UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FABIANNA PANSANI

Expressão dos microRNAs miR-126 e miR-873 e dos genes CASPASE-8 e C-FLIP em neuroesferas em linhagens de Glioblastoma U-343 submetidas ao tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

RIBEIRÃO PRETO
2019

FABIANNA PANSANI

Expressão dos microRNAs miR-126 e miR-873 e dos genes CASPASE-8 e C-FLIP em neuroesferas em linhagens de Glioblastoma U-343 submetidas ao tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Profª. Drª. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pansani, Fabianna

Expressão dos microRNAs miR-126 e miR-873 e dos genes CASPASE-8 e C-FLIP em neuroesferas em linhagens de Glioblastoma U-343 submetidas ao tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

64p.: il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Profª. Drª. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior

1. Glioblastoma 2. Apoptose 3. miRNA 4. Gene

FOLHA DE APROVAÇÃO

PANSANI, Fabianna

Expressão dos microRNAs miR-126 e miR-873 e dos genes CASPASE-8 e C-FLIP em neuroesferas em linhagens de Glioblastoma U-343 submetidas ao tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em: _____/_____/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Luis Antonio Pansani e Shirlei de Fátima Marques Pansani*** *que sempre me estimularam ao crescimento profissional e me ensinaram os verdadeiros valores da vida.*

As minhas irmãs, ***Giovanna Pansani e Vivianne Pansani*** *pelo companheirismo e admiração que sempre me demonstraram.*

Esses estiveram comigo durante todos os momentos, de vitórias e derrotas, de alegrias e tristezas, sempre com uma palavra de conforto. Meu eterno agradecimento a vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **Profª. Drª. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli**, pela confiança ao me receber quando cheguei na FMRP-USP para realizar meu mestrado, e desde então sempre contribuiu no meu crescimento profissional e pessoal, com muitos ensinamentos, cedendo espaço no Laboratório de Biologia Molecular onde obtive todo meu aprendizado, pela amizade, incentivo e companheirismo. Sempre com palavras de conforto em momentos que mais precisei. A você, Professora, meu eterno agradecimento e admiração.*

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, por me conduzir corretamente durante esta caminhada e por mais esta benção alcançada.*

*A todos os **Pacientes** pela colaboração em participar deste estudo, a contribuição de vocês foi imprescindível.*

*Ao **Tiago Amador Mascia**, por toda paciência, carinho e atenção ao meu lado. Me incentivando e apoiando.*

*Ao **Profº Drº Carlos Gilberto Carlotti Junior**, meu co-orientador nesta tese, sua paixão pela pesquisa dá grande entusiasmo para quem o acompanha. Obrigada pelos ensinamentos e por agregar no meu conhecimento.*

*A **Profª Drª Fernanda Maris Peria**, professora e minha orientadora do mestrado, que me ensinou muito sobre oncologia e pesquisa. Sempre com muita calma, confiando em mim e permitindo meu crescimento. Agradeço pela imensa contribuição na minha vida profissional.*

*Ao **Fermino Sanches Lizarte Neto,** que sempre foi solícito e compreensível nos momentos pertinentes. Obrigada pelos ensinamentos.*

*A **Letícia Passi Turra,** aluna do Laboratório de Biologia Molecular, pela parceria na realização dos resultados do trabalho, eficiência e disposição para ajudar.*

*A **Luana Antonio e Renata Sichieri** pelo carinho que sempre recebi, pela disponibilidade e ensinamentos.*

*À **Juliana Pischiottin da Silva Moraes** (Secretária do Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica da FMRP-USP) pela sua simpatia, profissionalismo e a disposição em ajudar.*

*A todos do **Departamento de Cirurgia e Anatomia**, pelos cafés e conversas partilhados todos os dias em que estive na FMRP-USP.*

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade.”

(Walt Disney)

RESUMO

PANSANI, F. **Expressão dos microRNAs miR-126 e miR-873 e dos genes CASPASE-8 e C-FLIP em neuroesferas em linhagens de Glioblastoma U-343 submetidas ao tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida.** 2019. 64f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: O glioblastoma é considerado incurável, mesmo com a combinação de terapias (quimio e radioterapia), e ressecção cirúrgica, são necessárias novas abordagens terapêuticas para melhorar o prognóstico de pacientes com glioblastoma. Nas últimas décadas tem se desatacado na literatura pesquisas com foco em biologia molecular associada aos tumores cerebrais. Para o nosso estudo selecionamos o mecanismo de morte celular programada, a apoptose, assim dois microRNAs que atuam como possíveis regulados de genes pró e anti-apoptóticos. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes CASPASE-8 e C-FLIP e dos microRNAs miR-126-5p e miR-873-5P em neuroesferas (NE) e células aderidas (CA) em linhagens celulares U343 submetidas ao tratamento com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI) isolados e em associação (TMZ+RI). **Material e métodos:** A linhagem celular U343 foi submetida aos tratamentos com TMZ, RI e TMZ+RI. A verificação da expressão dos genes e miRNAs foi realizada utilizando o método de PCR em tempo real. **Resultados** e **Conclusões:** o gene CASPASE-8 apresentou aumento dos níveis de expressão nas CA no grupo tratado com RI quando comparadas aos demais grupos. O gene C-FLIP apresentou aumento dos níveis de expressão nas CA e NE no grupo tratado com RI quando comparadas aos demais grupos. O miR-126 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA quando expostos a TMZ isolada quando comparadas aos demais grupos. O miR-873 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA nos grupos TMZ e TMZ+RI quando comparadas aos demais grupos.

Palavras-chave: Glioblastoma, Apoptose, miRNA, Gene

ABSTRACT

PANSANI, F. **Expression of the miR-126 and miR-873 microRNAs and of the CASPASE-8 and C-FLIP genes in neurospheres in U-343 Glioblastoma lines undergoing treatment with Ionizing Radiation and Temozolomide.** 2019. 64f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Introduction: Glioblastoma is considered incurable, even with the combination of therapies (chemo and radiotherapy), and surgical resection, new therapeutic approaches are needed to improve the prognosis of patients with glioblastoma. In recent decades, research has focused on molecular biology associated with brain tumors. For our study we selected the mechanism of programmed cell death, apoptosis, thus two microRNAs that act as possible regulated pro and anti-apoptotic genes. **Objectives:** This study aims to evaluate the expression of the following genes CASPASE-8 and C-FLIP and microRNAs miR-126-5p and miR-873-5p in adhered cells (AC) and neurospheres (NS) from cell line U343 which were submitted to temozolomide (TMZ) and ionizing radiation (IR), isolated and associated (TMZ + IR). **Methods:** The cell line U343 were treated with TMZ, IR and TMZ+IR. The analysis of gene expression and miRNAs was performed using the PCR in real time. **Results** and Conclusions: The CASPASE-8 gene showed increased levels of expression in CA in the group treated with IR when compared to the other groups. The C-FLIP gene showed increased levels of expression in the CA and NE in the group treated with IR when compared to the other groups. The miR-126 presented increased expression levels in CA when exposed to TMZ alone when compared to the other groups. The miR-873 presented increased expression levels in the CA in the TMZ and TMZ + RI groups when compared to the other groups.

Keywords: Glioblastoma, Apoptosis, miRNA, Gene.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AKT ou PKB	Protein Kinase B
AMPc1	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	20ng/ml, Gibco®
CA	Células Aderidas
cDNA	DNA complementar
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CT	Células-tronco
CTC	Células-tronco do Câncer
CTN	Células-tronco Neurais
DEPC	Dimetil Pirocarbonato
DMEN/F12 Gibco®	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12
DMEN/F12, Gibco®	Modified Eagle's Medium/F12
DTIC	5-(3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida
EGF	20ng/ml, Gibco®
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FGF	Fator de Crescimento Fibroblastos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GBM	Glioblastoma Multiforme
IDH1/2	Isocitrate Dehydrogenase
IL-6	Interleucina
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MET	gene (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)

MGMT	O6-methylguanine-DNA Methyltransferase miRNA ou miR MicroRNAs
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NE	Neuroesferas
NK-κB	Factor nuclear kappa B
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PI3K	Fosfatidil-Inositol-3-Quinase
PKB	Protein kinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
QT	Quimioterapia
RI	Radiação Ionizante
RNAm	RNAmensageiro
RQ-PCR	PCR quantitativa em tempo real
RT	Radioterapia
SFB	Soro Fetal Bovino
SG	Sobrevida global
siRNA	Small interfering
SNC	Sistema Nervoso Central
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer
TGF-β	Transforming growth factor-β
TMZ	Temozolomida
TP53	Tumor protein p53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma 17

Figura 2 - Percentagem de sobrevivência de pacientes com GBM. 19

Figura 3 - Distribuição de cérebro primário e outros gliomas do Sistema Nervoso Central por subtipos de histologia. Estatística de 2010-2014.....20

