do córtex cerebral utilizando a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) com objetivo de avaliar a citoarquiteta e citomorfologia. Este procedimento faz parte da rotina de diagnóstico do Departamento de Anatomia Patológica/HC/UNICAMP. Quando diagnóstico foi considerado inconclusivo, utilizou-se a técnica de imunohistoquímica para os anticorpos anti-NeuN, anti-MAP-2 e anti-Nestina, descritos a seguir. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia-Patológica/HC/UNICAMP.

A primeira etapa da imunohistoquímica é a desparafinização, a qual visa a passagem dos cortes histológicos de uma situação hidrofóbica para uma hidrofílica. As lâminas foram incubadas em estufa histológica a 60°C por 30 minutos. Essa temperatura corresponde ao ponto de fusão da maioria das parafinas comerciais. Imediatamente após a retirada das lâminas da estufa, elas foram imersas num primeiro recipiente à temperatura ambiente contendo xilol (xilol I) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas na solução de xilol II e depois em no xilol III. A etapa de hidratação das peças consistiu na utilização de soluções com concentrações decrescentes de álcoois, sendo três banhos consecutivos de álcool absoluto, depois 80% e 50% por um período de dois minutos em cada solução, seguida de vários banhos em água destilada.

O passo seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena conseguida por intermédio da incubação das secções em 10% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS por um período de cinco minutos em três banhos de imersão e seguida de vários banhos em água destilada. As secções de cortes foram incubadas, dependendo da proteína a ser analisada, com tampão Tris-EDTA (pH 8,9) ou tampão citrato de sódio (pH 6,0) em panela a vapor por 30 minutos a 95°C, as lâminas foram lavadas por cinco minutos em água destilada.

Depois as lâminas foram mergulhadas em tampão PBS e secas com papel filtro. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo primário em câmara escura e úmida durante 30 minutos a 37°C e, dependendo do marcador faz-se necessário uma hora a temperatura ambiente, então o processo se completou com a incubação *overnight* de 4° a 8°C. Passando este período, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão PBS para a retirada do excesso de anticorpo, demorando cerca de cinco minutos cada processo de lavagem, secadas e foi adicionado o sistema de visualização *Envision Plus* que possui o anticorpo secundário, incubado por uma hora a 37°C.

Para a revelação foi usado diaminobenzidina (*DAB*, *Sigma*) na proporção de 1 mL do tampão diluente *DAB* para uma gota do Cromógeno. O progresso do escurecimento da

reação foi acompanhado visualmente e, as lâminas foram lavadas em água destilada, contra coradas com hematoxilina, lavadas novamente em água destilada, mergulhadas por alguns segundos em água amoniacal

Por último, as lâminas foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de álcool e, posteriormente, xilol, sendo montadas com lamínula em *Entellan*. Esperou-se um período mínimo de 24 horas de secagem das lâminas para, então, proceder às análises microscópicas. Detalhamento dos anticorpos primários utilizados na pesquisa:

- Anti-NeuN (Chemicon, MAB377), diluído a 1:1000 em tampão de citrato. Este anticorpo monoclonal reconhece uma proteína nuclear específica de neurônios denominada NeuN, também encontrada no corpo celular e prolongamentos proximais de neurônios de vertebrados. Fonte: <http://www.chemicon.com/browse/productdetail.asp?ProductID=MAB377>.
- Anti-MAP-2 (Invitrogen, M13), diluído a 1:500 em tampão de citrato. Este anticorpo reage com uma proteína do citoesqueleto associada a microtúbulos. É primariamente expressada na região somatodendrítica de neurônios, mas também encontrada na glia. Fonte: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/131500_Rev1008.pdf
- Anti-Nestina (Millipore, AB5922) : diluído a 1:500 em tampão de Tris-EDTA. Este anticorpo reage com uma proteína do grupo dos filamentos intermediários do citoesqueleto, expressa em vários tipos de células imaturas, embrionárias ou em rápida multiplicação. Fonte: <http://www.millipore.com/catalogue/item/ab5922>

3.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Foram realizadas dois tipos de extração de RNA total, um específico para tecido cerebral fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) e um segundo para tecido cerebral fresco congelado (FF) em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer.

3.4.1. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE TECIDO FORMALINA E EMBEBIDO EM PARAFINA

Para a extração do miRNA foi utilizado o kit *Recover All* (Ambion), seguindo recomendações do fabricante com alterações proposta por Goswani (2010), que inclui aumento do tempo de incubação com a enzima proteinase K.

3.4.2. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE TECIDO FRESCO CONGELADO

Os tecidos cerebrais criopreservados foram pulverizados em nitrogênio líquido com auxílio de um almofariz e pistilo e colocados em tubos de 1,5mL juntamente com 700 µL de Qiazol lysis contido no miRneasy kit (Qiagen, Alemanha). A extração do RNA total foi realizada de acordo com a descrição do fabricante.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*Nanodrop ND-1000*, Wilmington, EUA), e a integridade verificada em *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, CA, EUA).

3.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e com os RNA 6000 Pico Chips (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). Este procedimento foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas – SP).

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se com o preparo do gel, pipetando 550 µL do RNA 6000 Pico gel numa coluna com filtro e centrifugou-se por 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 µL foi colocada num tubo 0,5 mL livre de nuclease, depois foi adicionado 1 µL de RNA 6000 Pico *Dye*, levou-se ao vórtex por 10 segundos e depois centrifugou-se a 13.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Pico chip que foi colocado no equipamento *priming station* com os ajustes corretos para a leitura de RNAs. Primeiramente pipetou-se 9 µL da mistura gel/ dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, pipetou-se outros 9 µL da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se ainda 1 µL do marcador na posição indicada e 5 µL do RNA 6000 Pico Marker em cada uma das 11 amostras, bem como na posição do marcador. Por último, pipetou-se um µL de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um vórtex *IKA MS 3* (Manca, Hong Kong, CHN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por um minuto e em seguida, colocou-se o chip no *Bioanalyzer*. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroforograma) em 10 minutos de corrida eletroforética e do valor da integridade do RNA total através do RIN (RNA Integrity Number), uma escala que compreende de 1 a 10, em que 1 é considerado um RNA totalmente degradado e 10 um RNA íntegro.

3.6.MICROARRANJOS DE miRNAS

A técnica de microarranjos consiste, sucintamente, da deposição de sequências de pequenos oligonucleotídeos em posições específicas de uma lâmina de vidro, que é hibridizado contra as sequências de cDNAs ou como neste caso de miRNAs maduros marcados por fluorescência (Figura 2A).

Posteriormente, essa lâmina deve passar por um processo de digitalização, em que os fluorocromos são excitados emitindo, assim, sinais luminosos que são captados pelo scanner. Os dados originais de um experimento de microarranjos são imagens (Figura 2B) que representam os níveis de expressão dos miRNAs fixados no substrato, que devem ser analisadas por um *software* específico que gera uma tabela de dados numéricos contendo os valores de intensidade.

O microarranjo de miRNA utilizado aqui é o *Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays* (*Affymetrix Inc.*, EUA), todos os procedimentos foram realizados segundo protocolo do fabricante, que estão resumidos na Figura 3.

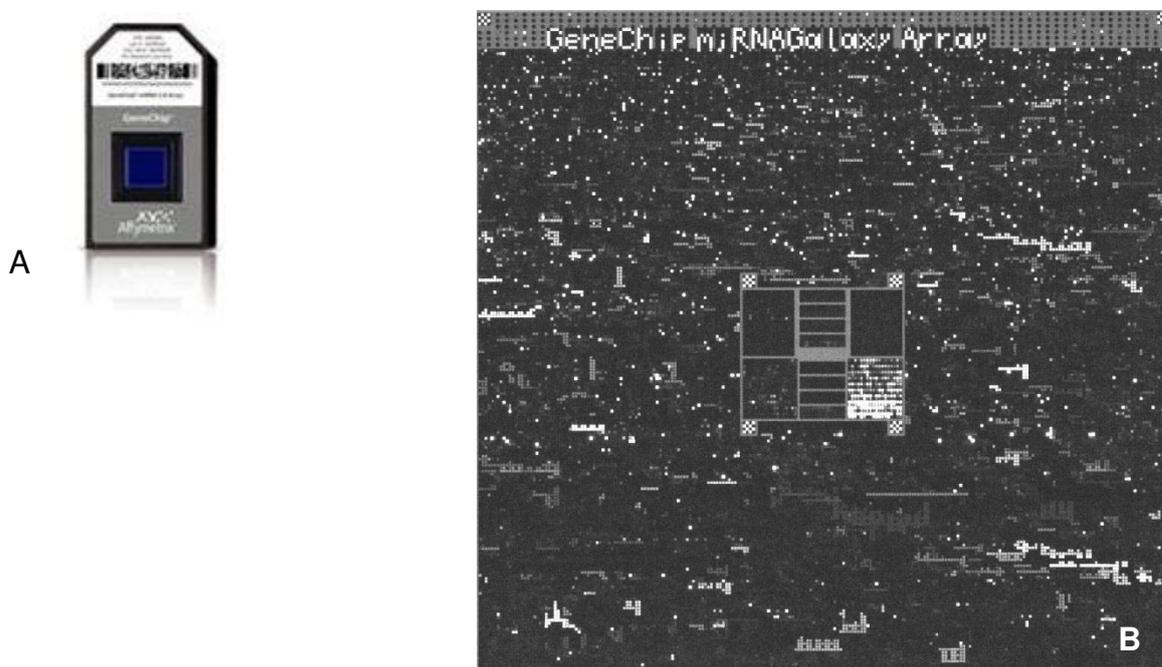


Figura 2. A : Lâmina (chip) *Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays* utilizada neste estudo. B: exemplo de uma imagem de microarranjo de miRNA após o escaneamento.

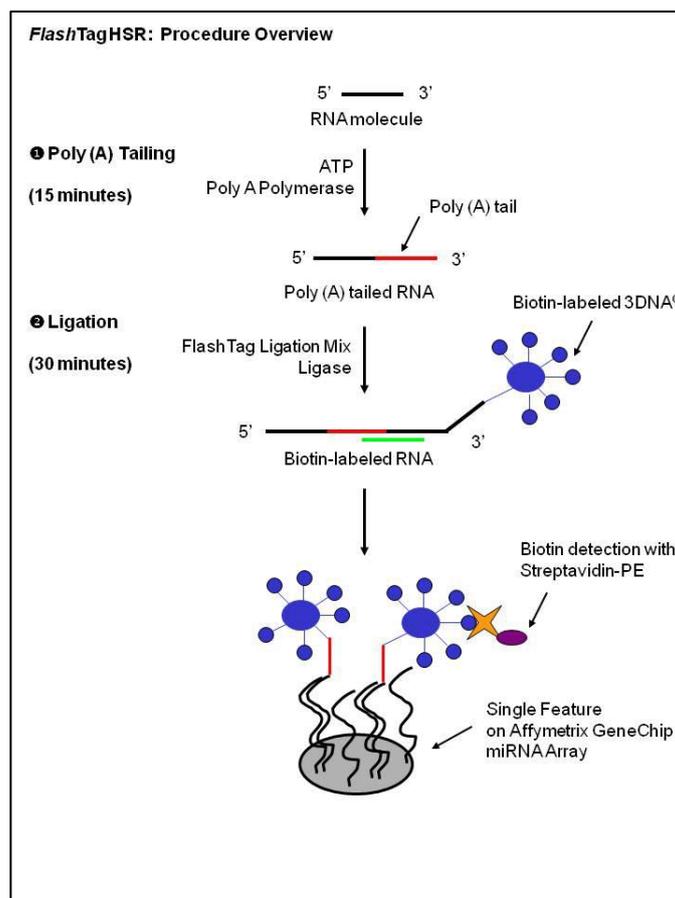


Figura 3. Esquema ilustrativo de adição da cauda poliA ao RNA total; marcação com biotina e hibridização do RNA marcado ao Affymetrix® GeneChip® miRNA Arrays. Fonte: FlashTag™ Biotin HSR.

1) ADIÇÃO DA CAUDA poliA

Partiu-se 200 ng de RNA total que foram ajustadas a um volume de 8 µL com água livre de RNase. Num tubo de 0,2 mL colocou-se os 8 µL de RNA, adicionou-se 2.0 µL de RNA Spike Control Oligos, 1.5 µL de tampão de reação, 1.5 µL de MnCl₂ 25mM, 1.0 µL de ATP (1:500) e 1.0 µL de enzima PAP (PoliA Polimerase). Agitou-se cuidadosamente e centrifugou-se. Incubou-se por 15 minutos a 37°C.

2) MARCAÇÃO COM BIOTINA

Adicionou-se 4.0 µL de mix Flash Tag Bioin HSR Ligation aos 15 µL além de 2.0 µL da Ligase DNA T4, misturou-se e incubou-se por 30 minutos a 25°C. A reação foi então parada com a adição de 2.5 µL de HSR Stop Solution. Retirou-se 2.0 µL desses 23.5 µL para verificar se a marcação com biotina havia ocorrido através *ELOSA QC Assay*, seguindo recomendações do fabricante. Se a marcação foi bem sucedida, seguiu-se para o passo de hibridização.

3) HIBRIDIZAÇÃO DO RNA MARCADO À LÂMINA

Ao RNA marcado com biotina (21.5 µL), adicionou-se 1.7 µL de oligonucleotídeo controle B2 (3nM), 5µL de controle eucariótico para hibridização (20x), 50 µL de tampão de hibridização (2x), 10µL DMSO, 15 µL de formamida 27.5%. Incubou-se a mistura a 99°C por cinco minutos e depois a 45°C por cinco minutos. Transferiu-se a mistura (100 µL) para a lâmina do *GeneChip miRNA Array*, a qual é constituída por um conjunto de 6703 sondas que abrange 71 organismos, sendo 847 sequências de miRNAs maduros humanos, oriundas da versão 11 do base de dados de miRNAs (<http://www.mirbase.org>). Posteriormente, as lâminas foram incubadas no forno de hibridização *GeneChip® Hybridization Oven 645 (Affymetrix)* à 48°C numa rotação de 60rpm por 16 horas. Seguindo o protocolo, as lâminas foram lavadas utilizando a *Fluidics Station 450* e cada chip foi escaneado por meio do *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA). Estas etapas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas – SP).

4) LEITURA DOS CHIPS

Os sinais gerados pela hibridização dos RNA biotinizados das amostras às sequências presentes nos chips de microarranjos foram capturadas utilizando-se um scanner a laser, *GeneChip® Scanner 3000 7G*. O programa de aquisição das imagens é dado pelo *GeneChip® Operating Software (GCOS)*.

5) ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRANJOS

A análise dos dados de microarranjos consistiu de duas etapas, a normalização das lâminas e o estudo de expressão diferencial do miRNAs.

NORMALIZAÇÃO DAS LÂMINAS (CHIPS) DE MICROARRANJOS DE miRNAs

O algoritmo utilizado para normalização neste trabalho foi o *Robust Multichip Averaging* (RMA), que se encontra dentro do projeto *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org>), desenvolvido em ambiente R. Ele executa a correção do ruído de fundo (*background correction*), a normalização e a sumarização dos dados a fim de converter os níveis de intensidade das sondas em valores de expressão dos miRNAs.

A correção do ruído de fundo baseia-se na intensidade de sinal obtida no perfeito pareamento entre as sondas contidas no chip e a amostra de miRNA. A normalização utilizada é a *quantile*, a qual se utiliza da intensidade bruta de todas as lâminas para construir a intensidade média de todas as sondas. Por fim, a sumarização dos dados

utiliza a *Median Polish* de *Tukey* para seguir o modelo linear nos dados já corrigidos e normalizados convertidos para o log de base 2 a fim de estimar o valor real da expressão dos miRNAs. O RMA utiliza arquivos.cel, provenientes do software *Affymetrix miRNAQctool*.

ESTUDO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE miRNAS

A fim de avaliar a presença de miRNAs diferencialmente expressos, foi realizada a análise de expressão diferencial de miRNAs entre o grupo caso (subtipo 2a e 2b) e grupo controle; subtipo 2a e 2b; subtipo 2a e controle e subtipo 2b e controle, utilizando o programa *Rankprod* (Hong, 2006). Este programa estima a razão de expressão (fold-change; FC) entre os grupos para cada miRNA. De acordo com Birks (2011), foi definido um valor limiar de FC = 1,5 para decidir se o miRNA em questão era diferencialmente expresso ou não. A fim de se evitar resultados falso-positivos devido ao problema de múltiplos testes, os valores de p foram corrigidos utilizando False Discovery Rate (FDR), descrito por Benjamini e Hochbergque (1995), o qual se baseia em um algoritmo de ordenamento de dados para estimar valores corrigidos de p, denominados *q-value*, sendo que valores de *q-value* ≤ 0.05 podem ser considerados estatisticamente significativos.

3.7. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)

3.7.1. QUANTIFICAÇÃO DOS miRNAs

Com o objetivo de confirmar os miRNAs encontrados diferencialmente expressos nos experimentos de microarranjos utilizou-se uma segunda técnica - a reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR).

Com o RNA extraído foi realizada a reação de transcrição reversa com o kit *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas em volume final de 15 μ L (0.15 μ L de dNTPs 100mM, 1 μ L de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50U/ μ L), 1.5 μ L de 10X Reverse Transcription Buffer, 0.094 μ L de RNase Inhibitor (20U/ μ L) e 4.256 μ L de água livre de nuclease, além de 3 μ L de iniciador específico para cada miRNA e 5 μ L da amostra de RNA (2ng/uL,) A reação foi feita com os seguintes parâmetros: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 5 minutos a 85°C.

Utilizou-se o *TaqMan™* (*Applied Biosystems*) para quantificação dos transcritos de miRNAs seguindo as recomendações do fabricante: em triplicatas com volume final de 10 μ L, contendo 5.0 μ L de Master Mix, 1.0 μ L de sonda (20X), 3.0 μ L de água Milli-Q e 1 μ L de cDNA. As condições da reação foram de 95°C por 10 minutos e 40

ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, realizadas no termociclador *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. System* (Applied Biosystems, CA, EUA) A Quantificação relativa foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os miRNAs RNU24 e RNU48 foram escolhidos como controles endógenos das reações.

3.7.2. QUANTIFICAÇÃO DOS PROVÁVEIS GENES-ALVOS

A síntese de cDNA foi realizada com 150 ng de RNA total, 1 µL de oligo (dT) e 1 µL de DNTP 10 nM e completou-se com água livre de nuclease para um volume final de 12 µL, segundo instruções do fabricante (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 25°C por cinco minutos, 50°C por uma hora e 70°C por 15 minutos. As amostras permaneceram a 65°C durante cinco minutos e depois foram colocadas imediatamente no gelo. Em seguida, acrescentou-se 4 µL de Buffer 5x, 1.0 µL de DTT 0.1M e 0.5 µL de enzima *SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase* (200U/ µL) (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 25°C por cinco minutos, 50°C por uma hora e 70°C por 15 minutos.

Para os experimentos de quantificação da expressão dos prováveis genes-alvos, foi realizada, inicialmente, a validação dos assays para verificar se as eficiências de amplificação dos genes selecionados. A reação foi feita em volume final de 10µL em triplicatas, contendo 5.0µL de Master Mix, 1.0µL de sonda (20X), 3.0µL de água Milli-Q e 1µL de cDNA. Utilizou-se termociclador *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. System* (Applied Biosystems, CA, EUA). As condições da reação foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. A quantificação relativa foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e foram utilizados como controle endógeno os genes GAPDH e HPTR .

