

MicroRNA Expression Profile in Epilepsy: Breaking Molecular Barriers*

Danyella B. Dogini^a, Simoni Helena Avansini^a, Fábio Rossi Torres^a, Fabio Rogério^c,
Cristiane S. Rocha^a, Rodrigo Secolin^a, Clarissa L. Yasuda^b, Ana Carolina Coan^b, Ana Flávia Costa^c,
Ana Cláudia Sparapani Piazza^c, Luzia Aparecida Magalhães Ribeiro Reis^c, Luciano de S. Queiroz^c,
Helder Tedeschi^b, Evandro Oliveira^b, Fernando Cendes^b, Iscia Lopes-Cendes^a

Programa CInAPCe** – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

ABSTRACT

Background: MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules (21-24 nt) that negatively regulate gene expression, either by repression of translation or by degradation of messenger RNA. These molecules are involved in many important processes including cell differentiation, neurogenesis, formation of nervous system and others. Mesial temporal lobe epilepsy and epilepsy caused by cortical dysgenesis are among the leading causes of drug resistant epilepsy. **Objectives:** The objectives of this study were to characterize the expression profile of miRNAs and to investigate their regulation in mesial temporal lobe epilepsy (MTL) and in focal cortical dysplasias (FCDs). **Methods:** Total RNA was extracted from hippocampal and neocortical tissue, maintained in paraffin or fresh-frozen, from patients who underwent surgery for seizure control. For comparison we used tissue obtained from autopsy. RNA was extracted and used in real time PCR reactions (157 miRNAs analyzed) or microarray chips (847 miRNAs analyzed). **Results:** Bioinformatics analyzes identified three miRNAs with expression significantly different in patients with MTLE: let-7d, miR-29b and miR-30d; while in patients with FCDs we found 23 microRNAs differentially expressed. In addition, we found that different pathological forms of had different molecular signatures. **Conclusions:** The possible genes regulated by miRNAs with differential expression in tissue with mesial temporal sclerosis (MTS) are mainly related to neurogenesis and apoptosis. While in DCFs they were predominantly related to cell proliferation and migration. Our results demonstrate the importance of miRNA regulation in molecular processes that lead to the lesions present in the MTS and the FCDs.

Keyword: epilepsy, microRNA, gene expression.

RESUMO

Perfil de expressão microRNAs em epilepsia: revelando novos mecanismos moleculares

Introdução: MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA (21-24 nt) que regulam negativamente a expressão gênica, seja pela repressão da tradução ou pela degradação do RNA mensageiro. Essas moléculas estão envolvidas em muitos processos importantes incluindo diferenciação celular, neurogênese, formação do sistema nervoso entre outras. A epilepsia de lobo temporal mesial e as epilepsias causadas por disgenesias corticais estão entre as principais causas de refratariedade ao tratamento medicamentosas nas epilepsias. **Objetivos:** Os objetivos desse trabalho foram elucidar o perfil de expressão dos miRNAs e investigar a regulação dos mesmos na epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e nas displasias corticais focais (DCF). **Métodos:** RNA total foi extraído de tecidos de hipocampo e de neocórtex, tanto congelados fresco como em parafina, de pacientes que se submeteram a cirurgia para controle das crises. Para comparação utilizamos tecidos equivalentes provindos de autópsia. Para a análise da expressão dos miRNAs, o RNA extraído foi utilizado em reações de PCR em tempo real (157 miRNAs analisados) ou em chips de microarranjos (847 miRNAs analisados).

* Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

** CInAPCe – Cooperação Interinstitucional de Apoio à Pesquisa sobre o Cérebro.

^a Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP

^b Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP.

^c Departamento de Anatomia Patológica, FCM-UNICAMP.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

Resultados: Análises de bioinformática identificaram três miRNAs com expressão significativamente alterada em pacientes com ELTM: let-7d, miR-29b e miR-30d; enquanto nos pacientes com DCFs foram encontrados 23 microRNAs diferencialmente expressos, sendo que o padrão de expressão foi diferente em diferentes formas histopatológicas de DCFs. **Conclusões:** Os possíveis genes regulados pelos miRNAs com expressão alterada nos tecidos com esclerose mesial temporal (EMT) estão relacionados principalmente com neurogênese e apoptose. Enquanto que nas DCFs estes estão predominantemente relacionados à proliferação e migração celular. Nossos resultados demonstram a relevância da regulação por miRNAs nos processos moleculares que culminam com a formação das lesões presentes na EMT e nas DCFs. A complexidade dessa regulação começa agora a ser desvendada e pode resultar não só na elucidação dos processos biológicos envolvidos, como também na identificação de biomarcadores de potencial uso clínico nas epilepsias.