Figura 4 - miRNAs regulam as principais vias de apoptose. 26

Figura 5 - MiRNAs regulam apoptose, autofagia e necroptose 27

Figura 6 - Cluster hierárquico não supervisionado de tumores e linhas celulares....29

Figura 7 - A fosforilação dependente de quinase Src em Tyr380 refaz a funcionalidade Caspase-8 em células cancerosas.....50

Figura 8 - Papel da Caspase-8 na terapia do câncer. 51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão do gene CASPASE-8 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas. 43

Gráfico 2 - Expressão do gene C-FLIP na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas. 44

Gráfico 3 - Expressão do microRNA-126 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas. 45

Gráfico 4 - Expressão do microRNA-873 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas. 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Tumores Cerebrais 17
1.1.1 Glioblastoma 18
1.1.2 Histopatologia 20
1.1.3 Alterações citogenéticas 21
1.1.4 Incidência 22
1.2 Biologia Molecular 22
1.2.1 Alterações Moleculares no Glioblastoma 22
1.3 Apoptose e Glioblastoma 23
1.4 MicroRNAs 24
1.5 MicroRNAs e Tumores Cerebrais 25
1.5.1 MicroRNAs relacionados com apoptose em Tumores Cerebrais 25
1.5.2 miR- 126 27
1.5.3 miR-873 28
1.6 Células Tronco, Tumor Cerebral e microRNAs 28

2 JUSTIFICATIVA 32

3 OBJETIVO 34

4 MATERIAIS E MÉTODOS 36
4.1 Grupos experimentais 36
4.1.1 Grupo controle 36
4.1.2 Grupo tratado com temozolamida 36
4.1.3 Grupo tratado com radiação ionizante 36
4.1.4 Grupo tratado com radiação ionizante associado a temozolamida 37
4.2 Cultivo Celular 37
4.2.1 Linhagens celulares 37
4.2.2 Contagem de células em câmera de Neubauer 38
4.3 Estudo de expressão gênica e de microRNAs 39
4.3.1 Síntese do cDNA dos microRNAs: miR-126-5p e miR-873-5p 39
4.3.2 Síntese do cDNA dos genes C-FLIP e CASPASE-8 40
4.3.3 PCR em tempo real 40

4.4 Análise Estatística 41

5 RESULTADOS.....43

5.1 Expressão do gene CASPASE-8 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante, isolados e associados 43

5.2 Expressão do gene C-FLIP na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados 44

5.3 Expressão do microRNA-126 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados 45

5.4 Expressão do microRNA-873 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados 46

6 DISCUSSÃO 48

7 CONCLUSÕES 54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

INTRODUÇÃO

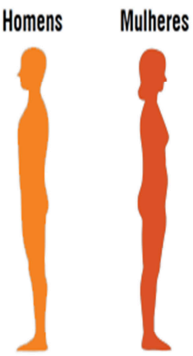
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores Cerebrais

Os tumores cerebrais primários encontram-se todos localizados no sistema nervoso central (SNC) (LOUIS, et al. 2007; LOUIS, et al. 2016). Tumores do sistema nervoso central demonstram uma evolução maligna ou incerta, apresentando diferentes causas, fatores prognóstico e tratamentos (DARLIX, et al. 2017; LOUIS, et al. 2007; LOUIS, et al. 2016).

Segundo as Estimativas do Inca 2018, no Brasil, são previstos 5.810 casos novos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Estes valores correspondem a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres, correspondendo à décima e à nona posições, respectivamente (INCA, 2018).

Localização primária	Casos	%	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%



* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA 2018)

Em 2007 foi apresentada Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde (OMS), nesta agruparam todos os tumores com um fenótipo astrocítico separadamente daqueles com um fenótipo oligodendroglial, sem levar em consideração se os tumores astrocíticos eram clinicamente semelhantes ou diferentes (LOUIS, et al. 2007). Em uma reunião

realizada em 2014, houve uma atualização da Classificação da OMS de 2016, no qual diagnóstico deixa de ser baseado inteiramente na microscopia, incorporando parâmetros moleculares na classificação das entidades tumorais do SNC, se baseando em características histopatológicas (ALDAPE, et al. 2015; LOUIS, et al. 2016).

No entanto, considerando o elevado número de subtipos histológicos; que podem ser divididos em duas categorias principais dependendo do grau de invasão (gliomas com infiltração difusa do parênquima cerebral são denominados gliomas difusos, para serem contrastados com gliomas com comportamento de crescimento mais “circunscrito”); cada subtipo pode ser considerado um tumor raro (ALDAPE, et al. 2015). Por suas altas taxas morbidade e mortalidade, esses tumores considerados um problema na saúde pública (DARLIX, et al. 2017; DeANGELIS 2001; OSTROM, et al. 2015).

Segundo a OMS, para classificação dos tumores do sistema nervoso central, os gliomas difusos que possuem capacidade de infiltrar no parênquima cerebral normal circundante, são divididos em três graus: os graus II, III e IV (GBM) da OMS (ALDAPE, et al. 2015; SAHM, et al. 2012), são classificados com base no tipo de célula de origem e características moleculares (LOUIS, et al. 2016). Devido a sua natureza infiltrativa, mesmo após a ressecção total, apresentam recorrência (ALDAPE, et al. 2015; SAHM, et al. 2012). Uma característica dos gliomas difusos é de que tumores de baixo grau (grau II), com o tempo não apresentam apenas recorrência, mas também possuem tendência de progredir para gliomas de grau III (anaplásicos) e eventualmente grau IV (glioblastoma), apresentando mau prognóstico e evolução rápida (ALDAPE, et al. 2015).

Os gliomas representam um terço de todos os tumores cerebrais e do sistema nervoso central, e representam também 80% dos tumores primários malignos do SNC (DARLIX, et al. 2017; OSTROM, et al. 2017; WOHRER, et al. 2009).

1.1.1 Glioblastoma

Apesar dos avanços sobre as terapias aplicadas em pacientes com GBM, sua sobrevida média continua baixa, aproximadamente 10% dos pacientes sobrevivem cinco anos (SEYSTAHL, et al. 2016).

O GBM é considerado incurável e com alta agressividade, mesmo com a combinação de terapias, como ressecção cirúrgica máxima segura, seguida de radioterapia adjuvante (RT) com tratamento simultâneo e temozolomida adjuvante (TMZ) (STUPP, et al. 2009). Quimiorradiação seguida de Temozolomida adjuvante continua sendo a terapia padrão para GBM recém-diagnosticado (LIEBERMAN, 2017).

Pacientes com diagnóstico de GBM tratados com Bevacizumab possuem sobrevida média de 8-9 meses (MCNEILL, et al. 2015). Embora a adição de bevacizumab à quimiorradiação e temozolomida adjuvante não tenha prolongado a sobrevida global, o bevacizumab ajuda a melhorar os efeitos colaterais causados pela radiação (LIEBERMAN, 2017).