3.8. SELEÇÃO DOS GENES ALVOS POR ANÁLISE *IN SILICO*

Para identificação dos genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos foram utilizadas a ferramenta de busca de alvos miRGen (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi#Results>), que de forma geral, buscam a predição de RNAm alvos de um dado miRNA pela busca de regiões complementares entre a região 5'UTR do miRNA de interesse e a região 3'UTR de transcritos humanos disponíveis no banco de dados de transcriptomas, além das possíveis vias metabólicas envolvidas.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE qPCR

Visto que a amostra analisada não segue uma distribuição normal dos dados, foi realizado o teste não-paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* a fim de validar os dados

de expressão diferencial dos miRNAs encontrados no chip de microarranjo e, posteriormente, dos possíveis genes relacionados a estes miRNAs. Todos os dados foram corrigidos por *Bonferroni*, para as quatro comparações realizadas: grupo caso (subtipo 2a e 2b) versus grupo controle; subtipo 2a versus 2b; subtipo 2a versus controle e subtipo 2b versus controle.

3.10.MICRODISSEÇÃO A LASER

Com o objetivo de verificar a expressão dos miRNAs nas células em balão foi utilizada a técnica de microdissecção a laser (LMC). Para tal, foram feitos, em blocos de tecidos congelados, 10 cortes de 6 µm cada. Os blocos foram montados em lâminas livres de nuclease e armazenados a 80° C. Os cortes foram re-hidratados durante três minutos em etanol 100%, 20 segundos em etanol a 95%, 20 segundos em etanol a 75% e mais 20 segundos em etanol a 50%. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina durante 40 segundos, enxaguados em água livre de nuclease durante 5 minutos, corados com eosina por dois segundos e enxaguados com água livre de nuclease por 5 minutos. As lâminas foram imersas respectivamente em etanol a 50%, 75%, 95% e 100% durante 20 segundos cada e xilol durante cinco minutos.

O microdissecador *PALM MicroBeam System* (Zeiss, Alemanha) foi utilizado para microdissecação, seguindo recomendações do fabricante. Foram microdissecados aproximadamente 1000 neurônios e a mesma quantidade de células em balão. As células microdissecadas foram depositadas num microtubo de 600 µL, em seguida realizou-se a extração do RNA total (kit *miRneasy*) e estudos de expressão com a técnica de qPCR, como descrito nos tópicos anteriores.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E DE NEUROIMAGEM

Todos os pacientes pertencentes a nossa casuística foram analisados clinicamente por neurologistas e tiveram o diagnóstico prévio de DCF por exames de ressonância magnética de alta resolução.

Foi possível visualizar como exemplo de um exame de RM para DCF tipo 2a, o “borramento” da transição cortico-subcortical na região frontal esquerdo e há também um sulco vertical anormal, Figura 4. O mesmo paciente, observou-se a distribuição anômala dos neurônios e alterações que consistem de neurônios piramidais anormalmente grandes, com perda da orientação, na profundidade de alguns sulcos e áreas limítrofes (Figura 5).

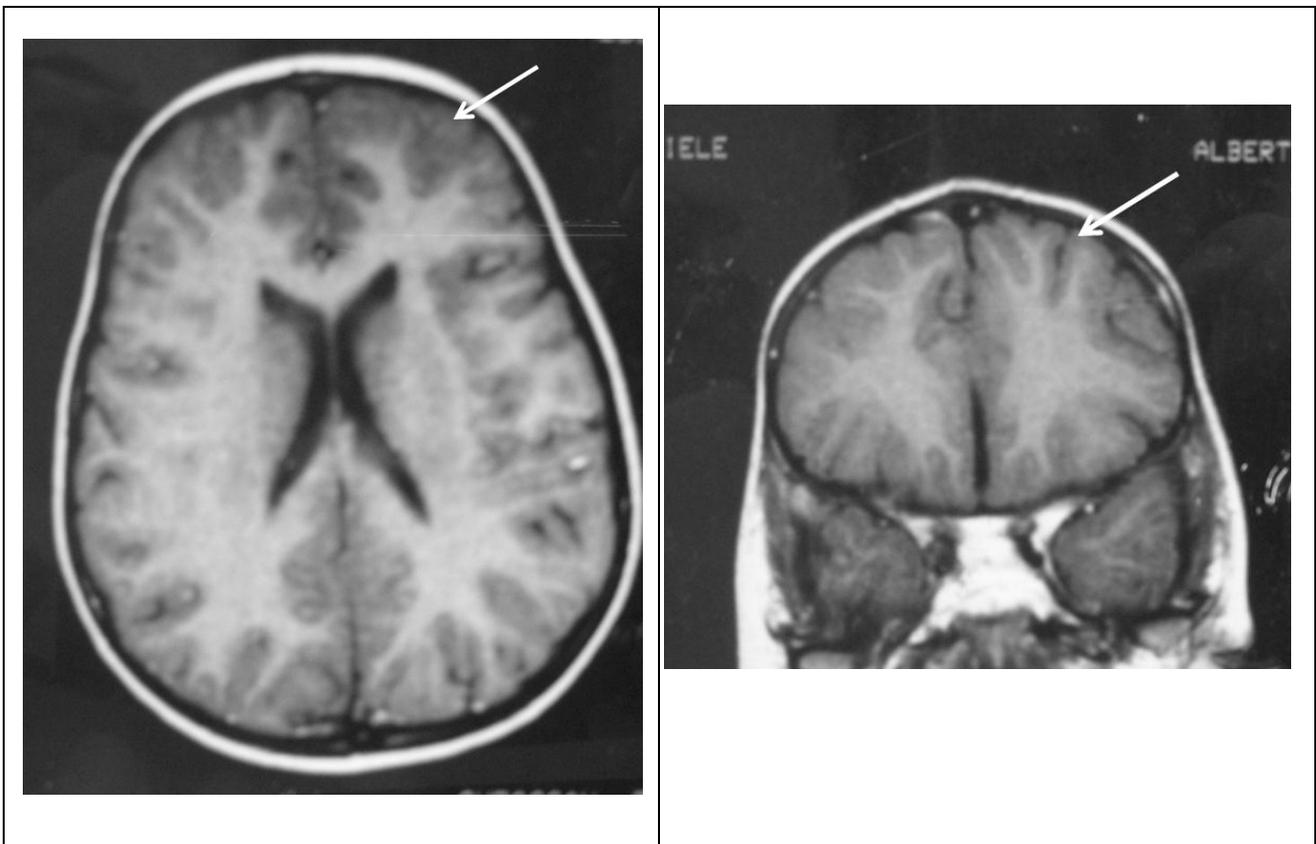


Figura 4. RM mostrando cortes axial(esquerda) e coronal (direita) de uma paciente com DCF, tipo 2a.

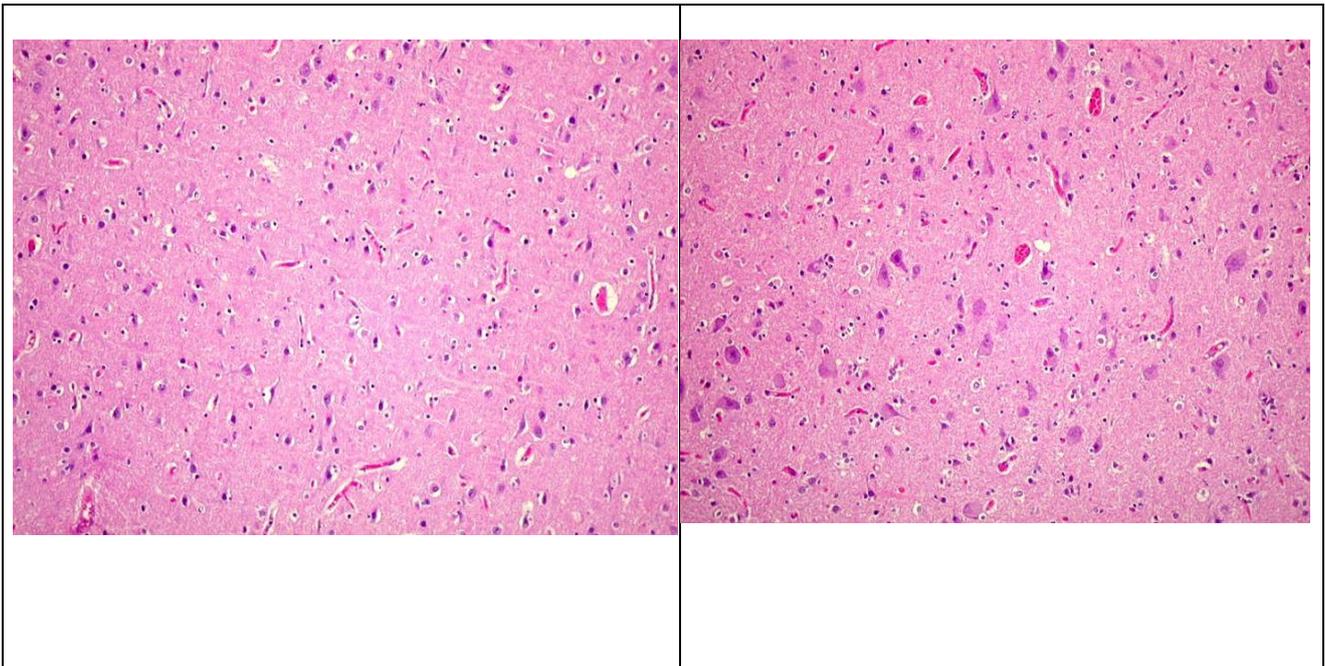


Figura 5. Citoarquitetura de um córtex normal (esquerda) e de um com DCF tipo 2a(direita), em que se verifica a desorganização citoarquitetural com neurônios dismórficos.H&E, 10X.

A Figura 6 mostra um outro exemplo de RM para displasia cortical focal. Nota-se um espessamento do córtex e perda da definição da transição entre substância cinzenta e branca.

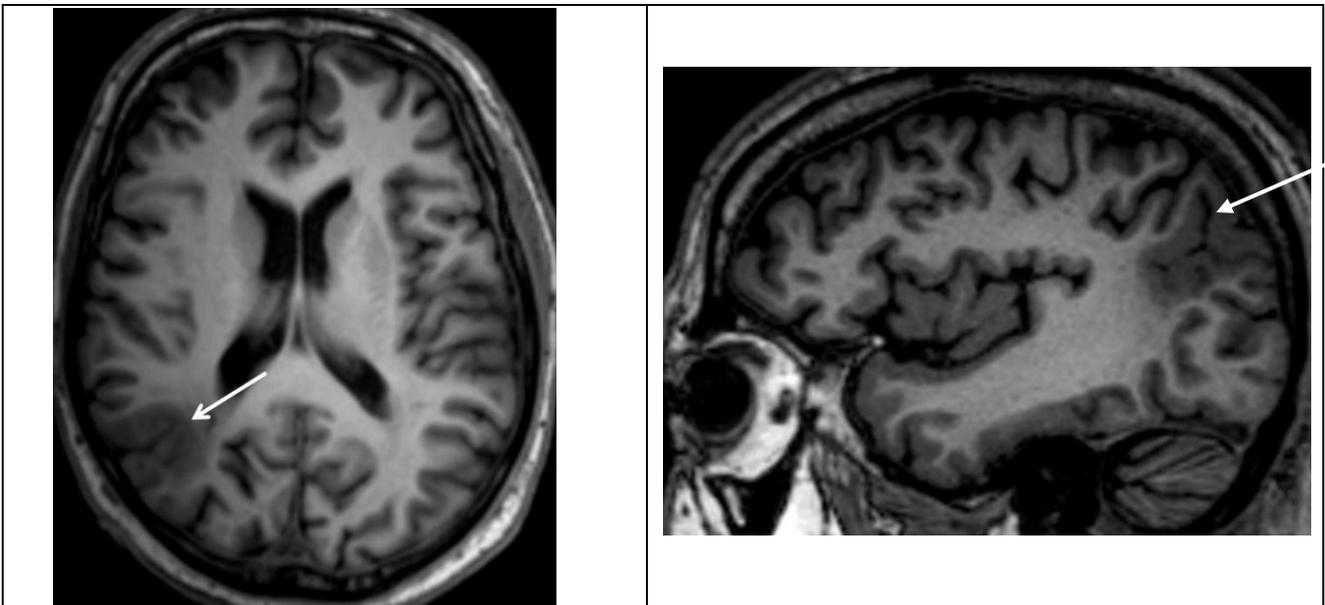


Figura 6. RM mostrando cortes axial e sagital e de uma paciente com DCF, tipo 2b.

Já na Figura 7, podemos observar um exemplo de exame histopatológico para DCF tipo 2B. Nota-se a presença de neurônios hipertróficos (Figura 7A), na camada molecular, além da presença de neurônios dismórficos com distribuição irregular dos corpúsculos de Nissl (Figura 7B, 7C, respectivamente) e células em balão com citoplasma intensamente eosinófilo, (Figuras 7D e 7E).

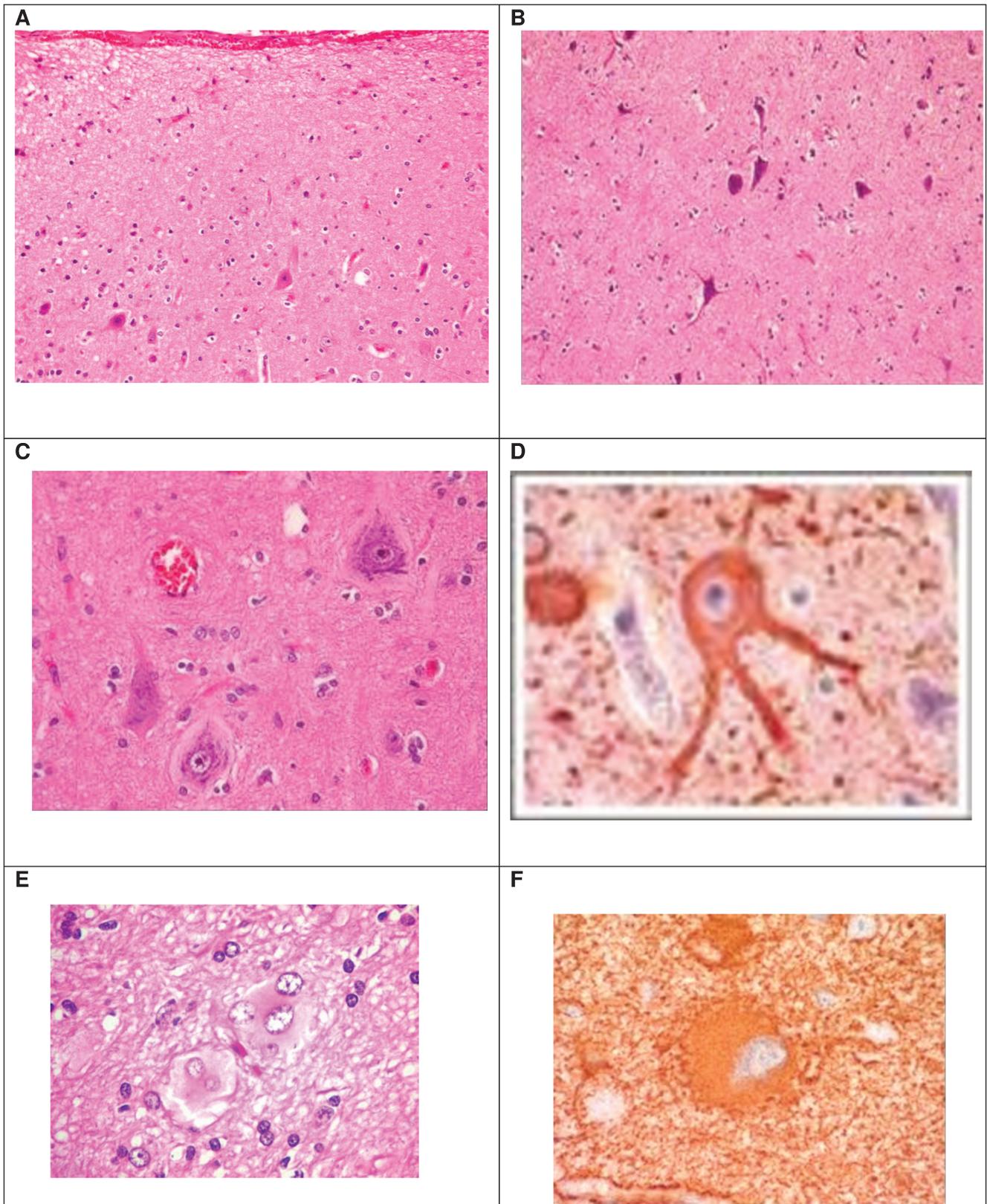


Figura 7. Achados histopatológicos de um paciente com DCF tipo 2b A: neurônios hipertróficos (20X), B, C, D: neurônios dismórficos (20x,40x e 100X respectivamente); E e F: células balão (100X). A,B,C e H: H&E; D: imunocoloração para MAP2; F: imunocoloração para nestina

4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.2.1. EXTRAÇÃO DE RNA: QUANTIDADE E QUALIDADE

O RNA extraído de amostras dos pacientes e dos controles oriundos de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) apresentaram valores de concentração e qualidade (A260/280, A260/230 e RIN) descritos no Quadro 3. Os valores de concentração e do RIN se apresentaram baixos, em especial os valores do RIN, em torno de dois, o que significa que este RNA está degradado. Esperava-se que os valores de integridade fossem baixos, uma vez que os blocos de parafina de onde foi extraído o RNA estavam arquivados há pelo menos dois anos e a degradação é proporcional ao tempo de exposição ao ambiente e à ação da formalina.

Embora essa seja uma característica a primeira vista insatisfatória para as análises de microarranjos e de qPCR, essa desvantagem é apenas aparente para o estudo de miRNAs uma vez que por serem pequenos e não possuírem cauda poliA, os miRNAs sofrem menos os efeitos da degradação do RNA e a ação da formalina (Li, 2007; Xi, 2007; Zhang, 2008). Além disso, tanto os controles como os pacientes apresentaram valores de RIN semelhantes (Gráfico 1), o que evidencia que a degradação ocorreu igualmente tanto para um grupo como para outro.

Quadro 3. Valores de qualidade e quantidade do RNA total oriundos de tecido cerebral FFPE. []: concentração de RNA em ng/μL; RIN: RNA Integrity Number; nd: não disponível

Código	[]	A260/280	A260/230	RIN	Código	[]	A260/280	A260/230	RIN
P1	128.3	1.98	1.64	2.50	C2	127.7	2.03	0.58	2.10
P2	52.2	1.87	0.35	1.0	C3	49.4	1.76	0.80	2.30
P3	103.7	1.91	0.43	1.70	C4	31.9	1.82	0.29	2.40
P4	55.7	1.82	0.43	1.10	C5	31.8	1.66	0.38	2.20
P5	110.5	1.89	0.48	3.90	C7	34.5	1.79	1.84	2.30
P6	84.7	1.78	1.10	1.0	C9	41.2	1.79	0.23	2.30
P7	27.0	1.79	0.43	6.60	C12	33.5	1.78	0.15	2.50
P8	125.3	1.86	1.26	2.10	C14	17.7	0.96	0.19	2.30
P9	31.9	1.84	0.68	2.30	C15	8.0	1.73	0.03	2.50
P10	31.2	1.88	0.19	2.30	C16	43.1	1.76	0.08	2.30
P11	150.9	2.0	1.82	1.50	C18	28.0	1.82	0.11	2.10
P13	25.0	2.27	0.27	2.40	C19	40.8	1.81	0.34	2.20
P14	43.1	1.89	0.48	nd					
P15	37.9	1.64	0.60	nd					
P17	70.8	1.84	0.22	nd					
P18	78.7	1.85	0.33	nd					

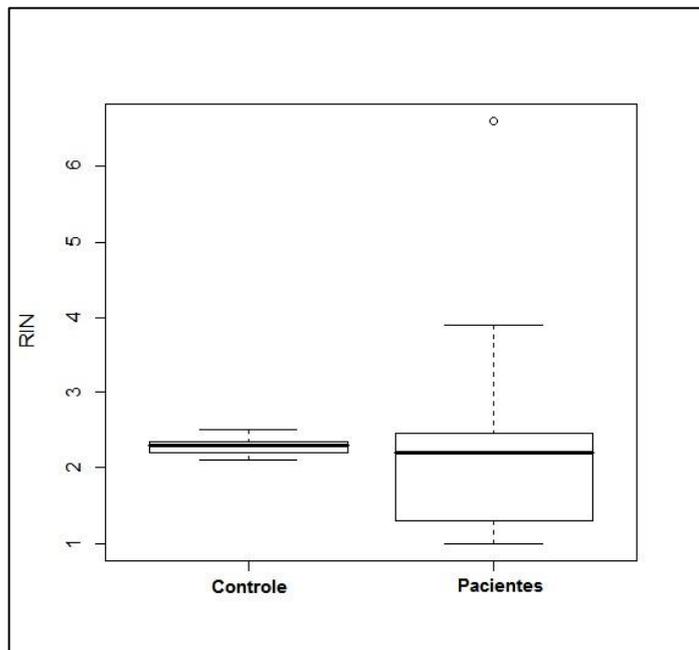


Gráfico 1. Box plot dos valores de RIN de pacientes e controles, em que se observa as medianas dos valores de RIN de controles e pacientes praticamente iguais.

