

## **ANÁLISE METABOLÔMICA NA BUSCA POR BIOMARCADORES DE REFRATARIEDADE MEDICAMENTOSA EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL ATRAVÉS DE RMN DE H<sup>1</sup>**

Alexandre B. Godoi<sup>1\*</sup>, Amanda M. Canto<sup>2</sup>, Amanda Donatti<sup>2</sup>, Douglas C. Rosa<sup>1</sup>, Danielle C.F. Bruno<sup>2</sup>, Marina K. Alvim<sup>3</sup>, Melissa Quintero<sup>5</sup>, Fernando Cendes<sup>3,4</sup>, Ljubica Tasic<sup>5,6</sup>, Iscia Lopes-Cendes<sup>2,7</sup>

1. Estudante da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Campinas (FCF-UNICAMP)
2. Pesquisadora Dra. no Dept. de Medicina Translacional - Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP)
3. Pesquisador(a) Dr(a). no Dept. de Neurologia – Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP)
4. Professor(a) Dr(a). no Dept. de Neurologia - Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP)
5. Pesquisadora Dra. no Dept. de Química Orgânica– Instituto de Química (IQ-UNICAMP)
6. Professora Dra. no Dept de Química Orgânica – Instituto de Química (IQ-UNICAMP)
7. Professora Dra. no Dept. de Medicina Translacional - Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP)

### **Resumo**

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) se destaca dentre os diferentes tipos de epilepsia devido à sua alta prevalência e a elevada proporção de pacientes refratários ao tratamento com drogas anticonvulsivantes (DAC). Dentre as diversas abordagens capazes de identificar biomarcadores para uma determinada condição, aquela baseada no estudo dos metabólitos de uma matriz biológica, chamada metabólômica, tem sido amplamente utilizada nos últimos anos. Dessa forma, nosso objetivo foi analisar metabólitos presentes no plasma de pacientes com ELTM, classificados como refratários ou responsivos as DAC, utilizando a técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1 (RMN de <sup>1</sup>H). Foram identificadas diferenças nos sinais correspondentes a L-Arginina, Citrato, Creatina, L-Glutamina e L-Tirosina, indicando um aumento de eventos inflamatórios e da hiperexcitabilidade neuronal, além de mecanismos associados a uma falha no metabolismo energético em pacientes refratários as DAC.

**Autorização legal:** Autorização do Comitê de Ética:12112913.3.0000.5404/Parecer:257.020.

**Palavras-chave:** Farmacorresistência; Metabolôma; Quimiometria.

**Apoio financeiro:** FAPESP.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UNICAMP.

### **Introdução**

Dentre as abordagens moleculares empregadas para analisar alterações biológicas, a metabólômica se concentra na caracterização e avaliação do conjunto de metabólitos de um organismo, apresentando um poder analítico capaz de avaliar diversas classes de biomoléculas (1). A metabólômica baseada em RMN de H<sup>1</sup> é um método destinado a identificação e quantificação de moléculas isoladas, podendo ser estendida a amostras complexas, como plasma sanguíneo, urina e outras matrizes biológicas. A utilização desta técnica tem como vantagens a alta reprodutibilidade, simplicidade na preparação das amostras e não destrutibilidade das amostras após a corrida, proporcionando, portanto, vantagens sobre outras técnicas analíticas (2).

As epilepsias são síndromes neurológicas crônicas, caracterizadas por uma hiperatividade persistente e duradoura de grupos de neurônios, culminando na ocorrência de crises epiléticas (3). A ELTM é o tipo mais comum de epilepsia focal em adultos, sendo caracterizada por focos epilepticos nas estruturas mesiais do lobo temporal (4). Cerca de 30 a 40% destes pacientes não respondem às terapias com as DAC disponíveis (5). Além dos efeitos deletérios intrínsecos das crises convulsivas não controladas, os pacientes com ELTM, especialmente os farmacorresistentes, estão mais expostos aos efeitos colaterais das DAC, muitas vezes prescritos na forma de politerapia e em doses elevadas.

