

ESTUDO ORIGINAL

# A regulação negativa dos miRNAs derivados do LCR miR-142-3p e miR-17-5p pode estar associada à cefaleia pós-punção dural em mulheres grávidas sob raquianestesia

Duygu Yücel

Erciyes University, Genome and Stem Cell Center (GenKok), Kayseri, Turkey

Recebido em 26 de maio de 2020; aceito em 28 de agosto de 2021.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Anestesia espinal;  
Cefaleia pós-punção  
dural;  
Líquido  
cefalorraquidiano;  
Biomarcadores;  
MicroRNAs

**RESUMO:**

**Introdução:** A cefaleia pós-punção dural (CPPD) desenvolve-se devido à punção da dura-máter. Os fatores de risco que influenciam a incidência de CPPD são Índice de Massa Corporal (IMC), sexo, tipo de agulha espinal, história de cefaleia e perda de volume do líquido cefalorraquidiano (LCR), mas não há consenso sobre esses fatores de risco. A fisiopatologia da CPPD é pouco compreendida. As vias moleculares que podem levar à CPPD são desconhecidas. Neste estudo, microRNAs derivados de LCR (miRNAs) foram investigados por seu potencial de predispor a CPPD em uma população de mulheres grávidas.

**Métodos:** Gestantes submetidas à cesariana por raquianestesia foram incluídas no estudo com o critério dos sujeitos apresentarem estado físico I da Sociedade Americana de Anestesiologistas (ASA). As pacientes foram classificadas em dois grupos como com CPPD (n = 10) e sem CPPD (n = 12) com base na definição de CPPD da International Headache Society. MicroRNAs derivados de CSF foram investigados por seus níveis de expressão diferencial em pacientes com CPPD em comparação com os controles saudáveis usando a plataforma de expressão de genes microfluidicos.

**Resultados:** Dos setenta e seis miRNAs, dois miRNAs, nomeadamente miR-142-3p e miR-17-5p, foram significativamente desregulados em pacientes com CPPD (teste U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). IMC e idade não influenciaram a ocorrência de CPPD. A média da escala visual analógica (EVA) dos pacientes com CPPD foi de 6,8 em 10.

**Conclusão:** Mostramos que a regulação negativa de miR-142-3p e miR-17-5p pode predispor gestantes a CPPD sob raquianestesia. No entanto, quais genes são direcionados pelo efeito mediado por miR-142-3p e miR-17-5p na CPPD ainda não foi elucidado.

E-mail: duygyucel@erciyes.edu.tr

<https://doi.org/10.1016/j.bjane.2021.08.016>

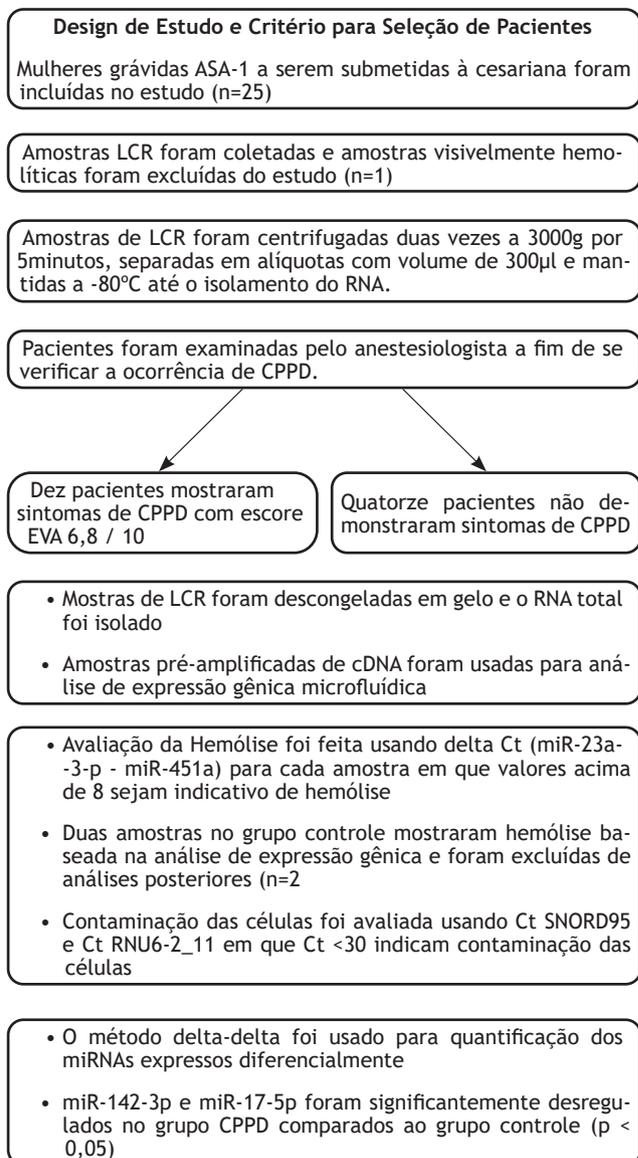
© 2021 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## Introdução

A cefaleia pós-punção dural (CPPD) é uma condição provocada após raqui-anestesia com taxas de incidência variáveis entre 2 a 85%<sup>1</sup>. A CPPD é definida como qualquer dor de cabeça após uma punção lombar que piora em 15 minutos após sentar ou ficar em pé e é aliviada em 15 minutos após o paciente deitar<sup>2</sup>. A maioria das CPPDs se desenvolve dentro de três dias após o procedimento e mais da metade deles começa nas primeiras 48 horas<sup>3</sup>. O principal mecanismo postulado para CPPD é a redução da pressão do líquido cefalorraquidiano (LCR) devido ao vazamento de LCR através da dura-máter no local da punção. É bem conhecido que a punção da dura-máter permite que o LCR vazze do espaço subaracnóideo, o que resulta em diminuição do volume e da pressão do LCR. IMC, idade, sexo, calibre da agulha espinhal, história de cefaleia crônica e perda de volume do LCR estão entre os fatores de risco que predisõem à CPPD<sup>4,6</sup>. No entanto, os fatores moleculares que predisõem à CPPD não foram investigados. Um mecanismo postulado há mais de vinte anos é a hipersensibilidade à substância P e a regulação positiva dos receptores de neurocinina 1 (NK1R)<sup>7</sup>.

