

**LEIDIANE LIMA DE SOUSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORNAs LIGADOS À EPILEPTOGÊNESE EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS EPILÉPTICOS**

**BRASÍLIA, 2019**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LEIDIANE LIMA DE SOUSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORNAS LIGADOS À EPILEPTOGÊNESE EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS EPILÉPTICOS**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestra  
em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Mortari**

**Brasília 2019**

**LEIDIANE LIMA DE SOUSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORNAs LIGADOS À EPILEPTOGÊNESE EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS EPILÉPTICOS**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestra  
em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.**

**Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida  
Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Ângela Patrícia Santana  
Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Giane Regina Paludo  
Universidade de Brasília**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças e nunca ter me deixado desistir de realizar este sonho, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Marcio, e à minha filha Sophia, por todo apoio e incentivo, por serem a minha fonte inspiradora nos momentos em que quase desisti. Principalmente por todas as vezes que estive ausente e meu esposo cuidou da nossa filha e da nossa casa por nós dois e também por sua compreensão nos meus momentos de ausência para me dedicar aos meus estudos.

Ao meu pai Lindomar, minha mãe Luzineide e o meu irmão Matheus que com muito esforço nunca me deixaram faltar nada me dando a grande oportunidade de estudar, dedico a eles, em especial à minha mãe, cada aprendizado e cada oportunidade profissional.

Aos meus irmãos Leandro e Lucas, à minha irmã Leodelma e sobrinho Gabriel pelo apoio e incentivo mesmo distantes.

Aos meus orientadores, Ricardo Titze e Ana Carolina, por todo apoio ao longo desta caminhada. Também gostaria de deixar um agradecimento especial à Simoneide Titze por toda sua contribuição e apoio principalmente nesta reta final, período em que as energias já estão esgotadas. A vocês o meu muito obrigada! Agradeço a esta instituição de pesquisa por possibilitar a execução deste trabalho científico e a realização deste sonho.

Aos meus amigos de trabalho e parceiros de pesquisa, por toda a ajuda e apoio durante este período tão importante da minha formação acadêmica. Em especial o Gabriel, a Franciele e Camila. Agradeço também a todos os residentes professores e técnicos do laboratório de Patologia Clínica.

Obrigada Flávia Tinoco, Jamilli Miranda, Tamara Lourenzatto, Mariana Chaves, Jordan Freitas e Claudia (Claudinha), por todo incentivo e apoio emocional em vários momentos desta jornada.

Um agradecimento muito especial aos pacientes e aos seus tutores, os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

“Nós crescemos pensando que o nosso destino estava nas estrelas, agora sabemos que, em boa parte nosso destino está nos genes”.

**(James Dewey Watson)**

## RESUMO

A epilepsia canina é a doença neurológica mais comum na Medicina Veterinária. O diagnóstico clínico de pacientes com epilepsia idiopática requer exame neurológico, juntamente com exames laboratoriais e de imagens. No entanto, o diagnóstico errôneo da epilepsia ocorre com frequência na rotina clínica. microRNAs circulantes representam importantes biomarcadores de doenças cerebrais. Examinamos cinco microRNAs, miR-34a, -134, -132, -382 e -26a, para a escolha de um alvo e de um microRNA endógeno calibrador. MiR-26a e miR-382 foram os melhores candidatos a alvo e a calibrador, respectivamente. Em seguida, testamos nosso protocolo de RT-qPCR em um grupo de indivíduos epiléticos (N = 10) em comparação com indivíduos saudáveis (N = 10). Cães epiléticos mostraram tendência de aumento de 1,45 vezes no conteúdo de miR-26a no plasma em comparação aos animais sadios (P = 0,2749). Essa assinatura foi encontrada em 70% dos cães com epilepsia idiopática, revelando a sensibilidade do método. Também verificamos satisfatória especificidade, uma vez que apenas 20% dos animais controles saudáveis foram falsos positivos. A acurácia foi estimada mediante determinação da área sob a curva (AUC, *area under the curve*) de acordo com análise de curva ROC (Receiver operating characteristic), obtendo-se o valor de 0,61. Este resultado sugere que miR-26a tem potencial para uso em combinação com outros microRNAs que ofereçam maiores valores de AUC, as denominadas assinaturas de múltiplos alvos, mas não como um biomarcador único para a epilepsia canina. O presente trabalho padronizou um método de RT-qPCR capaz de identificar microRNAs expressos aberrantemente em amostras de plasma de cães diagnosticados com epilepsia idiopática. Nosso estudo também revelou um calibrador estável para ensaios futuros de RT-qPCR com cães epiléticos, miR-382, e um potencial alvo para assinaturas de microRNAs ligados à epilepsia canina, miR-26a.

**Palavras chave:** epilepsia canina, microRNA, biomarcador, cão, plasma.

## ABSTRACT

Canine epilepsy is the most common neurological disease in Veterinary Medicine. Clinical diagnosis in patients with idiopathic epilepsy requires a neurological examination along with laboratory exams and brain imaging. However, misdiagnosis of epilepsy frequently occurs in the clinic routine. Circulating microRNAs represent valuable biomarkers of brain diseases. The present work set up a RT-qPCR method capable to identify microRNAs aberrantly expressed in plasma samples of dogs diagnosed with idiopathic epilepsy. We first examined five microRNAs, miR-34a, -134, -132, -382, and -26a, for choosing a target and a calibrator endogenous microRNAs. We found miR-26a and miR-382 the best candidates for target and calibrator, respectively. Then we tested our RT-qPCR scheme in a group of epileptic individuals (N=10) in comparison with healthy subjects (N=10). Epileptic dogs tended to show a 1.45 fold increase of miR-26a plasma content compared to controls (P=0,2749). This signature was found in 70% of dogs diagnosed with epilepsy, revealing the sensitivity of the method. Specificity was also satisfactory, as only 20% of healthy control animals were false positives. Accuracy was measured by the ROC (Receiver operating characteristic) analysis, which revealed an AUC (*Area under the curve*) value of 0.61. This value points this target might be used in combination with other microRNAs in signatures with increased accuracy, but not as a unique biomarker for canine epilepsy. In conclusion, the present work set up a straightforward method for identification of aberrantly expressed microRNAs in plasma dog samples. We also revealed a stable calibrator for further RT-qPCR studies with epileptic dogs, miR-382, and a potential target for microRNAs signatures of dog epilepsy, miR-26a.

**Keywords:** canine epilepsy, microRNA, biomarker, dog, plasma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese dos microRNAs.....	18
Figura 2. Rendimento de microRNAs de acordo com protocolo de uma ou duas eleições de coluna.....	31
Figura 3. Relação entre estado clínico dos animais e rendimento de microRNAs em protocolos de uma ou duas eleições de coluna.....	32
Figura 4. Análise da estabilidade da expressão do gene controle endógeno entre indivíduos controles e epiléticos.....	33
Figura 5. Expressão plasmática de miR-26a.....	34
Figura 6. Expressão de miR-26a de cada indivíduo amostral.....	35
Figura 7. Desempenho da assinatura de miR-26a pela frequência relativa de verdadeiros positivos e negativos e falsos positivos e negativos.....	37
Figura 8. Representação da acurácia da assinatura de miR-26a mediante curva ROC.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Denominação dos indivíduos em função do grupo experimental e da expressão de miR-26a.....	36
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO – Proteína Argonauta

AntimiRs – oligonucleotídeos inibidores de microRNA

AUC – Area under the curve

cDNA – DNA complementar

Ct – Ciclo limiar (threshold cycle)

DGCR8 – Proteína nuclear

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAc - DNA complementar

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PACT – Proteína de ligação

p53 – Proteína citoplasmática 53

Pré-miRNA – MicroRNA Precursor

Pri-miRNA – MicroRNA primário

Pol II - RNA Polimerase II

RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi - RNA interferente

RNAm – RNA mensageiro

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

ROC - *Receiver operating characteristic*

TRBP – Proteína de ligação

UNB – Universidade de Brasília – UnB

UTR - Região não traduzida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 EPILEPSIA.....	14
1.2 EPILEPSIA NO CÃO.....	15
1.3 MICRORNAS – CONCEITO E BIOGÊNESE.....	17
1.4 PAPEL DOS MICRORNAS NA EPILEPTOGÊNESE.....	19
1.5 MICRORNAS DE RELEVÂNCIA PARA O PRESENTE ESTUDO.....	20
1.6 MICRORNAS COMO BIOMARCADORES.....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	25
3.2 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	26
3.3 OBTENÇÃO DE PLASMA POR CENTRIFUGAÇÃO E ARMAZENAMENTO.....	26
3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS CIRCULANTES.....	27
3.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR) .....	27
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CURVA ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC) .....	28
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	29
4.3 EXTRAÇÃO DE MICRORNAS.....	30
4.4 SELEÇÃO DO MICRORNA ALVO E DO CALIBRADOR ENDÓGENO.....	32
4.5 EXPRESSÃO RELATIVA DE MIR-26A NO PLASMA DE ANIMAIS EPILEPTICOS.....	33

4.6 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS DE MIR-26A EM ANIMAIS EPILÉPTICOS E CONTROLES.....	34
4.7 ANÁLISE DE DESEMPENHO DO MÉTODO MEDIANTE COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A ASSINATURA.....	36
4.8 REPRESENTAÇÃO DE DESEMPENHO DO ALVO MEDIANTE CURVA ROC.....	37
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EPILEPSIA

Crises epiléticas são definidas como manifestações da atividade epilética sincrônica, excessiva e geralmente autolimitante dos neurônios cerebrais. A epilepsia é uma doença cerebral decorrente da predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas, e acomete seres humanos e animais (1, 2).

Nos seres humanos a epilepsia está entre as doenças neurológicas mais frequentes e, devido à sua complexidade, pode não responder à terapia com antiepiléticos (3). Além disto, a eficácia e a tolerabilidade dos fármacos anticonvulsivantes utilizados para o controle dos distúrbios são fatores limitantes em muitos casos (4).

O diagnóstico das epilepsias deve ser realizado com base no histórico do paciente, exame físico, análise de exames complementares de imagem, filmagens das crises, e eletroencefalograma (5). Associado aos dados anteriores, deve-se levar em consideração aspectos como: idade do paciente, características motoras, situação de ocorrência, manutenção ou perda da consciência, fatores desencadeantes, padrões de ocorrência dos eventos e posterior classificação das crises epiléticas. O conjunto destas informações irá assim nortear o diagnóstico clínico da epilepsia, além de projetar um possível prognóstico e condutas terapêuticas (6).