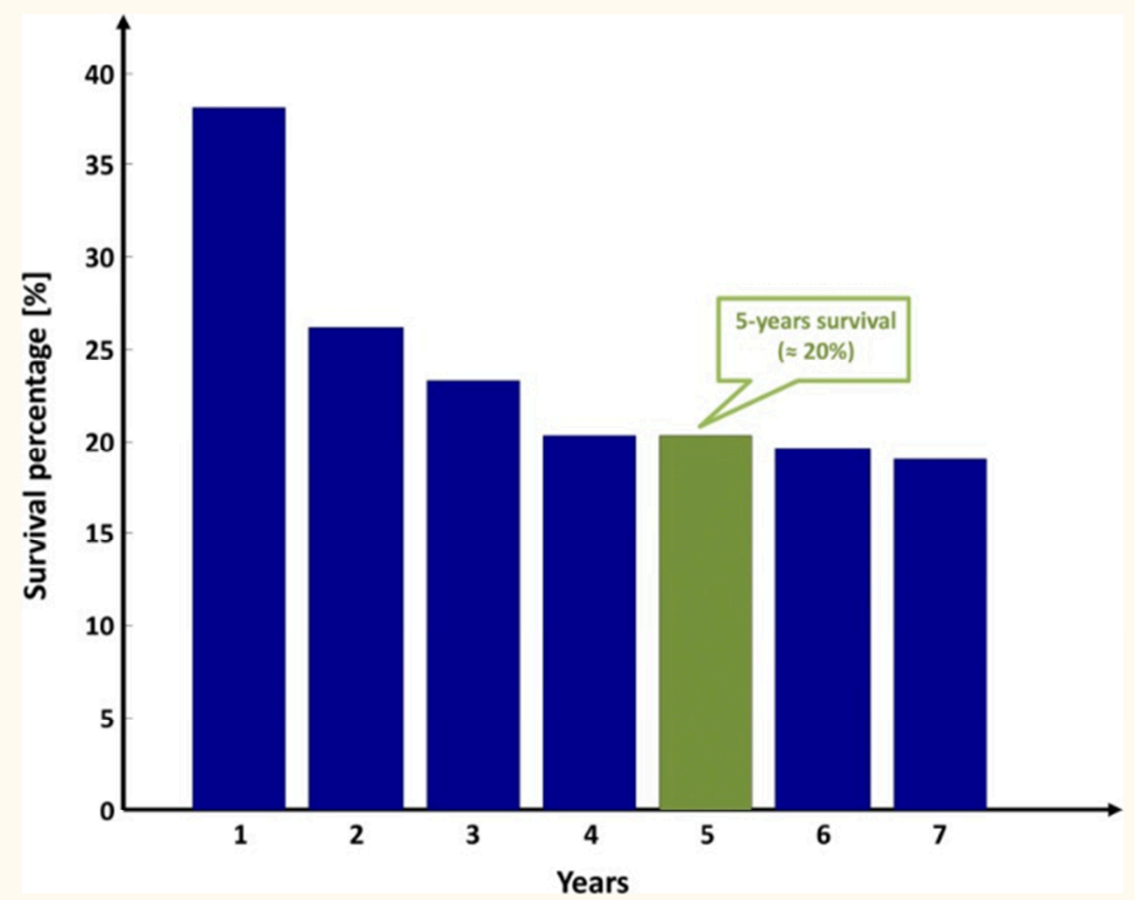


Figura 2 - Percentagem de sobrevivência de pacientes com GBM. A figura mostra a porcentagem de sobrevivência pós-diagnóstico relacionada a 161 pacientes com GBM únicos, cujos dados clínicos foram recuperados do repositório do TCGA em 2017, considerando um acompanhamento de cerca de sete anos. A porcentagem de sobreviventes em cinco anos após o diagnóstico é destacada. Adaptada de FISCON, et al. 2018.

O diagnóstico de GBM apresenta alguns critérios histológicos, como hipercelularidade, atipias nucleares e atividade mitótica, adicionalmente uma proliferação microvascular e/ou necrose tumoral (ALDAPE, et al. 2015).

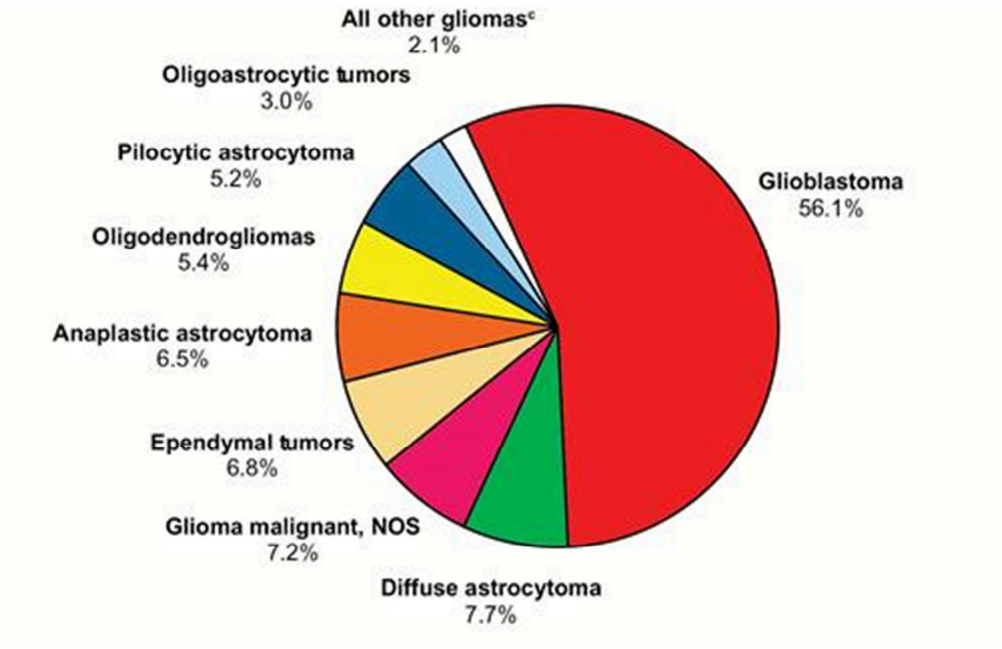


Figura 3 - Distribuição de cérebro primário e outros gliomas do Sistema Nervoso Central por subtipos de histologia. Estatística de 2010-2014. Adaptado de OSTROM, et al. 2017.

Muitos laboratórios e pesquisadores estão procurando novas abordagens terapêuticas para melhorar o prognóstico de pacientes com glioblastoma (DUNN, et al. 2012).

1.1.2 Histopatologia

Gliomas difusos ocorrem com maior frequência em adultos e são tumores cerebrais intrínsecos mais comuns, podendo ser de progressão clínica lenta em pacientes com tumores grau II assim como podem apresentar a média de sobrevida muito baixa em pacientes com tumores grau IV (GBM) de 12-18 meses (ALDAPE, et al. 2015).

Os gliomas grau II ou III são divididos em: astrocitoma /astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma/oligodendroglioma anaplásico e oligoastrocitoma/oligoastrocitoma anaplásico (ALDAPE, et al. 2015). No entanto, glioma difuso mais comum, é o glioma

grau IV, o Glioblastoma, representando 45-50% de todos os tumores cerebrais primários (DUNN, et al. 2012; LOUIS, et al. 2007; THAKKAR, et al. 2014). Quando ocorre progressão de um glioma já existente, grau II ou III, o GBM é menos comum e são denominados “GBMs secundários” (OHGAKI, et al. 2013).

1.1.3 Alterações citogenéticas

A mutação do gene isocitrato desidrogenase (IDH) está presente em 80% do GBM secundário e apenas 5% do GBM primário, considerada uma das primeiras e possivelmente iniciando a formação do tumor. Trata-se de importante alteração utilizada no diagnóstico entre o GBM primário e secundário (HARTMANN, et al. 2010; LIEBERMAN, 2017). Sua presença pode demonstrar um melhor prognóstico nos pacientes (LIEBERMAN, 2017).

De 40-50% de pacientes diagnosticados com GBM têm amplificação do gene EGFR, essa amplificação parecem se correlacionar com pior resultado de sobrevida (LIEBERMAN, 2017).

O gene O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) atua no reparo de DNA de agentes O06-alquilantes, foi estabelecido como um biomarcador preditivo para benefício da TMZ (Hegi et al., 2005; OLAR, et al. 2014). Pacientes com diagnóstico de GBM que apresentam a metilação do promotor MGMT (presente em aproximadamente 50%) recém-diagnosticados e tratados com quimiorradiação e temozolomida apresentam maior sobrevida (ALDAPE, et al. 2015; OLAR, et al. 2014).

Em pacientes idosos diagnosticados com glioblastoma e com metilação do promotor MGMT preconiza-se o tratamento com TMZ com ou sem radioterapia; e essa metilação demonstra ser um biomarcador predito para pacientes com idade superior de 65-70 anos (ALDAPE, et al. 2015; MALMSTROM, et al. 2012; WELLER,et al. 2014; WICK, et al. 2012). Já o padrão de tratamento para pacientes idosos com glioblastoma recém-diagnosticado sem metilação do promotor MGMT ou status de MGMT desconhecido é somente a radioterapia (KEIME-GUIBERT et al., 2007).

Pacientes mais jovens com tumores que demonstram hipermetilação de sítios CpG no genoma, normalmente tem subtipo pro-neural e têm prognóstico normalmente favorável (ALDAPE, et al. 2015).

Mesmo com muitos estudos e ensaios clínicos, identificar uma terapia eficaz é difícil devido a falta de controle, viés de seleção, número pequeno de amostras e heterogeneidade da doença (WELLER et al., 2013; WELLER et al., 2014).

1.1.4 Incidência

Nos EUA cerca de 70.000 diagnóstico são feitos anualmente. Sendo o glioblastoma o mais frequente, com incidência de 3-4/100.000 (MCNEILL, et al. 2015). A maioria dos diagnósticos são feitos em pacientes idosos, na quinta ou sexta década de vida quando GBM primário; em GBM secundário ocorre em pacientes mais jovens, antes dos 45 anos de idade (ALDAPE, et al. 2015; SEYSTAHL, et al. 2016).

Nos EUA, a sobrevida global mediana em estudos com sua base populacional, foi de 8,1 meses no período de 2000 a 2003, e 9,7 meses de 2005 a 2008 (JOHNSON e O'NEILL, 2012).

A sobrevida global média aumenta para 14,6 meses com a adição da TMZ durante e após a radioterapia em comparação com a radioterapia isolada com capacidade de diferenciar os efeitos da terapia e progressão do tumor recentemente diagnosticados, a neuroimagem está sendo uma abordagem inovadora (LIEBERMAN, 2017). Através de vários ensaios clínicos e suas avaliações, terapias direcionadas molecularmente e terapia personalizada baseada no perfil molecular de tumores individuais estão sendo estudados (LIEBERMAN, 2017).