Mecanismos moleculares de processamento da dor têm sido dissecados nos últimos anos com papéis de miRNAs em vias nociceptivas. microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes de 18 a 25 nucleotídeos de comprimento que inibem a expressão gênica pós-transcricionalmente<sup>8</sup>. Os miRNAs demonstraram direcionar moléculas que medeiam o processamento da dor, como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico- $\alpha$ 1 (GABA $\alpha$ 1), canais Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e canais TRPV1<sup>9</sup>. Os miRNAs podem ser transportados para fora das células por vesículas extracelulares e, portanto, encontrados em fluidos corporais, como LCR, urina e saliva<sup>10</sup>. Os miRNAs derivados do LCR refletem as funções cerebrais e são usados como biomarcadores candidatos para diagnóstico, prognóstico e classificação de doenças neurodegenerativas e doenças neoplásicas do sistema nervoso central<sup>11,12</sup>. Recentemente, os miRNAs derivados do LCR demonstraram desempenhar um papel na fibromialgia, que é uma condição de dor crônica<sup>13</sup>. No entanto, devido à dificuldade de obtenção de amostras de LCR, os estudos sobre o LCR e os miRNAs relacionados à dor têm sido limitados.

A fisiopatologia da cefaleia pós-punção dural (CPPD) é pouco compreendida. Embora vários fatores de risco tenham sido identificados, não há consenso sobre os fatores que influenciam a incidência de CPPD. Dadas as recentes descobertas sobre os papéis dos miRNAs no processamento da dor e na nocicepção, levantamos a hipótese de que os miRNAs derivados do LCR podem estar associados à predisposição à CPPD na raqui-anestesia. Portanto, neste estudo objetivamos identificar miRNAs diferencialmente expressos derivados do LCR de pacientes com CPPD. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que os miRNAs derivados de CSF são interrogados quanto ao seu potencial de predispor à CPPD.



**Figura 1** O esquema do desenho do estudo e o pipeline para o perfil de miRNA

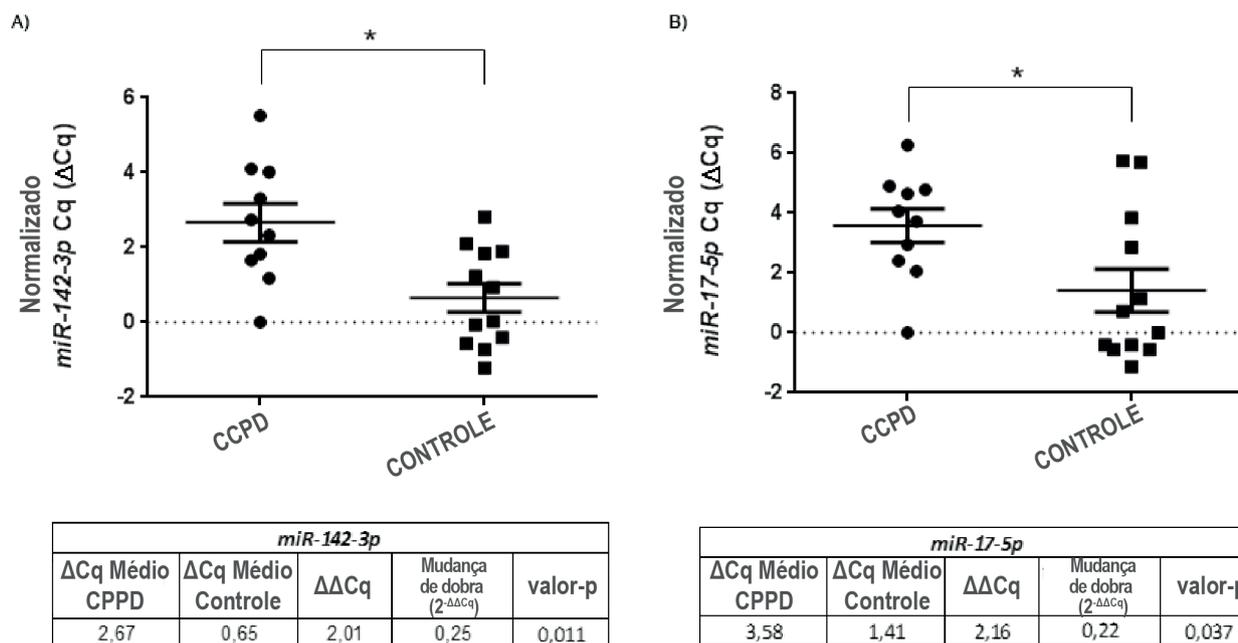
## Métodos

### Projeto de estudo e pacientes

Este estudo de coorte prospectivo foi realizado na Faculdade de Medicina com aprovação do comitê de ética médica. Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo participantes humanos estavam de acordo com a declaração de Helsinque de 1964. Indivíduos com um consentimento informado por escrito foram incluídos no estudo. Foram incluídas no estudo gestantes submetidas à cesariana via raqui-anestesia (n = 25) tendo como critério o estado físico I da American Society of Anesthesiologists (ASA), definido como paciente normal e saudável com características de não-obesas e não fumantes com boa tolerância ao exercí-