Estudos têm mostrado a importância de identificar fatores moleculares capazes de influenciar na resposta terapêutica de pacientes com ELTM frente a diferentes DAC. Nesse sentido, uma análise do perfil metabólico desses pacientes pode contribuir para uma visão mais ampla e abrangente das consequências geradas pelas mudanças fenotípicas frente às DAC (6). A investigação desses metabólitos pode resultar na identificação de biomarcadores associadas ao perfil de refratariedade medicamentosa (7). Aqui, trazemos uma primeira visão sobre as alterações metabólicas que podem estar relacionadas aos mecanismos de farmacorresistência em

pacientes com ELTM, através de uma avaliação por RMN de  $^1\text{H}$  do metabóloma do plasma de pacientes com diferentes respostas ao tratamento com DAC.

## Método

Analizamos os metabólitos do plasma de 29 pacientes com ELTM com acompanhamento ativo no Ambulatório de Epilepsia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a resposta ao tratamento farmacológico - pacientes com ELTM refratários aos medicamentos (N = 19) e pacientes com ELTM responsivos (N = 10). A classificação dos pacientes nesses dois grupos foi realizada pelo médico assistente de acordo com critérios da *International League Against Epilepsy* (ILAE) (8) e já tem sido usada em vários trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (9; 10). A terapia utilizada para avaliar o fenômeno de resistência aos medicamentos foi a combinação de Carbamazepina (CBZ) e Clobazam (CLB), sendo este o regime terapêutico mais frequente utilizado no Ambulatório de Epilepsia do Hospital das Clínicas - UNICAMP.

Para a obtenção do plasma, 4 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo EDTA e mantidos em gelo por até 2 h. Os tubos foram submetidos à centrifugação refrigerada e o plasma final foi armazenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . As amostras de plasma foram diluídas em uma proporção de 1:1 (v/v) em solvente de óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$  99,9%, com ácido trimetilsililpropanóico 0,03%-TSP), e subsequentemente analisadas no Espectrômetro BrukerAscendTM 600 MHz acoplado a uma sonda TBI (*Triple Resonance Broadband Inverse*) de 5 mm, à temperatura ambiente.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  editados com filtro  $T_2$  foram obtidos utilizando a sequência de pulso Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), filtrando os sinais de macromoléculas interferentes. Os espectros foram processados e padronizados usando o software MestreNova (MestrelabResearch S.L.). Os valores de deslocamento químico foram referenciados usando o duplete correspondente ao grupo metil ( $-\text{CH}_3$ ) do lactato em 1,3 ppm. As regiões do espectro correspondentes a água e ao EDTA, foram removidas. Todos os sinais foram normalizados pela área total sob a curva, bem como a extensão da informação reduzida usando um *binning* de 0,04 ppm. Por fim, os espectros foram convertidos em matrizes de dados para posterior análise estatística.

A análise estatística foi realizada usando o MetaboAnalyst 5.0 (Xia, McGillUniversity), sem filtragem e sem normalização dos dados. Já a escala de Pareto foi utilizada na etapa de pré-processamento de dados. Aplicamos as análises multivariadas PLS-DA (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) com a validação cruzada *leave-one-out cross validation* (LOOCV) e análises univariadas de Fold-Change (FC) e o teste t corrigido por FDR. O p-valor ajustado não atingiu significância estatística ( $\text{adj.p} < 0,1$ ). No entanto, alterações na concentração de alguns metabólitos com potencial importância biológica no contexto das epilepsias foram identificadas ( $p < 0,1$ ) levando-se em conta os resultados de FC. Portanto, os deslocamentos químicos com valor de  $p < 0,1$  foram considerados significativos e serão discutidos a seguir. Os compostos químicos foram identificados com o auxílio do Human Metabolome Database (HMDB) (11).