1.2 Biologia Molecular

1.2.1 Alterações Moleculares no Glioblastoma

Devido a alta agressividade tumoral do glioblastoma, novas estratégias terapêuticas mais eficazes são necessárias. Estudos sobre a genética molecular do GBM estão em andamento para entender as vias moleculares que medeiam a resistência a imunoterapia e entender a sensibilidade e resistência das moléculas que estão presentes nos teste clínicos translacionais (DUNN, et al. 2012; LIEBERMAN, 2017; STUPACK, 2013).

A expressão da CASPASE-8 no GBM é frequentemente aumentada (STUPACK, 2013; VERHAAK, et al. 2010). Fianco e colaboradores, em seus estudos demonstraram que a CASPASE-8 pode sustentar a transformação neoplásica in vitro e o crescimento tumoral in vivo, promovendo a atividade do NF-kB e auxiliando na produção de citocinas e da neoangiogênese (FIANCO, et al. 2016; FIANCO, et al. 2017).

Já o silenciamento da CASPASE-8 pode sensibilizar as células cancerígenas com o uso na TMZ no tratamento (FIANCO, et al. 2016; FIANCO, et al. 2017).

A conexão entre os receptores TRAIL e ativação das CAPASES e c-FLIP está presente nas duas formas presentes no GBM. A proteína FLIP curta (28 kDa) e a proteína FLIPL longa (55 kDa), ambas são derivadas de splicing alternativo do mesmo transcrito primário c-FLIP. Elas possuem função de bloquear a ativação da CASPASE-8, no qual as FLIPS possuem funções antiapoptóticas e a FLIPL possui função pró e antiapoptóticas (PANNER, et al. 2005).

1.3 Apoptose e Glioblastoma

Quimioradioterapia tem como objetivo eliminar as células cancerígenas que provoca danos no DNA, ocasionando assim a morte celular (FIANCO, et al. 2018).

A apoptose é uma das principais vias de morte celular, e quando ela não ocorre, sugere que sua perda de expressão ou o comprometimento de sua ativação apoptótica desencadeiam a resistência de células cancerígenas (FIANCO, et al. 2018; HUMPHREYS 2018). Por isso, os estudos sobre a apoptose são importantes, pois entendendo o seu mecanismo, pode-se desenvolver novas terapias a serem utilizadas no tratamento do câncer (FULDA 2015; PFEFFER e SINGH 2018).

As proteínas c-FLIP modulam a ativação enzimática da CASPASE-8, e são regulados em diversos tumores. Também possuem correlação com uma pior evolução clínica dos pacientes com câncer, possivelmente associada a função inibitória da c-FLIP em CASPASE-8 (HUMPHREYS 2018). Tumores que apresentam baixa expressão de CASPASE-8 ou altos níveis de c-FLIP, podem ser resistentes as terapias, pois a expressão da CASPASE-8 pode ser associada com a radio e quimioterapia, induzindo um aumento da apoptose tumoral (HUMPHREYS 2018; SAFA, et al. 2011; STUPACK 2013).

A apoptose induzida por receptores de morte, podem também apresentar uma estratégia complementar para adicionar na terapia do câncer. Por exemplo o receptor TRAIL, sua estimulação tem sido considerada uma abordagem promissora devido a sua seletividade com as células cancerígenas (KELLY and ASHKENAZI 2004; KUIJLEN, et al. 2010). Muitos estudos vêm destacando a sensibilidade do TRAIL no GBM, pois ele tem grande dependência dos níveis de expressão da csp-8 ou mesmo dos níveis de expressão ou atividade dos moduladores de sua ativação apoptótica, como a proteína FLIP (GROTZER, et al. 2000; KUIJLEN, et al. 2010).

Agentes que danificam o DNA, podem afetar diretamente a ativação da apoptose através da CASPASE-8. Por exemplo, a ATM quinase, umas das principais proteínas envolvidas na resposta ao dano no DNA quando induzida por quimioradioterapia, está diretamente ligada na regulação da CASPASE-8 (FULDA 2015; STAGNI, et al. 2008; STAGNI, et al. 2010).

Logo, estratégias que modulam a expressão da ativação apoptótica da CASPASE-8, representam uma abordagem importante para novas terapias, como por exemplo, a quimio e radioterapia podem melhorar a sensibilidade do receptor TRAIL através da modulação dos níveis da proteína c-FLIP (STAGNI, et al. 2012).

1.4 MicroRNAs

Os microRNAs são pequenos RNAs de fita simples não codificantes constituídos de 18 a 25 nucleotídeo que regulam a expressão gênica por direcionar transcritos de mRNA, que levam a sua repressão ou degradação translacional sendo reguladores da expressão gênica. Demonstram resultados complexos, pois um único miRNA tem capacidade de regular simultaneamente muitos genes (TANG, et al. 2016; ZONI, et al. 2015).

miRNAs regulando de forma negativa a expressão gênica através do emparelhamento imperfeito de bases com regiões não traduzidas 3'-UTRs de mRNA alvo, resultando na repressão da tradução ou degradação do mRNA (BARTEL 2004). Desempenham papéis importantes em diversos processos biológicos como proliferação celular, ciclo, morte, diferenciação, metástase e resistência a drogas (CALIN and CROCE 2006). São identificados por seu papel como oncogene ou supressor tumoral dependendo da característica do seu gene alvo, e pesquisas evidenciam que muitos miRNAs envolvidos no processo de Transição Epitélio

Mesenquinal (EMT), com papel na mediação da adesão célula-célula, arranjo do citoesqueleto ou expressão oncogênica (TANG, et al. 2016; ZARAVINOS 2015; ZONI, et al. 2015; ZHANG, et al. 2007).

1.5 MicroRNAs e Tumores Cerebrais

No Projeto Genoma do Câncer estudos com microarranjo, levaram a 4 classificações, separando o GBM em subgrupos clássico, pró-neura, neural e mesenquimal. Nas análises foram avaliadas as correlações entre parâmetros moleculares e clínicos, como por exemplo, os tratamentos farmacológicos. Pacientes recém-diagnosticados com GBM tratados com quimioradioterapia associado a TMZ apresentam padrão de gênica diferentes quando separados em pacientes com melhor e pior prognóstico, assim como tumores que surgem de gliomas pré-existentes de baixo grau daqueles que surgem como GBM primário (ALDAPE, et al. 2015; OLAR, et al. 2014).

Os alvos dos microRNAs correspondem a 30% de todos os genes codificadores de proteínas. Como os miRNAs possuem diversas funções, entre elas, controle da diferenciação celular, proliferação e apoptose; sua expressão aberrante e desregulação contribuem para tumorigênese, angiogênese e metástase, podendo servir como supressor de tumor ou oncogene (LI, et al. 2013)

1.5.1 MicroRNAs relacionados com apoptose em Tumores Cerebrais

Em relação a apoptose, existem duas vias: via intrínseca também conhecida como mitocondrial, desencadeada por estímulos intracelulares (danos no DNA, tratamento com drogas citotóxicas, falta de fatores de crescimento e/ou estresse oxidativo); essa via é dependente da formação do apoptossoma composto de: PRO-CASPASE-9, fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1) e CITOCROMO-C (ASLAN, et al. 2018; VERBRUGGE, et al. 2010; ZHENYI, et al. 2015).

Já a via extrínseca da apoptose, inicia-se pelos ligantes de morte (ligante FAS, TRAIL, TNF- α), onde esta interação, seguida pela montagem do complexo de sinalização do indutor de morte (DISC) que contém a proteína FAS (FADD) e a PROCASPASE-8 e PROCASPASE-10. Logo, as CASPASES-3/6/7 induzem a morte da célula ou acabam clivando a BCL-2 e BID formando a t-Bid que assim

desencadeiam a via de intrínseca ou via mitocondrial (ASLAN, et al. 2018; VERBRUGGE, et al. 2010; ZHENYI, et al. 2015).