O RNA extraído de amostras dos pacientes e dos controles oriundos de tecido fresco congelado apresentaram valores de concentração e qualidade satisfatórios.

4.2.2.MICROARRANJOS DE miRNAS

Neste experimento foram utilizados amostras de tecidos de quatro pacientes (P2, P8, P10 e P11) do tipo 2a, cinco do tipo 2b (P1, P3, P4, P5 e P7) e cinco controles (C3, C4, C9, C16 e C18) com objetivo de identificar miRNAs diferencialmente expressos quando comparados ao tecido de indivíduos controles. Os resultados dos experimentos de microarranjos identificaram 39 miRNAs humanos diferencialmente hipoexpressos e um miRNA hiperexpresso (Gráfico 2).

O Gráfico 2, um volcano plot, é usado frequentemente em experimentos de microarranjos com o objetivo de possibilitar uma visão geral dos miRNAs de interesse. Para a construção deste gráfico foram considerados os dados normalizados de todas as lâminas de controles e pacientes e estabelecido dois valores de limiar para determinar os miRNAs diferencialmente expressos: *Fold Change* (FC) maior que o valor absoluto de 1.5 e q-value ≤ 0.05 .

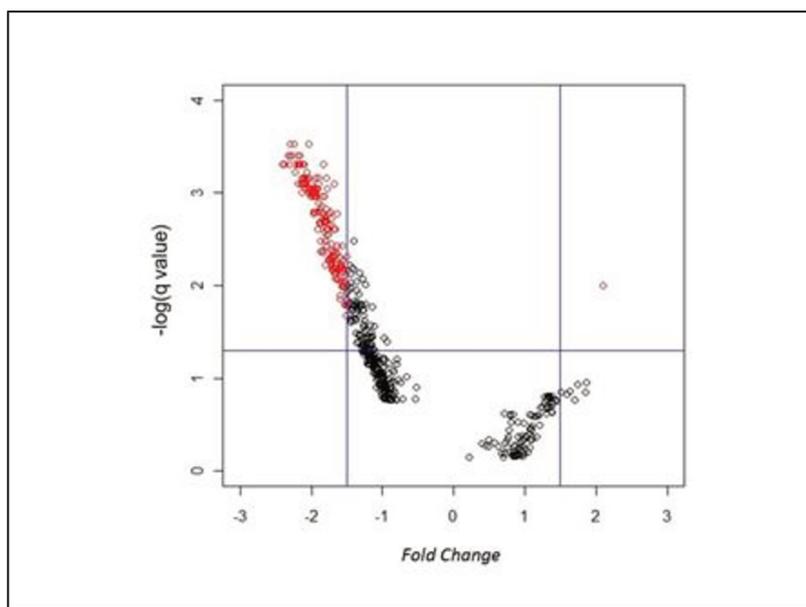


Gráfico 2. Volcano plot com panorama da expressão dos miRNAs. Pontos em vermelho indicam miRNAs diferencialmente expressos quando o *Fold Change* (FC) foi maior que o valor absoluto de 1.5 e *q-value* ≤ 0.05 .

Com objetivo de verificar a presença de uma assinatura molecular diferente entre os subtipos da DCF foram feitas comparações com os miRNAs encontrados diferencialmente expressos entre os grupo caso (2a e 2b) versus controle, 2a versus 2b, 2a versus controle e 2b versus controle. Na Tabela 1 observa-se os miRNAs que foram encontrados diferencialmente expressos quando foi comparado grupo caso (2a e 2b) versus controle.

Tabela 1. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado grupo caso e controle.

miRNAs	FC	q
hsa-miR-1274a	-1,5801	0
hsa-miR-486-5p	-1,6559	0
hsa-miR-106a	-1,2159	0,0018
hsa-miR-31	-1,0816	0,005
hsa-miR-92b	-1,0392	0,0112
hsa-miR-886-5p	+1,855	0

Sinais (-) e (+): miRNA hipoexpresso e hiperexpresso, respectivamente. FC: *Fold Change*; q: *q-value*

Na Tabela 2, observa-se os miRNAs encontrados quando foi feita a comparação entre subtipo 2a versus controle.

Tabela 2. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2a e controle.

miRNAs	FC	q
hsa-miR-486-5p	-2,9117	0
hsa-miR-886-5p	+2,3445	0
hsa-let-7f	+1,5569	0,0167

Sinais (-) e (+): miRNA hipoexpresso e hiperexpresso, respectivamente. FC: *Fold Change*; q: *q-value*

Os miRNAs encontrados diferencialmente expressos quando comparados subtipo 2b e controle encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2b e controle.

miRNAs	FC	q
hsa-miR-1274a	-1,4697	0,0275
hsa-miR-106a	-1,5023	0,0412
hsa-miR-31	-1,8552	0,015
hsa-miR-1182	+1,4111	0,0433

Sinais (-) e (+): miRNA hipoexpresso e hiperexpresso, respectivamente. FC: *Fold Change*; q: *q-value*

Na Tabela 4 encontra-se os miRNAs identificados quando o subtipo 2a foi comparado com 2b.

Tabela 4. MiRNAs diferencialmente expressos em DCF analisados por microarranjos de miRNAs quando comparado subtipo 2a versus 2b.

miRNAs	FC	q
hsa-miR-106a	-2,4814	0,0011
hsa-miR-31	-1,6301	0,0307
hsa-miR-92b	-1,6029	0,0321
hsa-miR-886-5p	-2,0014	0,0097
hsa-miR-195	-2,7975	0
hsa-miR-379	-2,855	0
hsa-let-7f	-2,555	0,0005
hsa-let-7g	-2,324	0,0009
hsa-miR-23a	-2,7385	0,001
hsa-miR-17	-2,3943	0,0012
hsa-miR-708	-2,0198	0,0013
hsa-miR-34a	-2,2265	0,0018
hsa-let-7i	-1,9938	0,0026
hsa-miR-126	-2,0038	0,0032
hsa-miR-20a	-2,0303	0,0065
hsa-miR-27b	-2,1354	0,008
hsa-miR-30c	-1,9247	0,008
hsa-miR-143	-1,8084	0,0159
hsa-miR-625	-1,4533	0,0163
hsa-miR-338-5p	-1,5396	0,0185
hsa-miR-361-5p	-1,5294	0,0193
hsa-miR-20b	-1,4365	0,0243
hsa-miR-25	-1,5301	0,0277
hsa-miR-652	-1,6482	0,0296
hsa-miR-1202	-2,1854	0
hsa-miR-1224-5p	-2,2296	0
hsa-miR-663	-1,6753	0,0081
hsa-miR-1207-5p	-1,5692	0,0082
hsa-miR-575	-1,5735	0,0086
hsa-miR-371-5p	-1,6316	0,0089
hsa-miR-150	-1,6443	0,0091
hsa-miR-572	-1,5935	0,0093
hsa-miR-1225-5p	-1,6886	0,0096
hsa-miR-1268	-1,7364	0,01
hsa-miR-92b	-1,5713	0,012
hsa-miR-1260	-1,4372	0,0123
hsa-miR-939	-1,4889	0,0168

Sinais (-) e (+): miRNA hipoexpresso e hiperexpresso, respectivamente. FC: *Fold Change*; q: *q-value*

Dentro da lista de miRNAs identificados foi feita uma seleção de 10 miRNAs para posterior confirmação pela técnica de qPCR (Tabela 5). Esta seleção levou em conta os maiores valores absolutos de *Fold Change*, os menores valores de *q-value*, os miRNAs que se mostraram capazes de diferenciar os subtipos da DCF tipo 2 (Tabelas 1 a 4) e dados disponíveis na literatura que pudessem evidenciar alguma relação com a doença estudada. Há dois miRNAs (hsa-miR-1182 e hsa-miR-1274a) que não foi encontrada nenhuma informação sobre a atuação do mesmo na literatura havendo, portanto potencial para a descoberta de novos dados referentes aos suas funções.

Tabela 5. Lista dos miRNAs selecionados para serem validados por qPCR

miRNA	<i>Fold Change</i>	<i>q-value</i>	Possível função	Vias metabólicas envolvidas
hsa-let-7f	-2,555	0,0005	Migração celular	Transporte de potássio; migração celular
hsa-miR-23a	-2,7385	0,001	Epileptogênese e tumorigenese	Neurogênese; proliferação celular
hsa-miR-31	-1,8552	0,015	Diferenciação celular	Diferenciação celular; agente anti-metástasico
hsa-miR-34a	-2,2265	0,0018	Proliferação celular	Proliferação e migração celular; sinapse
hsa-miR-106a	-2,4814	0,0011	Diferenciação celular	Diferenciação celular
hsa-miR-379	-2,855	0	Crescimento dendrítico	Diferenciação celular
hsa-miR-486-5p	-2,9117	0	Migração celular	Receptor de neuropeptídeo
hsa-miR-886-5p	2,3445	0	Proliferação celular	*
hsa-miR-1182	1.41	0.04	*	*
hsa-miR-1274a	-1.59	0	*	*

*Nada foi encontrado na literatura ou na base de dados de alvos de miRNAs no momento da pesquisa.

4.2.3. VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJOS DE miRNAs POR qPCR

Para validação dos dados obtidos dos microarranjos de miRNAs por qPCR foram utilizadas amostras de um grupo de onze pacientes sendo quatro do grupo 2a (P2, P8, P10 e P11) e sete do grupo 2b (P1, P3, P4, P5, P6, P7 e P9). Os dados foram comparados com amostras de 12 cérebros normais (C2, C3, C4, C5, C7, C9, C12, C14, C15, C16, C18 e C19).

Foram selecionados os miRNAs hsa-let-7f, hsa-miR-23a, hsa-miR-31, hsa-miR-34a, hsa-miR-106a, hsa-miR-379, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-1274a, que na análise de microarranjos de miRNAs estão hipoexpressos e hsa-miR-886-5p, hsa-miR-1182 que estão hiperexpressos (Tabela 5). Este último foi selecionado, mesmo com FC menor de 1.5, porque se mostrou um miRNA capaz de diferenciar o grupo 2b, foi encontrado hiperexpresso e, como mencionado anteriormente, não havia nenhuma informação sobre a sua função na literatura.

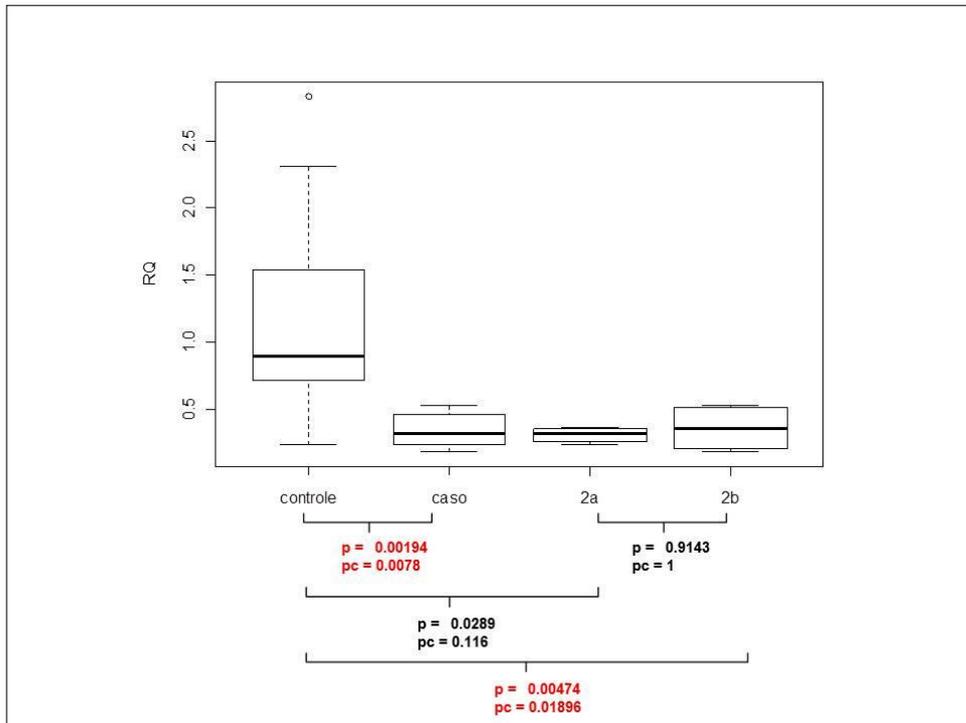
Dos 10 miRNAs selecionados para validação, três deles mostraram valores estatisticamente significativos: hsa-miR-31 com valor de *p-value* de $p=0.0078$ (Gráfico 3), hsa-miR34a, $p=0.021$ (Gráfico 4) e hsa-let-7f, $p=0.039$ (Gráfico 5). Todos os valores de *p* foram corrigidos por Bonferroni.

Em todos os três miRNAs (hsa-miR-31, hsa-miR34a, hsa-let-7f), foi possível distinguir pacientes (grupo caso) do grupo controle e todos foram encontrados com expressão diminuída, confirmando desta forma os achados identificados nos microarranjos.

O hsa-miR-31 foi encontrado também hipoexpresso na comparação grupo de pacientes do tipo 2b versus controle, $p=0.018$ (Gráfico 3). Este achado pode indicar uma provável assinatura molecular (biomarcador) para distinguir pacientes com DCF tipo 2b.

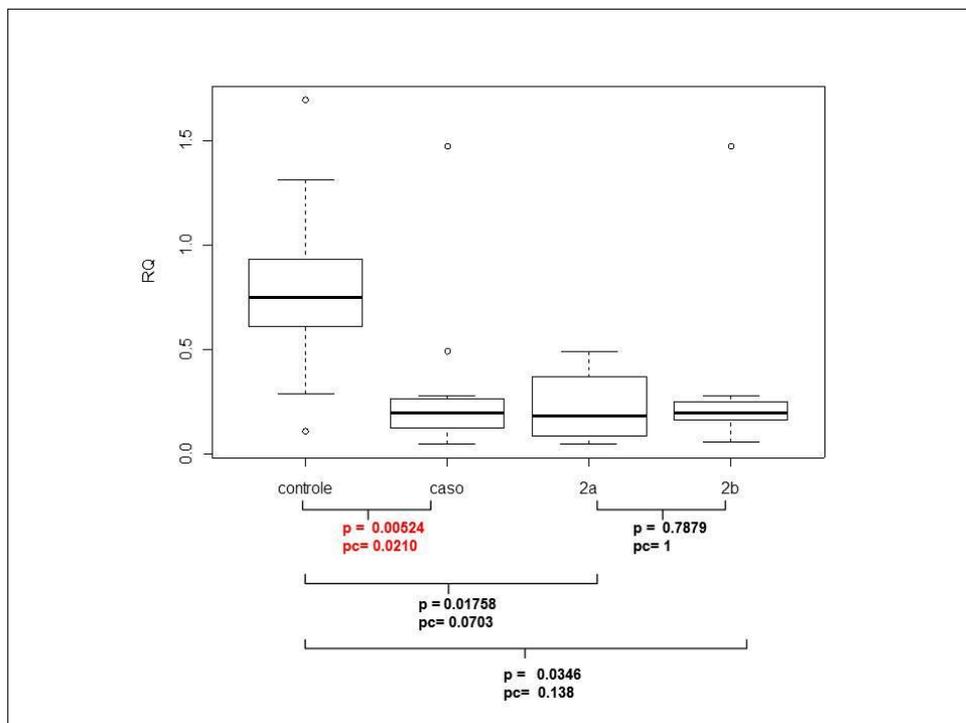
Para os outros miRNAs testados (hsa-miR-23a, 106a ,379, 486-5p, 886, 1182, 1274a) os valores de *p-value* não foram estatisticamente significativos em nenhuma das comparações e os gráficos encontram-se no Anexo 4.

Gráfico 3. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-31, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



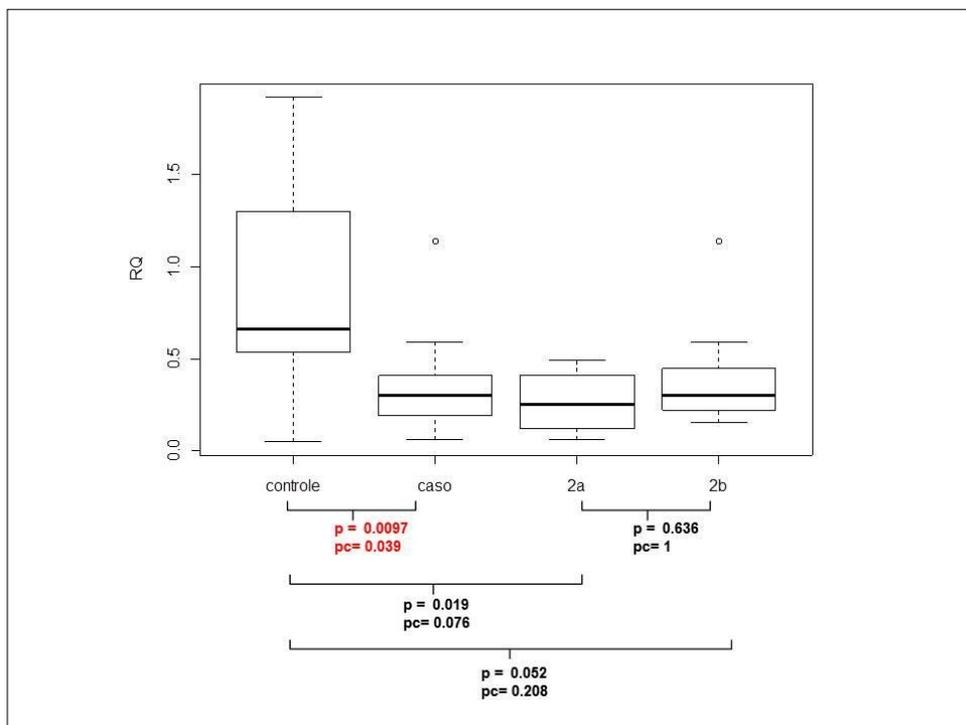
$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho. Neste caso foram encontrados diferenças estatísticas quando comparado grupo caso e subtipo 2b versus controle.

Gráfico 4. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-34a, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho. Observa-se diferenças estatisticamente significativas quando analisado grupo caso versus controle.

Gráfico 5. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-let-7f, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



p = *p-value*; pc= *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho e neste caso mostram-se significativas para a comparação controle versus caso.