O detalhamento dos vários tipos de crises convulsivas e seus componentes etiopatogênicos ultrapassa o escopo do presente estudo. Porém, cabe informar sobre um tipo especial de crise, a epilepsia do lobo temporal (TLE), que tem provido informações relevantes sobre mecanismos subjacentes de neuropatogênese, aspecto de importância para esta investigação. A epilepsia do lobo temporal (TLE) acomete o hipocampo, a amígdala ou ambas as estruturas, sendo considerada o tipo mais comum de epilepsia focal resistente à medicação (7). Neste tipo de epilepsia, o hipocampo apresenta focos de degeneração

conhecidos como esclerose hipocampal, com intensa proliferação de células gliais (gliose) e morte neuronal. Além disto, em estudos com modelos experimentais de epilepsia em roedores, o hipocampo mostra significativa reorganização de células neuronais, evidenciada por brotamento axonal de fibras musgosas (*sprouting*) e sinaptogênese (8). Ensaios com animais de laboratório mostram também que tais alterações neuropatológicas durante a epileptogênese estão associadas a padrões aberrantes de RNAs regulatórios, conforme será abordado posteriormente (9).

O cão é também considerado modelo viável para estudos fundamentais sobre a neurobiologia desta doença, havendo marcada similaridade entre a patogênese das síndromes epiléticas que acometem o homem e o cão (10-14). Neste sentido, destaque-se: (i) cão e homem podem apresentar crises convulsivas recorrentes e espontâneas, e manifestar, também quadros de *status epilepticus* (15); (ii) alterações genéticas presentes em cães epiléticos podem ser evidenciadas também no homem (10); (iii) casos de epilepsia refratária a vários medicamentos existem em ambas as espécies (10) e; (iv) cães, mais do que animais de laboratório, representam um modelo natural para estudo da epilepsia humana pós-traumática, considerando-se aqui que os traumatismos cerebrais são fatores de risco para a epileptogênese em ambas as espécies (16-18).

Assim sendo, estudos em cães contribuem com a elucidação da patogênese da doença em seres humanos, além de apresentar potenciais alvos terapêuticos para validação futura. Em síntese, a contribuição dos vários modelos animais de epilepsia é essencialmente importante para ampliar o conhecimento acerca desta doença neurológica de difícil terapêutica, projetando-se ganhos qualitativos para a clínica veterinária e medicina humana (4, 19).

## 1.2.EPILEPSIA NO CÃO

Trata-se de distúrbio neurológico prevalente na clínica de pequenos animais, acometendo cerca de 1% da população geral de cães (1, 2, 20, 21). A

epilepsia canina é uma doença encefálica complexa, onde se manifestam sinais clínicos resultantes de disfunções cerebrais, que, por sua vez podem advir de variadas afecções (2, 7).

As crises epiléticas podem ter origem genética ou serem desencadeadas após insulto inicial (traumas craniocéfálicos, neoplasias, doenças infecciosas e inflamatórias), e se desenvolvem de forma progressiva durante o período “latente” ou de “epileptogênese” (22). Os casos de epilepsias puramente genéticas, com comprovada alteração de canais iônicos, por exemplo, são afecções raras nos cães (2, 3).

No sentido finalístico, tais alterações neuropatológicas irão convergir para a ocorrência das denominadas crises convulsivas recorrentes e espontâneas no paciente epilético, cujas manifestações ictais variam de acordo com as áreas encefálicas afetadas (2). Crise convulsiva, neste sentido, é a manifestação clínica comportamental de focos de hiperatividade sincrônica de grupos de células neuronais (23).

O diagnóstico preciso da epilepsia em cães é aspecto fundamental na abordagem clínica dos pacientes. Deve ser realizado a partir de cuidadosa anamnese e questões específicas relativas à caracterização das crises e anormalidades pré e pós-ictais, vídeos do paciente no momento das crises, seguidos de exame físico criterioso e exames complementares. Hemograma, urinálise e bioquímicos, além de sorologias para doenças infecciosas, são fundamentais para descartar possíveis distúrbios metabólicos ou sistêmicos, uma vez que numerosos eventos paroxísticos podem mimetizar crises epiléticas (24). A eletroencefalografia auxilia na caracterização das crises, porém este exame tem uma série de limitações técnicas que reduz a viabilidade de sua utilização na medicina veterinária. Exames de imagem, especialmente ressonância magnética, são importantes para determinar alterações estruturais que podem ser a causa das crises, porém os mesmos não estão disponíveis facilmente e são de alto custo (24).

Cães entre seis meses a seis anos, com crises epiléticas bem caracterizadas, exames interictais e exame neurológico sem alterações e nos quais excluem-se causas metabólicas, tóxicas e infecciosas, podem ter o

diagnóstico presuntivo de epilepsia idiopática. A exclusão de danos estruturais e histórico familiar de crises epiléticas suportam o diagnóstico (24).

A conduta terapêutica inclui a administração de anticonvulsivantes, porém cerca de 75% a 85% dos cães ainda apresentarão crises, e cerca de 25% apresentam refratariedade à terapia medicamentosa (25-27). Ademais, falhas de resposta terapêutica podem advir da falta de acompanhamento ou falha dos tutores na administração do medicamento. Infelizmente, tais inconsistências podem acarretar em baixa qualidade de vida do animal, morte natural, ou mesmo eutanásia (28).

### 1.3.MICRORNAS – CONCEITO E BIOGÊNESE

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs pequenos, não codantes, que regulam a expressão de RNAs mensageiros – fenômeno denominado de interferência de RNA pelos pesquisadores Fire e Melo, cuja descoberta lhes rendeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006 (29-31). Este processo biológico ocorre naturalmente no organismo, é dependente de várias proteínas acessórias (Drosha, Dicer, Argonata-2), e tem como alvo de regulação a região 3'-UTR dos RNAs mensageiros (32). O resultado final? A redução do conteúdo do respectivo RNAm alvo – que contenha sequências complementares ao microRNAs, processo referido como *knockdown* ou silenciamento gênico (33).

A biogênese dos microRNAs baseia-se no processo celular envolvendo duas etapas, que se inicia no núcleo e finaliza no citoplasma (Figura 1). Tem início a partir da geração de um transcrito primário, onde uma longa molécula de microRNAs com estrutura em formato de grampo de cabelo (*hairpin*) é processada ainda no núcleo pela enzima Drosha e posteriormente exportada ao citoplasma pela proteína exportina 5. Neste novo compartimento celular, o microRNA será processado pela enzima Dicer e, em seguida, irá se associar a proteínas celulares formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Uma enzima presente no complexo irá remover uma das fitas (denominada de *passenger*, *sense*), sendo que a remanescente (fita *guide*,

*antisense*) permanecerá ligada ao complexo RISC para guiá-lo até o RNAm alvo que contenha sequências complementares. A ligação do complexo RISC ao RNAm irá impedir a tradução ribossomal da mensagem em proteínas e/ou causar perda de estabilidade, resultando finalmente em silenciamento gênico (31, 34).

Com base no exposto, conclui-se que microRNAs devem ser adequadamente expressos para o bom funcionamento do organismo, seja para o seu desenvolvimento embrionário ou a própria manutenção da vida (31).

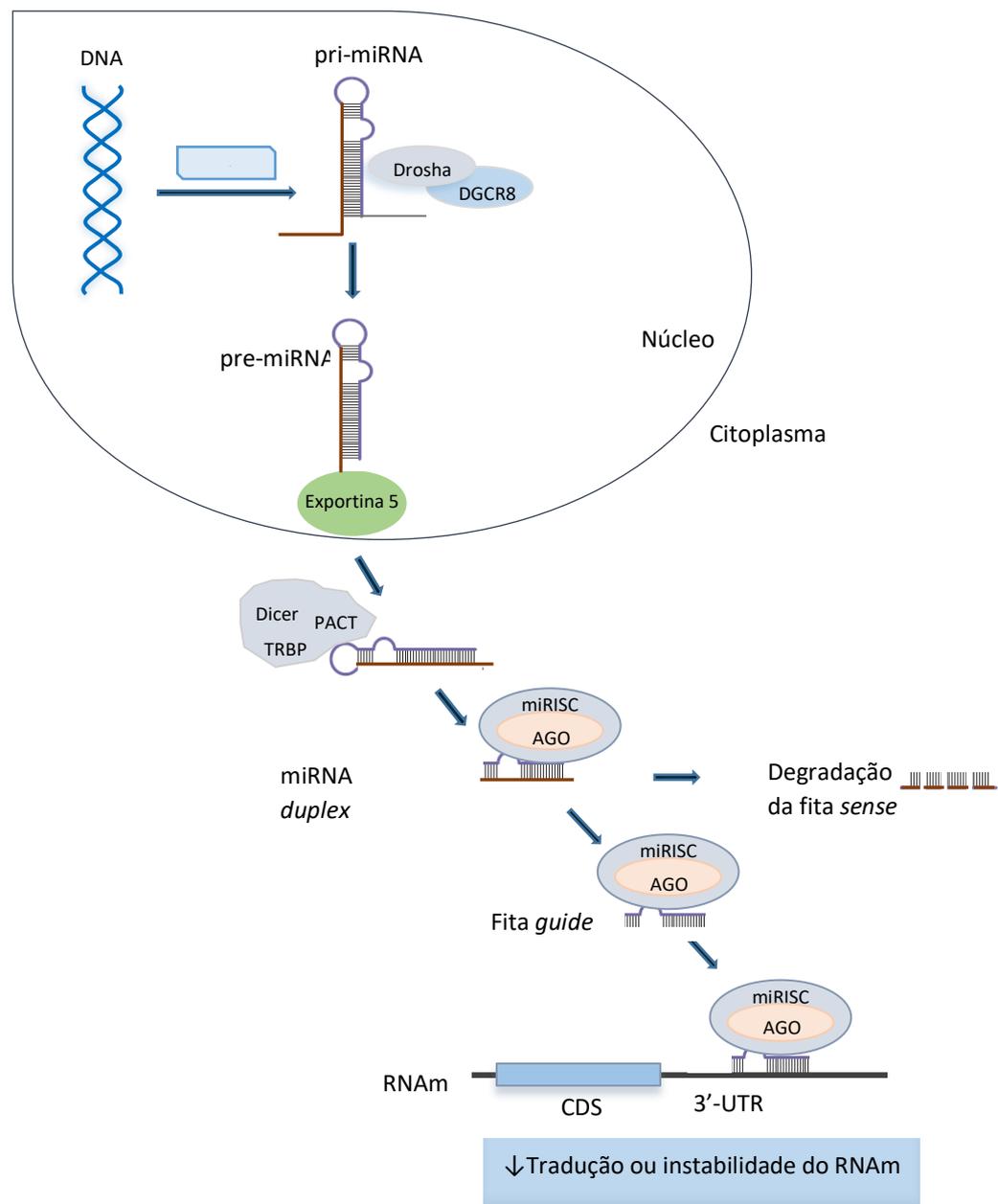


Figura 1. Biogênese dos microRNAs. A transcrição dos microRNAs primários (pri-miRNA) se inicia no núcleo da célula e é realizada pela RNA polimerase II. O pri-miRNA sofre processamento pelo complexo Drosha/DGR8, formando os pre-miRNAs. A seguir, a proteína exportina 5 transporta o pre-miRNA para o citoplasma, sendo na sequência submetido a clivagem

pela Dicer para a formação dos microRNAs maduros (miRNA *duplex*). O complexo RISC se liga ao miRNA *duplex* eliminando a fita *sense* e direcionando a fita *guide* para o RNA mensageiro alvo. Neste momento, o miRNA em fita simples acopla-se de forma parcial à região 3'UTR do RNAm mediante formação de pontes de hidrogênio, diminuindo sua tradução ou estabilidade. Tal fenômeno é denominado silenciamento gênico. (Adaptado de Titze-de-Almeida et al., 2018). AGO – *Proteína Argonauta*; DGCR8 – *Proteína nuclear*; PACT – *Proteína de ligação*; TRBP – *Proteína de ligação*; UTR: *Untranslated Region*;

#### 1.4 PAPEL DOS MICRORNAs NA EPILEPTOGÊNESE

Centenas de genes alvos são regulados por um único microRNA (34). Nos perguntamos então: estariam tais RNAs regulatórios definitivamente ligados à patogênese dos distúrbios neurológicos?