Unitermos: epilepsia, microRNA, expressão.

INTRODUÇÃO

A epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e as epilepsias causadas pelas malformações corticais, como a displasia cortical focal (DCF) são uma das principais causas de refratariedade das crises ao tratamento medicamentoso. Na ELTM o principal achado histopatológico é a esclerose mesial temporal (EMT) que é caracterizada por perda neuronal e gliose (Wieser, 2004). As DCFs são malformações dentro de um espectro de anormalidades da estrutura laminar do córtex, associadas com características citopatológicas que incluem neurônios gigantes, dismórficos e células em formato de balão (Guerrini, et al., 2008). É grande a proporção de pacientes refratários ao tratamento medicamentoso com drogas antiepilépticas presentes no grupo daqueles com ELTM e com DCFs (Mathern, 2009). Esses pacientes são candidatos ao tratamento cirúrgico que inclui a remoção das áreas lesadas (estruturas mesiais do lobo temporal ou neocórtex). Assim, permanece como desafio nessas duas etiologias de epilepsia refratária, o desenvolvimento de novas terapias para o controle efetivo das crises, sem aumentar o risco de novos déficits neurológicos. Isso envolve conhecer os mecanismos moleculares dessas etiologias e a busca por novos métodos diagnósticos que sejam menos invasivos, mais informativos e eficientes.

Nesse contexto, os microRNAs (miRNAs) têm sido utilizados como biomarcadores tanto para fins de diagnóstico e prognóstico, como para orientar decisões terapêuticas em várias doenças (Hui, 2011). Isso porque essa nova classe de pequenos RNA (21-24nt) não codificadores está envolvida na regulação fina de vários processos biológicos centrais, além de se apresentarem estáveis, reprodutíveis e biodisponíveis na fração plasmática circulante (Huachun, 2011). MiRNAs regulam negativamente a expressão gênica após a transcrição, através da inibição da tradução ou da degradação do RNA mensageiro dos genes alvos (Bartel, 2004). A complexidade da regulação gênica mediada pelos miRNAs pode ser verificada pelo grande número de genes que é alvo dessas moléculas (Lewis et al., 2005). Estudos *in silico* indicam que pelo menos 30% dos genes humanos

sejam alvos dos miRNAs (Bartel, 2004). Os miRNAs estão envolvidos em vários processos biológicos essenciais, tais como diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e formação do sistema nervoso central (Dogini et al., 2008; Vo et al., 2010), além de ser peça chave na regulação pós-transcricional de processos biológicos complexos tais como a neurogênese (Shi et al., 2010).

OBJETIVOS

Caracterizar o perfil de expressão de miRNAs, identificando miRNAs diferencialmente expressos na epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e nas displasias corticais focais (DCF). Pretendemos com isso apontar possíveis microRNAs candidatos a biomarcadores na ELTM e nas DCFs.

MATERIAL E MÉTODOS

RNA total foi extraído de quatro amostras de tecido com EMT retirados de pacientes com ELTM refratária ao tratamento clínico. Como tecido controle, foram utilizadas amostras de quatro hipocampus de obtidos por autópsia. Os miRNAs e os genes candidatos foram quantificados por PCR em tempo real com o kit TaqMan™ microRNA assays (*Applied Biosystems*) e foram quantificadas as expressões de 157 miRNAs. Além disso, RNA total foi extraído com *Recover ALLTM* kit (*Ambion*) de tecidos mantidos em parafina da região do córtex cerebral obtido cirurgicamente para o tratamento de crises refratárias de nove pacientes com DCF (quatro pacientes com DCF tipo IIa e cinco pacientes com tipo DCF IIb). Como controle também foi utilizado tecido cortical de autópsia (n=5). A integridade do RNA das amostras foi avaliada pela *Agilent Chip Pico RNA Kit* e *Bio-Analyzer*. A expressão dos miRNAs foi avaliada pela plataforma *Affymetrix Gene Chip miRNA Array*. Correção de background, sumarização e normalização foram realizadas através do algoritmo RMA. A expressão diferencial dos miRNA foi analisada utilizando o programa RankProd (FDR $p < 0,05$).