**Tabela 1** Os valores brutos de  $\Delta Cq$  (miR-23a-3p - miR-451a) para avaliação de hemólise são indicados.

Amostra de LCR (CPPD)	$\Delta Cq$ (miR-23a-3p - miR-451a)	Avaliação de Hemólise	Amostra de LCR (Controle)	$\Delta Cq$ (miR-23a-3p - miR-451a)	Avaliação de Hemólise
1	-2,58	Aprovada	1	-3,72	Aprovada
2	-0,11	Aprovada	2	-0,15	Aprovada
3	-1,75	Aprovada	3	-1,16	Aprovada
4	3,21	Aprovada	4	-2,80	Aprovada
5	-2,99	Aprovada	5	-0,21	Aprovada
6	-1,77	Aprovada	6	-2,64	Aprovada
7	-1,44	Aprovada	7	-1,12	Aprovada
8	-2,07	Aprovada	8	-3,20	Aprovada
9	1,73	Aprovada	9	-4,13	Aprovada
10	-2,80	Aprovada	10	3,28	Aprovada
			11	-4,41	Aprovada
			12	-1,98	Aprovada
			13	8,23	Reprovada
			14	9,85	Reprovada

**Figura 2** miR-142-3p e miR-17-5p são regulados negativamente em pacientes com CPPD em comparação com os controles saudáveis. Valores de  $\Delta Cq$  normalizados para A) miR-142-3p e B) miR-17-5p em pacientes com CPPD e os controles saudáveis são mostrados. O  $\Delta Cq$  médio para cada miRNA é indicado junto com as mudanças de dobra (teste U de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ ).

cio (Fig. 1)<sup>14</sup>. Indivíduos com doenças sistêmicas leves ou graves (ou seja, ASA II-IV) não foram incluídos na coorte do estudo. A fim de induzir a raquianestesia, a punção lombar foi realizada usando o mesmo tipo de agulha espinhal para todos os indivíduos que é uma agulha espinhal atraumática 26G com um introdutor 20G (Braun Atrauncan). Depois que a agulha espinhal atingiu o espaço subaracnóideo, o LCR foi deixado cair pela ponta da agulha. As gotas de LCR foram coleta-

das em tubos esterilizados. Durante a coleta do LCR, foram descartadas amostras visivelmente hemolíticas ( $n = 1$ ). Após a operação, as pacientes foram hospitalizadas por cinco dias e a CPPD foi diagnosticada por um anestesiologista durante o período de internação, onde os escores da Escala Visual Analógica (EVA) das pacientes foram interrogados. As pacientes foram classificadas em dois grupos como com CPPD e sem CPPD com base na definição de CPPD da International

**Tabela 2** Características dos indivíduos do sexo feminino com e sem CPPD. Média  $\pm$  EPM são indicados.

	CPPD (n=10)	CONTROLE (n=12)	Valor <i>p</i> <sup>a</sup>
EVA	6,8 $\pm$ 0,6	-	NA
Peso (kg)	72,7 $\pm$ 1,9	74,9 $\pm$ 2,1	0,458
Altura (cm)	162,3 $\pm$ 1,9	162,9 $\pm$ 1,9	0,827
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,6 $\pm$ 0,7	28,3 $\pm$ 0,7	0,572
Idade (anos)	31,3 $\pm$ 1,6	30,0 $\pm$ 1,3	0,542

NA: Não aplicável

<sup>a</sup> teste *t* de Student

Headache Society (IHS), que é definida como qualquer dor de cabeça após uma punção lombar que piora em 15 minutos após sentar ou ficar em pé e é aliviada em 15 minutos após a punção lombar da paciente deitada<sup>2</sup>. Dez pacientes tiveram CPPD e 14 pacientes não desenvolveram CPPD. De acordo com as diretrizes do IHS, a maioria dos sintomas de CPPD começa dentro de três dias após o procedimento, no entanto, pode levar até cinco dias para que os sintomas se desenvolvam e até duas semanas para resolver espontaneamente. Para garantir que o diagnóstico de CPPD estava correto, as pacientes foram interrogadas pelo anestesiológico em um período de duas semanas. Nenhuma das pacientes tinha sintomas persistentes de CPPD neste momento. A duração dos sintomas de CPPD também foi registrada (5,7  $\pm$  0,4 dias). Os escores de Apgar neonatais das pacientes com CPPD e dos controles ficaram entre 8-10, portanto, não houve diferença significativa entre os grupos.

Todas as amostras de LCR foram processadas para análise de expressão gênica e avaliação de hemólise foi realizada onde duas das amostras sem grupo CPPD foram excluídas de análises adicionais conforme indicado abaixo. Ao final, dez amostras de CPPD foram comparadas com doze pacientes controle sem CPPD.

### Amostragem de LCR

As amostras de LCR foram coletadas em um tubo de microcentrífuga com volume aproximado de 600  $\mu$ l e centrifugadas duas vezes a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C em alíquotas de 300  $\mu$ l até o isolamento total do RNA.