Expressões aberrantes de microRNAs foram descritas em vários distúrbios neurodegenerativos, incluindo Alzheimer e Parkinson (35-37). As epilepsias – foco do presente estudo, seguem a mesma tendência. Foi identificado que mudanças no conteúdo de alguns microRNAs, em humanos epiléticos, podem culminar com as alterações patológicas progressivas ao longo do período latente ou de epileptogênese, resultando em degenerações permanentes do sistema nervoso (22). Desta forma, as epilepsias constituem exemplo concreto do papel que determinados microRNAs exercem na fisiopatologia de um distúrbio neurológico crônico e degenerativo, apresentando assim relevância científica, valor heurístico (38-40).

Considerando-se o cérebro de dado indivíduo epilético, microRNAs aberrantemente expressos contribuem para eventos criticamente importantes da patologia em curso, tais como: neurodegeneração, neurogênese, proliferação de células da glia, lesão axonal e brotamento dendrítico (*sprouting*), plasticidade neuronal, lesão da barreira hematoencefálica, neuroinflamação, bem como reorganização da arquitetura molecular das células neuronais (17, 22, 38).

Trabalhos pioneiros vinculam microRNAs à patogênese da epilepsia, mostrando suas expressões aberrantes em tecidos cerebrais, sejam estes ressectados de pacientes humanos com epilepsia refratária a anticonvulsivantes, e também em modelos murinos desta doença (39, 41). O papel de microRNAs na patogênese das epilepsias foi confirmado por testes de “proof-of-concept”. Neste sentido, a inibição de certos microRNAs ligados à epileptogênese,

mediante uso de oligonucleotídeos antisense sintéticos (AntimiRs), foi capaz de impedir o desenvolvimento da epilepsia experimental. Por exemplo, o tratamento com AntimiRs para miR-134 mostrou-se eficaz no controle de alterações críticas da epileptogênese, incluindo morte neuronal, gliose, e as próprias crises convulsivas, conforme resultados obtidos em vários modelos experimentais, incluindo ácido caínico, pilocarpina, pentilenotetrazol, e também estimulação da via perfurante (9, 42, 43).

### 1.5 MICRORNAS DE RELEVÂNCIA PARA O PRESENTE ESTUDO

O atual estudo pré-selecionou três alvos para análise no plasma de cães epiléticos, com base em estudos usando modelos de epilepsia e outras doenças neurodegenerativas (38, 44, 45). São eles: miR-34a, miR-134, e miR-26a.

O microRNA 34a pertence à denominada família miR-34, composta por miR-34a, miR-34b e miR-34c. Foram primeiramente descritos como supressores tumorais (46, 47), sendo parte de uma rede de supressão do desenvolvimento de tumores ligada à proteína p53 (48). Mir-34a sofre regulação direta de p53, e sua hiperexpressão causa apoptose, bloqueio do ciclo celular e senescência (49-51). A morte de células em distúrbios neurodegenerativos também está relacionada com este eixo p53 – mir-34 (52). Estudos com *Drosophila melanogaster*, mostram que a expressão de miR-34a aumenta com o envelhecimento dos indivíduos (47, 53, 54). Ademais, animais modelos da doença de Alzheimer, também apresentam níveis superiores de miR-34a (55). Alterações cerebrais dependentes da idade também foram relacionadas a aumentos nos níveis plasmáticos de miR-34a (47). Nosso grupo recentemente reportou que miR-34a foi o microRNA com maior expressão em região de marcada morte neuronal, o estriado de ratos, no parkinsonismo experimental induzido por rotenona (44). Também já foi relatado que células dopaminérgicas SH-SY5Y expostas a esta mesma toxina mostram aumento deste microRNA, e que a inibição do mesmo atenua a injúria celular (56).

Quanto às epilepsias, miR-34a apresentou expressão aumentada no hipocampo de ratos e camundongos após convulsões induzidas por ácido caínico e lítio-pilocarpina (40, 57). Para vincular este achado com a patogênese da doença, autores mostraram que inibidores do miR-34a injetados no cérebro podem prevenir a morte neuronal no hipocampo induzida pelas crises convulsivas (40).

No que se refere a miR-134, trata-se de microRNA com papel no desenvolvimento do sistema nervoso, no controle da neuritogênese e crescimento medular (58). Contribui para a plasticidade neuronal ao exercer papel regulatório sobre a atividade pós-sináptica dos neurônios (59). Estudo mostra – de maneira conclusiva – que miR-134 participa da epileptogênese nas epilepsias do lobo temporal em camundongos (9). Novamente, a hipótese foi confirmada mediante uso de inibidores específicos de miR-134, que conseguiram reduzir a densidade de ramificações dendríticas de células piramidais da região CA3 do hipocampo, alteração celular diretamente relacionada aos eventos da epileptogênese. Houve paralela diminuição da injúria de CA3 do hipocampo e controle das crises convulsivas induzidas pela injeção intra-amigdalár de ácido caínico (9).

Finalmente, miR-26a. Nosso grupo havia observado aumento significativo deste microRNAs no referido estudo sobre degeneração cerebral do estriado induzida pela toxina rotenona (44). Além disto, miR-26a mostrou-se hiperexpresso em células sanguíneas mononucleares em pacientes com Parkinson em relação a controles sadios (60). Este microRNA também suprime a expressão de um importante fator neurotrófico, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), ao exercer RNAi sobre a região 3'-UTR deste RNAm alvo (61).

Quanto às epilepsias, há resultados de aumento ou de diminuição deste alvo em áreas cerebrais de ratos submetidos a modelos de epilepsia (39). Além disto, trabalhos anteriores mostram o potencial de miR-26a como biomarcador de diversas doenças, incluindo cardíacas, hipertensão arterial pulmonar, tumores cerebrais, entre outras (62-64).

## 1.6 MICRORNAS COMO BIOMARCADORES

O termo “biomarcador” se refere a mensuração acurada e reprodutível obtida de uma amostra biológica do paciente que revela um determinado processo biológico (65). Ou seja, um indicador de determinado processo biológico normal, processo patogênico, ou mesmo resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (66). Tais conceitos se aplicam perfeitamente às doenças neurológicas (67, 68). Deve-se considerar, entretanto, a limitação de se prospectar o *status* da degeneração cerebral mediante biomarcadores, haja visto que doenças neurológicas apresentam mecanismos de patogenicidade complexos e ainda pouco compreendidos (69).

Recentemente, foi confirmado que os microRNAs circulantes podem ser utilizados como biomarcadores de diversas doenças (70). Na Medicina Veterinária, os microRNAs circulantes têm emergido como biomarcadores promissores para diferentes afecções, tais como cardiopatias em cães, monitoração de dor aguda associada à laminite em equinos (71, 72).

Quanto aos cães, poucos estudos avaliaram o potencial de microRNAs como biomarcadores de distúrbios neurológicos. As expressões dos microRNAs miR10b, miR-21, miR-19b, miR-181c, miR-633, miR-128-3p, miR-155-5p, miR210, miR-922, miR-103a-3p, miR-194-5p, miR146, miR155 e miR124 foram analisadas no líquido cefalorraquidiano de 20 cães com doenças do sistema nervoso central, mas apenas sete microRNAs foram detectados neste líquido: miR-10b-5p, miR-19b, miR-21-5p, miR-30b-5p, miR-103a-3p, miR-124 e miR-128-3p (73).

Concluindo, novos estudos para identificação de microRNAs diferencialmente expressos na epilepsia do cão se fazem necessários, como método de apoio ao diagnóstico clínico da doença. Biomarcadores baseados em microRNAs poderão trazer auxílio e refinamento nos exames diagnósticos voltados à epilepsia do cão, haja visto que em cerca de 1/3 dos casos tal doença é mal diagnosticada (74, 75)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do qPCR em tempo real para identificar microRNAs com expressão aberrante no plasma de cães epiléticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Realizar recrutamento de pacientes epiléticos e indivíduos saudáveis para os ensaios experimentais, respeitados os critérios de inclusão e de exclusão;
- (ii) Padronizar condições ideais para a colheita de sangue e obtenção de plasma, visando preservar a integridade de microRNAs circulantes;
- (iii) Aprimorar protocolo para purificação de microRNAs contidos em amostras de plasma de cão;
- (iv) Quantificar por RT-qPCR os microRNAs miR-34a, -134, -132, -382, e -26a, para escolha de um microRNAs alvo e um endógeno calibrador;
- (v) Padronizar metodologia de qPCR para quantificação de microRNAs isolados do plasma de cães;
- (vi) Testar a metodologia de RT-qPCR padronizada utilizando amostras de cães epiléticos e cães clinicamente saudáveis;
- (vii) Examinar a sensibilidade e especificidade do alvo, visando-se caracterizar microRNAs diferencialmente expressos na epilepsia canina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UnB (CEUA). No sentido metodológico, empregou-se a seguinte estratégia experimental para alcance dos objetivos propostos, dividida em três etapas. Inicialmente foram padronizados os critérios clínicos para recrutamento de indivíduos controles e de cães epiléticos idiopáticos, bem como a metodologia de RT-qPCR para quantificação de microRNAs em amostras de plasma. Na segunda etapa, realizou-se ensaio-piloto para teste de três microRNAs ligados à epileptogênese, visando-se selecionar um único alvo diferencialmente expresso na epilepsia canina. Finalmente, quantificou-se a expressão deste microRNA no plasma de animais controles e epiléticos, organizados em coortes de 10 indivíduos cada. Os resultados de expressão gênica embasaram a análise de desempenho deste potencial biomarcador, em termos de sensibilidade, especificidade, e acurácia medida pelo método da curva ROC.

#### 3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

A coleta de sangue total dos cães utilizados no presente estudo foi realizada mediante autorização do tutor. Foram organizadas duas coortes de indivíduos (N=10/grupo), a de pacientes epiléticos e aquela de indivíduos saudáveis que formaram o grupo controle. Pacientes epiléticos foram recrutados por apresentarem histórico de convulsões e sinais clínicos de alterações neurológicas.

A avaliação clínica realizada em todos os animais incluiu exame neurológico completo, com análise do estado mental/comportamento, postura do tronco e cabeça, nervos cranianos, reflexos espinhais e segmentares.