4.2.4. SELEÇÃO DOS GENES ALVOS POR ANÁLISE *IN SILICO*

Para identificação dos genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos (hsa-miR-31, hsa-miR-34a e hsa-let-7f) foi utilizada a ferramenta miRGen ([://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi](http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi)) que faz a intersecção de três das principais bases de dados de predição de genes alvos de miRNAs – miRanda, PicTar e TargetScan -, quando não foi possível identificar nenhum alvo por meio da intersecção, optou-se pela união das três bases de dados. Esse programa fornece os possíveis genes alvos, além das possíveis vias metabólicas envolvidas. Para refinar a seleção se utilizou de busca pelas palavras chaves “neurogênese”, “diferenciação celular”, “ migração celular”, “proliferação celular” e por dados da literatura sobre a relevância dos genes propostos com relação à doença estudada. Tabela 6 mostra os genes alvos selecionados como candidatos a serem regulação por esses miRNAs.

Tabela 6. miRNAs validados por qPCR e os genes alvos selecionados

miRNA	Gene alvo	Possível função
hsa-let-7f	<i>MAP4K3</i>	Proliferação celular
hsa-let-7f	<i>SEMA4C</i>	Orientação de axônios e dendritos
hsa-let-7f	<i>GAS7</i>	Proliferação neuronal
hsa-mir-34a	<i>JAG1</i>	Migração e proliferação celular
hsa-mir-34a	<i>SYT1</i>	Refratariedade de crises epilépticas
hsa-mir-34a	<i>NOTCH1</i>	Diferenciação celular
hsa-miR-31	<i>SATB2</i>	Crescimento axonal e desenvolvimento cortical
hsa-miR-31	<i>PAFAH1B1</i>	Neurogênese e diferenciação celular
hsa-miR-31	<i>SLC1A2</i>	Transportador de glutamato
hsa-miR-31	<i>NEUROG2</i>	Diferenciação neuronal

4.2.5. VALIDAÇÃO DOS GENES ALVOS POR qPCR

Neste experimento foram utilizados quatro pacientes (P8, P10, P11 e P18) do tipo 2a, quatro do tipo 2b (P1, P3, P5 e P6) e oito controles (C2, C4, C5, C9, C7, C12, C16 e C19). O objetivo deste experimento foi verificar se os genes alvos selecionados estão sendo regulados negativamente pelos miRNAs validados quando comparados a um grupo controle (tecido cerebral normal).

Foram selecionados dez genes *MAP4K3*, *SEMA4C*, *GAS7*, *JAG1*, *SYT1*, *NOTCH1*, *SATB2*, *PAFAH1B1*, *SLC1A2*, *NEUROG2* (Tabela 6). E com a finalidade de verificar uma assinatura molecular entre os subtipos da DCF, também foram feitas comparações com os genes selecionados entre os grupos caso (2a e 2b) e controle, 2a versus 2b, 2a e controle e 2b e controle.

A amplificação desses 10 genes foi difícil por conta da degradação do RNA total oriundo de material parafinado tanto do grupo caso como do grupo controle, com variações muito grandes entre os valores de Ct das triplicatas, muito provavelmente pela presença de grupos monometilol que impedem o anelamento dos primers, dificultando a amplificação (Xi, 2007 e Farragher, 2008). Tentamos inúmeras possibilidades para melhorar o poder e a qualidade da amplificação, mas em apenas quatro genes foi possível avaliar a expressão e em nenhum deles foi observada diferenças estatisticamente significativas. Gráficos desses quatro genes encontram-se no Anexo 5.

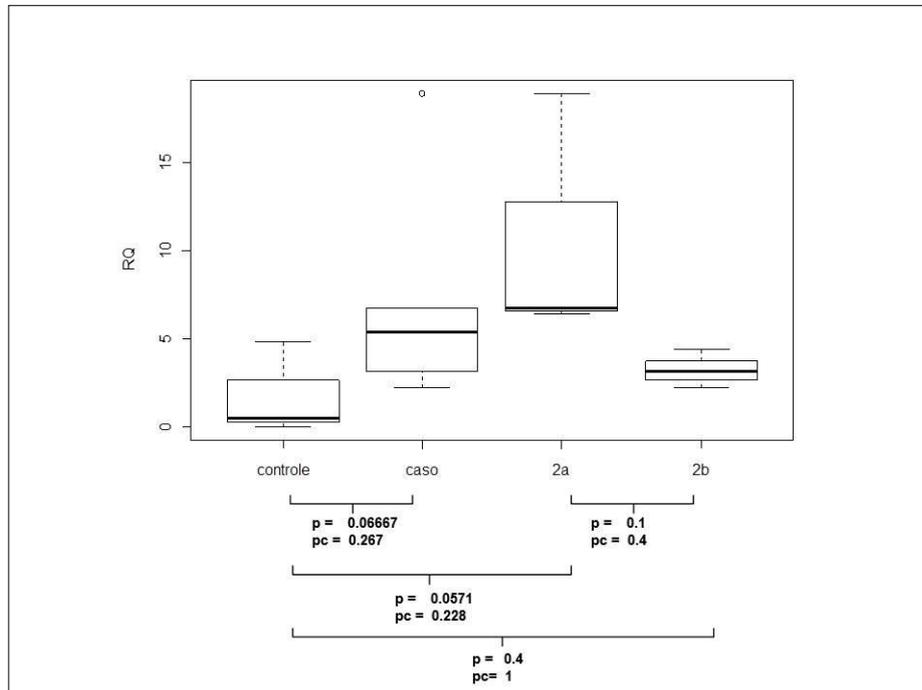
Diante disso, decidimos que a validação dos genes alvos seria feita com tecido cerebral fresco congelado a -80°C , pois se esperava que este material estivesse menos degradado, o que possibilitaria uma amplificação mais eficiente dos transcritos.

No decorrer do desenvolvimento do projeto coletamos espécimes cirúrgicos de três pacientes do tipo 2a (P2, P13 e P15) e três do tipo 2b (P1, P3 e P16) que tiveram DCF confirmado pelo exame anatomopatológico. Também foram coletadas quatro amostras de cérebros normais provenientes de autopsias (C1, C2, C20 e C21) para serem utilizadas como controles. Esse número de pacientes, embora baixo, é o mínimo necessário para experimentos de validação expressão gênica por qPCR.

Desta forma o qPCR foi realizado para os 10 genes propostos, utilizando RNA total extraído de material fresco congelado. Em nenhuma das comparações propostas (caso x controle, 2a x 2b, controle x 2b, e controle x 2a) foi possível observar diferenças estatísticas significativas, os gráficos encontram-se no Anexo 6. No entanto, observando cuidadosamente os gráficos verifica-se que há diferenças relevantes nos valores de expressão relativa entre os grupos propostos que podem refletir uma diferença biológica significativa, como é o caso do para o gene *NEUROG2* (Gráficos 6 e 7)

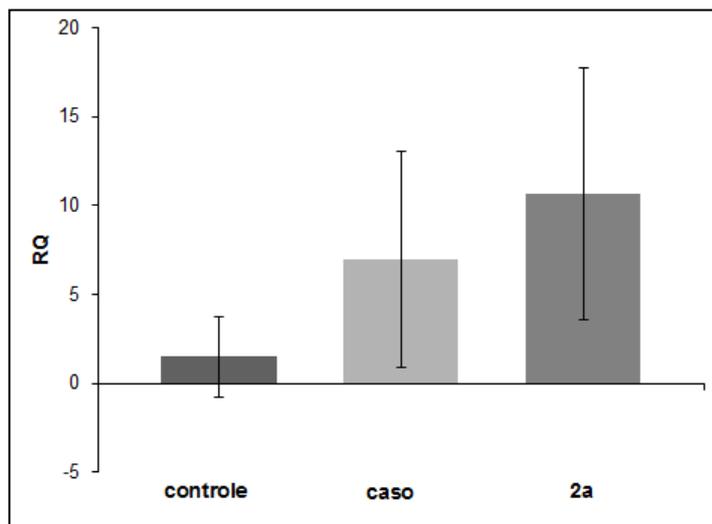
No Gráfico 6 é possível observar que não há diferenças estatísticas entre as comparações e no Gráfico 7, constata-se que a expressão do *NEUROG2* está aproximadamente cinco vezes maior quando comparado grupo caso (2a e 2b) com controle e aproximadamente sete vez mais expresso no grupo 2a com relação a expressão deste no controle.

Gráfico 6. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *NEUROG2*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho. Neste caso não foi observado diferenças significativas entre as comparações

Gráfico 7. Valores de expressão relativa (RQ) do gene *NEUROG2* nos grupos controle, caso (2a e 2b) e 2a)



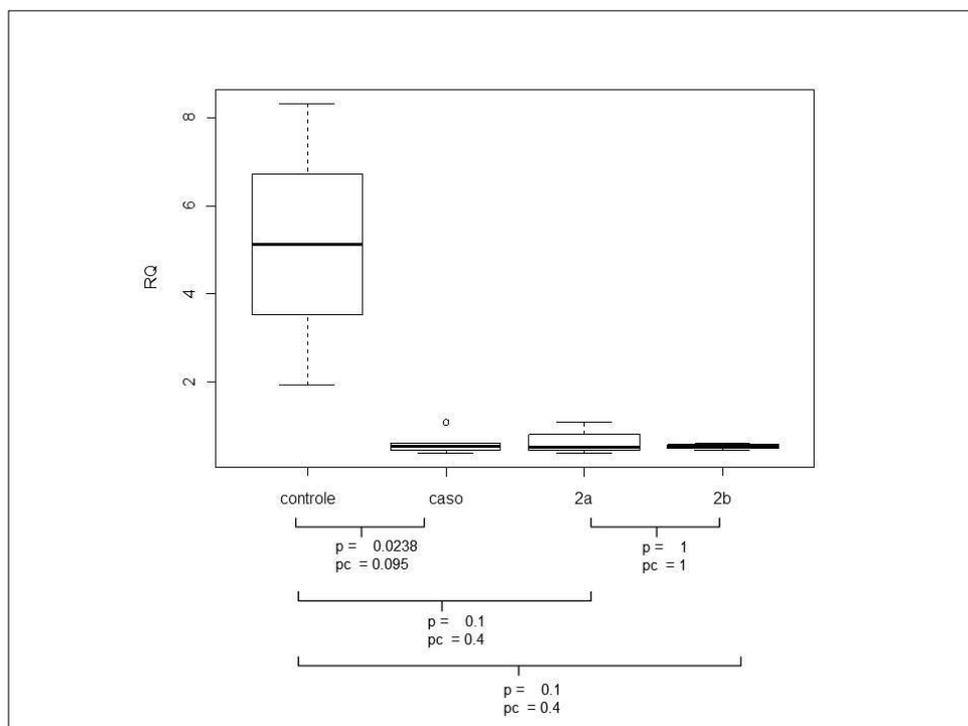
4.2.6. GENES *DROSHA* e *DICER1*

Como foi observado uma expressão menor dos miRNAs em pacientes do que nos controles, foi feito qPCR para os genes *DROSHA* e *DICER1* utilizando os mesmos três pacientes do tipo 2a, os três do tipo 2b e quatro controles. Também foram feitas as mesmas comparações entre os grupos (caso x controle, 2a x 2b, controle x 2b, e controle x 2a).

Em nenhum dos dois genes foi observada diferenças significativas nos valores de expressão relativa entre os grupos propostos. No entanto, como no caso do gene *NEUROG2*, observa-se no gene *DICER1* diferenças que podem refletir alguma alteração biológica relevante (Gráficos 8 e 9).

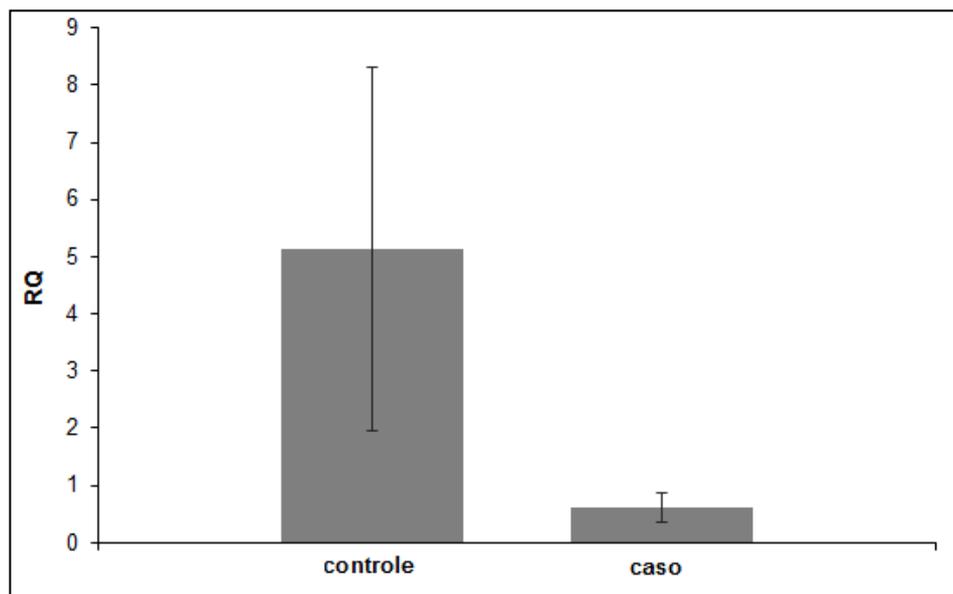
No Gráfico 8 é possível observar que não há diferenças estatísticas entre as comparações propostas para o gene *DICER1*, mas verifica-se que os pacientes com DCF do grupo caso (2a e 2b) possuem a expressão diminuída de aproximadamente oito vezes em relação ao controle, mais evidente no Gráfico 9. O gráfico do gene *DROSHA* pode ser visualizado no Anexo 6.

Gráfico 8. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *DICER 1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho. Neste caso não se observa diferenças estatísticas significativas entre as comparações propostas.

Gráfico 9. Valores de expressão relativa (RQ) do gene *DICER 1* no grupo controle e no caso (2a e 2b)



4.2.7. qPCR DO hsa-miR-31 EM CÉLULAS EM BALÃO

Nos experimentos de expressão dos miRNAs foi observado que o hsa-miR-31 (Gráfico 3) poderia ser um potencial marcador para DCF subtipo 2b, pois estava hipoexpresso nesse subtipo de DCF. Sendo assim, foi formulada a hipótese de que este miRNA poderia ter alguma relação com as células em balão, tipo celular característico deste subtipo de DCF.

Diante disso, decidiu-se estudar a expressão do hsa-miR-31 diretamente nesse tipo celular, utilizando-se a técnica de microdissecção a laser, que permitiu a remoção específica deste tipo celular. As Figuras 8A e B mostram, respectivamente, duas células em balão antes e depois de serem microdissecadas. Para este experimento, foi utilizado tecido fresco congelado de três pacientes com DCF tipo 2b (P1, P3 e P16). e estabeleceu-se que os neurônios com citoarquitetura normal de cada um desses três pacientes seriam considerados como o controle do ensaio. As Figuras 8C e D evidenciam neurônios do paciente antes e após a microdissecção.

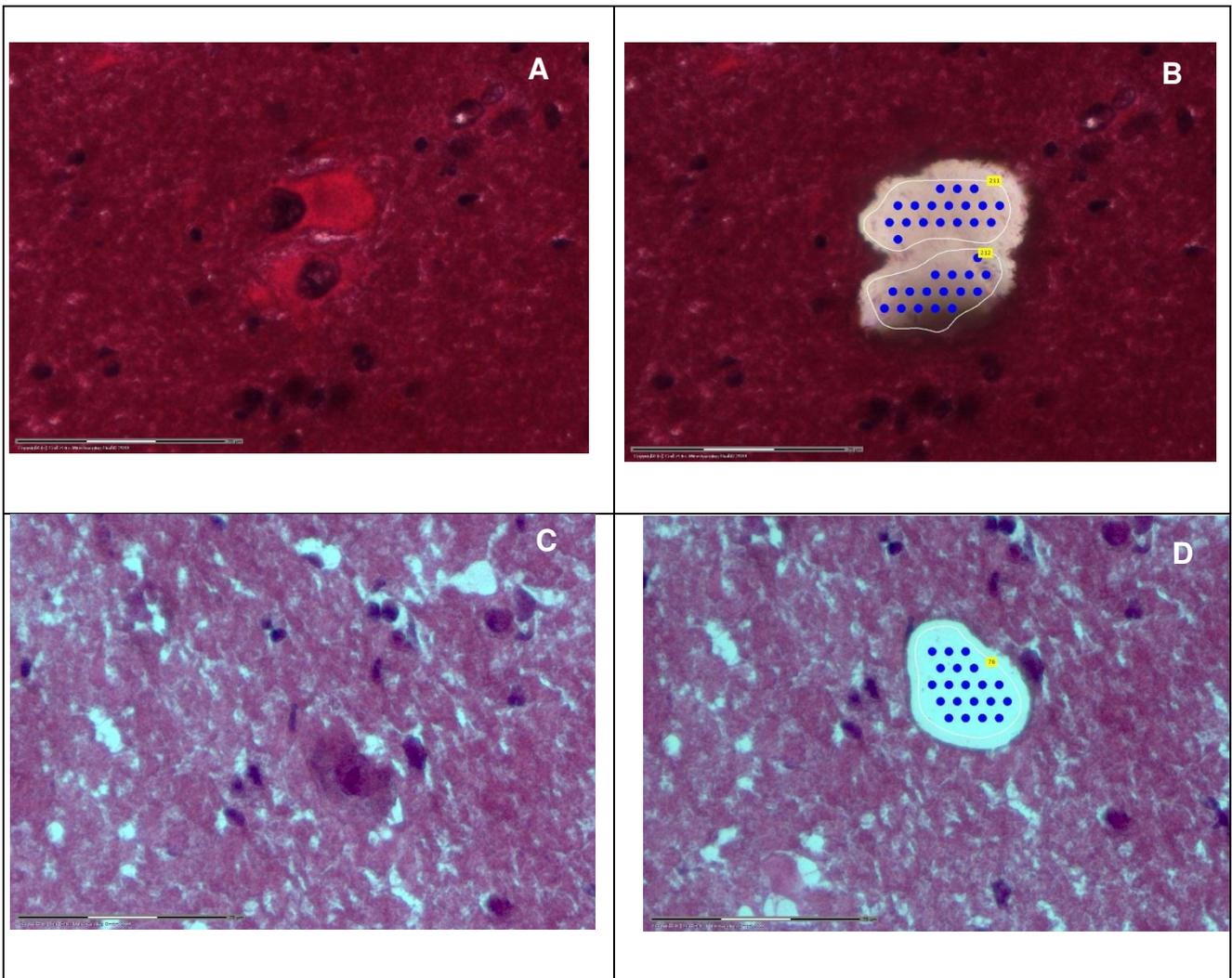


Figura 8. Tecido cerebral de paciente com DCF tipo 2b, em cortes de 6 μm , corados em H&E, aumento de 20X. A e B: células em balão; D e F neurônios, antes e após a microdissecção, respectivamente.

Foi feito qPCR dos cDNAs obtidos das células em balão e dos neurônios desses três pacientes. Em uma das amostras, foi possível verificar a amplificação de hsa-miR-31 nos dois tipos celulares, onde houve um aumento da expressão de aproximadamente 30 vezes com relação ao neurônio do mesmo paciente (Gráfico 10).