### Preparação de amostra

As amostras de LCR foram descongeladas em gelo e o RNA total foi isolado usando o MiRVANA PARIS RNA Purification Kit (catálogo no AM1556, Ambion-ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, solução desnaturante 2X foi adicionada 1:1 volume a 200  $\mu$ l de amostras de CSF e misturada imediatamente. Após a adição de solução desnaturante às amostras de CSF, esta mistura foi incubada em gelo por 5 minutos, após o que 25 femtomoles de cel-miR-39 miRNA mimetiza-

dor foram adicionados por amostra como um controle de pico. Ácido-fenol:clorofórmio foi adicionado na proporção de 1:1 e agitado em vórtex por 45 segundos e centrifugado por 5 minutos a 10.000g em temperatura ambiente. Após a extração orgânica, glicogênio grau RNA (ThermoFisher) foi adicionado à fase aquosa em uma concentração final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l<sup>1</sup> para aumentar o rendimento de RNA. Adicionou-se 1,25 volumes de etanol à fase aquosa e misturou-se cuidadosamente por pipetagem. A mistura foi carregada nas colunas e centrifugada por 30 segundos a 10.000 g. Após as etapas de lavagem, o RNA foi eluído em um novo tubo de microcentrífuga e armazenado a -80°C graus. A síntese de cDNA foi realizada usando o kit miScript II RT da Qiagen. O RNA foi descongelado em gelo. 5X miScript HiSpec Buffer, 10x Nucleics Mix, água sem RNase e mix de transcriptase reversa miScript foram adicionados às amostras de RNA de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 37°C durante 60 minutos e a 95°C durante 5 minutos. Antes da análise da expressão gênica, as amostras de cDNA foram diluídas em 1:3 e amplificadas com o kit miScript Microfluidics PreAMP usando tampão 5XPreAmp (Qiagen, Hilden, Alemanha). Amostras pré-amplificadas foram usadas para análise de expressão gênica microfluídica.

### RT-qPCR e normalização

O sistema de expressão gênica microfluídica da Fluidigm foi usado para análise de RT-qPCR. O circuito fluídico integrado (IFC) Dynamic Array (96.96) (Fluidigm, South San Francisco, CA) foi injetado com o Control Line Fluid Kit e preparado usando o IFC Controller HX (Fluidigm). As misturas para entradas de ensaio e entradas de amostra foram preparadas usando o kit miScript Microfluidics PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os ensaios de primer e o primer universal miScript foram misturados com 2xAssay Loading Reagent (Fluidigm) e dispensados nas entradas de ensaio do IFC. As amostras de cDNA pré-amplificadas foram misturadas com o mix mestre Microfluidics qPCR fornecido no kit miScript Microfluidics PCR (Qiagen) e reagente de carregamento de amostra de ligação 20xDNA (Fluidigm). A mistura de amostra foi dispensada nas entradas de amostra do IFC e o processo de carregamento foi iniciado usando o IFC Controller HX (Fluidigm). Após a conclusão das etapas de preparação e carregamento, o IFC foi executado no sistema BioMark™ HD.

A lista personalizada de miRNAs é composta por 77 miRNAs e foi encomendada à Qiagen na forma de ensaios de primers. Os miRNAs candidatos foram selecionados com base em sua expressão robusta e dominante no LCR em várias condições relacionadas por outros grupos<sup>15-17</sup> (Tabela Complementar 1). Dos 77 miRNAs candidatos, 7 deles, nomeadamente hsa-miR-124-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-24, hsa-miR-99a-5p e hsa-let-7b foram incluídos como potenciais genes de referência com base em rela-

tórios anteriores<sup>16,18,19</sup>. hsa-miR-124-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-191-5p foram usados como genes de referência por Murray et al e miR-30b-5p foi escolhido como o melhor gene de referência pelos algoritmos NormFinder e usado para análise posterior por este grupo<sup>18</sup>. miR-99a-5p, miR-30b-5p e let-7b foram usados como genes de referência por Holm et al. e miR-24 foi usado como gene de referência por Baraniskin et al.<sup>16,19</sup>. Em nossa configuração experimental, o miR-99a-5p foi encontrado como o melhor gene de referência pelo NormFinder, que usa uma abordagem baseada em modelo para determinar genes que são expressos de forma estável entre um conjunto de genes candidatos à normalização<sup>20</sup>. Todos os candidatos a miRNA personalizados foram interrogados por seu desempenho de referência, ou seja, por serem expressos de forma robusta em todas as amostras e hsa-miR-99a-5p foi encontrado como o melhor gene de referência em nosso projeto experimental. Além de nenhum controle de amplificação e nenhum controle de modelo como controles negativos, a ausência de dois pequenos RNAs, SNORD95 e RNU6-2\_11, foi testada como um indicador de células contaminantes no LCR<sup>21</sup>. A avaliação da hemólise foi realizada usando hsa-miR-23a-3p e hsa-miR-451a. As amostras com valores de delta Ct de hsa-miR-23a-3p - hsa-miR-451a acima de 8 (Tabela 1) foram excluídas do estudo devido à hemólise que correspondeu a duas amostras do grupo controle (sem CPPD). Após a determinação dos genes de referência mais adequados usando algoritmos do NormFinder, a normalização das amostras foi realizada conforme descrito por Murray et al., usando hsa-miR-99a-5p como gene de referência e o controle spike-in<sup>18</sup>. O nível de expressão de miRNAs foi determinado usando o método  $\Delta\Delta Cq$ . As mudanças de dobras foram calculadas usando a fórmula  $2^{-(\Delta Cq^{CPPD} - \Delta Cq^{Controle})}$  onde  $\Delta Cq = Cq_{alvo} - Cq_{referência}$ .