O grupo de estudo foi composto por cães apresentando crises epiléticas de provável causa genética baseado em informações do consenso internacional

de epilepsia veterinária (24), para tanto, os critérios de inclusão considerados foram a idade de início dos sinais clínicos entre 1 a 6 anos, sorologia negativa para toxoplasmose, neosporose, erlichiose e cinomose. O exame neurológico sem alterações entre as crises e ausência de outras doenças neurológicas concomitantes também foram obrigatórios. O grupo controle incluiu o mesmo número de cães da mesma faixa etária, sem sinais neurológicos ou histórico de doenças neurológicas prévias.

### 3.2 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE

Foi coletado volume de 2 ml pela punção da veia jugular de cães saudáveis e epiléticos, com seringa descartável e estéril BD Plastipak™ de 3ml e agulha hipodérmica estéril 25 x 0,7 mm, transferido imediatamente para um tubo BD Vacutainer® contendo EDTA K2 (ácido etilenodiaminotetracético K<sub>2</sub>) jateado na parede interna do tubo. Sangue e EDTA foram homogeneizados mediante dez procedimentos de inversão do tubo em angulações de 180°. A amostra de sangue foi mantida a 4 °C até a centrifugação, estabelecido intervalo máximo de uma hora entre a colheita e a centrifugação.

### 3.3 OBTENÇÃO DE PLASMA POR CENTRIFUGAÇÃO E ARMAZENAMENTO

O plasma foi obtido mediante centrifugação das amostras a 1.300 x g durante 10 minutos, à temperatura de 4 °C. Após a primeira centrifugação, o material foi novamente centrifugado a 3.000 x g, mesmo tempo e temperatura (10 minutos, 4 °C), para se eliminar possíveis plaquetas residuais.

O plasma foi armazenado em alíquotas de 250 microlitros em microtubos tipo eppendorf de 1,5mL, para evitar ciclos de congelamento e descongelamento que viessem a degradar os microRNAs. As alíquotas foram armazenadas a - 80 °C ou imediatamente utilizadas para extração dos microRNAs.

As amostras que apresentaram sinais de hemólise, detectados por inspeção visual (cor rosada ou avermelhada), foram descartadas. Neste caso, houve, nova coleta e extração do plasma, como descrito anteriormente no item 3.2.

### 3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS CIRCULANTES

Os microRNAs presentes no plasma, de cães saudáveis e epiléticos foram extraídos usando-se o kit miRNeasy mini kit, conforme protocolo descrito pelo fabricante (Qiagen) e utilizado em publicações anteriores (76, 77). A quantificação foi realizada por fluorimetria (Qubit® 2.0 firmwares 3.11; Thermo Fisher Scientific, Inc).

### 3.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

A obtenção do DNA complementar (cDNA) dos microRNAs foi realizada por transcrição reversa com uso do kit comercial TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). A quantificação dos microRNAs foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando sondas fluorescentes Taqman, no equipamento termociclador QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems). A mistura de reação foi composta por: 2 µl de cDNA, 1 µl de primers específicos para cada microRNAs: miR-34a, 000426; miR-134, 001186; miR-132, 002132; miR-382, 000572; miR-26a, 000405 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 10 µl de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) e água milli-Q para um volume final de 20 µl de reação. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: dois ciclos iniciais (50°C por 2 min, 95°C por 20 s), seguido por 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 60°C por 1 min). Cada amostra foi testada

em triplicata, incluindo-se controles negativos no ensaio. Utilizou-se o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cálculo da expressão relativa dos microRNAs, conforme descrito por Livak et al. (2001) (78).

O ponto de corte estabelecido no presente estudo foi com valores de Ct abaixo de 33, baseado em estudo anterior, que avaliou o conteúdo de microRNAs em amostras de sangue mediante RT-qPCR (77).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CURVA ROC (*RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC*)

Os resultados numéricos foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 8. Foi inicialmente realizado teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, para apoio na decisão sobre uso de testes paramétricos ou não-paramétricos. Comparações entre dois grupos, por exemplo indivíduos controles e epiléticos, e que seguiram a distribuição normal, foram submetidos ao teste paramétrico t de Student. Dados que não seguiram a distribuição normal foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância estatística adotado foi de  $p < 0,05$ .

A metodologia da curva ROC foi empregada para análise do desempenho do microRNA, em termos de especificidade, sensibilidade, e acurácia (79, 80).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram obtidas amostras de 10 cães com crises epiléticas e 10 cães clinicamente saudáveis. As raças dos cães do grupo afetado variaram, sendo as raças de cães de pequeno porte representadas por Maltês, Shitzu e sem raça definida. As raças de médio a grande porte incluíram Fila Brasileiro, Golden Retriever, Labrador Retriever, Border Collie, American Staffordshire. Do total de animais epiléticos, seis eram machos e quatro fêmeas, no grupo de pacientes sadio, sete eram machos e três fêmeas, com peso corporal variando de 3 a 55 kg (média = 28,68 kg). A idade dos animais variou de 1,5 a 3 anos, confirmando a precocidade do desenvolvimento dos sinais clínicos. Para um animal resgatado, não foi possível precisar a data de nascimento.

Quanto ao tipo de manifestação das crises, todos os cães apresentavam crises tônico-clônicas, as mais frequentes em cães.

Nenhum dos cães selecionados para o estudo apresentou déficits interictais ou sinais que pudessem indicar outras anormalidades neurológicas.

Cinco animais fizeram tomografia computadorizada contrastada para diferenciação de possíveis alterações estruturais, confirmando-se a ausência de anormalidades.

Animais que estavam recebendo mais de um fármaco para controle das crises ou em casos onde as crises ainda não estavam controladas durante o período de tratamento, foram considerados cães refratários à terapia medicamentosa, e estes representaram a metade dos cães do grupo afetado (n=5). Nesse contexto, nossos pacientes recebiam um dos seguintes tratamentos: monoterapia com fenobarbital, monoterapia com brometo de potássio, fenobarbital associado ao brometo de potássio, ou associações de três fármacos para controle das crises (fenobarbital, brometo de potássio e levotiracetam).

#### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

A colheita de sangue venoso em tubo BD Vacutainer® com EDTA foi bem-sucedida a partir da veia jugular que, em relação a veia cefálica, permitiu coleta rápida e com menor risco de hemólise das amostras. Seguiu-se ao armazenamento a 4 °C, o que é viável em centros de atendimento clínico a pequenos animais. O passo seguinte da centrifugação requereu equipamento específico, a centrífuga refrigerada, que é comumente encontrada em laboratórios de patologia clínica. Em caso de solicitação futura deste exame por clínicas veterinárias, a amostra teria que ser encaminhada do local de coleta até este laboratório para obtenção do plasma, no prazo de 1 a 4 horas.

O plasma foi devidamente obtido mediante centrifugação, conforme descrito anteriormente. Buscou-se reduzir a possível contaminação de plaquetas na amostra, assim permitindo a obtenção apenas dos microRNAs livres circulantes no plasma dos animais (81). A partir de cada amostra de 2mL de sangue colhido obteve-se em média 1.000 µL de plasma.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE MICRORNAS

O presente estudo selecionou o kit comercial miRNeasy mini kit (Qiagen) para extração de microRNAs do plasma, incluindo-se modificação no protocolo recomendado pelo fabricante. O passo experimental realizado ao final do ensaio – a eluição do microRNAs da coluna de extração utilizando-se 30 µL de água RNase-free, foi repetido uma vez. Esta modificação no protocolo melhorou significativamente o rendimento obtido de microRNAs em cada amostra, conforme mostra o resultado de quantificação por fluorometria descrito na Figura 2. O rendimento médio obtido no protocolo de uma passagem, de 0,79 ng/µL, foi significativamente melhorado para 2,13 ng/µL com a modificação realizada ( $P=0,006$ , Mann-Whitney).  $N= 8$  cães por grupo.

**Concentração média de microRNAs medido por fluorimetria (N= 8 cães por grupo)**

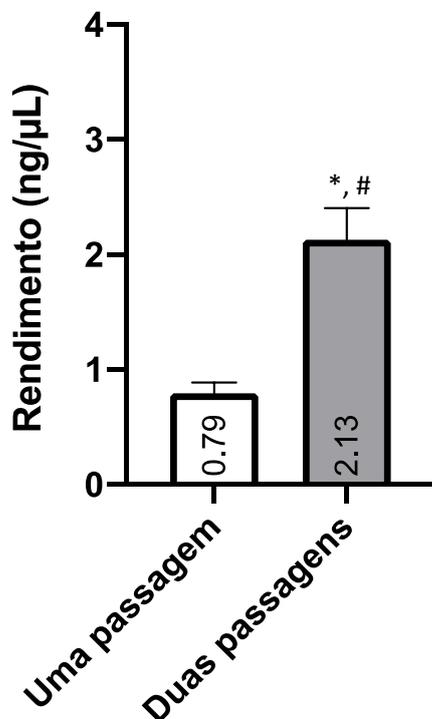


Figura 2. Rendimento de microRNAs de acordo com protocolo de uma ou duas passagens de coluna (N = 8 cães por grupo). A concentração de microRNAs na amostra (ng/μL) foi medida por fluorimetria. O procedimento com duas eluições da coluna, barra cinza, apresentou rendimento significativamente maior que o de uma única passagem, barra branca (2,13 versus 0,79 ng/μL). Dados expressos como média ± EPM. \*, P=0,0004, teste t de Student; # P=0,0006, teste de Mann-Whitney.

Curiosamente, observamos que o rendimento das extrações foi superior em cães epiléticos em relação aos controles, nas duas condições de protocolo acima descritas (Figura 3). As concentrações obtidas no protocolo de uma passagem foram de 0,94 ng/μL nos animais epiléticos, e de 0,65 ng/μL nos controles. Quanto ao protocolo de duas passagens, obteve-se o rendimento de 2,54 ng/μL nos cães epiléticos e de 1,73 ng/μL nos indivíduos controles (P=0,1496).

