Neurologia:
DIAGNÓSTICOS, TRATAMENTOS E CIRURGIAS
EDIÇÃO IV

Capítulo 10

EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS WNT EMTOR EM PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL FOCAL TIPO II

Amanda Foerster Grande[1]
Daniel Rodrigo Marinowic [2]
Douglas Bottega Pazzin[3]
Elisa Demarchi Krug[1]
Fernando Antônio Costa Xavier[4]
Fernanda Wagner[1]
Gabriela Uchôa Da Silveira[1]
Helena Morsch Marques[1]
Helena Scartassini Erwig[5]
Isabella Schnorr Paglioli[1]
Júlio Dilli De Paula[1]
Maria Eduarda Prytoluk Lima[1]
Marina Ottmann Boff[1]
Thales Thor Ramos Previato[6]
Veronica Damacena Kunrath[7]

[1]Discente - Medicina na Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[2]Docente - Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[3]Discente - Mestrando em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[4]Pós-Doutorando - Instituto do Cérebro da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[5]Discente - Ciências Biológicas na Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[6] Discente - Mestrando em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
[7]Discente - Doutoranda em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Palavras-Chave: *Epilepsia; Displasia cortical focal; Expressão gênica.*

DOI 10.59290/978-65-6029-149-2.1.10

EDITORA PASTEUR

INTRODUÇÃO

A displasia cortical focal (DCF) é a principal malformação do desenvolvimento cortical associada à epilepsia resistente à droga (ERD) tanto em crianças quanto em adultos. Cerca de 9% dos pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia são acometidos com DCF tipo II (BLÜMCKE *et al*., 2017). Estudos apontam que 61% dos pacientes iniciaram com crises epilépticas antes dos 5 anos de idade e 92,5% dos pacientes antes dos 16 anos (LORTIE *et al*., 2002; FAUSER *et al*., 2006). A DCF foi descrita pela primeira vez em 1971 por um relato de 10 pacientes com ERD submetidos à lobectomia. Foi relatada a presença de conjuntos de grandes e bizarros neurônios distribuídos pelas diversas camadas corticais, exceto pela primeira, além da presença de células grotescas (TAYLOR *et al*., 1971). As características descritas por Taylor serviram de base para a definição da DCF tipo II. Atualmente a DCF é definida por características histológicas, onde a DCF tipo II é definida por uma interrompida laminação cortical e anormalidades citológicas específicas, como neurônios dismórficos, muitas vezes citomegálicos, subdivididas em IIa e IIb. DCF IIb é distinta da DCF IIa pela presença adicional de células abalonadas sugestiva de uma população celular da oligodendroglia comprometida (BLÜMCKE *et al*., 2011; NAJM *et al*., 2022).

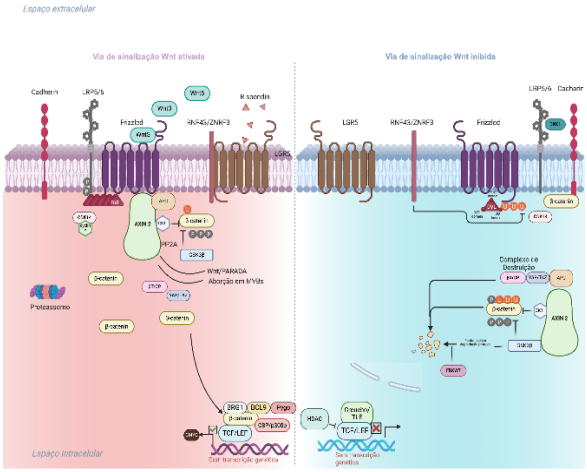
A origem da malformação na DCF mantém-se desconhecida. Diversos genes reguladores da formação do córtex já foram relacionados com a doença. Alterações no perfil de expressão gênica podem ser responsáveis por respostas celulares patogênicas e desenvolvimento de malformações teciduais. A via PI3K/AKT/mTOR (via mTOR) é a principal relacionada com DCF tipo II.

A via mTOR regula o crescimento, proliferação, motilidade e a sobrevivência celular, além de síntese proteica, autofagia e transcrição. Atualmente já é consolidado a relação entre a mTOR e DCF tipo II, particularmente por apresentar hiperativação da via (KUMARI *et al*., 2020). A via mTOR atua através da ativação de dois complexos principais, a mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 modula a maquinaria translacional.