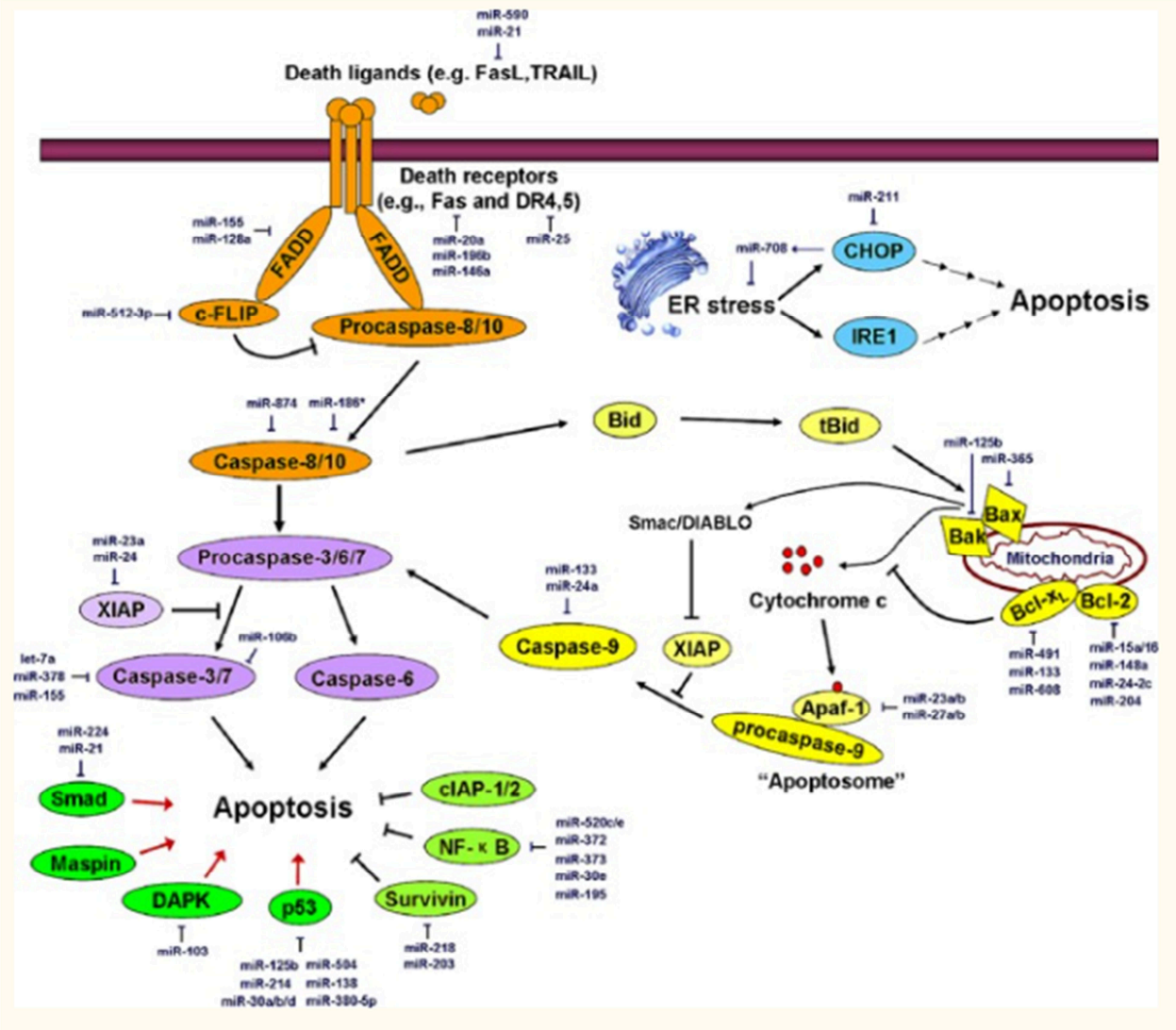


Figura 4 - miRNAs regulam as principais vias de apoptose. FasL, ligando de Fas; TRAIL, ligando indutor de apoptose relacionado com TNF; DR4, receptor de morte 4; FADD, proteína do domínio de morte associado a Fas; c-FLIP, proteína inibidora semelhante a FLICE celular; CHOP, protease homologa de C / EBP; IRE1, proteína 1 requerendo inositol; XIAP, inibidor da apoptose ligado ao X; Maspin, inibidor da protease de serina mamária; DAPK, proteína quinase associada à morte; cIAP1 / 2, inibidor celular da apoptose 1/2; Smac, segundo ativador derivado de mitocôndrias de caspases, também conhecido como DIABLO. Adaptado de ZHENYI, et al. 2015.

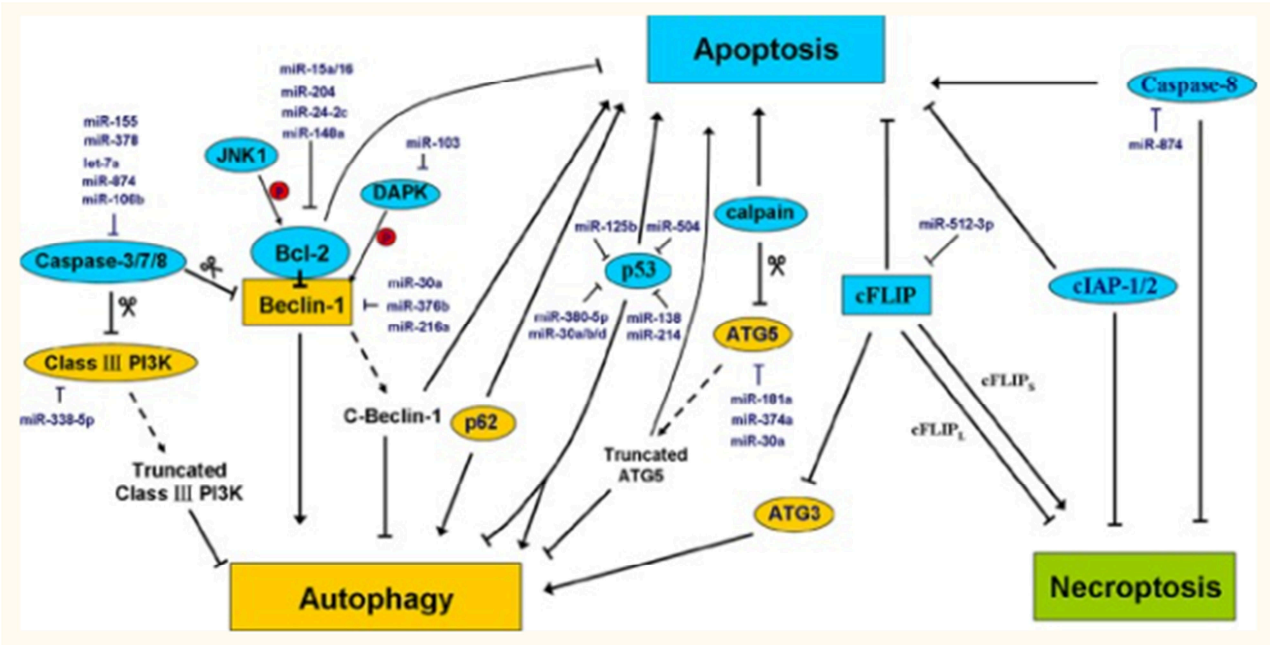


Figura 5 - MiRNAs regulam apoptose, autofagia e necroptose Estudos vem mostrando uma estreita interação entre apoptose, autofagia e necroptose. Algumas proteínas que convencionalmente participam da apoptose e podem desempenhar novos papéis na autofagia ou na necroptose. Alternativamente, alguns moduladores de autofagia podem desempenhar um papel em outros modos de morte celular programada. Adaptado de ZHENYI, et al. 2015.

1.5.2 miR- 126

O miR-126 tem associação com vários tipos de tumores. Liu e colaboradores em 2014, analisaram que este microRNA funciona como supressor tumoral no câncer colorretal (LIU, et al. 2014). Jiang e colaboradores concluíram que o miR-126 inibe o crescimento celular, invasão e migração de células de osteossarcoma (JIANG, et al. 2014).

Sun e colaboradores, analisaram que a perda de expressão do miR-126 pode promover a progressão do câncer de próstata e está associada a recorrência tumoral em pacientes submetidos a prostatectomia radical (SUN, et al. 2013).

Otsubo e colaboradores em 2011 relataram em seus estudos que uma super expressão do miR-126 pode promover carcinogênese gástrica (OTSUBO, et al. 2011).

Em 2014, Vergho e colaboradores, relataram uma associação positiva entre a expressão do miR-126 e a sobrevida do câncer no CCRcc (VERGHO, et al. 2014).

Zhang e colaboradores em 2016 concluíram em seu estudo uma associação do miR-126 com progressão do CCR e metástase, sugerindo assim que este microRNA pode funcionar como supressor tumoral envolvido no desenvolvimento do CCR, sendo um potencial biomarcador no diagnóstico e ato terapêutico (ZHANG, et al. 2016).

1.5.3 miR-873

Wang e colaboradores, em seu estudo realizado em 2015, estudaram sobre o miR-873 estando ligado no desenvolvimento do GBM. Os autores demostraram que o baixo nível do miR-873 estava associado a carcinogênese e metástase via promoção da proteína IGF2BP1. Concluíram que o miR-873 foi regulado negativamente em amostras tumorais e linhagens celulares do GBM; que está diretamente ligado a proteína IGF2BP1 através do sítio de ligação na 3′-UTR; e por fim, que a expressão ectópica do miR-873 inibiu a proliferação e invasão das linhagens celulares do GBM. Portanto, o estudo forneceu fortes evidências de que este microRNA atua como supressor tumoral no desenvolvimento do GBM e podendo implicar o miR-873 como alvo potencial para terapias do GBM (WANG, et al. 2015).