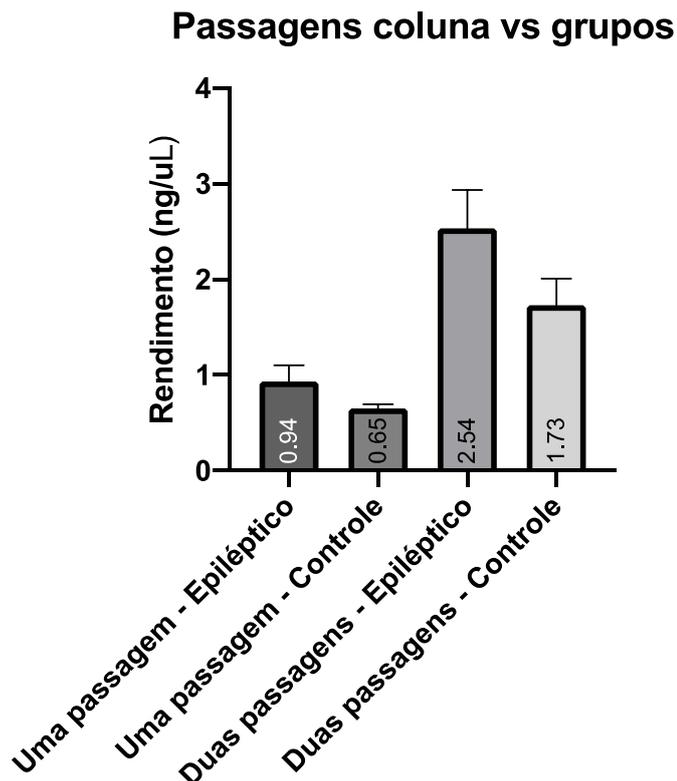


Figura 3. Relação entre estado clínico dos animais e rendimento de microRNAs em protocolos de uma ou duas passagens de coluna. O procedimento de duas passagens favoreceu a obtenção de microRNAs em ambos os grupos experimentais, mostrando que o estado de saúde dos animais não afetou significativamente o rendimento da extração. Animais epiléticos, entretanto, apresentaram tendência de aumento de rendimento em ambos os protocolos de uma eluição ( $P=0,1443$ ) e de duas eluições ( $P=0,1496$ ). A concentração de microRNAs foi medida por fluorimetria e expressa em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Dados expressos como média  $\pm$  EPM, analisados pelo teste t de Student.

#### 4.4 SELEÇÃO DO MICRORNA ALVO E DO CALIBRADOR ENDÓGENO

Foram examinados inicialmente cinco microRNAs obtidos do plasma de cães: miR-34a, miR-134, miR-132, miR-382, e miR-26a. Os alvos miR-34a, miR-134 e miR132 apresentaram quantificação abaixo do limite de detecção do método de RT-qPCR em amostras de animais controles e epiléticos, sendo assim descartados do projeto. Os dois demais microRNAs – miR-382 e miR-26a –

apresentaram concentrações plasmáticas dentro do limite de detecção do método de RT-qPCR.

O Ct de amplificação de miR-382 nos animais epiléticos e controles situou-se no mesmo ciclo de RT-qPCR, ciclo 31 (31,84 versus 31,49). Desta forma, miR-382 foi selecionado como calibrador endógeno para os cálculos de delta CT dos ensaios de RT-qPCR (Figura 4).

### Estabilidade do Calibrador Endógeno

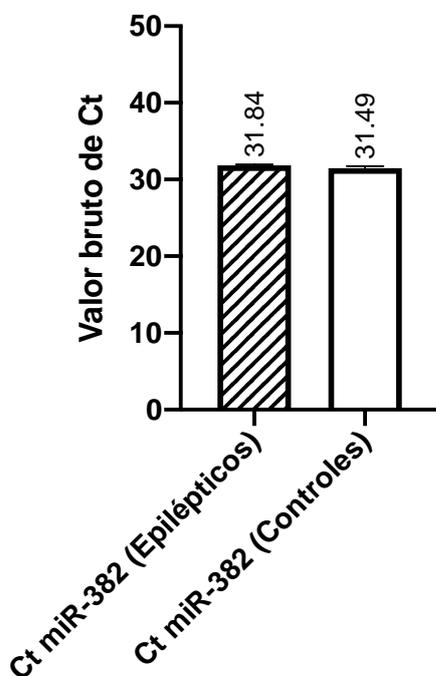


Figura 4. Análise da estabilidade da expressão do gene controle endógeno entre indivíduos controles e epiléticos. Resultados de RT-qPCR mostram valores médios do ciclo de amplificação (Crossing treshold, Ct) de miR-382 em amostras plasmáticas de indivíduos controles e epiléticos. Ambos os grupos mostraram valores de Ct dentro do ciclo 31 do RT-qPCR, sem diferença estatística.

### 4.5 EXPRESSÃO RELATIVA DE MIR-26A NO PLASMA DE ANIMAIS EPILÉPTICOS

Os resultados do presente estudo mostram que animais epiléticos apresentam níveis plasmáticos 1,45 vezes maiores de miR-26a em relação a indivíduos controle (N=10/grupo; Figura 5). Apesar de a diferença não alcançar a significância estatística aqui proposta ( $P < 0,05$ ), nota-se tendência com valor de  $P = 0,2749$  pelo teste *t* de Student, dados seguindo a distribuição normal.

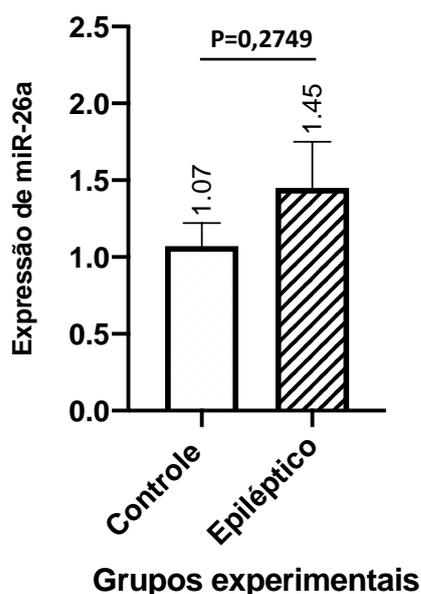


Figura 5. Expressão plasmática de miR-26a. Animais epiléticos apresentam nível de miR-26a no plasma 1,45 vezes superior ao de animais controles. Expressão de miR-26a no grupo controle foi arbitrariamente definida como 1. Conteúdo de microRNAs quantificado por RT-qPCR, com ensaios normalizados pelo calibrador miR-382, e expressão relativa expressa pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Teste *t* de Student,  $P = 0,2749$ .

#### 4.6 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS DE MIR-26A EM ANIMAIS EPILÉPTICOS E CONTROLES

Para iniciar a análise do desempenho do biomarcador, os resultados de quantificação de miR-26a plasmático foram examinados mediante gráfico Scatter plot (Figura 6). Nota-se que a maioria dos animais epiléticos,

representados pelos quadrados vermelhos, distribuem-se na posição do gráfico acima do valor 1,19, que corresponde ao ponto de corte para identificação dos indivíduos positivos, obtido da análise da curva ROC (dado não mostrado). Ou seja, sete dos dez animais epiléticos apresentaram expressão de miR-26a acima de 1,19, sendo classificados como verdadeiros positivos desta assinatura molecular (vide Tabela 1). Três animais epiléticos com expressão de miR-26a abaixo deste ponto de corte foram considerados falsos negativos – um animal clinicamente diagnosticado como epilético, mas que não apresenta a expressão de miR-26a aumentada. Quanto aos animais sadios do grupo controle, oito indivíduos de fato apresentaram expressão diminuída de miR-26a (abaixo de 1,19); ao obedecerem à regra da assinatura, foram considerados verdadeiros negativos. Os demais dois indivíduos controles foram falsos positivos – um animal clinicamente sadio, mas com expressão aumentada de miR-26a.

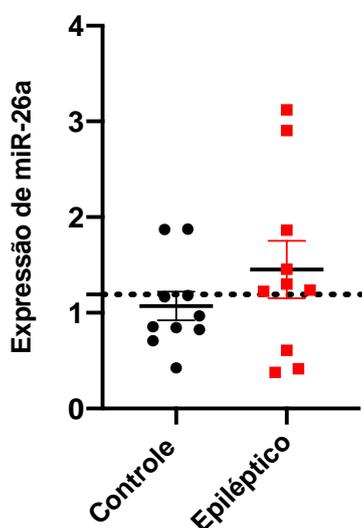


Figura 6. Expressão de miR-26a de cada indivíduo amostral. Gráfico de Scatter plot apresentando a dispersão dos valores de expressão relativa em indivíduos controles e epiléticos. Conteúdo de miR-26a quantificado por RT-qPCR, normalizado pelo controle endógeno miR-382. Expressão relativa expressa pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Linha pontilhada indica o valor do ponto de corte, 1,19, obtido pela análise da curva ROC.

Tabela 1. Denominação dos indivíduos em função do grupo experimental e da expressão de miR-26a

<b>Denominação de acordo com resultados de qPCR e curva ROC</b>	<b>Critério de classificação</b>
Verdadeiro positivo	Epiléptico com ↑ miR-26 <sup>a</sup>
Verdadeiro negativo	Sadio com ↓ miR-26 <sup>a</sup>
Falso positivo	Sadio com ↑ miR-26 <sup>a</sup>
Falso negativo	Epiléptico com ↓ miR-26a

#### 4.7 ANÁLISE DE DESEMPENHO DO MÉTODO MEDIANTE COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A ASSINATURA

O desempenho comparativo desta assinatura foi examinado quanto à frequência relativa de indivíduos positivos e negativos (verdadeiros ou falsos, conforme Tabela 1). Observa-se que 70% dos pacientes epilépticos apresentaram o biomarcador miR-26a hiperexpresso (expressão relativa acima de 1,19 vezes em relação aos controles), o que demonstra a sensibilidade do método em identificar os verdadeiros positivos (Fig. 7, barra hachurada). O método mostrou desempenho satisfatório em termos de especificidade, já que ocorreram apenas 20% de falsos positivos.

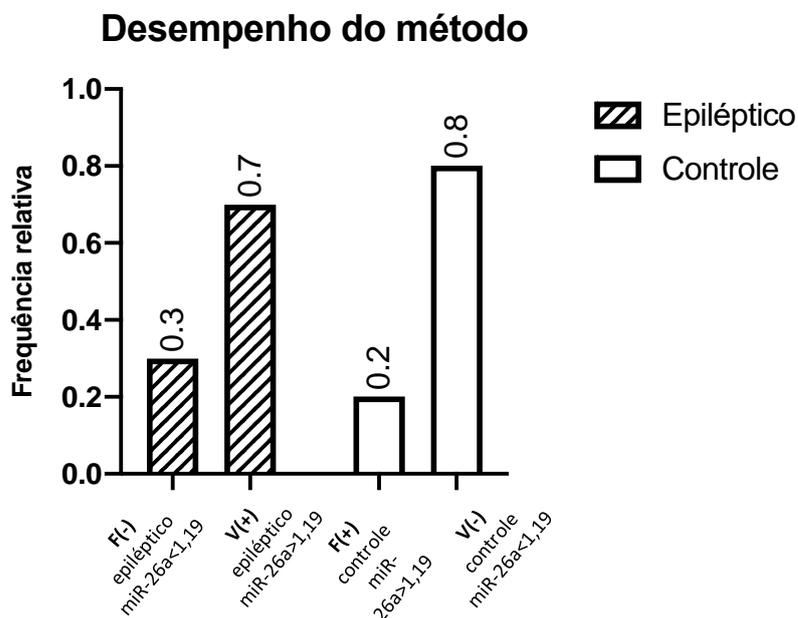


Figura 7. Desempenho da assinatura de miR-26a pela frequência relativa de verdadeiros positivos e negativos e falsos positivos e negativos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos em função do conteúdo plasmático de miR-26a, conforme os seguintes critérios e siglas: F(-), falso negativo, animal epilético com expressão relativa de miR-26a < 1,19; V(+), verdadeiro positivo, animal epilético com expressão relativa de miR > 1,19; F(+), falso positivo, animal controle com expressão relativa de miR-26a > 1,19; V(-), verdadeiro negativo, animal controle com expressão de miR-26a < 1,19. Valor do ponto de corte de 1,19 estabelecido mediante análise de curva ROC. Conteúdo de miR-26a quantificada por RT-qPCR, normalizado pelo controle endógeno miR-382. Expressão relativa expressa pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . A assinatura de miR-26a identificou de maneira acurada 70% dos animais epiléticos e 80% dos controles, os denominados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, respectivamente.