Ras Homolog Enriched in Brain 1 (RHEB), um membro da família RAS das pequenas GTPases, é um ativador direto da mTORC1. O complexo mTORC2 atua no controle e organização do citoesqueleto, além da mobilidade celular adjunto do mTORC1. Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) é um ativador do mTORC2.

As vias WNT e mTOR são importantes, estando relacionadas ao desenvolvimento embrionário, diferenciação, polarização, crescimento, apoptose e diferenciação das células de diversos tecidos fundamentais para a corticogênese. A via WNT é uma das moduladoras da mTOR, sendo ativada por proteínas WNT que se ligam à proteína transmembrana Frizzled (FZD) que induzem a ativação da via pelo acúmulo de β-catenina (CTNNB1) no núcleo celular. A via WNT possui uma via canônica (dependentes de β-catenina) e duas secundárias (independentes de β-catenina). A via canônica ocorre quando o complexo WNT-FZD liga-se à proteína transmembrana Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), o que promove a inativação do complexo AXIN-APC, responsável pela degradação da β-catenina **Figura 10.1.**

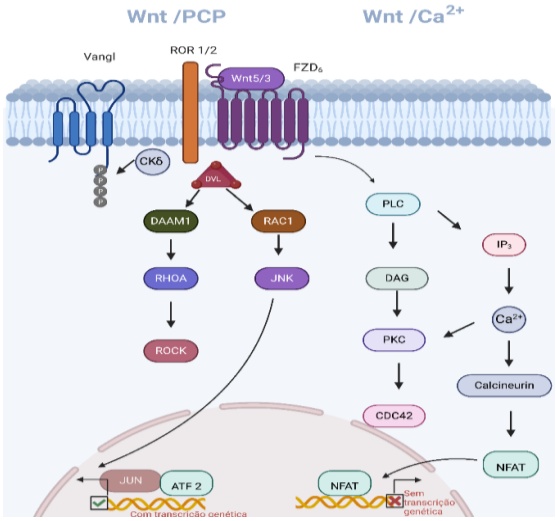
Figura 10.1 Ilustração do funcionamento da via canônica de WNT em sua forma ativada e inativada.



Legenda: Imagem obtida no *software* BioRender (Versão *web*). **Fonte:** Autores, 2024.

Por fim, a via não canônica PCP, a Wnt livre liga-se ao complexo receptor ROR-*Frizzled*, levando a rearranjos do citoesqueleto e respostas transcricionais. A segunda via não canônica, também chamada de via de sinalização Wnt/Ca2+ que é iniciada pela atividade da fosfolipase C, que por fim, acaba gerando fluxos de cálcio intracelular e respostas citoesqueléticas e/ou transcricionais dependentes de cálcio (Komiya & Habas; 2008; Zhan *et al*; 2017). **Figura 10.2**.

Figura 10.2 Ilustração do funcionamento das vias não canônicas da WNT



Legenda: Imagem obtida no *software* BioRender (Versão *web*). **Fonte:** Autores, 2024.

O principal tratamento para ERDs é a ressecção do tecido epileptogênico, apresentando eficácia de 60-80% para DCF II, onde os pacientes apresentam controle completo das crises, auxiliados por fármacos. Já se foi relatado controle de crises para pacientes com ERD, suspeita de DCF tipo II, com fármacos antiepilépticos adjuntos de inibidores da mTOR. Torna-se então de interesse a investigação de potenciais novos alvos relacionados à formação destes tecidos epileptogênicos em DCF tipo II.

Este estudo teve como objetivo analisar alterações nos níveis de expressão gênica das vias de sinalização WNT e mTOR em tecido cortical de pacientes com DCF tipo II.

MÉTODO

Este projeto trata-se de um estudo prospectivo experimental laboratorial realizado no Instituto do Cérebro da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Para todos os participantes foi realizada a leitura e apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após consentimento e assinatura do termo, amostras e dados dos pacientes passaram a fazer parte do Biobanco do Instituto do Cérebro (BBInsCer). No caso de participantes menores de 18 anos, o termo de assentimento foi assinado pelos pais ou responsáveis. As amostras e seus dados estão depositadas sobre rígidos controles da LGPD, com acesso restrito aos pesquisadores envolvidos no projeto. A Coleção Especializada | CE – BBInsCer pertencente ao Biobanco PUCRS registrada de acordo com a ANVISA (RDC nº 9 de 14 de março de 2011), com o CONEP/CNS/MS (RESOLUÇÃO nº 441 de 19 de julho de 2011) e Ministério da Saúde (PORTARIA nº 2.201 de 14 de setembro de 2011).