Liang e colaboradores, em seu estudo, concluíram que o miR-873 estava sub-expresso em tecidos e linhagens celulares em tumores de esôfago (LIANG, et al. 2018).

1.6 Células Tronco, Tumor Cerebral e microRNAs

Algumas células evoluem ao longo do curso da doença, formando subpopulações heterogêneas dentro da massa tumoral, células que possuem propriedade de resistência a quimio e radioterapia e possuem função importante na tumorigênese, resistência ao tratamento, progressão do tumor e recorrência (FISCON, et al. 2018). São denominadas de células tronco tumorais, com grande capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens; responsável pela carcinogênese em vários tipos tumorais como de mama, cólon, próstata, pâncreas e melanoma (FISCON, et al. 2018; GUO, et al. 2006).

Schulte e colaboradores em 2011, analisaram um subgrupo de linhagens celulares de células tronco do GBM, o fenótipo de glioblastoma semelhante a célula tronco tumoral (Cancer Stem Cell - CSCs), pois tem todos os critérios de uma célula tronco de glioma e o transcriptoma de GBM humanos mais perto que outras linhagens (SCHULTE, et al. V2011). Assim, Fiscon e colaboradores fizeram uma análise comparando genes em 15 linhagens celulares de CSCs e tumores originais em relação a linhagens celulares de GBM convencionais (FISCON, et al. 2018).

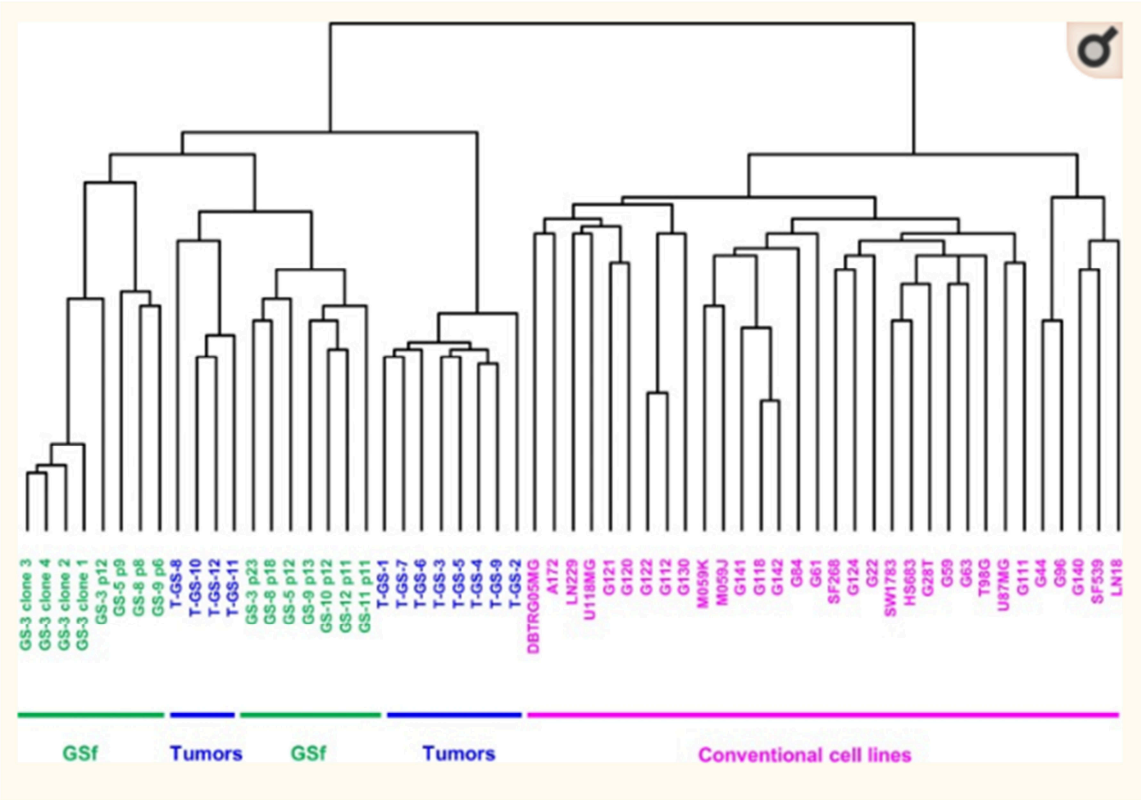


Figura 6 - Cluster hierárquico não supervisionado de tumores e linhas celulares. Os espécimes incluíram 12 glioblastomas (azul), 15 linhas celulares de glioblastoma com fenótipo semelhante ao tronco (GSf) estabelecidos a partir destes tumores (verde) e 32 linhas celulares de glioma convencionais (magenta). O dendograma foi obtido usando a correlação de Spearman como métricas de distância e destaca como as linhas de células GSf espelham o transcriptoma dos tumores mais de perto do que as linhas celulares convencionais. Adaptado de FISCON, et al. 2018.

Dificilmente se consegue remover essas células, sendo assim uma das principais causas de ineficácia nas terapias no tratamento do GBM (TABATABAI, et al. 2011). Concentrar estudos sobre as características das CSC (células tronco tumorais) vem sendo uma estratégia importante para propor novos alvos terapêuticos, melhorando assim o tratamento do GBM.

A expressão dos microRNAs vem sendo muito estudada quando se referem as vias de mediação envolvidas na tumorigenênese, diferenciação, autorenovação e manutenção da CSCs, pois estão presentes de forma desregulada diversos tipos de tumores, possuindo assim uma expressão distinta, incluindo o GBM (CASCIO, et al. 2010; GAROFALO AND CROCE 2015; HUANG, et al. 2016; HUANG, et al. 2019 LI, et al. 2013; SO, et al. 2013).

Perfis de expressão diferentes de miRNAs foram descritas em células tronco (CSCs) de tumores individuais, sugerindo funções especificas do tipo de célula tumoral. No GBM, existem agrupamentos onco-miR que influenciam na sobrevivência, ressaltando assim os efeitos que os microRNAs possuem na heterogeneidade do tumor (HUANG, et al. 2016).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

O GBM é uma doença com controle e cura ineficaz, sendo importante aprofundar estudos relacionados a biologia molecular desses tumores. Este estudo buscamos compreender sobre alguns genes e miRNAs associados ao mecanismo de apoptose nas células tumorais e nas células tronco tumorais, na tentativa de compreender a relação dessas interações relacionadas as terapias existentes.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Avaliar a expressão dos genes da CASPASE-8 e C-FLIP e dos microRNAs: miR-126-5p e miR-873-5p em neuroesferas e em células aderidas em linhagens celulares de glioblastoma, submetidas ao tratamento com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Foram utilizadas linhagens celulares de glioblastoma U343-MG, pertencentes à coleção de linhagens de Tumores Cerebrais do Banco de Tumores da Divisão de Neurocirurgia da responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior (Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP), disponível por meio da American Type Culture Collection (ATCC) – Rockville, Maryland, USA.

4.1 Grupos experimentais

A avaliação nas neuroesferas (NE) e nas células aderidas (CA) das linhagens celulares foram realizadas em cada um dos grupos assim descritos:

4.1.1 Grupo controle

As amostras do grupo controle (C) foram coletadas para as análises sem que nelas fossem aplicadas qualquer tipo de tratamento.

4.1.2 Grupo tratado com temozolamida

As amostras do grupo tratado com temozolamida (TMZ) foram coletadas para as análises após a utilização da temozolomida (princípio extraído do medicamento Temodal®, Schering Plough). O conteúdo da cápsula (100 mg) foi diluído em água deionizada (pH 7,4), agitada a 37°C por 30 minutos, e, em seguida, filtrada em filtro Millipore (0,45 μ) e estocado a -80°C, em uma concentração de 340 mM.

4.1.3 Grupo tratado com radiação ionizante

As amostras do grupo tratado com Radiação Ionizante (RI) foram submetidas ao protocolo de radiação (com raios-x de 6MV, produzidos por acelerador linear da

marca Siemens, com taxa de dose de 2,0 Gy/min, do HC-FMRP/USP) com dose de 14Gy, sendo analisadas 48h após o tratamento.

4.1.4 Grupo tratado com radiação ionizante associado a temozolamida

Finalmente as amostras do Grupo tratado com Radiação Ionizante, associada à temozolomida (RI + TMZ), foram submetidas aos tratamentos associados do grupo RI com o grupo TMZ.