#### 4.8 REPRESENTAÇÃO DE DESEMPENHO DO ALVO MEDIANTE CURVA ROC

O desempenho do biomarcador proposto foi aqui avaliado mediante metodologia da curva ROC (*Receiver operating characteristic*), conforme

anteriormente descrito (82). A análise ROC considerou a expressão plasmática de miR-26a obtida nos grupos controle e epiléticos, em termos de sensibilidade e especificidade (Figura 8). O valor de AUC (*area under the curve*) obtido foi de 0,61, que indica o nível de acurácia deste biomarcador. MicroRNAs com valores de AUC desta ordem já se mostraram úteis na formação de assinaturas que agregam de dois a quatro microRNAs conjuntamente, anteriormente propostas para diagnóstico de outras doenças crônicas (82, 83).

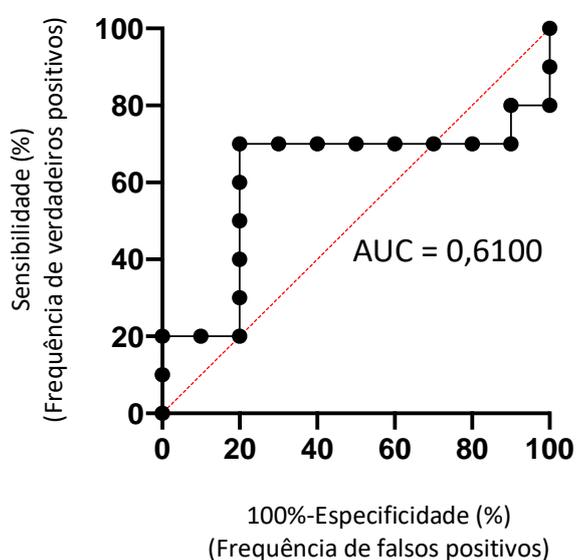


Figura 8. Representação da acurácia da assinatura de miR-26a mediante curva ROC. O gráfico apresenta resultados de sensibilidade (verdadeiros positivos) no eixo Y, e de (100%-especificidade), ou seja, os falsos positivos, no eixo X. Observar as coordenadas do eixo Y na magnitude de 70% de sensibilidade, que corresponde à identificação da assinatura de miR-26a em 70% dos animais epiléticos (verdadeiros positivos). O eixo X mostra coordenadas na magnitude de 20% de especificidade, indicando que 20% dos animais controles apresentaram a assinatura de miR-26a como falsos positivos. A linha hachurada vermelha divide o gráfico em dois quadrantes, delimitando uma área de 50% do gráfico para análise da aleatoriedade dos resultados.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou a viabilidade da metodologia de qPCR em tempo real para detectar expressões aberrantes de microRNAs circulantes em cães epiléticos, como etapa inicial para busca de biomarcadores de epilepsia canina. Neste ponto, precisamos ressaltar aspectos relevantes de construto teórico. Primeiro, expressões aberrantes detectadas no sangue periférico podem servir a dois propósitos essenciais, o de distinguir indivíduos que apresentem a doença em relação a controles sadios, assim apoiando o diagnóstico, bem como prospectar o estado da neurodegeneração cerebral dos pacientes já diagnosticados com epilepsia, ou seja, contribuir para o prognóstico. Atenda-se à premissa de que microRNAs participam da degeneração de áreas cerebrais ligadas à epilepsia, estando desta forma aberrantemente expressos no sistema nervoso central dos indivíduos epiléticos(70, 81).

Em estudo inicial, foram mostradas alterações na expressão de 31 microRNAs, com aumento (n=10 alvos) ou redução (n=21 alvos), em amostras de sangue de ratos, no tempo de 24 horas após *status epilepticus* induzido por ácido caínico (53). Um segundo estudo conduzido por Hu et al., 2012 (57) confirmou alterações de microRNAs no sangue de ratos, também no tempo de 24 horas após a crise convulsiva, neste caso no modelo de *status epilepticus* induzido por pilocarpina. Este estudo foi particularmente relevante para a premissa de nossa pesquisa, uma vez que houve concordância entre a variação dos microRNAs no cérebro e no sangue dos animais, em termos de aumento ou de redução de conteúdo (57). Estudo seguinte revelou três microRNAs aberrantemente expressos no hipocampo de ratos epiléticos e que se mostraram também alterados no plasma dos animais, nas fases inicial, latente, e crônica do modelo experimental (84). Em síntese, os resultados de modelos experimentais revelam a concordância quanto à expressão de microRNAs em amostras cerebrais e sanguíneas nos modelos murinos de *status epilepticus*.

Neste ponto nos perguntamos: - Os resultados de modelos experimentais de epilepsia poderiam ser transpostos do laboratório para a clínica médica? Destaque-se que o trabalho aqui defendido é o primeiro sobre epilepsia canina.

Neste sentido, nos resta observar publicações de pacientes humanos, como aproximação; aproximação que de fato existe entre as enfermidades canina e humana, em termos de neuropatologia, fenótipo das crises, e refratariedade ao tratamento (10-14). Ademais, cães são considerados modelos da doença que acomete o homem, sobretudo nas epilepsias pós-traumáticas (16-18). Vários trabalhos têm mostrado que pacientes humanos com epilepsia apresentam expressões aberrantes de microRNAs em amostras sangüíneas. Para simplificação, citaremos apenas aqueles que mostraram análise dos resultados via curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), metodologia de que trataremos posteriormente. Notar que se tratam de publicações recentes, de 2015 a 2017, conforme elegante revisão de Noelle Enright et al. (2018) (85), do grupo do Prof. David Henshall. Dos oito trabalhos sobre microRNAs obtidos do sangue de pacientes epiléticos e que fizeram análise ROC, quatro utilizaram amostras de plasma, conforme foi realizado em nosso estudo, e os demais utilizaram soro, conforme descrito anteriormente (85).

Por que optamos por utilizar plasma ao invés de soro? O uso do plasma como fonte de microRNAs tem vantagens relevantes em relação ao soro, principalmente porque evita-se o passo de coagulação do sangue (este necessário para obtenção do soro) (81). Com isto, reduz-se variações entre amostras e diminui-se a possível liberação de RNAs curtos por células circulatórias, incluindo plaquetas, leucócitos e hemácias, ambos aspectos ligados ao processo de coagulação do sangue - que não irá existir em amostras plasmáticas (86, 87). Em nosso estudo, também tomamos cuidado de repetir a centrifugação inicial visando remover eventuais plaquetas presentes no plasma (88, 89), para obter-se um protocolo experimental que revele de maneira fidedigna o real conteúdo de microRNAs livres presentes na corrente circulatória dos animais. Apesar destas vantagens, é preciso ponderar sobre a necessidade do equipamento de centrífuga refrigerada para obtenção do plasma, o que normalmente não existe nas clínicas veterinárias. O uso de soro, neste sentido, seria um procedimento mais simples de ser encaminhado na rotina hospitalar. Além dos trabalhos que citaremos a seguir baseados em microRNAs obtidos do soro, nosso grupo de pesquisa também já realizou testes com este tipo de amostra e com resultados satisfatórios. Neste sentido, hipotetizamos que o

protocolo aqui descrito para amostras de plasma poderá ser facilmente adaptado para amostras de soro, alterando-se tão somente o processamento inicial das amostras de sangue para que se obtenha soro ao invés de plasma. Os passos seguintes de extração de microRNAs, transcrição reversa e qPCR seriam idênticos.

Cabe ressaltar que tanto o plasma quanto o soro são amostras viáveis para estudos microRNAs, conforme resultados anteriores sobre microRNAs isolados do sangue de pacientes humanos com epilepsia. Neste sentido, foram identificadas expressões aberrantes no plasma para os seguintes alvos: miR-129-2-3p (90), miR-134-5p (91), miR-323a-5p (92), miR-3613-5p, miR-4668-5p, miR-8071, e miR-197-5p (93). Quanto a amostras de soro, foram identificadas mudanças nos seguintes microRNAs: let-7d-5p, miR-106b-5p, miR-130a-3p, miR-146a-5p, miR-15a-5p, miR194-5p (94) – como primeiro estudo utilizando microRNAs como biomarcadores de epilepsia, miR-301a-3p, miR30b-5p, miR342-5p, miR-4446-3p, miR-194-5p (95), miR-106b, miR-146a (96), miR-4521 (97).

Nosso grupo examinou um dos microRNAs descritos acima, miR-134, diretamente envolvido na epileptogênese do lobo temporal de ratos, conforme citado Jimenez-Mateos 2012(9). No estudo de Avansini et al. (2017) com amostras clínicas, miR-134a mostrou-se significativamente depletado em pacientes humanos com epilepsia do lobo temporal (91). Na fase inicial de nossa pesquisa, também examinamos este alvo no plasma de cães epiléticos, cuja quantificação mostrou-se "indeterminada", ou seja, o conteúdo de miR-134 no plasma dos cães mostrou-se abaixo do limite de detecção do método. No entanto, esta falta de sinal para miR-134 ocorreu em ambos os grupos, epilético e controle, indicando que não se trata de alteração desencadeada pela doença e sim baixo nível plasmático. O mesmo resultado ocorreu para miR-34a, sendo ambos descartados nesta triagem inicial. Em síntese, nosso estudo selecionou cinco microRNAs obtidos do plasma de cães, miR-382, e miR-26a selecionados para escolha do endógeno e três alvos testados em um piloto inicial (miR-134, miR-34a, e miR-26a) para escolha de um deles, visando testagem inicial de alvo. Esta mesma estratégia experimental de examinar três alvos para escolha de um único foi adotada no estudo de Avansini et al. (2017)(91). Ali foram testados miR-

134, miR-23a e miR-31 (N= 14 pacientes epiléticos; N=16 controles), com escolha de miR-134 para estudo de validação em nova coorte de pacientes com epilepsia (N=65) e controles sadios (N=83).