Foram utilizadas no total 22 amostras de tecido cortical cerebral, sendo 12 deles de pacientes com DCF (5 do tipo IIa e 7 do tipo IIb) e

10 controles. As amostras foram obtidas de pacientes atendidos no Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS por epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso e diagnosticados com malformação cortical. As amostras de tecido cerebral do grupo controle foram obtidas do neocórtex de pacientes com epilepsia do lobo temporal associada à esclerose do hipocampo (TLE-EH) submetidos à lobectomia temporal anterior em bloco. Todas as amostras de tecido cerebral foram obtidas através de frações sobressalentes da dissecação do tecido cerebral durante o procedimento cirúrgico para tratamento de epilepsia refratária, não adicionando nenhum procedimento ou alteração no curso cirúrgico dos participantes.

As amostras de tecido cerebral destinadas para análises genéticas passaram inicialmente por um processo de maceração mecânica e química por Trizol ® para extrair RNA. Após essa etapa, o RNA extraído foi purificado por coluna usando Kit SV-Total RNA (Promega). A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando GoScriptTM Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) (PROMEGA) em uma etapa de RT-PCR. Tanto o RNA quanto cDNA foram quantificados no espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) para observar valores de concentração e pureza, para estabelecer os valores de input da próxima etapa.

Foi realizada análise da expressão gênica através da técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa e em tempo real (qPCR-do inglês *Polymerase Chain Reaction*). A análise de expressão gênica abordou 19 genes ao todo, sendo: 16 da via WNT (AXIN2, C-MYC, CTNNB1, DKK1, FOSL1, FZD5, LRP5, LRP6, NFAT1, NKD1, PYGO, SFRP1, SFRP4, TCF7, WNT3 e WNT5), 3 da via mTOR (MTOR, PI3K e RHEB) e o gene ACTB foi usado como gene controle.

A partir dos dados de CT, foi realizado análise de expressão gênica pelo método de $2^{-\Delta\Delta ct}$ gerando um *fold-change*. Com base no valor de *fold-change*, foram gerados diagramas de caixa (*boxplot*) para observar a distribuição dos dados. Também foi realizado correlação de Pearson para observar a relação entre os níveis de expressão dos genes de par a par. Todas as análises foram realizadas no *software* Rstudio (RSTUDIO TEAM, 2024).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A DCF é uma condição médica com característica de dislaminação cortical e células dismórficas. Por conta desses aspectos, o paciente com DCF apresenta crises epilépticas convulsivas, problemas cognitivos além de resistência ao tratamento medicamentoso.

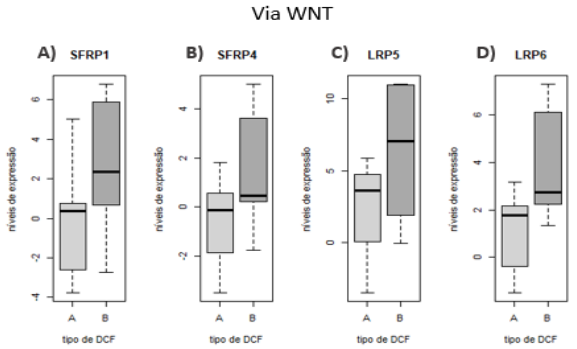
Embora não se saiba a origem da DCF, pacientes com DCF tipo II apresentam mutações em alguns genes presentes na via mTOR e PI3K/AKT/mTOR (LIM *et al*. 2015; MIRZA *et al*. 2016). As vias WNT e mTOR estão presentes em inúmeros processos de inúmeros tecidos e de diferentes órgãos. Esses processos incluem, diferenciação, proliferação, apoptose e outros, o que permite o desenvolvimento e manutenção do tecido. Ambas as vias foram relacionadas com o desenvolvimento do córtex cerebral e suas patologias. A DCF é uma patologia do desenvolvimento do córtex cerebral e diferentes estudos têm apontado a atuação das vias WNT e mTOR na sua patogenicidade.

Através dos valores de expressão relativa, identificou-se hiperexpressão para os genes da WNT e mTOR em pacientes com DCF, sendo IIb com maiores níveis de expressão que o grupo IIa.

Para os genes SRFP1, SFRP4, LRP5 e LRP6, observa-se como os valores de expressão gênica da DCF IIb foram maiores que a DCF IIa. Na **Figura 10.3** pode-se observar que a DCF IIa teve baixo nível de expressão gênica dos genes SFRP1 e SFRP4, diferente da DCF

IIb que apresentou alto nível de expressão gênica para ambos. Nos genes LRP5 e LRP6, ambos os grupos apresentaram hiperexpressão, porém o grupo IIb apresentou maior expressão se comparada a IIa.