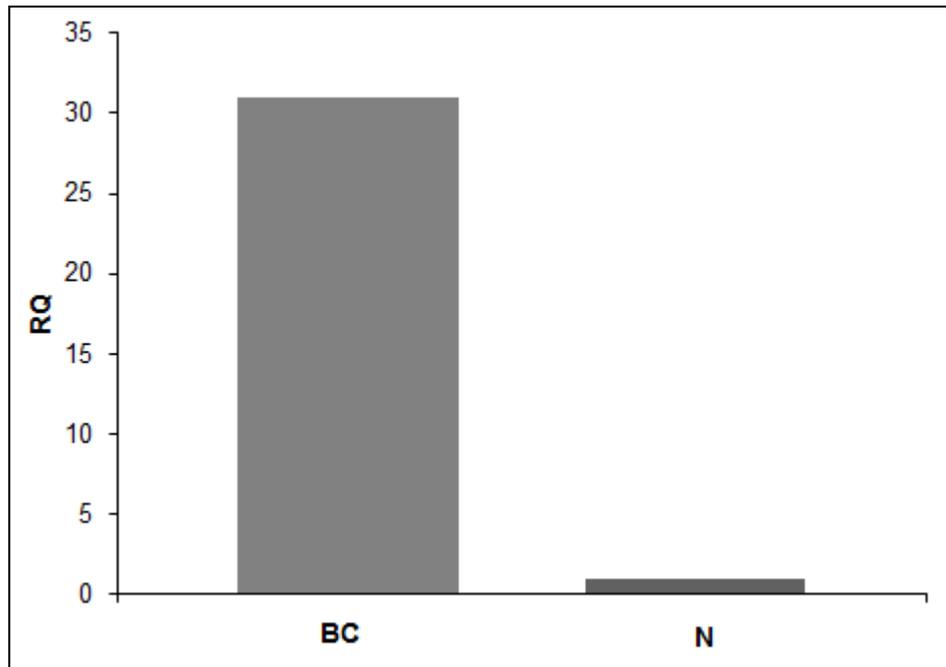


Gráfico 10. Valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-31, comparando-se células em balão (BC) e neurônios (N) microdissecados de tecido cerebral fresco congelado de paciente com DCF subtipo 2b.

Nas outras duas amostras estudadas não se observou a amplificação em nenhum dos dois tipos celulares estudados, evidenciando que uma quantidade insuficiente de RNA havia sido obtida pelo processo de microdissecação.

5. DISCUSSÃO

Foram identificados três miRNAs diferencialmente expressos quando comparado tecido cortical de pacientes com DCF tipo 2 e controle: hsa-let-7f, hsa-miR-34 e hsa-miR-31, todos com a expressão diminuída nos pacientes, implicando que os genes alvo possivelmente regulados por eles estariam com sua expressão aumentada nos pacientes.

O **hsa-let-7f** pertence à família dos let-7. Recentemente, foi observado que muitos membros desta família tinham os níveis de expressão reduzidos em uma variedade de cânceres. Foram encontrados, por exemplo, hipoexpressos em câncer de pulmão (Takamizawa, 2004), pele (Schultz, 2008) e mama (Yu, 2007), regulando diversos oncogenes, tais como o *RAS*, *MYC*, e *HMGGA2*. Shibahara e colaboradores (2012) demonstraram que hsa-miR-7f é um supressor de tumor. Além disso, hsa-let-7f parece afetar a proliferação celular e pode suprimir a invasão e metástase no câncer gástrico quando regula o gene alvo *MYH9* (Liang, 2011).

Não se pode afirmar que o hsa-let-7f tenha a mesma função no tecido displásico, mas se confirmado, ele poderia explicar a desregulação em genes alvos relacionados com os processos de proliferação, progressão e de sobrevivência celular e com isso justificar o surgimento de alterações histopatológicas como as encontradas na DCF tipo 2. Assim como foi descrito para o complexo esclerose tuberosa, em que mutações em um dos genes supressores de tumores, *TSC1* ou *TSC2*, podem levar a características histopatológicas de aumento no tamanho das células, formação de células imaturas e indiferenciadas (Holmes et al., 2007).

Do mesmo modo, o **hsa-miR-34a** também é considerado um supressor de tumor, encontrado hipoexpresso em câncer de cólon (Tazawa, 2007), glioma (Guessous, 2010) e neuroblastoma (Welch, 2007). Foi demonstrado que essa hipoexpressão pode ser causada pela metilação aberrante de ilhas CpG em vários tipos de câncer (Lodygin, 2008). Estudos recentes relatam que quando hiporegulado o hsa-miR-34a pode contribuir para aumento da mobilidade dos precursores neuronais e ser crucial para o deslocamento das células tronco mesenquimais até o local de destino das mesmas (Chang, 2011), bem como regular a maturação desses precursores (Datta et al, 2010).

Blüncke et al.(2011) relatam que neurônios displásicos, tipo celular característico dos dois subtipos 2a e 2b, são componentes neuronais de tumores glioneuronais – gangliogliomas e tumor neuroepitelial disembrionário. Isso pode dar mais indicativos para a hipótese de que os miRNAs encontrados podem ter função de supressores tumorais desregulados na DCF tipo 2.

Seguindo a mesma linha, o **hsa-miR-31** é considerado um oncogene porque reprime a ação de genes supressores de tumor em células de câncer de pulmão (Liu 2010). Foi encontrado hipoexpresso em câncer de colórectal humano (Motoyama, 2008), de cabeça e pescoço (Liu, 2009), bem como na leucemia mieloide (Hershkovitz Rokah, 2012). É possível que essa expressão diminuída seja decorrente de silenciamento epigenético (Augoff, 2012). Paradoxalmente, o hsa-miR-31 também foi denominado supressor de tumor, encontrado hiperexpresso associado com progressão maligna em câncer de mama (Valastyan, 2009), de próstata (Schaefer, 2010) e ovário (Creighton, 2010) por possivelmente inibir a expressão de oncogenes e a proliferação de células neoplásicas. Tan e colaboradores (2011) relataram que o hsa-miR-31 reprime a expressão de *DICER1* e sugerem que o ele pode atuar como um regulador negativo no *feedback* de controle da expressão de miRNAs.

Este miRNA também foi identificado em nosso estudo, como um possível biomarcador para a DCF do subtipo 2b. Embora observamos um aumento significativo da expressão do hsa-miR-31 nas células em balão quando comparado com os neurônios normais, não se pode assegurar, ainda, que exista algum indicativo de que ele seja um possível biomarcador do subtipo 2b, ou mesmo que ele esteja envolvido com as células em balão, uma vez que se trata de dado obtido em um único paciente. Portanto, experimentos adicionais são necessários para confirmação desses achados que, no entanto são de grande interesse potencial nesse momento.

Outro aspecto que precisa ser levado em conta em futuros ensaios utilizando a técnica de microdissecção é que, considerando que a célula em balão possui tanto características de neurônio quanto de glia e, que foi encontrada alterações num gene cuja função é regular a transição da neurogênese para gliogênese, o *NEUROG2*, se faz necessária a inclusão da microdissecção de células da glia para avaliarmos com exatidão a relação do hsa-miR-31 com as células em balão ou/e o subtipo 2b.

Apesar das diferenças na expressão dos miRNAs, não fomos capazes de documentar diferenças significativas na expressão dos genes alvo putativamente regulados por eles e que foram selecionados para os ensaios quantitativos. Possíveis causas desse resultado podem ser: **i)** uma amostra pequena, com baixo poder estatístico para detectar diferenças nos experimentos realizados ou **ii)** porque os miRNAs identificados não atuam efetivamente na regulação dos genes alvo que selecionamos.

Vale ressaltar, no entanto, que para um gene observou-se que há diferenças nos valores de expressão relativa entre os grupos analisados o que pode refletir uma diferença biológica significativa, mesmo que não ocorra diferença estatística. O gene

NEUROG2 foi encontrado de cinco a sete vezes mais expresso nos pacientes em relação aos controles. Este gene é membro da família de fatores de transcrição bHLH (básico hélice *loop*-hélice) que desempenha um papel central na promoção da especificação e diferenciação neuronal em muitas regiões do sistema nervoso central (Hirabayashi & Gotoh, 2010).

Os fatores de transcrição proneuronais bHLH *NEUROG1*, *NEUROG2* são importantes para determinar o destino dos neurônios pertencentes ao neocórtex (Guillemot, 2005). Recentemente, foi demonstrado que para promover mudanças da via de neurogênese para a via de gliogênese é necessária a presença e regulação precisa desses genes (Bertrand, 2002). A hipopressão de *NEUROG 1 e 2* tem sido proposta como um passo chave na transição entre a inibição da fase de neurogênese e o início da gliogênese (Kessaris, 2001; Zhou, 2001). No córtex cerebral os RNAm de *NEUROG1*, *NEUROG2* tem padrão de expressão temporo-espacial bem definidos, uma vez são detectados exclusivamente na zona ventricular, onde os precursores se localizam somente durante o período de neurogênese (Sun, 2001).

Os dados encontrados neste trabalho apontam para uma possível falha na diferenciação neuronal uma vez que a transição da neurogênese para a gliogênese pode estar prejudicada pelo aumento da expressão de *NEUROG2* e, juntos esse dados corroboram a hipótese que Englund e colaboradores propuseram em 2005, de que há uma diferenciação aberrante nas células tronco na DCF tipo 2a e 2b.

Pode-se inferir também que a alta expressão do gene *NEUROG2*, neste trabalho, pode ser decorrente da hiporegulação do hsa-miR-31, no entanto ainda são necessários experimentos funcionais, utilizando inibidores de miRNAs sintéticos ou experimentos com cultura de células que demonstrem a ligação biológica direta do miRNA com a região 3'UTR do gene alvo.

Galichet (2008) mostrou também que ratos mutantes, que não expressam *NEUROG2* apresentaram menos progenitores e defeitos na diferenciação neuronal do giro dentado no hipocampo, área que desempenha um papel central na aprendizagem e memória em roedores adultos. Deng e colaboradores (2009) não identificaram mutações no gene *NEUROG2* em uma amostra grande de 202 pacientes com doença de Parkinson e sugerem a existência de alterações na região não codificante do gene, bem como o envolvimento de outros fatores de transcrição no desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos. Esse relato reforça a possibilidade do *NEUROG2* ser regulado por miRNAs

O gene *DICER1* também foi encontrado desregulado neste trabalho, sua expressão está aproximadamente oito vezes diminuída em relação ao controle. Esse gene codifica a enzima Dicer que é peça chave no processamento dos miRNAs. Vários estudos tem relatado os efeitos dos miRNAs no desenvolvimento do SNC pela remoção da enzima Dicer e por sua vez o bloqueio da biogênese de todos os miRNAs em regiões específicas e em diferentes fases de desenvolvimento no SNC (Bian e Sun, 2011). Kawase-Koga *et al.* (2009) relataram que a eliminação da Dicer no córtex cerebral de camundongo, ocasionou uma redução significativa na espessura cortical, causada por uma redução das células-tronco neurais e de progenitores neurais, com aumento da apoptose e prejuízo da diferenciação neuronal. Zheng *et al.* observaram interrupção na oligodendrogênese e astrogliogênese quando ocorreu a retirada da enzima Dicer. Ratos deficientes (*knockout*) em *Dicer* confirmaram os defeitos corticais e revelaram anormal expansão e diferenciação de oligodendrócitos na medula espinhal (Kawase-Koga, 2010). Em modelo animal sem expressão da Dicer, foi observada incapacidade de gerar tanto neurônios quanto células da glia, e que essa enzima tem função na manutenção do fenótipo das células-tronco neurais na diferenciação neuronal (Andersson, 2010). Esses achados juntamente com nossos resultados mostram o papel essencial da *DICER1* no desenvolvimento do SNC e, somados aos dados já encontrados com *NEUROG2* reforçam a hipótese de haver uma falha na diferenciação glioneuronal na DCF tipo 2.

Por fim, propomos uma hipótese para explicar esse evento e possibilitar melhor elucidação das vias moleculares envolvidas nesta malformação cortical. Várias vias metabólicas são necessárias para controlar a progressão das células tronco neurais multipotentes para progenitores intermediários e finalmente neurônios maduros e células da glia (Guillemot, 2005). A regulação dessas etapas é controlada por uma complexa rede de regulação gênica. Uma vez que o gene *DICER1* está hipoexpresso, neste trabalho, esperava-se que a formação de miRNAs maduros seja afetada, fenômeno que identificamos em nosso estudo pois praticamente todos os miRNAs encontrados se apresentarem hipoexpressos. A literatura tem reportado o papel desses miRNAs como supressores de tumor já que, uma vez hipoexpressos podem levar ao aumento da expressão de genes alvos relacionados com proliferação, progressão do ciclo e sobrevivência celular. Os eventos em cascata originados por esta baixa expressão poderiam levar ao surgimento de aberrações histopatológicas como as encontradas nos subtipos da DCF tipo 2, tais como aumento do tamanho celular, observado nos neurônios dismórficos e gigantes, anormalidades que caracterizam os subtipo 2a, e células imaturas ou não totalmente diferenciadas, como as células em balão, que distinguem o subtipo 2b.

Além disso, o *NEUROG2* tem papel central na especificação e diferenciação neuronal, sua expressão é relatada como temporo-espacial e atua na transição de neurogênese para gliogênese, através da diminuição da expressão deste gene proneuronal. Deste modo, com a expressão aumentada, como constatado em nosso trabalho, levaria a falhas na transição neurônio-glia, e justificaria a existência do tipo celular com características tanto de neurônio como de glia, como é o caso das células em balão. (Figura 9)

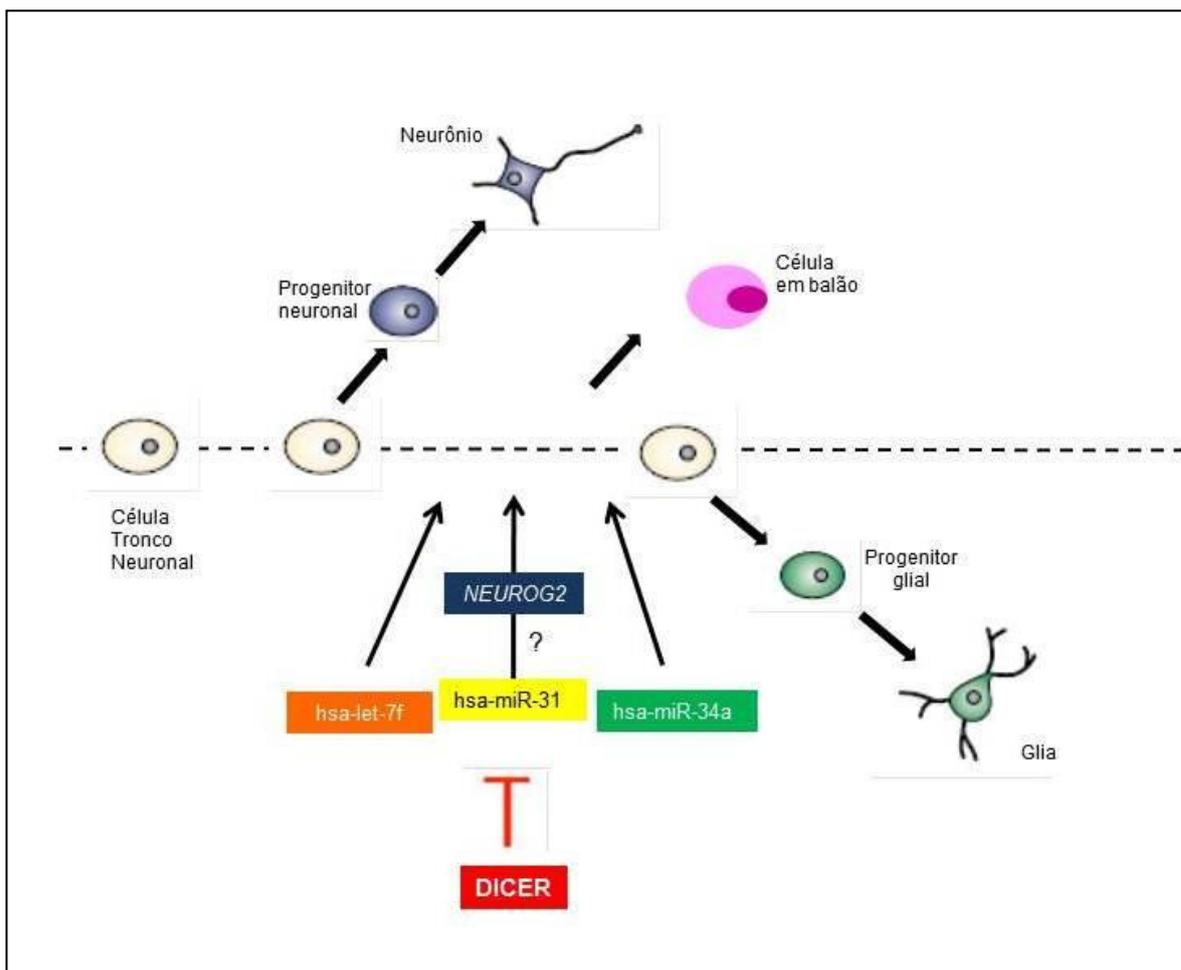


Figura 9. Modelo proposto para falha na diferenciação glioneuronal na DCF tipo 2. A hipoxpressão do gene *DICER1*, leva a desregulação dos níveis de expressão dos miRNAs, hsa-miR-31, hsa-miR-34a, hsa-let-7f, todos conhecidos como supressores tumorais; uma vez hipofunção podem induzir surgimento de alterações histopatológicas como as encontradas nos subtipos da DCF tipo 2, neurônios dismórficos e gigantes, e células não totalmente diferenciadas, como as células em balão. Além disso, a hiperexpressão de *NEUROG2* levaria a falhas na transição neurogênese-gliogênese e justificaria a existência do tipo celular com características tanto de neurônio como de glia, como é o caso das células em balão. Adaptado de Bertrand, 2002.

6. CONCLUSÃO

1. Foi possível identificar uma diferenças na expressão de três miRNAs: **hsa-miR-31**, **hsa-miR-34a** e **hsa-let-7f** em pacientes com DCF tipo 2 em relação ao grupo controle.
2. O **hsa-miR-31** foi identificado como um possível biomarcador para o subtipo 2b de DCF.
3. O gene *DICER1* foi encontrado hipoexpresso, o que justifica a predominância de miRNAs com expressão diminuída encontrados neste trabalho.
4. O gene *NEUROG2* foi encontrado hiperexpresso e é um possível gene alvo do o hsa-miR-31.
5. O padrão diferencial de expressão dos três miRNAs e os dois genes identificados em nosso estudo fornecem subsídios importantes para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na falha da diferenciação neuroglial em DCF tipo 2.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdueva D, Wing M, Schaub B , Triche T, Davicioni E. Quantitative Expression Profiling in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples by Affymetrix Microarrays *Journal of Molecular Diagnostics*. 2010; 12: 409- 417.
- Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM et al. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's Syndrome. *Science*. 2005; 310:317-320.
- Agostini M, Tucci P, Killick R, Candi E, Sayan BS, Rivetti di Val Cervo P, et al. Neuronal differentiation by *TAp73* is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108(52):21093-8.
- Ambros V, Lee R C, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003;13(10):807-18.
- Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431:350-355.
- Andersson T, Rahman S, Sansom SN, Alsio JM, Kaneda M, Smith J, et al. Reversible block of mouse neural stem cell differentiation in the absence of *dicer* and microRNAs. *PLoS One*.2010; 5(10): doi:10.1371/journal.pone.0013453.
- Augoff K, McCue B, Plow E F, Sossey-Alaoui K. miR-31 and its host gene *lncRNA LOC554202* are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*. 2012, 11:5
- Barbato C, Giori C, Catalanotto C, Cogoni C. Thinking about RNA ? MicroRNAs in the brain. *Mamm Genome*. 2008; 19:541-551.
- Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012;135:1348-69.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Bollen AW, Grant PE. Focal transmantle dysplasia: a specific malformation of cortical development. *Neurology* 1997;49(4):1148–52.
- Bartel DP, Chen C Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Rev. Genetics*. 2004; 5: 396-400.
- Bast T, Ramantani G, Seitz A, Rating D. Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentation and epilepsy in children and adults. *Acta Neurol Scand*. 2006: 113: 72–81.