### Análise estatística

Os miRNAs diferenciais entre a CPPD e os controles foram determinados pelo teste U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). As características contínuas da coorte do estudo que é peso, altura, IMC e idade dos pacientes com CPPD e os controles foram comparados usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para distribuição normal e o teste t de Student. Graphpad Prism 6.0 (versão de teste) foi usado para análise estatística.

### Resultados

Perfis de miRNA derivados de LCR de pacientes com CPPD foram comparados com os controles. Dos setenta e seis miRNAs (Tabela Suplementar 1), dez deles foram regulados negativamente e quinze deles foram regulados positivamente (cut-off para mudança de dobra abaixo de 0,5 e acima de 2). Dois dos 10 miRNAs regulados negativamente, ou seja, miR-142-3p e miR-17-5p, foram significativamente alterados, enquanto nenhum dos miRNAs regulados positivamente mostrou uma diferen-

ça significativa ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2). A distribuição dos valores de miR-142-3p e miR-17-5p ao longo da coorte é indicada na Fig. 2A e 2B, respectivamente. miR-142-3p foi expresso aproximadamente quatro vezes menos que os controles. A expressão de miR-17-5p nos pacientes com CPPD diminuiu aproximadamente 5 vezes em comparação com os controles.

Os pacientes com CPPD foram comparados com os controles em relação aos fatores de viés relatados, que é IMC e idade (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre o IMC e a idade dos pacientes com CPPD ( $p > 0,05$ ). Dado que todos os indivíduos eram do sexo feminino e o mesmo tipo de agulha espinhal foi usado para cada gestante, o sexo e os efeitos do calibre da agulha espinhal não foram fatores de viés aplicáveis para este estudo. A EVA média dos pacientes com CPPD foi de 6,8 em 10.

### Discussão

Neste estudo, abordamos o papel dos miRNAs derivados do LCR na fisiopatologia da CPPD e identificamos dois miRNAs diferencialmente expressos no LCR que podem ser fatores de risco para a ocorrência de CPPD. Até onde sabemos, existem apenas dois estudos investigando a relação entre condições de dor e miRNAs derivados de LCR em humanos. Um deles foi realizado em pacientes com fibromialgia onde os perfis de miRNA dessas pacientes foram comparados com os perfis de miRNA de gestantes saudáveis e pacientes urológicas que receberam raquianestesia. Este estudo relatou nove miRNAs regulados negativamente, a saber, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-29a-3p, miR-99b-5p, miR-125b-5p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-195-5p, miR-223-3p, em pacientes com fibromialgia<sup>13</sup>. Em nosso estudo, esses nove miRNAs foram interrogados quanto à sua expressão diferencial no LCR de pacientes com CPPD; no entanto, não foram obtidos resultados significativos. Dado que a fibromialgia é uma condição de dor crônica, seus mecanismos moleculares podem diferir com condições de dor aguda, como CPPD.

No segundo estudo, miR-124 foi encontrado regulado negativamente no LCR de pacientes com dor de câncer ósseo em comparação com os pacientes sem câncer e história de dor crônica<sup>22,23</sup>. À luz de estudos em animais em que injeções intratecais de miR-124 mimetizam a dor do câncer ósseo, o miR-124 foi sugerido como um potencial analgésico para pacientes com dor de câncer. miR-124 foi incluído em nossa lista de miRNAs e não foi significativamente alterado em pacientes com CPPD.

Descobrimos que miR-142-3p e miR-17-5p foram regulados negativamente no LCR de pacientes com CPPD. Curiosamente, miR-142-3p também foi regulado negativamente no soro de pacientes com fibromialgia<sup>24</sup>. Os achados de miRNA derivados do LCR de pacientes com fibromialgia não se sobrepuseram aos nossos achados de miRNA no LCR de pacientes com CPPD; no entanto, uma sobreposição foi observada nos miRNAs derivados

do soro de pacientes com fibromialgia. A falta de miR-142-3p significativamente alterado no LCR de pacientes com FM pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra (10 pacientes com FM e 8 pacientes no grupo controle). O LCR e o soro são fluidos corporais distintos, mas os achados no soro às vezes podem ser estendidos ao LCR e vice-versa<sup>11</sup>. Além de seu suposto papel na fibromialgia, o miR-142-3p também pode estar envolvido na neuroinflamação durante a esclerose múltipla<sup>25</sup>.

O miR-142-3p desempenha um papel na inibição da diferenciação neuronal ao direcionar uma proteína de ligação ao RNA de fita dupla *Staufen1* (*STAU1*), que está envolvida na morfogênese neuronal e implicada na nocicepção com a virtude de sua expressão na raiz dorsal e trigêmeo gânglios radiculares (DRG) em ratos<sup>26</sup>. Em um modelo de camundongo de dor neuropática induzida por ligação do nervo espinhal (LNE), o miR-142-3p foi regulado negativamente no gânglio da raiz dorsal da LNE dos camundongos. De acordo com esta observação, a inibição da dor neuropática foi observada quando o miR-142-3p foi superexpresso<sup>27</sup>. Dadas nossas descobertas sobre a regulação negativa do miR-142-3p no LCR de pacientes com CPPD e sua regulação negativa nos estudos acima mencionados em pacientes com fibromialgia e modelos animais, são necessários mais estudos para dissecar o papel do miR-142-3p no processamento da dor.