RESULTADOS

Após a análise de bioinformática, identificamos três miRNAs com expressão significativamente diferente no tecido de pacientes com ELTM. Estes foram let7d e miR-29b que tiveram sua expressão aumentada nos pacientes e o miR-30d que apresentou expressão diminuída nos pacientes em relação aos controles. Para validação biológica dos genes possivelmente regulados por esses microRNAs, prosseguimos o estudo com a avaliação da expressão desses genes no mesmo tecido. Esses resultados mostraram que o provável gene alvo regulado pelo let7d – *NME6* (inibidor de p53) e o alvo para miR-29b – *MCL-1* (anti-apoptótico da família do *BCL-2*), realmente tiveram sua expressão diminuída nas amostras de pacientes em relação ao tecido controle, validando o mecanismo putativo de regulação gênica pelos miRNAs identificados. No entanto, o gene *SON*, provável alvo do miR30d não apresentou diferença de expressão significativa.

Nos tecidos com DCF, nossas análises identificaram 23 miRNAs diferencialmente expressos quando foram comparados os pacientes e o grupo controle. Além disso, quando o grupo DCF tipo IIa e IIb foram comparados encontramos seis tipos de miRNA diferencialmente expressos entre os dois grupos. Entre eles, observamos uma significativa regulação de vários elementos pertencentes ao *cluster* miR-17~92.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo analisando o perfil de expressão de vários miRNAs na ELTM e nas DCFs. Nós identificamos miRNAs com expressão alteradas nos tecidos com EMT (let-7d, miR-30d e miR-29b), os quais regulam vários genes de acordo com análises de bioinformática. Nós validamos experimentalmente genes alvos relacionados aos miRNAs identificados na ELTM: *NME6* (alvo do let-7d) e *MCL-1* (alvo do miR-29b). *NME6* codifica a nucleosídeo difosfato quinase 6, um membro da família de proteínas NM23 que está envolvido com progressão tumoral e metástase bem como com regulação da apoptose (Chow et al., 2006). *MCL-1* codifica a proteína de diferenciação celular na leucemia mielóide, que tem também um papel relevante na apoptose através da regulação pelo próprio miR-29b (Zhang et al., 2010).

Já nossos resultados com os tecidos com DCFs mostraram a expressão diferenciada do *cluster* miR-17~92. Este *cluster* é conhecido por contribuir para a regulação da transcrição na diferenciação de células tronco, no envelhecimento (Olive et al., 2010), assim como o ajuste fino de vias envolvidas na diferenciação neuronal. Além disso, identificamos uma assinatura molecular diferente na expressão de miRNAs em subtipos distintos de DCF.

Nossos resultados demonstram a relevância da regulação por miRNAs nos processos moleculares que culminam com a formação das lesões presentes na EMT e nas DCFs. A complexidade dessa regulação começa agora a ser desvendada e pode resultar não só na elucidação dos processos biológicos envolvidos, como também na identificação de biomarcadores de potencial uso clínico nas epilepsias.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq e CInAPCe.

REFERÊNCIAS

- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and functions. *Cell*. 2004;23:281-97.
- Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases. *Mol Neurobiol*. 2011;44:359-73.
- Chow JM, Shen SC, Wu CY, Chen YC. 12-*o*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate prevents baicalein-induced apoptosis via activation of protein kinase C and JNKs in human leukemia cells. *Apoptosis*. 2006 Nov;11(11):1999-2011.
- Dogini DB, Ribeiro PA, Rocha C, Pereira TC, Lopes-Cendes I. MicroRNA expression profile in murine central nervous system development. *J Mol Neurosci*. 2008;35:331-7.
- Guerrini R, Doyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in Neuroscience*. 2008;31:154-62.
- Huachun Weng, Chunshen Shen, Gou Hirokawa, Xu Ji, Rie Takahashi, Kana Shimada, Chiharu Kishimoto and Naoharu Iwai. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. *Biomedical Research*. 2011;32:135-41.
- Hui C, How EI, Fei-Fei Liu. Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies. *BMC Cancer*. 2011;11:500.
- 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.
- Mathern GW. Challenges in the surgical treatment of epilepsy patients with cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2009;50:45-50.
- Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42:1348-1354.
- Shen Q, Temple S. Fine control: microRNA regulation of adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*. 2009;12:369-70.
- Shi Y, Zhao X, Hsieh J, Wichterle H, Impey S, Banerjee S, Neveu P, Kosik KS. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *J Neurosci*. 2012;10:30(45):14931-6.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:16426-31.
- Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45:695-714.
- Zhang YK, Wang H, Leng Y, Li ZL, Yang YF, Xiao FJ, Li QF, Chen XQ, Wang LS. Biochem. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. *Biophys Res Commun*. Oct 2011;414(1):233-9.

Endereço para correspondência:

Iscia Lopes Cendes
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil
E-mail: icendes@unicamp.br