## Resultados e Discussão

Os modelos estatísticos foram aplicados usando diferentes regiões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para avaliação de diferenças globais nos metabólitos presentes no plasma dos grupos investigados. Os pacientes do grupo refratário (N = 19) tinham média de idade de  $52,35 \pm 12,03$  anos e percentual feminino de 50%. Os pacientes do grupo responsivo (N = 10) tinham média de idade de  $53,90 \pm 8,50$  anos e percentual feminino de 60%. Não houve diferenças significativas entre as idades dos pacientes e distribuição por sexo nos dois grupos (testes U e Qui-quadrado).

Os dados adquiridos foram analisados nas regiões: a) 0,00 - 9,00 ppm, para uma análise global dos metabólitos; b) de 6,50 - 9,00 ppm, para análise de compostos aromáticos; c) 0,00 - 4,50 ppm, para uma análise de compostos alifáticos. A escolha dessa divisão baseou-se em uma análise mais específica para a identificação de aminoácidos aromáticos, uma vez que estes são observados em uma região do espectro compreendida entre 6,50 – 8,00 ppm, e exibem um papel fundamental na biossíntese de neurotransmissores, tendo, portanto, grande relevância na fisiopatologia das epilepsias (12).

Através do uso de modelos baseados em análises multivariadas, não foi possível demonstrar uma separação clara entre os grupos por uma análise de PCA (nas três divisões do espectrais), o que indica uma

homogeneidade dos perfis metabólicos. Porém, por meio de testes supervisionados como o PLS-DA, foi possível observar a separação entre os grupos, como mostrado na Imagem 1. Apesar de permitir uma melhor separação, a inspeção visual do perfil de *clusters* não é suficiente para fornecer confiabilidade preditiva para o modelo

Para tal, os valores de LOOCV ( $Q^2$ ) foram avaliados para determinação do grau de previsibilidade do modelo de PLS-DA: a) 0,00 - 9,00 ppm, com  $Q^2 = -0,193$ ; b) 6,50 - 9,00 ppm, com  $Q^2 = -0,121$ ; c) 0,00 - 4,50 ppm, com  $Q^2 = -0,221$ . Os baixos valores encontrados para  $Q^2$  podem ser o resultado de um universo amostral baixo ou um processo de *overfitting* do modelo (13). Com este modelo, deslocamentos químicos com valores de importância de variáveis em projeção (do inglês - *variable importance in projection*, VIP) mais altos foram avaliados e discutidos - usando a componente 1 do modelo -, de maneira a abranger todos os VIPs evidenciados pelas 3 divisões espectrais. Nessas condições, os deslocamentos químicos encontrados foram:  $\delta 1,702$  ( $p = 0,01$ ) e  $\delta 1,706$  ( $p = 0,002$ ), correspondendo a átomos de hidrogênio da L-arginina;  $\delta 2,654$  ( $p = 0,09$ ) para citrato de hidrogênio;  $\delta 3,914$  ( $p = 0,08$ ) para hidrogênios de creatina;  $\delta 2,130$  ( $p = 0,03$ ) para hidrogênios de L-glutamina e  $\delta 6,861$  ( $p = 0,05$ ) para hidrogênios de L-tirosina.