O segundo miRNA diferencialmente expresso identificado em nosso estudo foi o miR-17-5p que promove a proliferação celular e funciona como um oncogene. miR-17-5p foi relatado com papéis na nocicepção recentemente. No sangue de pacientes com Síndrome de Fadiga Crônica (células natural killer), miR-17-5p foi regulado negativamente em comparação com controles não fatigados<sup>28</sup>. Em um modelo de rato de dor neuropática, miR-17-5p foi regulado positivamente nos neurônios DRG após lesão e inibição de alodinia mecânica melhorada de miR-17-5p<sup>29</sup>. Os canais de potássio foram identificados como um dos alvos do miR-17-5p e postula-se que o miR-17-5p pode mediar a nocicepção através da modulação dos canais de potássio. Dado os papéis preditivos do miR-17-5p no prognóstico do câncer e seus níveis de expressão profundos no carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão e câncer colorretal; miR-17-5p não é um marcador específico para CPPD<sup>30</sup>. Da mesma forma, miR-142-3p foi relatado como um potencial biomarcador diagnóstico para câncer colorretal e biomarcador prognóstico para câncer cervical<sup>31,32</sup>. Vários estudos usaram miRNAs derivados do LCR para interrogação de biomarcadores para diversas doenças. Baraniskin et al., identificaram os primeiros biomarcadores baseados no LCR para detecção de glioma comparando os perfis de miRNA derivados do LCR de pacientes com glioma (n = 10) e pacientes com vários distúrbios neurológicos (n = 10) como controle<sup>33</sup>. Eles descobriram que miR-15b e miR-21 são regulados positivamente nos pacientes com glioma e o biomarcador miR-21 foi confirmado por Shi et al. onde os autores

compararam os perfis de miRNA do LCR de pacientes com glioma (n = 70) e controles não tumorais (n = 25) e descobriram que o miR-21 é um indicador importante para o diagnóstico e prognóstico do glioma<sup>34</sup>. Galimberti et al. mostraram que o miR-125b pode ser usado como um biomarcador da doença de Alzheimer (DA) para soro e LCR comparando 22 pacientes com DA e trinta e seis controles de doenças neurológicas não inflamatórias<sup>21</sup>. Haghika et al. mostraram que os miRNAs derivados do LCR podem ser usados para diferenciar o curso da doença da Esclerose Múltipla (EM)<sup>12</sup>.

Semelhante aos estudos indicados acima, nossos achados implicam um papel para miR-142-3p e miR-17-5p no desenvolvimento de CPPD. Sua expressão diferencial sugere que esses miRNAs podem ser usados como biomarcadores para CPPD. miR-142-3p e miR-17-5p são reguladores validados da nocicepção, portanto, é provável que desempenhem papéis reguladores em como a variabilidade individual dos fenótipos de dor é determinada em nível molecular. Os miRNAs podem afetar a indução da dor direta ou indiretamente. O miR-142-3p foi mostrado como um mediador molecular chave da disfunção sináptica em pacientes com esclerose múltipla, interrompendo a homeostase do glutamato e está implicado em papéis na nocicepção em virtude de seu gene alvo que funciona nos neurônios DRG<sup>25</sup>. Níveis desregulados de miR-142-3p podem tornar os indivíduos mais suscetíveis ao desenvolvimento de CPPD devido à homeostase de glutamato interrompida semelhante às funções miR-142-3p, miR-17-5p nos neurônios DRG. Canais de potássio foram identificados como um dos alvos do miR-17-5p. A punção lombar cria um insulto tecidual agudo que pode causar a liberação de mediadores levando à despolarização da membrana celular, incluindo íons de potássio. Esses sinais são transmitidos para a medula espinhal através dos neurônios DRG. Dado seu papel nos neurônios DRG, é possível que níveis desregulados de miR-142-3p e miR-17-5p possam causar sensibilidade à dor. Cada vez mais evidências sugerem que um fenótipo de dor específico para um indivíduo pode ser devido à regulação diferencial da expressão gênica, incluindo os achados apresentados neste estudo. Nossos achados aguardam confirmação com coortes maiores e abordagens mecanicistas.

Os papéis do miRNA em condições de dor crônica foram elaborados com estudos recentes. MiRNAs derivados do sangue e miRNAs derivados do LCR foram identificados em pacientes com enxaqueca e pacientes com fibromialgia, respectivamente<sup>13</sup>. No entanto, pouco se sabe sobre as condições de dor aguda, como a CPPD. Tem sido relatado que em casos de punção inadvertida da dura-máter, apenas metade dos pacientes desenvolve CPPD. Há dados conflitantes sobre os fatores de risco que afetam a incidência de CPPD. Relatos de correlação negativa entre aumento de IMC e incidência de CPPD são confrontados por estudos que indicam a falta de tal correlação<sup>5</sup>. Postula-se que a perda de volume do LCR devido ao vazamento de LCR no local da

punção, portanto, a diminuição da pressão do LCR, cria uma tração para baixo nas estruturas cerebrais sensíveis à dor, causando CPPD. Por outro lado, estudos recentes mostraram pressão de abertura do LCR semelhante entre CPPD e controles<sup>35,36</sup>. A história de cefaleia foi considerada um fator predisponente, mas foi demonstrado que a enxaqueca não era um fator de risco para CPPD<sup>37</sup>. Esses resultados conflitantes podem ser devidos aos fatores moleculares que predisõem à CPPD, que foram negligenciados. Aqui mostramos pela primeira vez que os miRNAs podem influenciar a ocorrência de CPPD. Em nosso estudo, a raqui-anestesia foi realizada com o mesmo tipo de agulha espinhal para cada gestante pelo mesmo anestesologista. O IMC e a idade do grupo CPPD e do grupo controle não apresentaram diferença significativa. Todos os sujeitos eram do sexo feminino e os sujeitos com histórico de cefaleia e doenças neurológicas não foram aceitos no estudo. Portanto, todos os fatores de viés para a ocorrência de CPPD foram descartados, o que destacou o papel dos miRNAs derivados do LCR que podem predispor à CPPD.