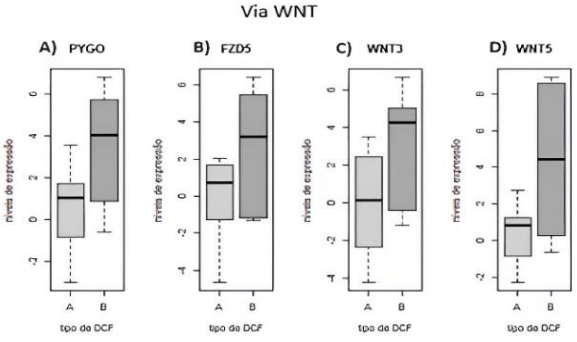
Figura 10.3 Diagrama de caixa (*boxplot*) com os níveis de expressão de SFRP1, SFRP4, LRP5 e LRP6 em pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa e IIb



Legenda: Imagens obtidas no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Nos genes PYGO, FZD5, WNT3 e WNT5 os valores de expressão entre os grupos IIa e IIb variaram desde hipoexpressão para hipoexpressão. No caso do grupo IIb, a ambos os padrões de hipoexpressão e hiperexpressão são observáveis, embora a maior frequência nos valores se enquadram em hiperexpressão **Figura 10.4**.

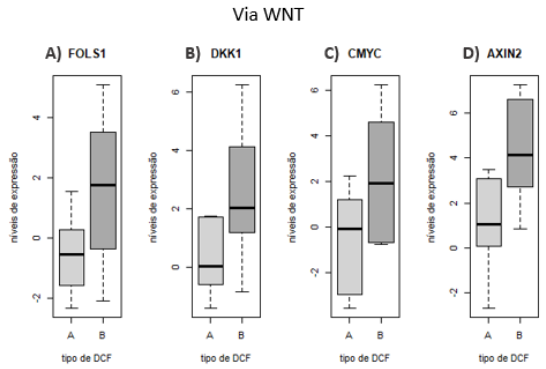
Figura 10.4 Diagrama de caixa (*boxplot*) com os níveis de expressão de PYGO, FZD5, WNT3 e WNT5 em pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa e IIb



Legenda: Imagens obtidas no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Na **Figura 10.5** os valores de expressão gênica para os genes FOLS1, DKK1, CMYC e AXIN2 na DCF IIB tendem a ser altos, maiores mesmo que a IIa. No grupo da DCF IIa, os valores variam em hiperexpressão para AXIN2, e variações de expressão para FOLS1, DKK1 e CMYC.

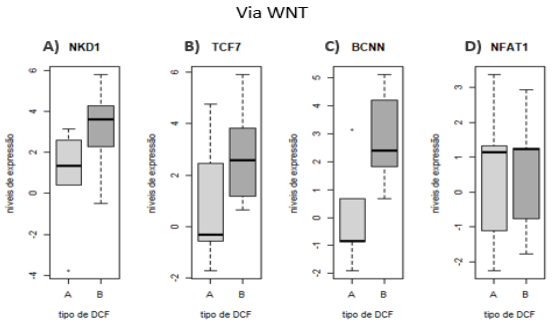
Figura 10.5 Diagrama de caixa (*boxplot*) com os níveis de expressão de FOLS1, DKK1, CMYC e AXIN2 em pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa e IIb



Legenda: Imagens obtidas no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Ao comparar o nível de expressão gênica entre a DCF IIa e DCF IIb para o gene BCNN, observa diferença significativa entre os grupos, tendo maior expressão o grupo IIb que teve hiperexpressão. Para NFAT1, ambos os grupos tiveram valores similares de expressão gênica. Para o gene NKD1, os valores variam entre hipoexpressão e hiperexpressão para ambos os grupos. Já o gene TCF7 teve maior expressão na DCF IIb enquanto na DCF IIa teve menor expressão, variando entre valores positivos e negativos **Figura 10.6.**

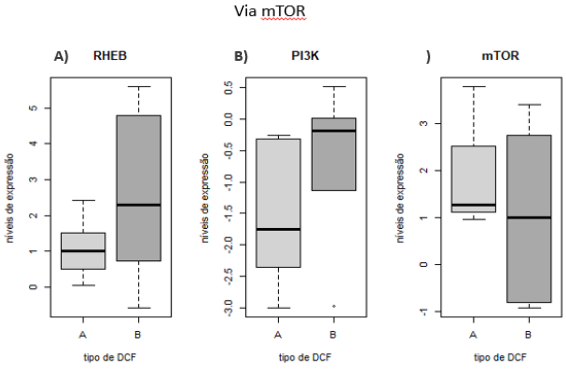
Figura 10.6 Diagrama de caixa (*boxplot*) com os níveis de expressão de NKD1, TCF7, BCNN e NFAT1 em pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa e IIb.