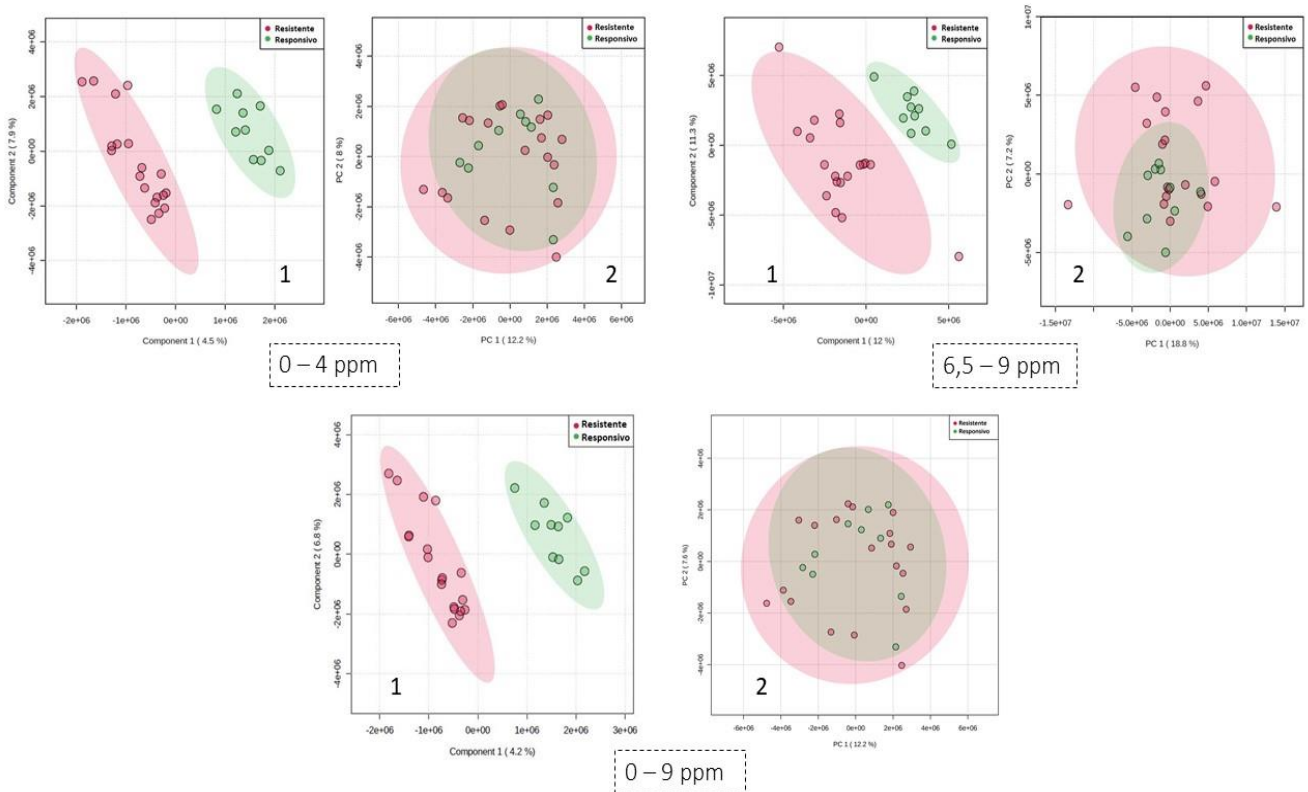


Imagem 1. Figura mostrando os gráficos dos modelos de (1) PLS-DA e (2) PCA das três divisões espectrais, construídos a partir de espectros de RMN de  $H^1$  com a sequência de pulsos CPMG. As áreas circunscritas aos grupos representam um intervalo de confiança de 95%. Os pontos vermelhos representam os pacientes refratários e os verdes, os pacientes responsivos as DAC.

Alguns desses metabólitos, como L-arginina, citrato e creatina, foram encontrados em maiores quantidades em pacientes refratários, podendo caracterizar uma presença mais significativa de eventos inflamatórios e mecanismos de falha no metabolismo energético (14; 15). Por outro lado, a L-glutamina e a L-tirosina mostraram-se diminuídas nos pacientes farmacorresistentes, o que pode indicar uma hiperexcitabilidade neuronal aumentada nesses indivíduos (16).