Animais epiléticos do atual estudo apresentaram tendência de aumento de miR-26a quando comparados com controles sadios, com expressão plasmática 1,45 vezes superior (P=0,27). Este achado ocorreu em 70% dos animais doentes. Neste ponto, poderíamos nos fazer a seguinte pergunta: - Seria o método de qPCR para miR-26a acurado o suficiente como um biomarcador de epilepsia canina? Com a cautela imposta a ensaios científicos, responderíamos que o número amostral do presente estudo (N=10 indivíduos por grupo) não permite responder precisamente se miR-26a é biomarcador acurado, apesar de ser um alvo promissor. Ressalte-se que o número amostral aqui empregado - 10 indivíduos por grupo (animais controle e animais epiléticos), é semelhante ao empregado na primeira fase de desenvolvimento tecnológico denominada de Descoberta de Biomarcador ("Biomarker discovery"), onde busca-se examinar grande número de alvos para identificação daqueles alterados em modelos animais da doença (81). Agora trataremos do número amostral usado em dois estudos com amostras clínicas. Um dos trabalhos pioneiros no uso de microRNAs circulantes como biomarcadores de doença neurodegenerativa, neste caso Alzheimer, dividiu a estratégia em duas etapas, na qual a primeira consistia na denominada "geração da assinatura", e utilizou 11 indivíduos doentes e 20 controles (82). Neste estudo, a diferença de expressão relativa ("fold change") mínima aceitável entre indivíduos com Alzheimer e controles sadios deveria ser de 1,5. O número de indivíduos doentes aproxima-se do nosso, que foi 10, e, além disto, o "fold change" também é próximo ao encontrado no nosso estudo (1,45)(82). O segundo trabalho examinou amostras clínicas de pacientes humanos com epilepsia, portanto mais próximo do estudo aqui defendido. A pesquisa foi também dividida em duas etapas, sendo a primeira denominada de "fase de descoberta inicial". Novamente, o número amostral utilizado para teste do microRNAs alvo (miR-134) como biomarcador de epilepsia do lobo temporal foi próximo do nosso, com 14 pacientes epiléticos e 16 controles sadios (91).

Feita esta ponderação, optamos por submeter os nossos resultados de miR-26a a parâmetros utilizados na literatura científica para avaliação do desempenho de assinaturas de microRNAs em amostras de sangue, como aproximação para avaliar sua acurácia. A temática da acurácia de biomarcadores assume alta importância e tem mobilizado grupos de trabalho em instituições conceituadas, a exemplo da iniciativa "FDA-NIH Working Group", sob título "BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource" (98). Parte-se do princípio que um biomarcador para teste diagnóstico considerado "perfeito" deveria detectar todos os pacientes com a doença, mostrando assim 100% de sensibilidade (resultado positivo para todos os doentes), e 100% de especificidade, ou seja, nenhum paciente sem a doença teria resultado positivo. Na prática não existe biomarcador "perfeito", e sim aquele que oferece os melhores resultados possíveis, comumente citado como padrão de referência; cada novo biomarcador desenvolvido é então comparado com o padrão de referência para determinada doença.

O raciocínio aplica-se a biomarcadores de epilepsia e, para fins da presente dissertação, vamos focar apenas em microRNA circulantes (99). Neste sentido, é importante considerar que o simples aumento ou diminuição de determinado microRNA no sangue - conforme obtivemos no presente estudo (ex. miR-26a 1,45 vezes superior no plasma de animais epiléticos) não é suficiente para apontá-lo como potencial biomarcador, mesmo que a diferença alcance significância estatística. Faz-se necessário examinar sua sensibilidade e especificidade, estimando-se sua acurácia. No campo dos microRNAs circulantes, consolidou-se o método da curva ROC para análise comparativa do desempenho dos alvos em várias doenças neurológicas além das próprias epilepsias, incluindo-se as duas doenças neurodegenerativas mais prevalentes, Alzheimer e Parkinson (77, 82, 85). O detalhamento da metodologia ROC e suas variantes está descrito em outras publicações (100, 101), a qual foi recentemente revisada quanto à sua aplicação ao diagnóstico das epilepsias (99). Basicamente, o método compara sensibilidade e especificidade do resultado experimental (expressão aumentada de miR-26a, por exemplo) em dois grupos de indivíduos – pacientes epiléticos e indivíduos controle. Conforme Obuchowski & Bullen (2018)(79) explicam, a metodologia da curva

ROC baseia-se na plotagem dos resultados do teste diagnóstico em termos de sensibilidade (eixo Y) *versus* os falsos positivos (1-especificidade), no eixo X (79). Cada coordenada do gráfico representa assim a sensibilidade e os falsos positivos associados a um ponto de corte e que define positivos e negativos. Finalmente, a área sob a curva (AUC) deste gráfico representaria a acurácia do método, onde  $AUC=1$  (100%) seria o valor de um teste "perfeito" conforme descrito acima, ou seja, capaz de discriminar indivíduos doentes daqueles sadios sem nenhuma sobreposição de resultados entre os grupos (80).

Agora nos perguntaríamos: - Já que não existem biomarcadores "perfeitos" com  $AUC=1$ , qual seria um valor minimamente aceitável? A literatura não apresenta um valor consensual de AUC para classificar o desempenho de determinado biomarcador; porém, considera-se  $AUC>0,8$  como aceitável (99). A acurácia obtida no presente estudo esteve aquém de 0,8, já que obtivemos  $AUC=0,61$ . Ressalte-se que outros estudos com microRNAs circulantes na epilepsia também não alcançaram este desempenho. Os valores de AUC destes trabalhos variaram entre 0,67 e 0,93 (85). Ademais, considerando-se os microRNAs avaliados nestes oito estudos, apenas 6 de um total de 21 alvos testados apresentaram  $AUC>0,8$  (29%), ou seja, mais de 70% dos microRNAs não alcançaram a meta de desempenho proposta como aceitável. O resultado de nosso grupo foi próximo do obtido por Avansini et al. (2017), ao estudar epilepsias do lobo temporal ( $AUC=0,67$ ) (91). Tal estudo obteve 75% de sensibilidade e 58% de especificidade, valores próximos aos obtidos no nosso ensaio de descoberta do alvo miR-26a, que foram de 70% e 60%, respectivamente.

O valor de  $AUC=0,61$  aqui obtido não deve ser considerado de maneira simplista, como mera comparação a valores obtidos em trabalhos anteriores que alvejaram outros microRNAs. Evidências mostram que combinações de microRNAs - as denominadas "assinaturas" de múltiplos alvos - podem aumentar a acurácia do método diagnóstico. Mais ainda, a combinação de microRNAs com valores relativamente menores de AUC com outros de valores altos pode prover resultados melhores do que combinações em que todos microRNAs apresentem valores altos, curiosamente. Vamos a um exemplo numérico, com base no artigo de Kumar et al. (2013) (82). A combinação de miR-15b-5p ( $AUC=0,96$ ) com miR-

545 (AUC=0,74) produziu o mesmo desempenho obtido com o uso isolado de miR-15b-5p (AUC=0,96), portanto não se mostrou vantajosa. Ao se introduzir nesta dupla combinação (miR-15b-5p + miR-545) um terceiro microRNA de menor acurácia, miR-301a (AUC=0,67), houve ligeiro aumento do desempenho (AUC=0,97). Este mesmo microRNAs de relativa baixa acurácia, miR-301, também mostrou-se vantajoso em outra assinatura quádrupla de alto desempenho com AUC=0,97 (miR-301 + miR-545 + let7g + miR-142). Em outro trabalho com biomarcadores, neste caso para diagnóstico do câncer de mama, quatro alvos foram testados: miR-16 (AUC=0,912), miR-21 (AUC=0,810), miR-451 (AUC=0,937), e miR-145 (AUC=0,631). A melhor combinação de alvos (miR-451 + miR-145, AUC= 0,956) incluiu um microRNA que apresentava o menor valor de AUC; valor este próximo ao encontrado para miR-26a em nosso estudo (AUC=0,610).

Com base no exposto, o que poderíamos afirmar quanto aos resultados obtidos? Que a metodologia de qPCR pode identificar microRNAs aberrantemente expressos no plasma de cães epiléticos, sendo miR-26a um alvo promissor para integrar assinaturas múltiplas de microRNAs como biomarcadores de epilepsia idiopática. A inclusão de novos alvos poderá melhorar a acurácia do método para valores de AUC>0.8, permitindo-se que esta nova assinatura seja posteriormente testada em novas coortes de pacientes e controles com número amostral satisfatório para validação do biomarcador.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando-se:

(i) Os resultados positivos de padronização de colheita de sangue, obtenção de plasma, extração de microRNAs e qPCR quantitativo de miR-26a e miR-382 obtidos no presente estudo;

(ii) A potencial sensibilidade de miR-26a em identificar pacientes epiléticos;

(iii) A viabilidade de assinaturas com múltiplos alvos, e que incluam microRNAs com AUC entre 0,6 e 0,7.

Concluimos que:

A metodologia de qPCR em tempo real pode ser empregada para identificar microRNAs aberrantemente expressos no plasma de cães epiléticos, sendo miR-26a um potencial alvo para compor uma assinatura de epilepsia canina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uriarte A, Maestro Saiz I. Canine versus human epilepsy: are we up to date? *J Small Anim Pract.* 2016;57(3):115-21.
2. Berendt M, Farquhar RG, Mandigers PJ, Pakozdy A, Bhatti SF, De Risio L, et al. International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res.* 2015;11:182.
3. Engel JJ, Pedley TA. What is epilepsy? In: *Epilepsy: A comprehensive textbook.* Philadelphia: Lippincott-Raven 2005. 1 - 11 p.
4. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20(5):359-68.
5. Fernandes MJds. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas estudos avançados 2013;vol.27.
6. Yacubian EMT. Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epilépticas. *Correlação Videoeletrencefalográfica.* *Rev Neurociencias.* 2002;10:49-65.
7. Engel J, Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996;26(1):141-50.
8. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol.* 1989;26(3):321-30.
9. Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, McKiernan RC, Tanaka K, Mouri G, et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med.* 2012;18(7):1087-94.
10. Potschka H, Fischer A, von Ruden EL, Hulsmeyer V, Baumgartner W. Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia.* 2013;54(4):571-9.
11. Jokinen TS, Metsahonkala L, Bergamasco L, Viitmaa R, Syrja P, Lohi H, et al. Benign familial juvenile epilepsy in Lagotto Romagnolo dogs. *J Vet Intern Med.* 2007;21(3):464-71.
12. Berendt M, Gullov CH, Fredholm M. Focal epilepsy in the Belgian shepherd: evidence for simple Mendelian inheritance. *J Small Anim Pract.* 2009;50(12):655-61.
13. Hulsmeyer V, Zimmermann R, Brauer C, Sauter-Louis C, Fischer A. Epilepsy in Border Collies: clinical manifestation, outcome, and mode of inheritance. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):171-8.
14. Weissl J, Hulsmeyer V, Brauer C, Tipold A, Koskinen LL, Kyostila K, et al. Disease progression and treatment response of idiopathic epilepsy in Australian Shepherd dogs. *J Vet Intern Med.* 2012;26(1):116-25.
15. Leppik IE, Patterson EN, Coles LD, Craft EM, Cloyd JC. Canine status epilepticus: a translational platform for human therapeutic trials. *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 8:31-4.
16. D'Ambrosio R, Perucca E. Epilepsy after head injury. *Curr Opin Neurol.* 2004;17(6):731-5.