Legenda: Imagens obtidas no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

A **Figura 10.7** mostra os valores dos genes da via mTOR para DCF (IIa e IIb). Para o gene RHEB, hiperexpressão foi observada para a DCF IIb enquanto os valores para IIa foram leves para hipo e hiperexpressão. Para o gene PI3K, observou-se maior hipoexpressão para a DCF IIa enquanto os valores para IIb variaram levemente entre hipo e hiperexpressão. No gene mTOR, houve hiperexpressão no grupo IIa e, no grupo II os valores variaram entre hipo e hiperexpressão.

Figura 10.7 Diagrama de caixa (*boxplot*) com os níveis de expressão de RHEB, PI3K e mTOR em pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa e IIb

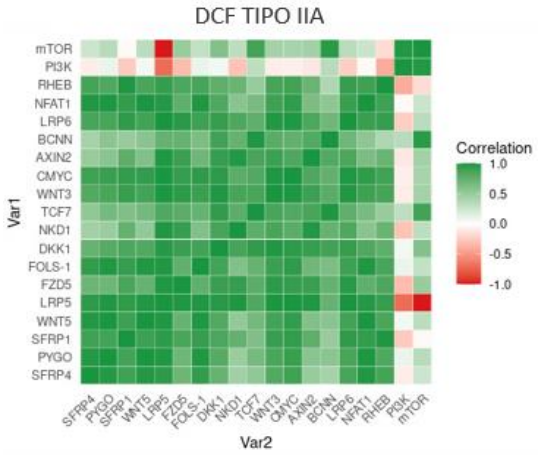


Legenda: Imagens obtidas no software Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Os dados de expressão gênica de cada gene, ao serem correlacionados, gera uma matriz de correlação que pode ser positiva, quando os valores de expressão entre os genes tendem a seguir uma proporção entre cada indivíduo. Para os valores negativos, a correlação indica que à medida que um gene é hiperexpresso, outro tende a ser hipoexpresso e que essa proporção tende a se manter independente do paciente analisado.

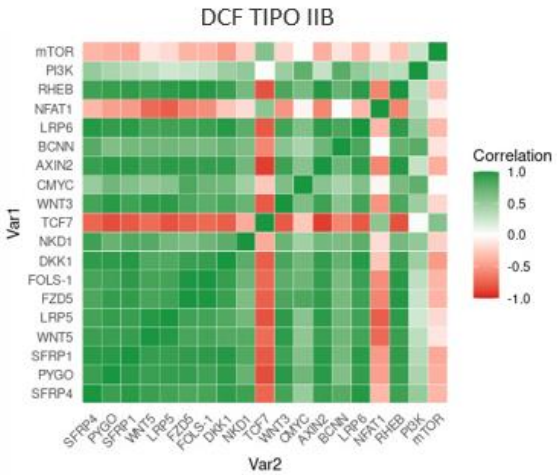
Nas **Figura 10.8** e **Figura 10.9** mostram matrizes de correlação entre os genes da via WNT e mTOR para os pacientes do grupo DCF IIa e DCF IIb respectivamente. Os quadrados preenchidos pela cor verde evidenciam correlação positiva e os quadrados vermelhos evidenciam correlação negativa entre os genes. Para ambos os grupos, há uma maior proporção de genes positivamente correlacionados do que genes negativamente correlacionados. No caso da DCF IIb, houve uma maior quantidade de genes negativamente correlacionados do que comparado a DCF IIa, contudo a proporção entre verdes permanece maior.

Figura 10.8 Matriz de correlação entre genes (via mTOR e WNT) em amostras de pacientes com displasia cortical focal do tipo IIa



Legenda: Imagem obtida no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Figura 10.9 Matriz de correlação entre genes (via mTOR e WNT) em amostras de pacientes com displasia cortical focal do tipo IIb



Legenda: Imagem obtida no *software* Rstudio. **Fonte:** Autores, 2024.