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos e discutidos nesse trabalho, encontramos diferenças significativas nos metabólitos plasmáticos de pacientes com ELTM de acordo com a resposta as DACs. Cinco metabólitos presentes em diferentes abundâncias nos dois grupos de pacientes foram encontrados: L-arginina, citrato, creatina, L-glutamina e L-tirosina. Juntas, essas moléculas podem ser consideradas como potenciais biomarcadores para refratariedade as DAC. Apesar da baixa capacidade discriminatória do modelo estatístico obtido para os dois grupos estudados encontramos diferenças significativas na concentração deses metabólitos que podem ser relacionados a diversas vias biológicas, como o metabolismo energético e a biossíntese e modulação da atividade de neurotransmissores. Desse modo, essas vias devem ser exploradas em trabalhos futuros em pacientes com ELTM refratários ao tratamento com DACs.

## Referências bibliográficas

- (1) Clish, C.B. Metabolomics: An emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2015 Oct;1(1):a000588. doi: 10.1101/mcs.a000588. PMID: 27148576; PMCID: PMC4850886;
- (2) Gebregiworgis, T.; Powers, R. Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2012;
- (3) Fisher, R.S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Engel, J. Jr. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005 Apr;46(4):470-2. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x. PMID: 15816939;
- (4) Engel, J. Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? *Neuroscientist*, 7(4), 340–352. 2001. <https://doi.org/10.1177/107385840100700410>;
- (5) Yasuda, C.L.; Cendes, F. *Neuroimaging for the prediction of response to medical and surgical treatment in epilepsy. Expert Opin Med Diagn. Jul.* 2012, 6(4):295–308;
- (6) Messerli, G.; Partovi Nia, V.; Trevisan, M.; Kolbe, A.; Schauer, N.; Geigenberger, P.; Chen, J.; Davison, A. C.; Fernie, A. R.; Zeeman, S. C. Rapid classification of phenotypic mutants of arabidopsis via metabolite fingerprinting. *Plant Physiol.*, 2007, 143 (4), 1484- 1492;
- (7) Pitkänen, A.; Ekolle Ndode-Ekane, X.; Lapinlampi, N.; Puhakka, N. (2019). Epilepsy biomarkers – Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiology of Disease*, 123(2019), 42–58. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.007>;
- (8) Kwan, P.; Brodie, M.J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005;46(2):224-35;
- (9) Bilevicius, E.; Yasuda, C.L.; Silva, M.S.; Guerreiro, C.A.; Lopes-Cendes, I.; Cendes, F. Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: a clinical and MRI morphometry study. *Neurology.* 2010 Nov 9;75(19):1695-701. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181fc29dd. PMID: 21060092.
- (10) Silva-Alves, M.S.; Secolin, R.; Carvalho, B.S.; Yasuda, C.L.; Bilevicius, E.; Alvim, M.K.; Santos, R.O.; Maurer-Morelli, C.V.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. A Prediction Algorithm for Drug Response in Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy Based on Clinical and Genetic Information. *PLoS One.* 2017 Jan 4;12(1):e0169214. doi: 10.1371/journal.pone.0169214. eCollection 2017;
- (11) Wishart, D.S. et al. HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *NucleicAcids Res.*, 2018. 46(D1): p. D608-17. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>.
- (12) Morimoto, K.; Fahnestock, M.; Racine, R. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology*, 2004, 73(1): 1-60;
- (13) Triba, M.N.; Le Moyec, L.; Amathieu, R. et al. *PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. Mol Biosyst.* 2015;11(1):13-19. doi:10.1039/c4mb00414k;
- (14) Boguszewicz, Ł.; Jamroz, E.; Ciszek, M. et al. NMR-based metabolomics in pediatric drug resistant epilepsy – preliminary results. *Sci Rep* 9, 15035, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51337-z>;
- (15) Grewal, G.K.; Kukal, S.; Kanojia, N. et al. Effect of oxidative stress on ABC-Transporters: contribution to epilepsy pharmacoresistance. *Molecules.* 2017;22(3):365;
- (16) Bozzi, Y.; Borrelli, E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7:157. doi: 10.3389/fncel.2013.00157;