17. Pitkanen A, Immonen RJ, Grohn OH, Kharatishvili I. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*. 2009;50 Suppl 2:21-9.
18. Steinmetz S, Tipold A, Loscher W. Epilepsy after head injury in dogs: a natural model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(4):580-8.
19. LÖSCHER W, FREY HH. Pharmacokinetics of anti-epileptic drugs in the dog: a review. *Veterinary ÇPharmacology end Therapeutics*. 81985. p. 219-33.
20. Ekenstedt KJ, Oberbauer AM. Inherited epilepsy in dogs. *Top Companion Anim Med*. 2013;28(2):51-8.
21. Kearsley-Fleet L, O'Neill DG, Volk HA, Church DB, Brodbelt DC. Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *Vet Rec*. 2013;172(13):338.
22. Pitkanen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol*. 2011;10(2):173-86.
23. Lowenstein D. Epilepsy after head injury: the impact of impact. *Ann Neurol*. 2001;50(6):696-7.
24. De Risio L, Bhatti S, Munana K, Penderis J, Stein V, Tipold A, et al. International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs. *BMC Vet Res*. 2015;11:148.
25. KR M. Gestão de epilepsia refratária2013. 67-71 p.
26. Charalambous M, Brodbelt D, Volk HA. Treatment in canine epilepsy--a systematic review. *BMC Vet Res*. 2014;10:257.
27. Thomas WB. Idiopathic epilepsy in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2010;40(1):161-79.
28. Hulsmeyer VI, Fischer A, Mandigers PJ, DeRisio L, Berendt M, Rusbridge C, et al. International Veterinary Epilepsy Task Force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs. *BMC Vet Res*. 2015;11:175.
29. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
30. Zamore PD. RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. *Cell*. 2006;127(6):1083-6.
31. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
32. Sashital DG, Doudna JA. Structural insights into RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*. 2010;20(1):90-7.
33. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431(7006):343-9.
34. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205.
35. Martino S, di Girolamo I, Orlacchio A, Datti A, Orlacchio A. MicroRNA implications across neurodevelopment and neuropathology. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:654346.
36. Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2012;133(2):142-50.
37. Gascon E, Gao FB. Cause or Effect: Misregulation of microRNA Pathways in Neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2012;6:48.
38. Henshall DC. MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(2):199-205.

39. Alsharafi WA, Xiao B, Abuhamed MM, Luo Z. miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:59.
40. Sano T, Reynolds JP, Jimenez-Mateos EM, Matsushima S, Taki W, Henshall DC. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis*. 2012;3:e287.
41. Henshall DC. Antagomirs and microRNA in status epilepticus. *Epilepsia*. 2013;54 Suppl 6:17-9.
42. Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Rodriguez-Alvarez N, Reynolds J, et al. Antagomirs targeting microRNA-134 increase hippocampal pyramidal neuron spine volume in vivo and protect against pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Struct Funct*. 2015;220(4):2387-99.
43. Reschke CR, Silva LF, Norwood BA, Senthilkumar K, Morris G, Sanz-Rodriguez A, et al. Potent Anti-seizure Effects of Locked Nucleic Acid Antagomirs Targeting miR-134 in Multiple Mouse and Rat Models of Epilepsy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;6:45-56.
44. Horst CH, Schlemmer F, de Aguiar Montenegro N, Domingues ACM, Ferreira GG, da Silva Ribeiro CY, et al. Signature of Aberrantly Expressed microRNAs in the Striatum of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats. *Neurochem Res*. 2018;43(11):2132-40.
45. Aala A, Brennan DC. Transformation in Immunosuppression: Are We Ready for it? *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1791-2.
46. Agostini M, Niklison-Chirou MV, Catani MV, Knight RA, Melino G, Rufini A. TAp73 promotes anti-senescence-anabolism not proliferation. *Aging (Albany NY)*. 2014;6(11):921-30.
47. Li X, Khanna A, Li N, Wang E. Circulatory miR34a as an RNAbased, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(10):985-1002.
48. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130-4.
49. Chuang YC, Chen SD, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chan SH, et al. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. *Neuropharmacology*. 2007;52(5):1263-73.
50. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26(5):731-43.
51. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007;6(13):1586-93.
52. Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(3):214-30.
53. Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks GJ, Kennerdell JR, et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. 2012;482(7386):519-23.
54. Yang J, Chen D, He Y, Melendez A, Feng Z, Hong Q, et al. MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene *atg9*. *Age (Dordr)*. 2013;35(1):11-22.

55. Wang X, Liu P, Zhu H, Xu Y, Ma C, Dai X, et al. miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull.* 2009;80(4-5):268-73.
56. Horst CH, Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. The involvement of Eag1 potassium channels and miR-34a in rotenone-induced death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol Med Rep.* 2017;15(4):1479-88.
57. Hu K, Xie YY, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci.* 2012;13:115.
58. Coolen M, Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19(5):461-70.
59. Numakawa T, Richards M, Adachi N, Kishi S, Kunugi H, Hashido K. MicroRNA function and neurotrophin BDNF. *Neurochem Int.* 2011;59(5):551-8.
60. Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca BV, Gotovac K, Violante S, et al. Convergence of miRNA expression profiling, alpha-synuclein interacton and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6(10):e25443.
61. Caputo V, Sinibaldi L, Fiorentino A, Parisi C, Catalanotto C, Pasini A, et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. *PLoS One.* 2011;6(12):e28656.
62. Xue S, Zhu W, Liu D, Su Z, Zhang L, Chang Q, et al. Circulating miR-26a-1, miR-146a and miR-199a-1 are potential candidate biomarkers for acute myocardial infarction. *Mol Med.* 2019;25(1):18.
63. ParvizHamidi M, Haddad G, Ostadrahimi S, Ostadrahimi N, Sadeghi S, Fayaz S, et al. Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for glioblastoma multiform. *Biotechnol Appl Biochem.* 2019;66(2):261-5.
64. Schlosser K, White RJ, Stewart DJ. miR-26a linked to pulmonary hypertension by global assessment of circulating extracellular microRNAs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(12):1472-5.
65. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463-6.
66. Atkinson A.J. JC, W. A.; DeGruttola, V. G.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Hoth, D. F.; Oates, J. A.; Peck, C. C.; Schooley, R. T.; Spilker, B. A.; Woodcock, J.; Zeger, Scott. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
67. Beach TG. A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley? *Neurol Ther.* 2017;6(Suppl 1):5-13.
68. Rachakonda V, Pan TH, Le WD. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? *Cell Res.* 2004;14(5):347-58.
69. Jeromin A, Bowser R. Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. *Adv Neurobiol.* 2017;15:491-528.
70. Yao Q, Wang X, He W, Song Z, Wang B, Zhang J, et al. Circulating microRNA-144-3p and miR-762 are novel biomarkers of Graves' disease. *Endocrine.* 2019.
71. Hulanicka M, Garncarz M, Parzeniecka-Jaworska M, Jank M. Plasma miRNAs as potential biomarkers of chronic degenerative valvular disease in Dachshunds. *BMC Vet Res.* 2014;10:205.
72. Lecchi C, Dalla Costa E, Lebelt D, Ferrante V, Canali E, Ceciliani F, et al. Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers

- to monitor acute pain associated with laminitis in horses. *Animal*. 2018;12(2):366-75.
73. Marioni-Henry K, Zaho D, Amengual-Batle P, Rzechorzek NM, Clinton M. Expression of microRNAs in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disease. *Acta Vet Scand*. 2018;60(1):80.
74. Benbadis SR, Lin K. Errors in EEG interpretation and misdiagnosis of epilepsy. Which EEG patterns are overread? *Eur Neurol*. 2008;59(5):267-71.
75. Ferrie CD. Preventing misdiagnosis of epilepsy. *Arch Dis Child*. 2006;91(3):206-9.
76. Botta-Orfila T, Morato X, Compta Y, Lozano JJ, Falgas N, Valldeoriola F, et al. Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease. *J Neurosci Res*. 2014;92(8):1071-7.
77. Fernandez-Santiago R, Iranzo A, Gaig C, Serradell M, Fernandez M, Tolosa E, et al. MicroRNA association with synucleinopathy conversion in rapid eye movement behavior disorder. *Ann Neurol*. 2015;77(5):895-901.
78. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
79. Obuchowski NA, Bullen JA. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. *Phys Med Biol*. 2018;63(7):07TR1.
80. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*. 2013;4(2):627-35.
81. van Vliet EA, Puhakka N, Mills JD, Srivastava PK, Johnson MR, Roncon P, et al. Standardization procedure for plasma biomarker analysis in rat models of epileptogenesis: Focus on circulating microRNAs. *Epilepsia*. 2017;58(12):2013-24.
82. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(7):e69807.
83. Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One*. 2013;8(1):e53141.
84. Gorter JA, Iyer A, White I, Colzi A, van Vliet EA, Sisodiya S, et al. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2014;62:508-20.
85. Enright N, Simonato M, Henshall DC. Discovery and validation of blood microRNAs as molecular biomarkers of epilepsy: Ways to close current knowledge gaps. *Epilepsia Open*. 2018;3(4):427-36.
86. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41561.
87. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*. 2014;18(3):371-90.
88. Mitchell AJ, Gray WD, Hayek SS, Ko YA, Thomas S, Rooney K, et al. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. *Sci Rep*. 2016;6:32651.
89. Moret I, Sanchez-Izquierdo D, Iborra M, Tortosa L, Navarro-Puche A, Nos P, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One*. 2013;8(12):e82753.

90. Sun Y, Wang X, Wang Z, Zhang Y, Che N, Luo X, et al. Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA-935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 2016;127:276-83.
91. Avansini SH, de Sousa Lima BP, Secolin R, Santos ML, Coan AC, Vieira AS, et al. MicroRNA hsa-miR-134 is a circulating biomarker for mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2017;12(4):e0173060.
92. Che N, Zu G, Zhou T, Wang X, Sun Y, Tan Z, et al. Aberrant Expression of miR-323a-5p in Patients with Refractory Epilepsy Caused by Focal Cortical Dysplasia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017;21(1):3-9.
93. Yan S, Zhang H, Xie W, Meng F, Zhang K, Jiang Y, et al. Altered microRNA profiles in plasma exosomes from mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Oncotarget.* 2017;8(3):4136-46.
94. Wang J, Yu JT, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:9522.
95. Wang J, Tan L, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:10201.
96. An N, Zhao W, Liu Y, Yang X, Chen P. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 2016;127:311-6.
97. Wang X, Sun Y, Tan Z, Che N, Ji A, Luo X, et al. Serum MicroRNA-4521 is a Potential Biomarker for Focal Cortical Dysplasia with Refractory Epilepsy. *Neurochem Res.* 2016;41(4):905-12.
98. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro Oncol.* 2018;20(9):1162-72.
99. Pitkanen A, Ekolle Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers - Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis.* 2019;123:42-58.
100. Ma H, Bandos AI, Gur D. On the use of partial area under the ROC curve for comparison of two diagnostic tests. *Biom J.* 2015;57(2):304-20.
101. Yang H, Lu K, Lyu X, Hu F. Two-way partial AUC and its properties. *Stat Methods Med Res.* 2019;28(1):184-95.