Os dados obtidos permitem observar um padrão de expressão gênica das vias WNT e mTOR entre pacientes com DCF tipo IIa e IIb. O padrão observado revela que pacientes com

DCF tipo II tendem a apresentar valores de expressão gênica diferentes de pessoas sem DCF. Esses valores podem ser hipoexpressos ou hiperexpressos conforme o gene analisado. A DCF tipo IIb tende a apresentar valores maiores de expressão para a maioria dos genes. Quando comparados, indivíduos com DCF IIb apresentam valores de expressão gênica maiores do que pacientes com DCF IIa. Contudo, isso não é regra pois há genes que fogem a essa exceção, podendo o cenário inverter ou até mesmo igualar valores de expressão.

O aumento da expressão dos genes da via mTOR condizem com os padrões na literatura para aumento da atividade da via em pacientes com DCF tipo II, porém foi identificada diferença de perfil entre essas doenças quando analisados genes da via WNT. A avaliação por correlação demonstrou uma forte correlação positiva entre todos os genes da via WNT para DCF IIa, comparado a 14 genes com forte correlação positiva e 2 com forte correlação negativa para DCF IIb. Estes dados apresentaram uma relação considerável da DCF tipo II com alterações na via WNT, além de um perfil de expressão distinto entre os dois tipos da doença, com correlações de expressões diferentes, potencializando um auxílio no diagnóstico pós-cirúrgico.

CONCLUSÃO

Devido aos achados é indicativo uma diferença de perfil de expressão para genes da via WNT. A DCF tipo IIa e IIb apresentam tipos celulares diferentes, indicativos de sinalização distinta para diferenciação celular.

A utilização de inibidores da mTOR já foram utilizados no tratamento para DCF tipo II. Desta forma, com os achados encontrados, a via WNT torna-se um alvo interessante para maiores estudos sobre seus efeitos no fenótipo da doença.

Além disso, a utilização de inibidores da via, como DKK, devem ser investigados no seu uso associado a drogas anti epileptogênicas em casos de DCF tipo II.

A evidente distinção nos perfis de expressão levanta também a possibilidade de diagnóstico distinto a cada paciente, evidenciando seus níveis de expressão para vias relacionadas à patologia.

Nosso trabalho encontra-se em fase inicial e demais experimentos estão em andamento para confirmar os achados e investigação do funcionamento da via WNT em DCF tipo II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLÜMCKE, I. *et al.* The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. Epilepsia, v. 52, p. 158, 2011. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x.

BLÜMCKE, I. *et al.* Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. New England Journal of Medicine, v. 377, p. 1648, 2017. doi : 10.1056/NEJMoa1703784.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 9, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos saneantes na ANVISA. Brasília DF., mar., 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/prt0009_14_03_2011.html. Acesso em: 12 jul. 2024.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Brasília DF., mai., 2011. Disponível em: https://conselho.saude.gov.br/normativas-conep. Acesso em: 12 jul. 2024.

BRASIL. Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Brasília DF., set., 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2201_14_09_2011.html. Acesso em: 12 jul. 2024.

FAUSER, S. *et al.* Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in a series of 120 patients. Brain. v. 129, p. 1907, 2006. doi:10.1093/brain/awl133

KOMIYA, Y. & HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis, v. 4, p. 68, 2008. doi: 10.4161/org.4.2.5851.

KUMARI, K. *et al.* mTOR pathway activation in focal cortical dysplasia. Annals of diagnostic pathology, v. 46, 2020. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151523.

LIM, J.S. *et al.* Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. Nature Medicine, v. 21, p. 395, 2015. doi: 10.1038/nm.3824.

LORTIE. *et al.* Characteristics of epilepsy in focal cortical dysplasia in infancy. Epilepsy Research. v. 51, p. 133, 2002. doi: 10.1016/s0920-1211(02)00102-x.

MIRZAA, G.M. *et al*. Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. JAMA neurology, v. 73, p. 836, 2016. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0363.

NAJM, I. *et al*. The ILAE consensus classification of focal cortical dysplasia: An update proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. Epilepsia, v. 63, p. 1899, 2022. doi: 10.1111/epi.17301.

TAYLOR, D.C. *et al*. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, v. 34, p. 369, 1971. doi: 10.1136/jnnp.34.4.369.

ZHAN, T. *et al*. Wnt signaling in cancer. Oncogene, v. 36, p. 1461, 2016. doi: 10.1038/onc.2016.304.