Bast T, Ramantani G, Seitz A, Rating D. Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentation and epilepsy in children and adults. *Acta Neurol Scand* 2006; 113: 72–81.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57: 289–300.

Bertrand N, Castro D S, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3:517-530.

Birks D K, Barton V N, Donson A N, Handler M H, Vibhakar R, Foreman N K. Survey of MicroRNA Expression in Pediatric Brain Tumors.2011: *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:211–216.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*. 2011;52(1):158-74.

Bozzi Y, Casarosa S, Caleo M. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2012; 3:1-14.

Caldas C, Brenton J D. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med*. 2005; 11: 712-4.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:857-66.

Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642–655.

Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernández J, Hernández-Echeagaray E, Klapstein GJ, Boylan MK. Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. *Journal of Neuroscience Research*. 2003; 72:472–486.

Cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci*. 2007; 8: 427–437.

Chang S Y, Weng S L, Hsieh J Y, Wang T Y, Chang M D T, Wan H W. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC Medical Genomics*. 2011; 4:65 doi:10.1186/1755-8794-4-65.

Cheng L C, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. MiR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature Neurosci*. 2009; 12: 399-408.

Chung CK, Lee SK, Kin KJ. Surgical outcome of epilepsy cause by cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2005;46(suppl 1):25–9.

Creighton C J, Fountain M D, Yu Z, Nagaraja A K, Zhu H, Khan M, et al. Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res*. 2010; 70:1906-15.

Crino PB, Miyata H, Vinters HV. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic considerations. *Brain Pathol*. 2002; 12:212–233.

Coras R, de Boer OJ, Armstrong D, Becker A, Jacques TS, Miyata H, et al. Good interobserver and intraobserver agreement in the evaluation of the new ILAE classification of focal cortical dysplasias. *Epilepsia*. 2012. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03508.x.

Datta P, Fineberg S F, Davidson BL .miR-34a modulates murine embryonic neural progenitor cell fate. In: *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: RNA Silencing: Mechanism, Biology and Application*, 2010, Keystone, Colorado, USA. Anais... Silverthorne, Colorado, USA: 2010.

Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM. Conditional Loss of Dicer Disrupts Cellular and Tissue Morphogenesis in the Cortex and Hippocampus. *J Neurosci*. 2008; 28:4322-4330.

Dogini D B, Ribeiro P A O, Rocha C, Pereira T C, Lopes-Cendes, I. MicroRNA Expression Profile in Murine Central Nervous System Development. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008; 35:331-337.

Dutta KK, Zhong Y, Liu YT, Yamada T, Akatsuka S, Hu Q, et al. Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent. *Cancer Sci*. 2007; 98(12):1845-1852.

Englund C, Folkerth RD, Born D, Lacy JM, Hevner RF. Aberrant neuronal-glia differentiation in Taylor-type focal cortical dysplasia (type IIA/B). *Acta Neuropathol*. 2005; 109(5):519-33.

Erickson HS, Albert PS, Gillespie JW, Rodriguez-Canales J, Marston Linehan W, Pinto PA, et al. Quantitative RT-PCR gene expression analysis of laser microdissected tissue samples. *Nat Protoc*. 2009;4(6):902-22.

Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clinical Genetics*. 2008; 74:296-306.

Farragher S K, Tanney A, Kennedy R D, Harkin D P. RNA expression analysis from formalin embedded tissues. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:435–445

Fathman C G, Soares L, Chan S M, Utz P J. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature.* 2005; 435 : 605-611.

Galichet C, Guillemot F, Parras C M. Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development.* 2008; 135: 2031–2041.

Ghildiyal M, Zamore P D. Small silencing RNAs: an expanding universe *Nature Rev. Genetics.* 2009;10:94-108.

Goswami RS, Waldron L, Machado J, Cervigne NK, Xu W, Reis PP, Bailey DJ, Jurisica I, Crump MR, Kamel-Reid S. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnol.* 2010;10:47.

Guerrini R, Doyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in Neuroscience.* 2008; 31:154-162.

Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis.* 2010; 38(2):154-66.

Guerrini R; Doyns W B, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in Neuroscience.* 2008; 31: 154-162.

Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle.* 2010; 9(6): 1031-1036.

Guillemot F, Molnár Z, Tarabykin V, Stoykova A. Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur J Neurosci.* 2006;23(4):857-68.

Gumbinger C, Rohsbach CB, Schulze-Bonhage A, Korinthenberg R, Zentner J, Häffner M, Fauser S. Focal cortical dysplasia: a genotype-phenotype analysis of polymorphisms and mutations in the TSC genes. *Epilepsia.* 2009; 50(6): 1396-408.

HersHKovitz Rokah O, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M. Downregulation of Mir-31, Mir-155, and Mir-564 in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *PLoS ONE.* 2012; 7(4): doi:10.1371/journal.pone.0035501.

Hirabayashi Y, Gotoh Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11:377- 388.

Holmes GL, Stafstrom CE, and the Tuberous Sclerosis Study Group. Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges. *Epilepsia*. 2007; 48:617–630.

Hong F, Breitling R, McEntee C W , Wittner B S, Nemhauser J L, Chory J. *Bioinformatics*. 2006; 22(22):2825-7.

Hutchison ER, Okun E, Mattson MP. The therapeutic potential of microRNAs in nervous system diseases. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32(2):105–113.

Kawase-Koga Y, Low R, Otaegi G, Pollock A, Deng H, Eisenhaber F et al. RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells. *J Cell Sci*. 2010; 123(4):586–594.

Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T. Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn*. 2009; 238(11):2800–2812.

Kessarlis N, Pringle N, Richardson, W D. Ventral neurogenesis and the neuron–glial switch. *Neuron*. 2001; 31: 677–680.

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

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011, 39:D152-D157.

Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific MicroRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*. 2006; 24:857–864.

Kriegstein A, Noctor S ,Martinez-Cerdeno V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat. Rev. Neurosci*. 2006; 7, 883–890.

Kuzniecky RI, Barkovich AJ. Malformations of cortical development and epilepsy. *Brain Dev*. 2001; 23(1):2-11.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. The nuclear Rnase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425:415-419.

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

Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed

paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*. 2007; 7:36
doi:10.1186/1472-6750-7-36.

Lindow M, Gorodkin J. Principles and limitations of computational microRNA gene and target finding. *DNA Cell Biol*. 2007;26:339-351.

Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest*. 2010;120:1298-1309.

Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 2011; 146:18–36.

Manzini M C, Walsh A C. What disorders of cortical development tell us about the cortex:

Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*. 2009; 4: 609-613.

Molyneaux B J, Arlotta P, Menezes J R, Macklis J D. Neuronal subtype specification in the
Nelson PT, Wang-Xia W, Rajeev BW. MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases. *Brain Pathology*. 2008; 18:130-138.

Olsen L, Klausen M, Helboe L, Nielsen FC, Werge T. MicroRNAs Show Mutually Exclusive Expression Patterns in the Brain of Adult Male Rats. *PLoS ONE*. 2009; 4: 1-7.

one plus one does not always make two. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2011; 21:333–339.

Palmieri A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*. 2004;62(6 Suppl 3):S2-8.

Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010; 126:1166-76.

Schönberger A, Niehusmann P, Urbach H, Majores M, Grote A, Holthausen H, et al. Increased frequency of distinct TSC2 allelic variants in focal cortical dysplasias with balloon cells and mineralization. *Neuropathology*. 2009; 29: 559-65.

Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res*. 2008; 18: 549–557.

Shen Q, Temple S. Fine control: microRNA regulation of adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*. 2009;12:369-370.

Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS M, Yiu C C P, et al. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f , a microRNA targeting CYP19A1. *J Pathol*.2012: DOI: 10.1002/path.4019.

Shimamura M, Garcia JM, Prough DS, Dewitt DS, Uchida T, Shah SA, Avila MA, Hellmich HL. Analysis of long-term gene expression in neurons of the hippocampal subfields following traumatic brain injury in rats. *Neuroscience*. 2005;131(1):87-97.

Sisodiya, S M, Fauser S, Cross J H, Thom M. Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *Lancet Neurol*. 2009; 8:830–843.

Sisodiya, SM, Fauser S, Cross JH, Thom M. Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *Lancet Neurol*. 2009; 8:830–843.

Specht K, Richter T, Iler U, Walch A, Werner M, Fler H H. Quantitative Gene Expression Analysis in Microdissected Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue *Am J Pathol*. 2001; 158:419–429

Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin M Z, Zubiaga A, Hua I. Neurogenin Promotes Neurogenesis and Inhibits Glial Differentiation by Independent Mechanisms. *Cell*. 2001; 104: 365–376.

system damage, degeneration, and repair. *Neuromolecular Med*. 2009;11(3):153-61.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*.2004; 64: 3753–3756.

Tan X, Qin W, Zhang L , Hang J, Li B, Zhang C, et al. A Five-microRNA Signature for Squamous Cell Lung Carcinoma (SCC) Diagnosis and Hsa-miR-31 for SCC Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(21): 6802–11.

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*. 2009; 137:1032-46.

Welch C, Chen Y, Stallings R L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007; 26:5017-22.

Wong M. Mechanisms of epileptogenesis in tuberous sclerosis complex and related malformations of cortical development with abnormal glioneuronal proliferation. *Epilepsia*. 2008; 49(1):8-21.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E . Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007; 13: 1668-1674.

Xi Y, Nakajima, Gavin E , Morris C G, kudo k, Hayashi k. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and 2011formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007; 13: 1668-1674.

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q. let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007; 131: 1109–1123.

Zheng K, Li H, Zhu Y, Zhu Q, Qiu M. MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord. *J Neurosci*. 2010; 30(24):8245– 8250.

Zhou Q, Choi G, Anderson, DJ. The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron*. 2001; 31: 791–80.

8.ANEXOS

ANEXO 1



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

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cláudia Vianna Maurer Morelli

II - PARECER DO CEP.

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

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

III - DATA DA REUNIÃO.

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


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

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

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

ANEXO 2

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com epilepsia. O objetivo geral do estudo é o de isolar genes responsáveis por essa doença, além de estudar a expressão desses genes através de métodos de genética molecular. Os resultados podem eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento dessa doença. Tanto as amostras de DNA e RNA, de linhas celulares e a informação médica a meu respeito bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. Podendo assim ser utilizada eventualmente para outros fins de pesquisa sobre as epilepsias. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a um eletroencefalograma (EEG) e talvez uma tomografia computadorizada ou uma ressonância magnética de crânio. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com epilepsia. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro dos primeiros 6 meses após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento mais adequado. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecido nos ambulatórios do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 3521-8908.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, mas não os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3521-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas- UNICAMP, tel. (019) 3521-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

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

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

ANEXO 3

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 26/07/11.
(PARECER CEP: Nº 470/2003)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cláudia Vianna Maurer Morelli

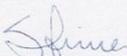
II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto "O PAPEL DOS microRNAs NA DISPLASIA CORTICAL FOCAL (DCF)", com a finalidade de mestrado da aluna Simoni Helena Avansini, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2011.

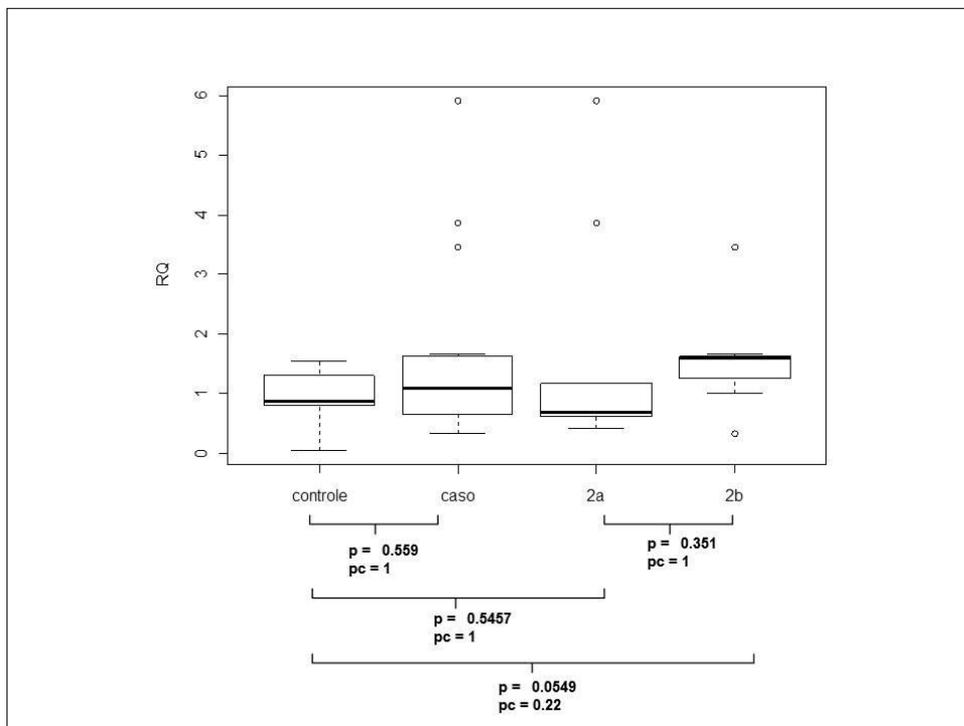

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

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

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

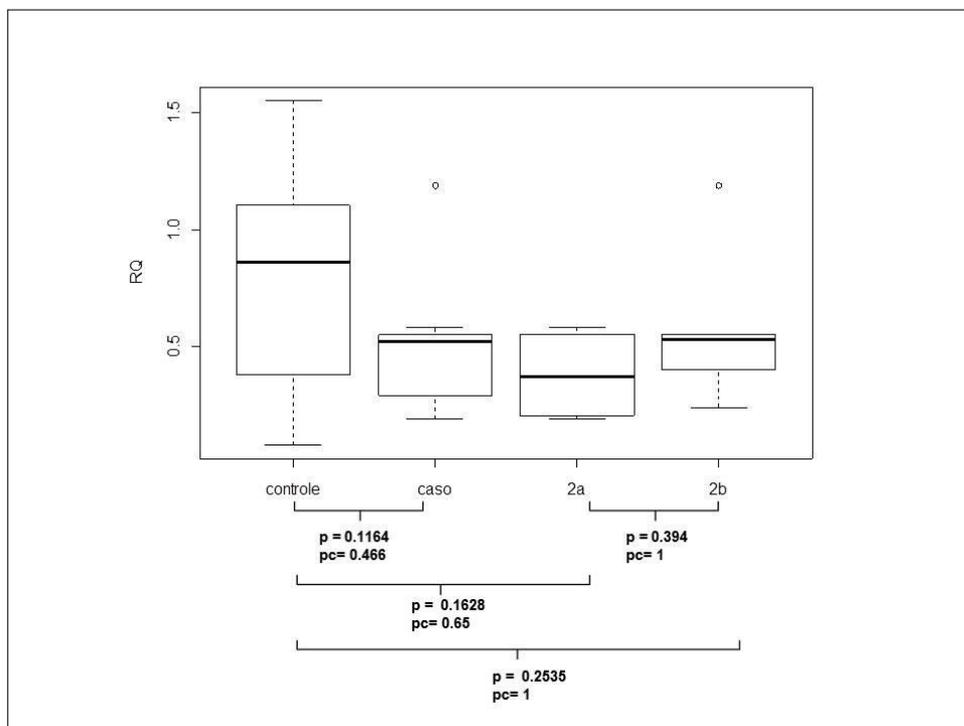
ANEXO 4: miRNAs

4.1. Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-23a, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



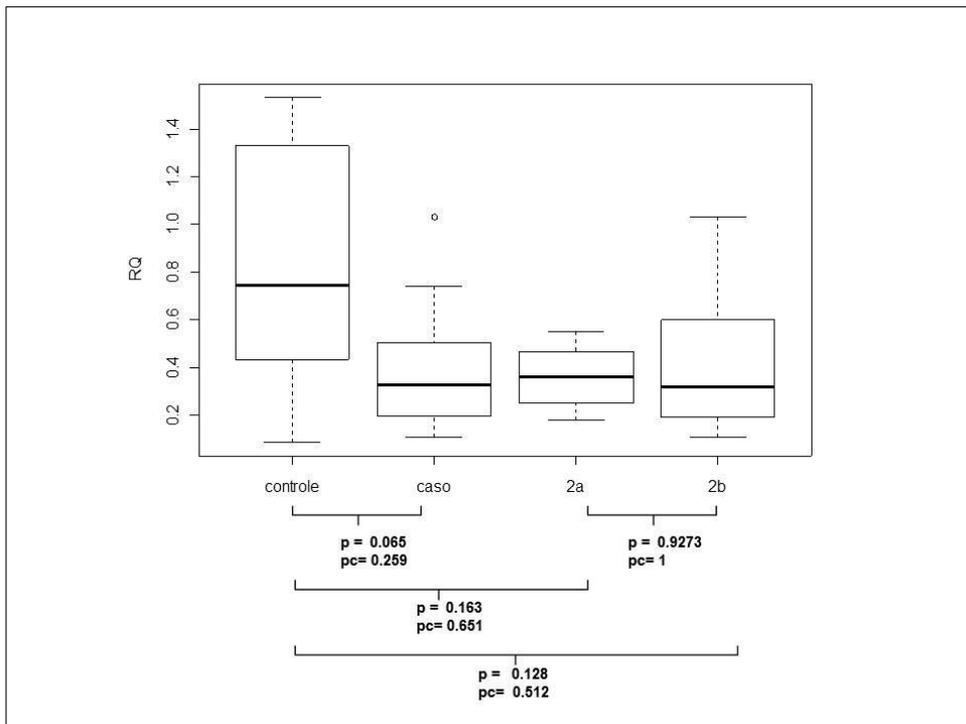
$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

4.2 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-106a, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



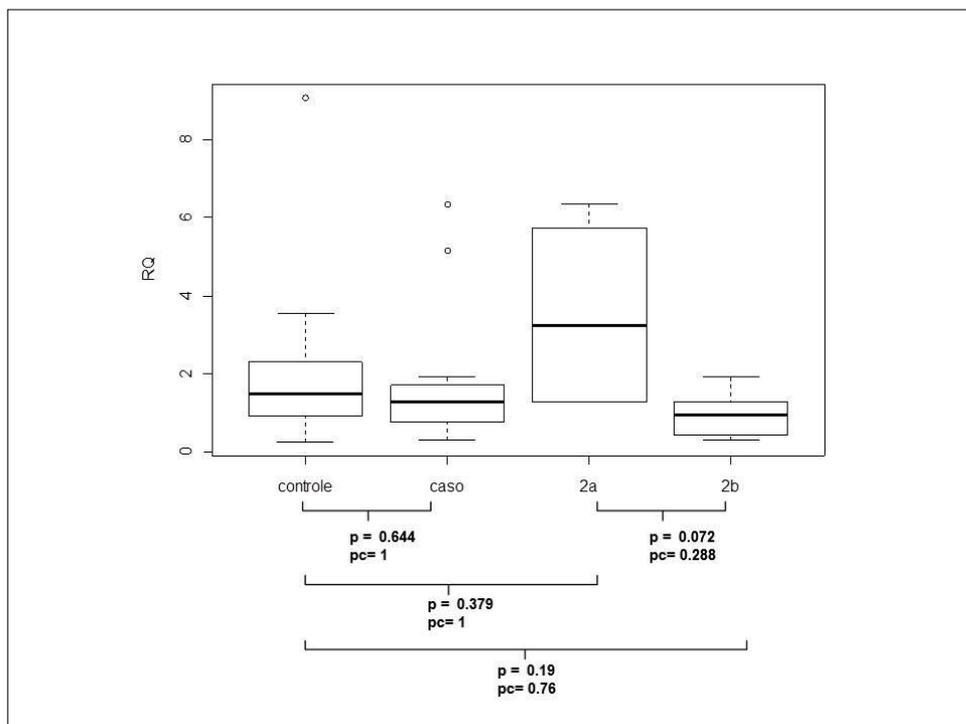
$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