Os achados sobre miRNAs derivados de LCR e condições de dor têm sido escassos devido à dificuldade de obter amostras de LCR de pacientes com condições de dor e devido à falta de um grupo de controle confiável que seja o LCR obtido de indivíduos ASA I. Por razões éticas óbvias, não é possível coletar LCR de indivíduos saudáveis. A maioria dos estudos baseados no LCR utiliza amostras de LCR de pacientes com doenças que não são pertinentes à sua doença de interesse. Por esse motivo, as gestantes submetidas à raqui-anestesia parecem ser a melhor opção para a obtenção de amostras de LCR de indivíduos saudáveis. As características do LCR de gestantes ASA I são as que mais se aproximam das características do LCR obtido de indivíduos saudáveis. Portanto, nossos achados podem ser estendidos aos outros estudos como um grupo de controle cruzado.

A incidência de CPPD tem sido relatada como sendo maior em pacientes obstétricas<sup>38</sup>. Vários fatores aumentam a incidência de CPPD e vários estudos têm demonstrado que a idade jovem e o sexo feminino estão entre os fatores de risco<sup>39</sup>. Os estudos que investigam a incidência de CPPD em gestantes têm tamanho amostral variando de 100 a 250.000<sup>40,41</sup>. A incidência de CPPD em nosso estudo é maior do que a relatada na literatura para agulhas atraumáticas em pacientes obstétricas. No entanto, o número de indivíduos em nosso estudo é baixo ( $n = 24$ ) para inferir uma incidência de CPPD. Em termos de tamanho da amostra, nosso desenho de estudo é comparável aos relatórios sobre biomarcadores derivados do LCR, onde o número de indivíduos variou de 10 a 25<sup>21,33</sup>. Os biomarcadores identificados nesses estudos com tamanho de amostra pequeno foram então confirmados com um tamanho de amostra maior<sup>34</sup>.

Uma limitação deste estudo é o pequeno tamanho da amostra, portanto, os biomarcadores CPPD putativos identificados com este trabalho aguardam confirmação adicional com coortes maiores e abordagens mecanicis-

tas. Estudos futuros devem replicar a configuração atual, incluindo uma biblioteca de miRNA mais abrangente.

Em conclusão, mostramos pela primeira vez que a regulação negativa de miR-142-3p e miR-17-5p pode predispor mulheres grávidas a CPPD sob raqui-anestesia. Ambos os biomarcadores de miRNA candidatos têm papéis nas condições de dor ou no processamento da dor. No entanto, quais genes são direcionados pelo efeito mediado por miR-142-3p e miR-17-5p no CPPD ainda não foi elucidado.

## Financiamento

Este estudo foi parcialmente financiado por uma bolsa (TCD-2017-7076) da Unidade de Coordenação de Projetos de Pesquisa Científica da Universidade Erciyes (ERU-BAP).

## Conflitos de interesse

O autor declara que não há conflito de interesse.

## Aprovação ética

Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo participantes humanos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de ética médica (2017/565) e com a declaração de Helsinque de 1964 e suas alterações posteriores ou padrões éticos comparáveis. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo.

## Agradecimentos

Gostaria de expressar minha gratidão ao professor Fatih Ugur da Universidade de Erciyes, Faculdade de Medicina, Departamento de Anestesiologia e Reanimação (ugurf@erciyes.edu.tr) por fornecer amostras de líquido cefalorraquidiano.

## Apêndice A. Dados Suplementares

O material complementar relacionado a este artigo pode ser encontrado, na versão online, em doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2021.08.016>.

## Referências

1. Plewa MC, Dulebohn SC. Postdural Puncture Headache (PDPH). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017.
2. Society HCSotIH. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. 2004/02/26 ed2004. 9-160 p.
3. Turnbull DK, Shepherd DB. Post-dural puncture headache: pathogenesis, prevention and treatment. *British journal of anaesthesia*. 2003;91(5):718-29.
4. Schmittner MD, Terboven T, Dluzak M, Janke A, Limmer ME, Weiss C, et al. High incidence of post-dural puncture