4.2 Cultivo Celular

4.2.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares foram estocadas em nitrogênio líquido (-196°C), em alíquotas de 1x106 células/ml, em uma solução de congelamento. Como o objetivo deste estudo é comparar células em suspensão e células aderidas, essas foram cultivadas em frascos de 25 cm2 (TPP®), com 5 ml de meio de cultura, definido como meio ideal para cultivo de células tronco tumorais cerebrais, composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEN/F12, Gibco®), por EGF (20ng/ml, Gibco®) e por bFGF (20ng/ml, Gibco®), para as células em suspensão; 5 ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEN/F12, Gibco®) e 10% de soro fetal bovino (SFB), para as células crescerem em monocamadas. Todas foram mantidas incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO2, até atingirem uma confluência de 1x106 células por frasco de cultura. As células que cresceram em suspensão formaram colônias de células, denominadas neuroesferas. Essas células foram aspiradas e levadas para centrifugação, a 1200 rpm, por sete minutos, a 23°C; em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado com 1 ml de PBS, e as células ressuspensas em 1 ml de meio de cultura. Já para as células aderidas, foi feita tripisinização, com o objetivo de desprender as células da placa. Esse processo consiste em adicionar 3 ml de tripsina às células e levá-las para estufa, a 37°C, durante 5 minutos. Após esse período, o desprendimento das células pôde ser observado ao microscópio. Seguidamente adicionaram-se 6 ml de meio de cultura para inativação da tripsina, e todo o conteúdo do frasco foi aspirado e levado para centrifugação, a 1200 rpm, por sete minutos, a 23°C. Posteriormente o sobrenadante

foi descartado e realizou-se a lavagem do pellet com 1 ml de PBS. O mesmo foi ressuspenso em 1ml de meio de cultura conduzindo-se para a contagem das células na câmara de Newbauer.

Após contagem, essas células foram distribuídas em placas de cultura de seis poços (TPP®), sendo 1x105 células por poço, com 2ml de meio de cultura. As células dos grupos tratados passaram pelos respectivos tratamentos, enquanto que as células do grupo controle permaneceram sem nenhum tipo de tratamento. O meio de cultura foi trocado a cada quarenta e oito horas.

4.2.2 Contagem de células em câmera de Neubauer

Neste trabalho, foi utilizado o teste de exclusão com o azul de trypan (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) – um corante marcador para células mortas. Essa marcação é feita de acordo com a permeabilidade da membrana celular, permitindo estimar indiretamente o grau de integridade dela. Células vivas mantêm a membrana celular íntegra, enquanto que células mortas perdem essa integridade, sendo assim, marcadas pelo azul de trypan. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular. Uma lamínula especial que fornece a profundidade correta foi colocada sobre a área demarcada na câmara de contagem. Após ser bem homogeneizada, 6µl da suspensão celular foi transferida para um pequeno tubo acrescentando-se 54µl de azul de tripan 0,2%, obtendo-se uma diluição 1/10. O conteúdo foi bem misturado e uma alíquota retirada com a pipeta. Encostando-se a ponta da pipeta na borda da lamínula, toda a câmara de contagem foi preenchida cuidadosamente. A área demarcada da câmara foi focada com objetiva de menor aumento. Cada quadrante da Câmara de Neubauer possui área de 0,1 mm2. Esses quadrantes possuem 16 quadrados menores. Ao adaptar uma lamínula de vidro à câmara de Neubauer, obtém-se altura de 0,1mm. A capacidade de volume é, portanto, de 0,1 mm x 0,1 mm2 = 0,1 mm3 (0,1 mm3 = 0,0001 cm3 = 0,0001 ml ou 10-4 ml). Essa medida padronizada possibilita a quantificação da suspensão celular. Para isso deve-se contar as células presentes nos quatro quadrantes. Em seguida, o número total de células obtido nos quatro quadrantes foi dividido por quatro (média), e multiplicado pelo valor da diluição realizada. Ao final, o valor encontrado foi multiplicado por 1 x 104 ml (ordem de grandeza da câmara). As células viáveis foram identificadas e contadas nas quatro áreas de um lado da câmara de contagem. O

valor médio encontrado nos quatro quadrantes foi multiplicado pelo fator de diluição, no caso 10.

4.3 Estudo de expressão gênica e de microRNAs

Às amostras, foram adicionados 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). Após permanência em temperatura ambiente por cinco minutos, foram acrescentados 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C, por quinze minutos, a 14.000 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100%, e permaneceu a -20°C por, pelo menos, doze horas. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C, por quinze minutos, a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se, então, 1000µl de etanol 75%, seguido novamente de centrifugação refrigerada, por cinco minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada, e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por, pelo menos, quinze minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a - 80°C. Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também utilizamos um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, esse aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6, considera-se que o material esteja degradado, e, para valores maiores do que 2,0, houve possibilidade de interferência do clorofórmio. Portanto foram aceitas amostras na faixa 1,7 a 1,9.

4.3.1 Síntese do cDNA dos microRNAs: miR-126-5p e miR-873-5p

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA, a transcrição reversa realizou-se utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados 0,75µl de RT Buffer, seguido de 0,075µl de dNTP's, de 1,5µl de primers específicos (miRNAs e controles endógenos), e de 0,5µl da enzima MultiScribeTM, 0,094µl de

RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, e encubando as amostras no termociclador por trinta minutos a 16 º C, trinta minutos a 42 ºC, 5 minutos a 85 º C e, em seguida, a 4°C. Para o PCR, em tempo real, foram utilizados 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

4.3.2 Síntese do cDNA dos genes C-FLIP e CASPASE-8

A transcrição reversa realizou-se utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante, para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µg RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; de 2,5µl Random Primers e de 1,25µl da enzima MultiScribeTM, completando com água DEPC o volume final de 20µl.

4.3.3 PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido das amostras, realizou-se a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), quantitativa em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). Para a análise quantitativa da expressão dos genes e dos microRNAS, utilizou-se o sistema disponível comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e por sondas (Applied Biosystems). Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras são normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene ou microRNA) é subtraído do CT determinado para um house-keeping (neste caso, a média do TBP e do HPRT para os genes, e U6 para os microRNAs) na mesma amostra, originando o chamado ΔCT. Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene ou um microRNA, ser comparados diferentemente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão desse gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias, em uma reação de PCR, duplica. Dessa forma, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador duplica; para o número, utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta$CT. Esta diferença,

em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula 2-ΔΔCT. Realizamos a quantificação relativa dos genes CASPASE-8 e C-FLIP, e dos microRNAs miR-126-5p e miR-873-5p, nas quais as reações de PCR, em tempo real, foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR, em tempo real, 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), juntamente com o software Sequence Detection System, para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram exportados para planilhas do software Excel, para cálculo dos valores de ΔCT. O software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA) foi utilizado, para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. As condições padrão de amplificação foram 95°C por dez minutos, seguidos por quarenta ciclos de 95°C por quinze segundos e 60°C por um minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata, e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR, e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

4.4 Análise Estatística

O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows e o teste Two-Way ANOVA foram usados, para analisar as diferenças na expressão dos genes e dos microRNAs estudados (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Os valores de p foram considerados significativos, quando inferiores a 0.05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Expressão do gene CASPASE-8 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante, isolados e associados

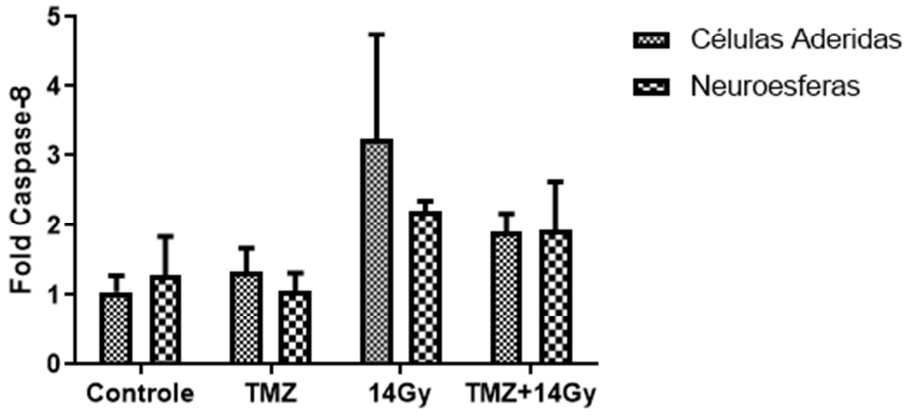


Gráfico 1 - Expressão do gene CASPASE-8 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas.

a) A exposição à TMZ não resultou em modificação na expressão da CASPASE-8 nas CA e nas NE, entre si e em relação ao grupo controle.