4.3 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-379, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



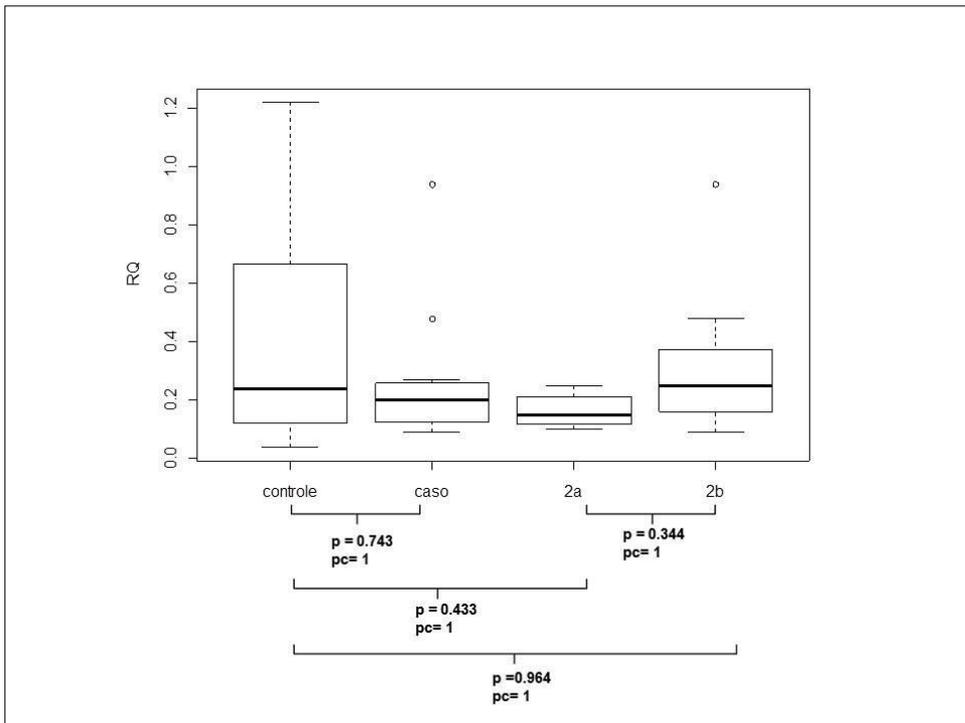
p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

4.4 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-486-5p, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



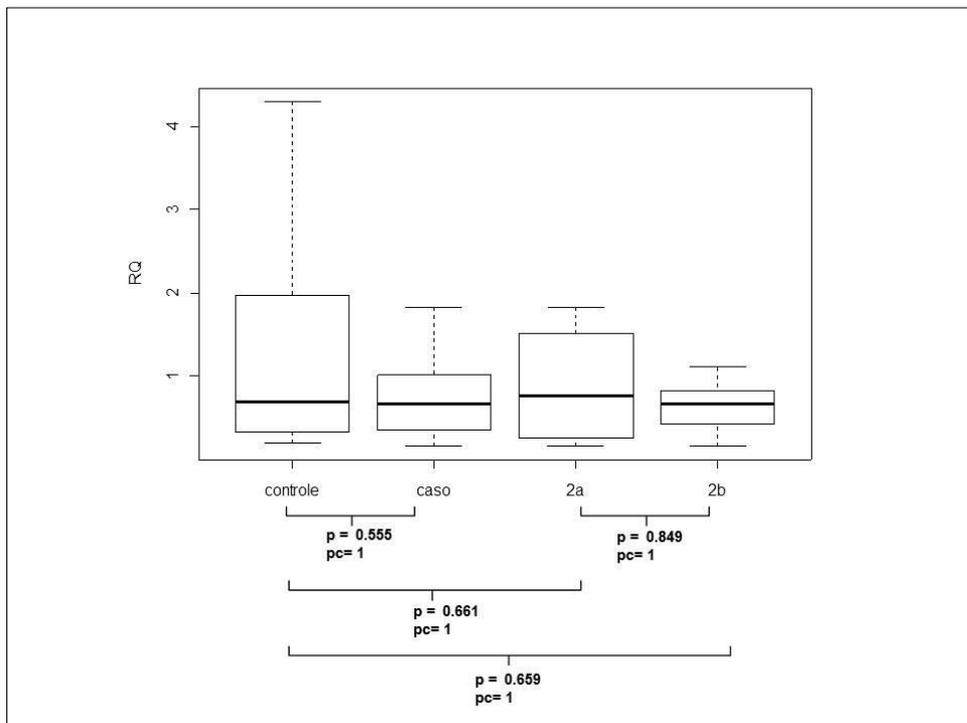
p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

4.5 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-886-5p, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



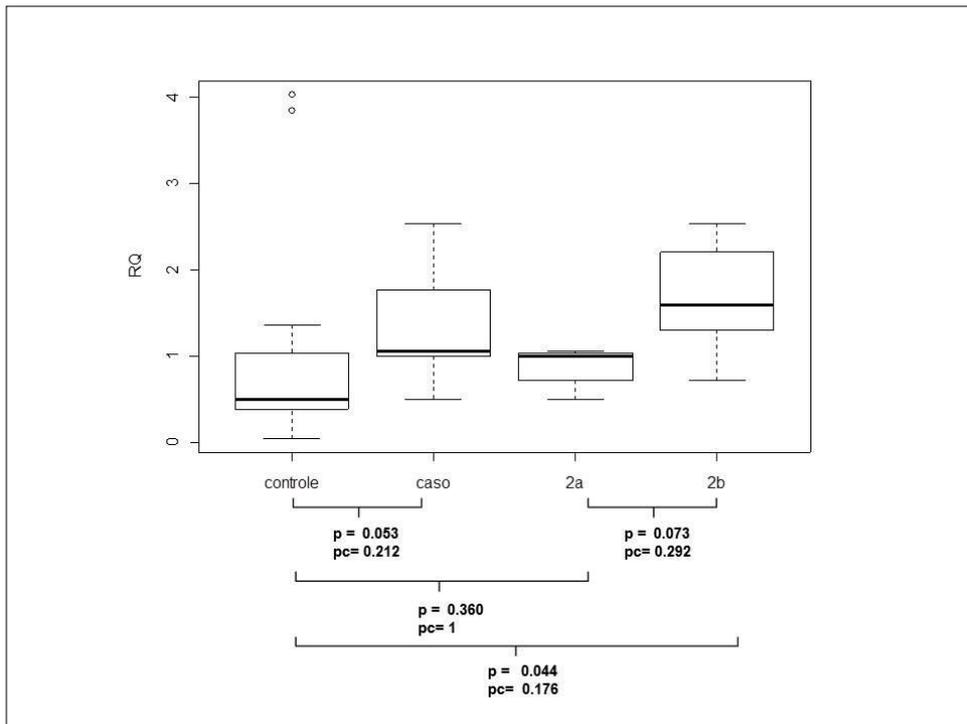
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

4.6 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-1182, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

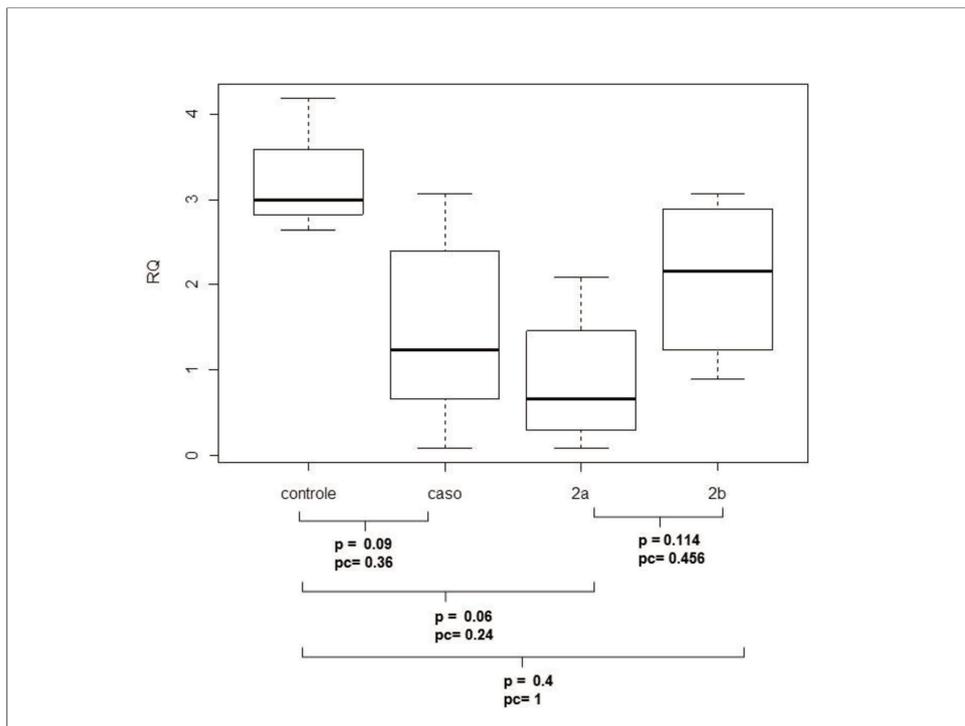
4.7 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do hsa-miR-1274a, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

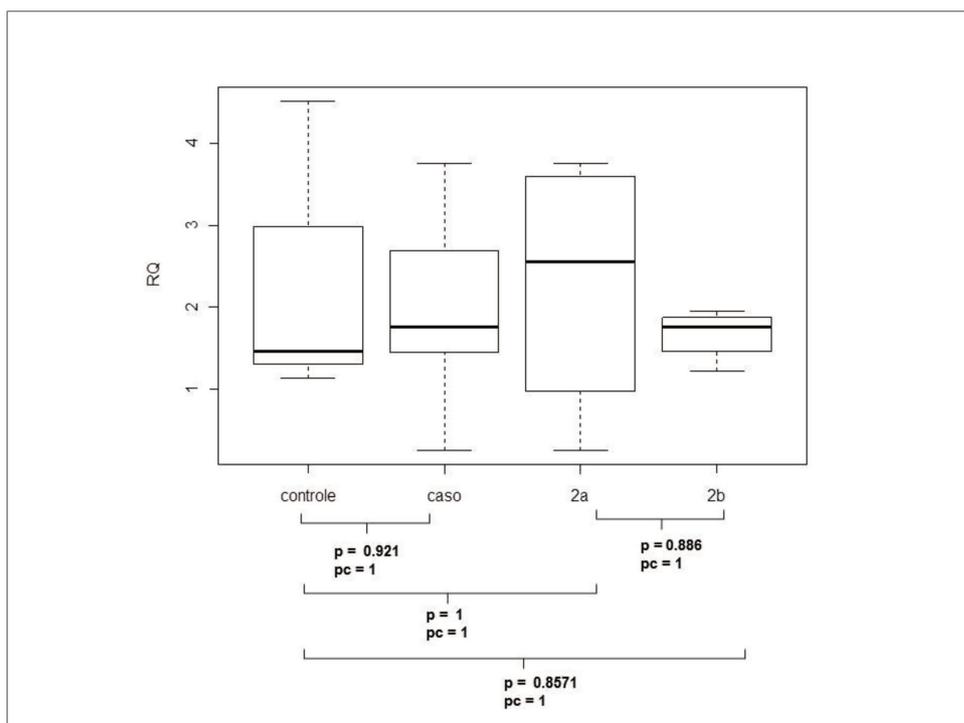
ANEXO 5: Genes alvos utilizando tecido em FFPE

5.1 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *SYT1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



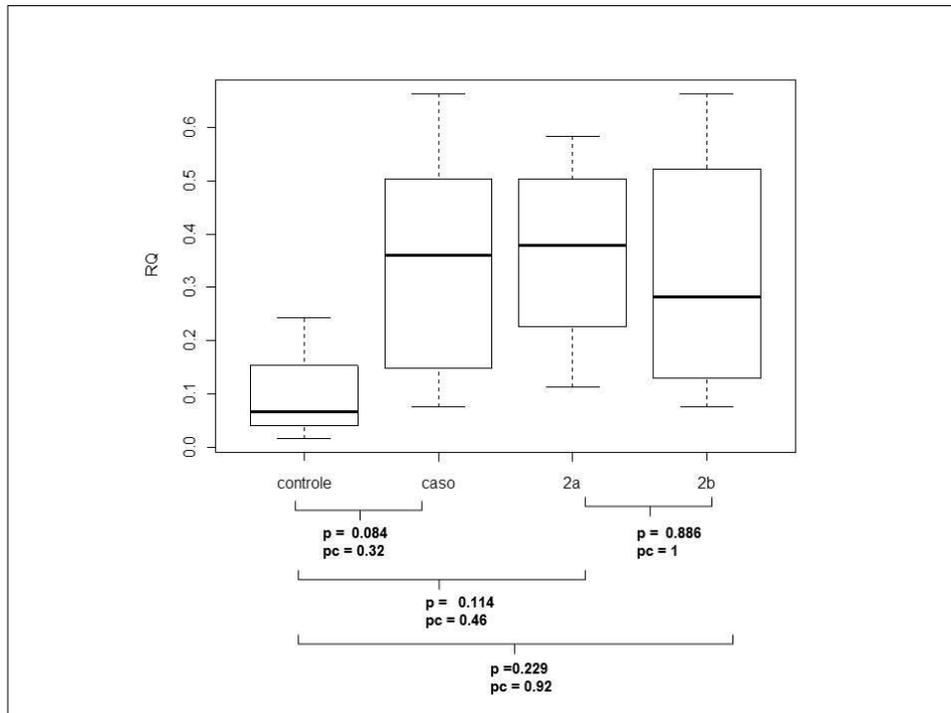
p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

5.2 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *PAFAH1B1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



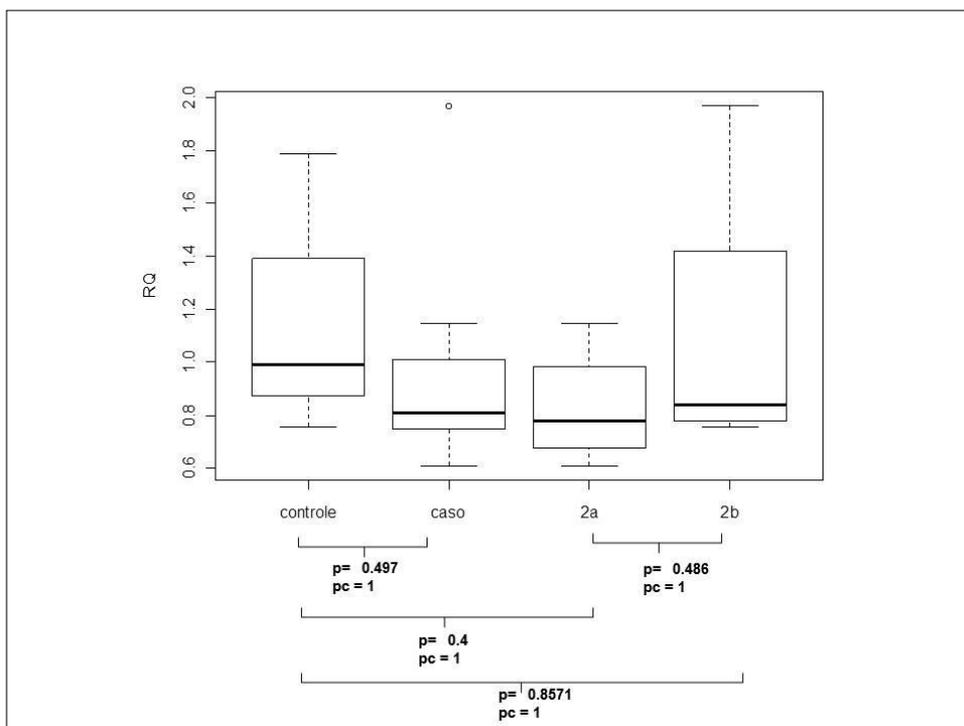
p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

5.3 Box plot dos valores de expressão relativa do gene *SLC1A2*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

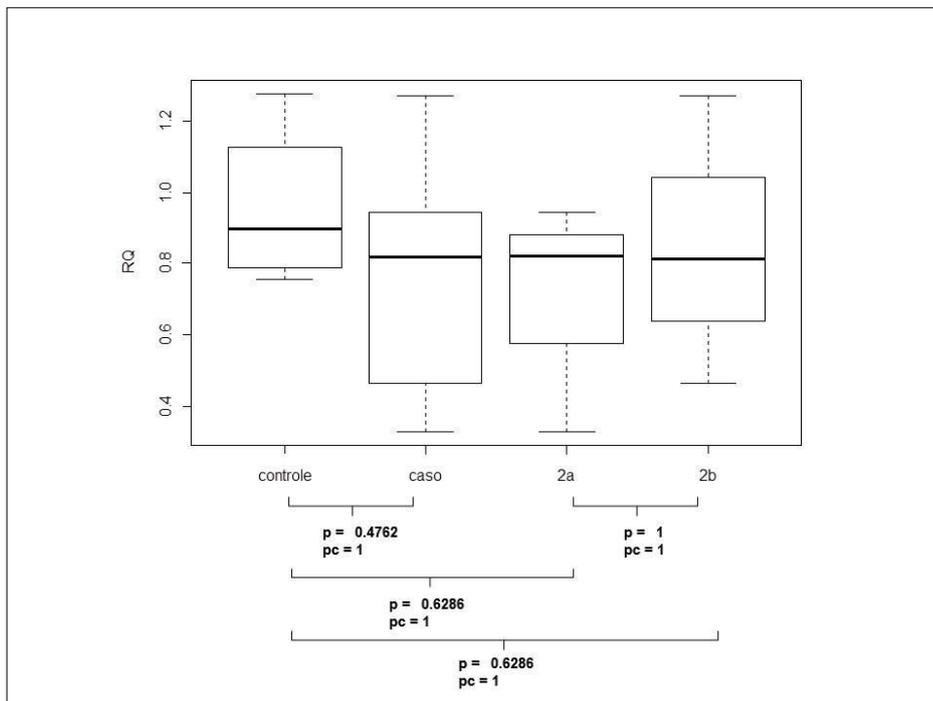
5.4 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *GAS7*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



p = *p-value*; pc = *p-value* corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho

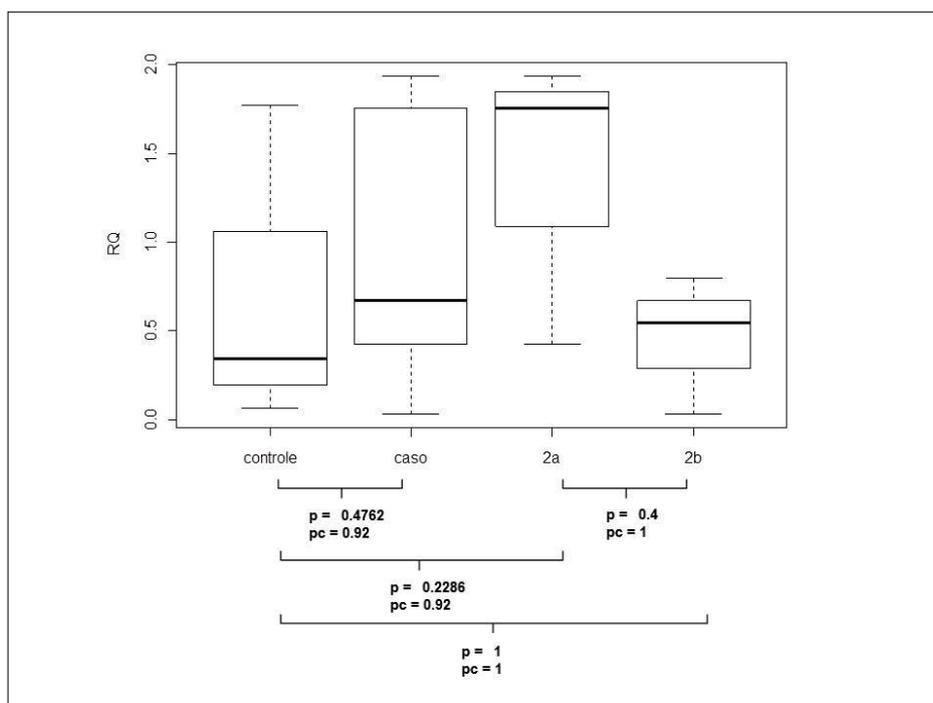
ANEXO 6: Genes alvos utilizando tecido FF

6.1 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *SYT1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



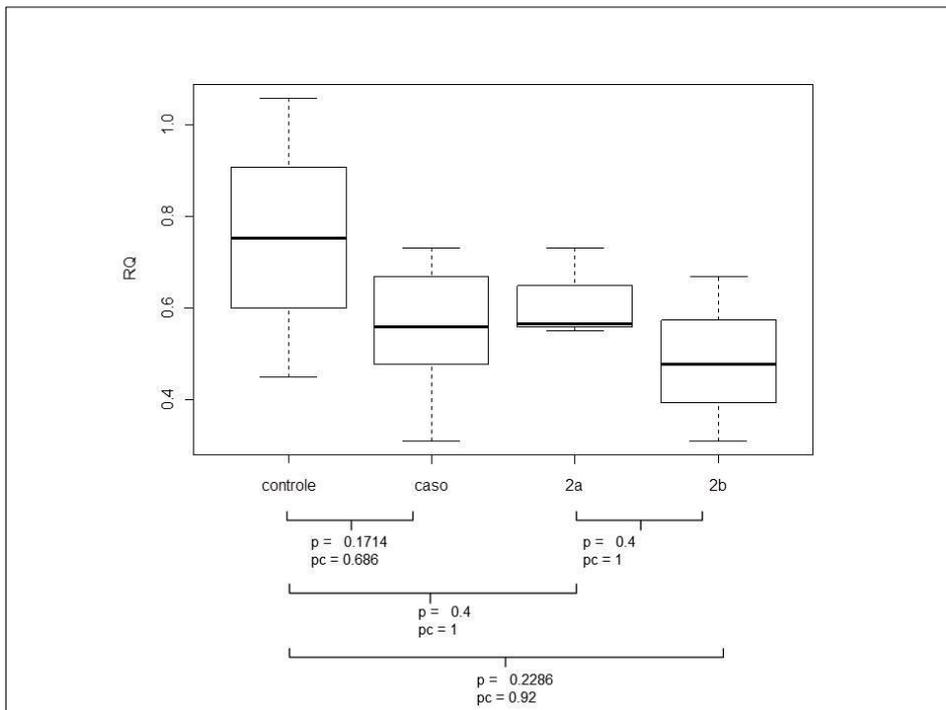
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

6.2 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *MAP4K3*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



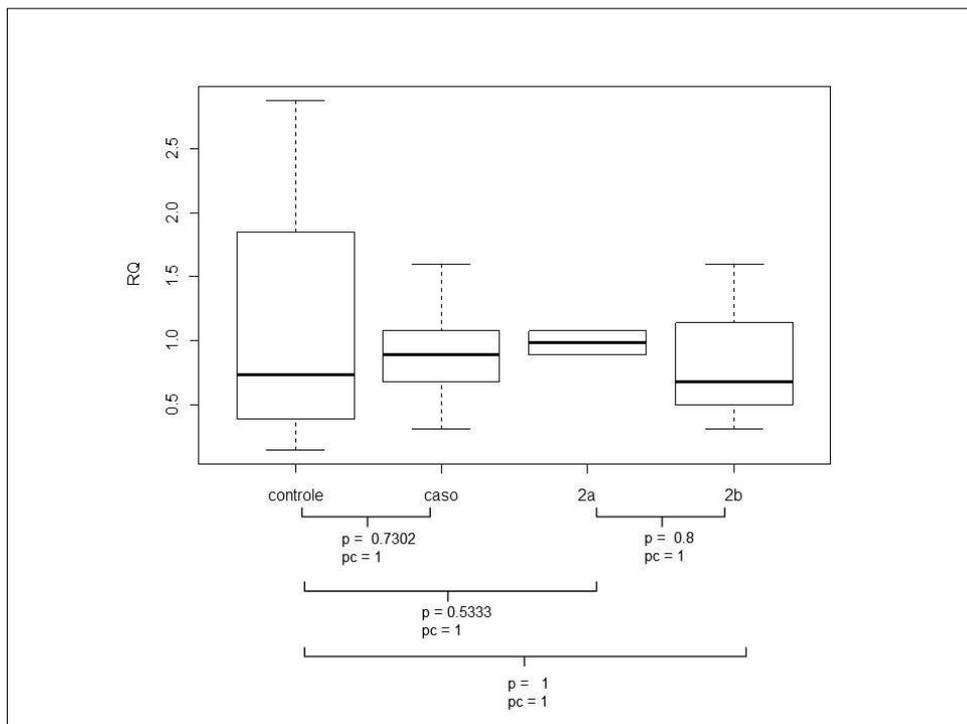
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

6.3 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *GAS7*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



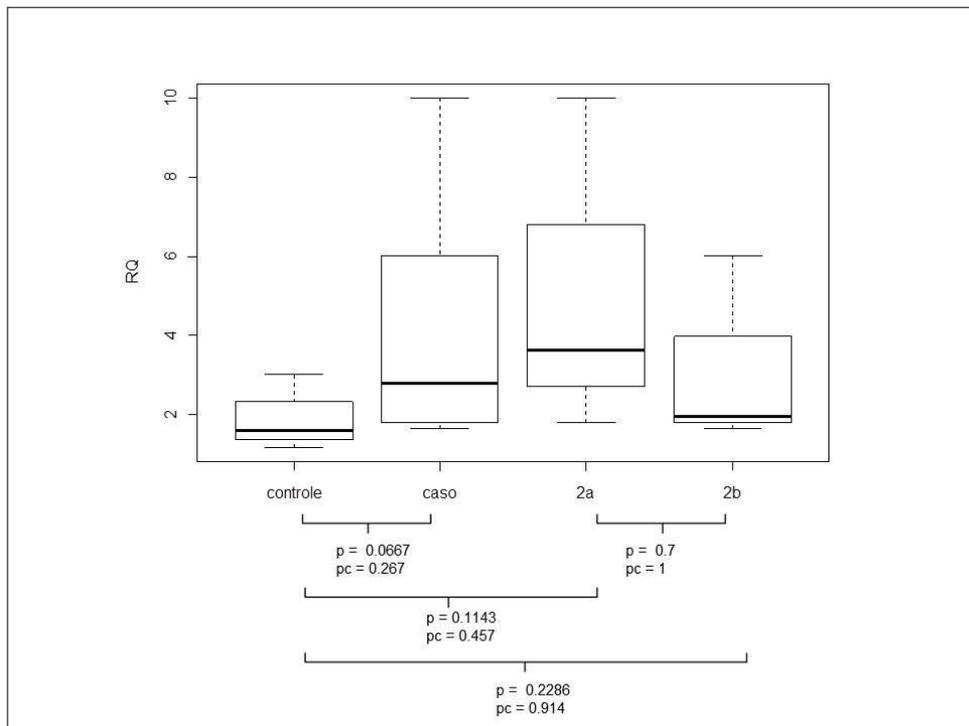
$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

6.4 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *JAG1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



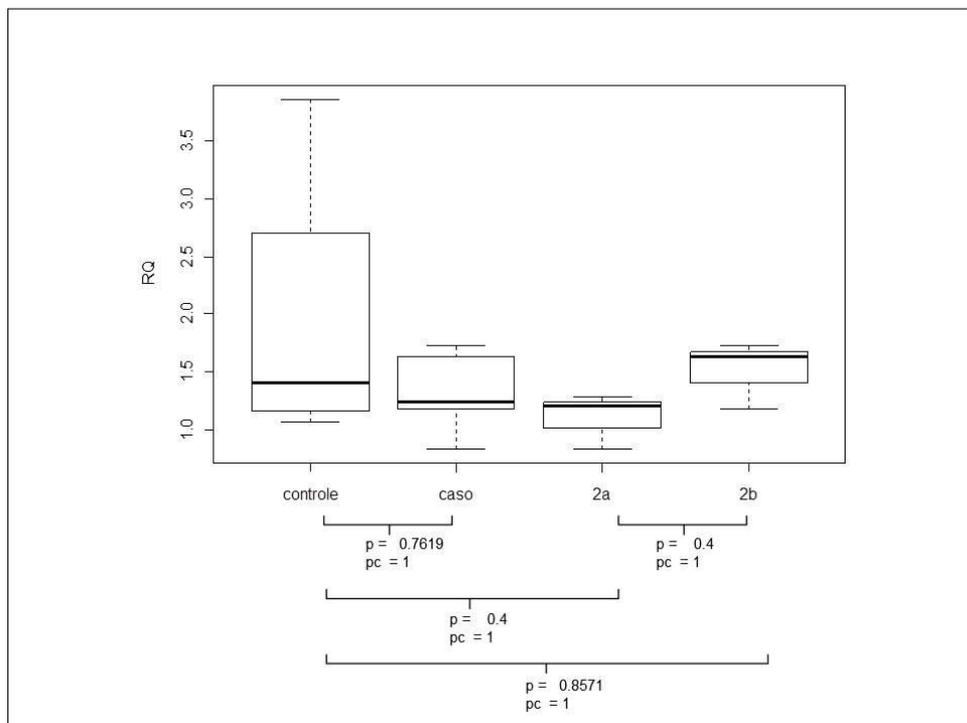
$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho.

6.5 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *NOTCH1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



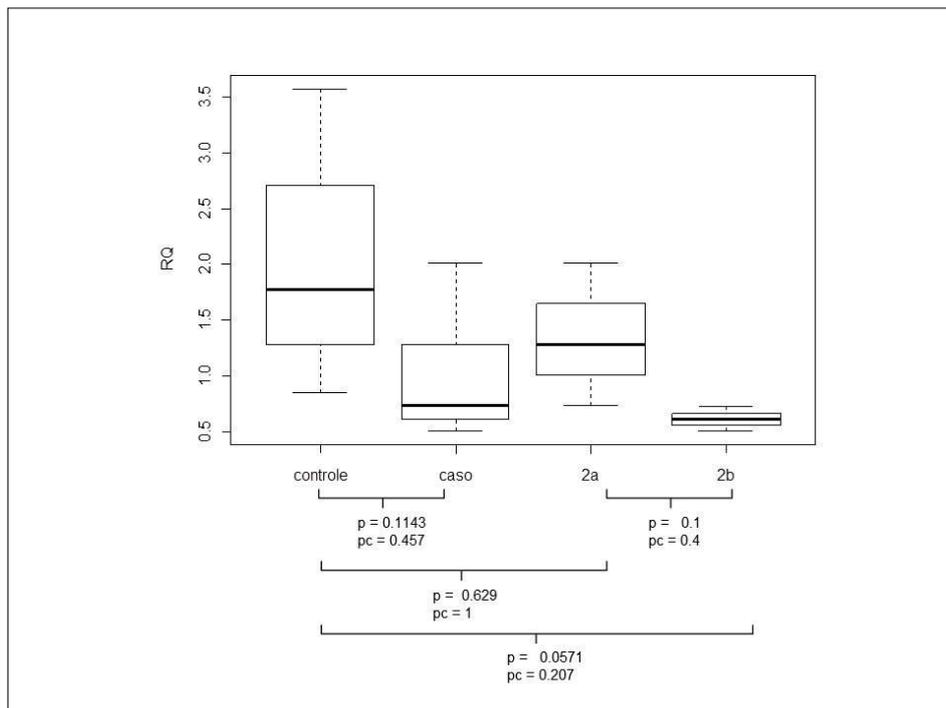
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho.

6.6 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *PAFAH1B1*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



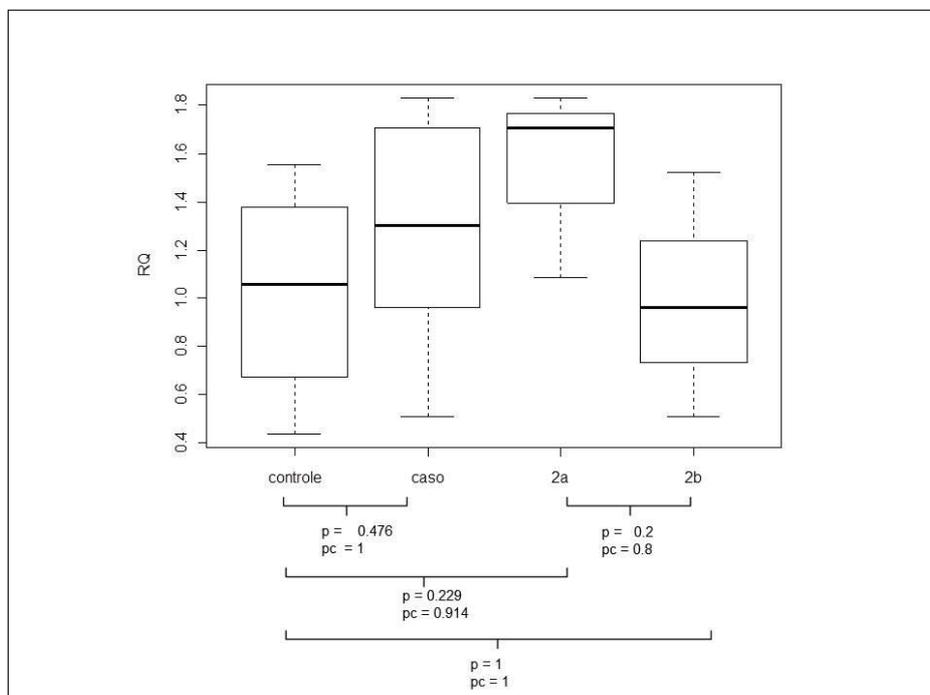
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho

6.7 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *SATB2*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



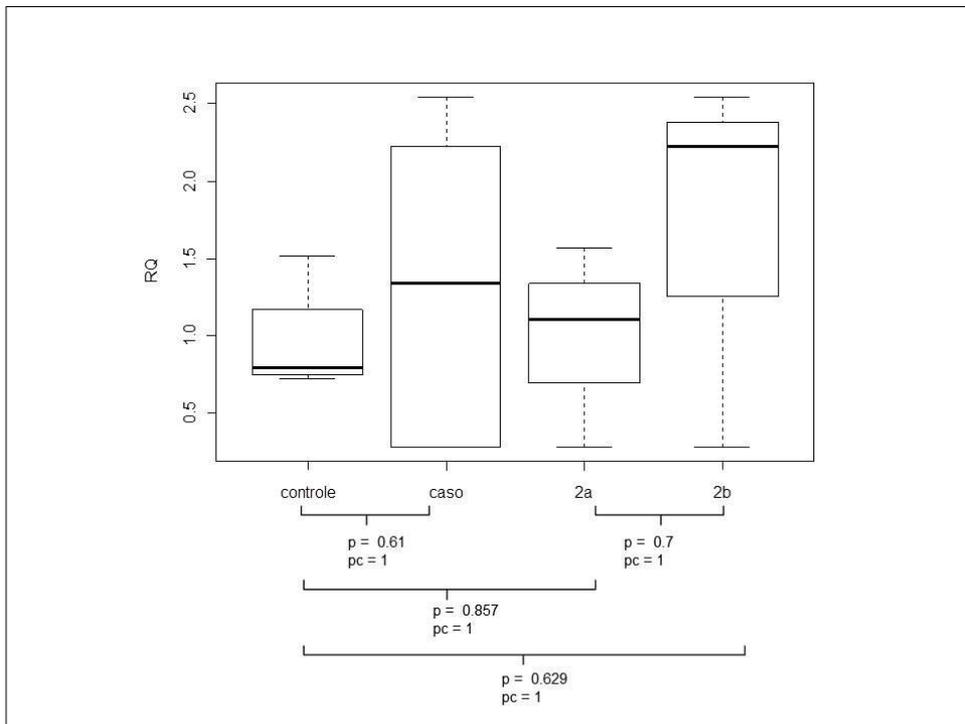
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho

6.8 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *SEMA4C*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



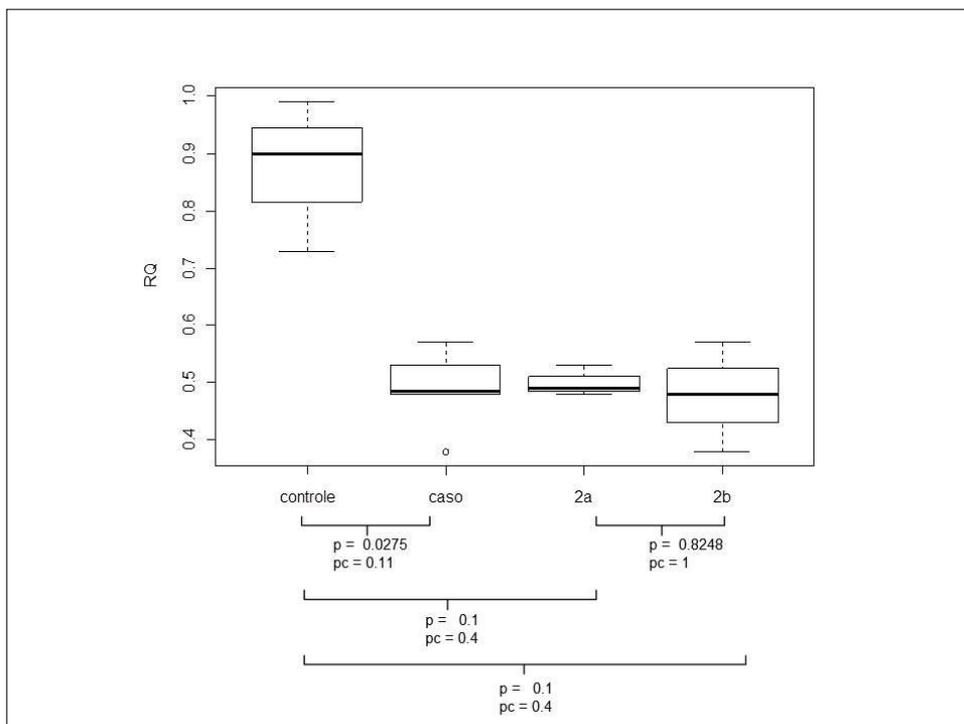
p = p-value; pc= p-value corrigido por Bonferroni. Valores de pc < 0.05 estão destacados em vermelho

6.9 Box plot dos valores de expressão relativa do gene *SLC1A2*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e controle x 2b.



$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho

6.10 Box plot dos valores de expressão relativa (RQ) do gene *DROSHA*, comparando-se controle x caso (2a e 2b); 2a x 2b; controle x 2a e c ontrole x 2b.



$p = p\text{-value}$; $pc = p\text{-value}$ corrigido por Bonferroni. Valores de $pc < 0.05$ estão destacados em vermelho