- headache in patients with spinal saddle block induced with Quincke needles for anorectal surgery: a randomized clinical trial. *International journal of colorectal disease*. 2010;25(6):775-81.
5. Kwak KH. Postdural puncture headache. *Korean journal of anesthesiology*. 2017;70(2):136-43.
  6. Nair AS, Rayani BK. Sphenopalatine ganglion block for relieving postdural puncture headache: technique and mechanism of action of block with a narrative review of efficacy. *Korean J Pain*. 2017;30(2):93-7.
  7. Clark JW, Solomon GD, Senanayake PD, Gallagher C. Substance P concentration and history of headache in relation to postlumbar puncture headache: towards prevention. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1996;60(6):681-3.
  8. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. 2006;15 Spec No 1:R17-29.
  9. Sengupta JN, Pochiraju S, Kannampalli P, Bruckert M, Adya S, Yadav P, et al. MicroRNA-mediated GABA A $\alpha$ -1 receptor subunit down-regulation in adult spinal cord following neonatal cystitis-induced chronic visceral pain in rats. *Pain*. 2013;154(1):59-70.
  10. Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine*. 2011;9:9.
  11. Burgos K, Malenica I, Metpally R, Courtright A, Rakela B, Beach T, et al. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS one*. 2014;9(5):e94839.
  12. Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Decard BF, et al. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*. 2012;79(22):2166-70.
  13. Bjersing JL, Lundborg C, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. Profile of cerebrospinal microRNAs in fibromyalgia. *PLoS one*. 2013;8(10):e78762.
  14. Doyle DJ GE. American Society of Anesthesiologists Classification (ASA Class) Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
  15. Burgos KL, Javaherian A, Bompreszi R, Ghaffari L, Rhodes S, Courtright A, et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. *RNA (New York, NY)*. 2013;19(5):712-22.
  16. Holm A, Bang-Berthelsen CH, Knudsen S, Modvig S, Kornum BR, Gammeltoft S, et al. MiRNA profiles in cerebrospinal fluid from patients with central hypersomnias. *Journal of the neurological sciences*. 2014;347(1-2):199-204.
  17. Gallego JA, Gordon ML, Claycomb K, Bhatt M, Lencz T, Malhotra AK. In vivo microRNA detection and quantitation in cerebrospinal fluid. *Journal of molecular neuroscience* : MN. 2012;47(2):243-8.
  18. Murray MJ, Bell E, Raby KL, Rijlaarsdam MA, Gillis AJ, Looijenga LH, et al. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. *British journal of cancer*. 2016;114(2):151-62.
  19. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*. 2011;117(11):3140-6.
  20. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*. 2004;64(15):5245-50.
  21. Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Ghezzi L, Cioffi SM, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD. 2014;42(4):1261-7.
  22. Elramah S, Lopez-Gonzalez MJ, Bastide M, Dixmerias F, Roca-Lapirot O, Wielanek-Bachelet AC, et al. Spinal miRNA-124 regulates synaptopodin and nociception in an animal model of bone cancer pain. *Scientific reports*. 2017;7(1):10949.
  23. Hou B, Cui X, Liu Y, Zhang W, Liu M, Sun YE, et al. Positive feedback regulation between microRNA-132 and CREB in spinal cord contributes to bone cancer pain in mice. *European journal of pain (London, England)*. 2016;20(8):1299-308.
  24. Bjersing JL, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. Profile of circulating microRNAs in fibromyalgia and their relation to symptom severity: an exploratory study. *Rheumatology international*. 2015;35(4):635-42.
  25. Mandolesi G, De Vito F, Musella A, Gentile A, Bullitta S, Fresegna D, et al. miR-142-3p Is a Key Regulator of IL-1 $\beta$ -Dependent Synaptopathy in Neuroinflammation. *J Neurosci*. 2017;37(3):546-61.
  26. Oh Y, Park J, Kim J-I, Chang M-Y, Lee S-H, Cho Y-H, et al. Lin28B and miR-142-3p regulate neuronal differentiation by modulating Staufen1 expression. *Cell Death and Differentiation*. 2018;25(2):432-43.
  27. Zhang Y, Mou J, Cao L, Zhen S, Huang H, Bao H. MicroRNA-142-3p relieves neuropathic pain by targeting high mobility group box 1. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(1):501-10.
  28. Brenu EW, Ashton KJ, van Driel M, Staines DR, Peterson D, Atkinson GM, et al. Cytotoxic lymphocyte microRNAs as prospective biomarkers for Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *Journal of affective disorders*. 2012;141(2-3):261-9.
  29. Sakai A, Saitow F, Maruyama M, Miyake N, Miyake K, Shimada T, et al. MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain. *Nature communications*. 2017;8:16079.
  30. Kong W, Cheng Y, Liang H, Chen Q, Xiao C, Li K, et al. Prognostic value of miR-17-5p in cancers: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:3541-9.
  31. Gao W, Pang D, Yu S. Serum level of miR-142-3p predicts prognostic outcome for colorectal cancer following curative resection. *The Journal of international medical research*. 2019;300060519834815.
  32. Li M, Li BY, Xia H, Jiang LL. Expression of microRNA-142-3p in cervical cancer and its correlation with prognosis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(10):2346-50.
  33. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Maghnoouj A, Zollner H, Schmiegel W, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro-oncology*. 2012;14(1):29-33.
  34. Shi R, Wang PY, Li XY, Chen JX, Li Y, Zhang XZ, et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget*. 2015;6(29):26971-81.
  35. Wang YF, Fuh JL, Lirng JF, Chen SP, Hseu SS, Wu JC, et al. Cerebrospinal fluid leakage and headache after lumbar puncture: a prospective non-invasive imaging study. *Brain* : a journal of neurology. 2015;138(Pt 6):1492-8.

36. Ugur F, Yucel D. A novel method to replace classical spinal manometry: A non-inferiority study. *Biomedical Research (India)*. 2017;28(20):9148-53.
37. van Oosterhout WP, van der Plas AA, van Zwet EW, Zielman R, Ferrari MD, Terwindt GM. Postdural puncture headache in migraineurs and nonheadache subjects: a prospective study. *Neurology*. 2013;80(10):941-8.
38. Kuczkowski KM. Post-dural puncture headache in the obstetric patient: an old problem. New solutions. *Minerva Anesthesiol*. 2004;70(12):823-30.
39. Amorim JA, Gomes de Barros MV, Valença MM. Post-dural (post-lumbar) puncture headache: risk factors and clinical features. *Cephalalgia*. 2012;32(12):916-23.
40. D'Angelo R, Smiley RM, Riley ET, Segal S. Serious complications related to obstetric anesthesia: the serious complication repository project of the Society for Obstetric Anesthesia and Perinatology. *Anesthesiology*. 2014;120(6):1505-12.
41. Maranhao B, Liu M, Palanisamy A, Monks DT, Singh PM. The association between post-dural puncture headache and needle type during spinal anaesthesia: a systematic review and network meta-analysis. *Anaesthesia*. 2020.