b) Observamos um aumento na expressão da CASPASE-8 nas CA no grupo com RI

5.2 Expressão do gene C-FLIP na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados

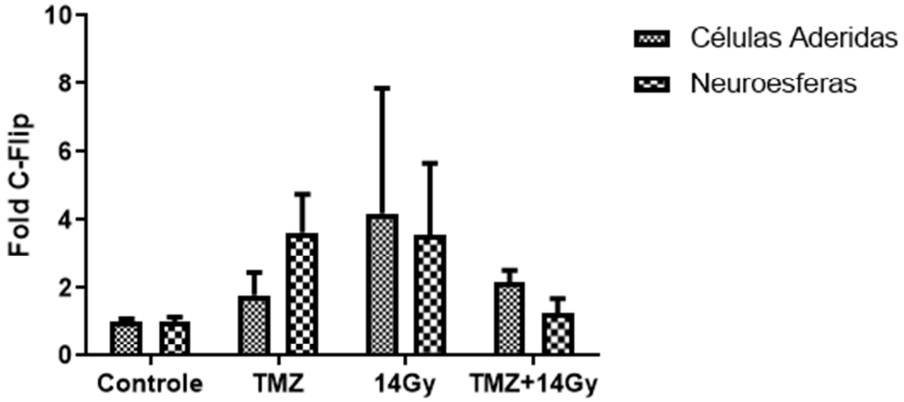


Gráfico 2 - Expressão do gene C-FLIP na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas.

a) A intervenção com RI produziu aumento significativo na expressão da C-FLIP nas CA e NE, quando comparados ao grupo com o tratamento de TMZ + RI

5.3 Expressão do microRNA-126 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados

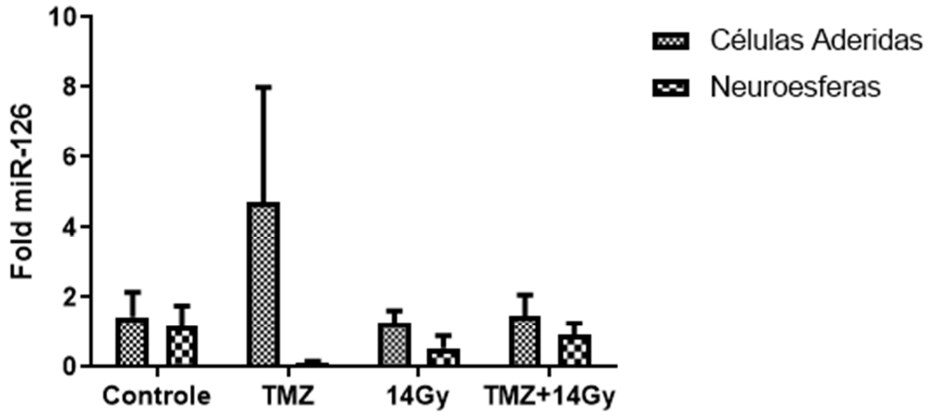


Gráfico 3 - Expressão do microRNA-126 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas.

a) A exposição à TMZ isoladamente resultou no aumento significativo da expressão do miR-126 nas CA.

b) Observamos uma diminuição da expressão do miR-126 nas NE quando expostos a TMZ.

5.4 Expressão do microRNA-873 na linhagem U343 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e radiação ionizante , isolados e associados

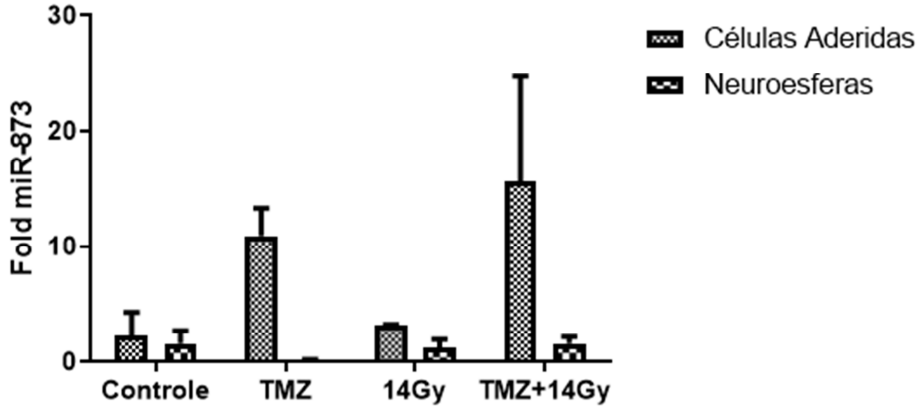


Gráfico 4 - Expressão do microRNA-873 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas.

a) Observamos um aumento de expressão do miR-873 nas CA nos grupos TMZ, RI e TMZ+RI, quando comparadas aos demais grupos de CA e de NE.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O GBM é um tumor maligno do sistema nervoso central com mau prognóstico por ter angiogênese associada a uma ativação aberrante do NF-kB, e grande capacidade de se infiltrar em todo tecido cerebral e ter forte resistência a quimioterapia ((DUNN, et al. 2012; KARGIOTIS, et al. 2006; NOGUEIRA, et al. 2011).

Estudos demonstraram alterações nos níveis de expressão da CASPASE-8 em linhagens de GBM e tumores primários (ASHELY, et al. 2005; KUIJLEN, et al. 2010; STUPACK 2012; VERHAAK, et al. 2010). Fianco e colaboradores em estudos de 2016 e 2017 relataram que a expressão da CASPASE-8 é diminuída em linhagens celulares de glioblastoma, U87MG e U251MG. Com esses modelos, pode ocorrer a transformação neoplásica e resistência ao tratamento com TMZ *in vitro*, sustentando a ativação do NF-kB, produção de citocinas, neoangiogênese e crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (FIANCO, et al. 2016; FIANCO, et al. 2017).

Verhaak e colaboradores em seu estudo analisaram a regulação e também encontraram expressão aumentada da CASPASE-8 em pacientes com GBM em comparação com tecido normal, particularmente no subtipo mesenquimal (VERHAAK, et al. 2016).

Em análise bioinformática de dados clínicos derivados de pacientes com GBM, observou-se forte correlação entre altos níveis de expressão da CASPASE-8 e um mau prognóstico, confirmando um papel central da expressão da CASPASE-8 no desenvolvimento e resposta a terapia (FIANCO, et al. 2017).

Em alguns tumores, como neuroblastoma e meduloblastoma, a CASPASE-8 tem sua expressão geneticamente ou epigeneticamente silenciada (PINGOUD-MEIER, et al. 2003; TEITZ, et al. 2000). Já em tumores como carcinoma hepatocelular e GBM, a CASPASE-8 tem uma super expressão (STUPACK, 2013).

Os estudos que envolvem a CASPASE-8 tem como finalidade descobrir os mecanismos moleculares que permitem que as células tumorais sejam resistentes a apoptose assim como descobrir novas funções da CASPASE-8 e entender melhor seu papel no desenvolvimento e terapias do câncer (FIANCO, et al. 2018). Sua função atualmente não está apenas relacionada a morte celular, mas também com a modulação da atividade do NF-κB e do desenvolvimento do sistema imune; como também na adesão e migração celular em células tumorais (GRAF, et al. 2014; KELLER, et al. 2018; SOLIER, et al. 2017; TUMMERS and GREEN 2017).

Em nosso estudo a expressão do gene CASPASE-8 apresentou aumento de expressão em neuroesferas e em células aderidas em linhagem U-343 submetidas ao tratamento com radiação ionizante isolado.

As proteínas c-FLIP modulam a ativação da CASPASE-8, e sua super expressão prejudica a expressão da CASPASE-8 (PETER, 2004) (HUMPHREYS, et al. 2018). A fosforilação e a ubiquitinação balanceiam a cascata de eventos que ativam a CASPASE-8 (CURSI, et al. 2006).

Estudos sugerem que tumores também podem ativar a função apoptótica da CASPASE-8 em sinalizações que sustentam a tumorigênese e que desencadeiam a resistência da radio e quimioterapia (FIANCO, et al. 2018).

Além da necroptose e autofagia onde identifica-se CASPASE-8 com função importante, os estudos laboratoriais sugerem que a atividade da CASPASE-8 também pode envolver a modulação do equilíbrio entre esses mecanismos de morte celular: autofagia, apoptose e necroptose (TUMMERS and GREEN 2017).

Quando ocorre a inibição genética ou farmacológica da CASPASE-8, a morte celular é ativada dependendo da autofagia, logo, sua atividade basal tem função benéfica para sobrevivência (YU, et al. 2004).

A CASPASE-8 presente nos gliomas, ativam a produção de citocinas, angiogênese e tumorigenicidade através de vias que foram parcialmente elucidadas (FIANCO, et al. 2017).

Estudos para identificar o papel primário da CASPASE-8 estabeleceram que no desenvolvimento inibe a necroptose (TUMMERS and GREEN 2017). Portanto, a modulação da CASPASE-8 redireciona a autofagia citoprotetora para a morte celular nas células cancerígenas, estas que possuem alto fluxo autofágico e resistência a sinalização apoptótica canônica (TANG, et al. 2017).

A proteína c-FLIP tem capacidade de modular a atividade enzimática da CASPASE-8 e modular o recrutamento para diversos caminhos de sinalização, indicando c-FLIP com capacidade de interromper a funcionalidade da CASPASE-8 (FIANCO, et al. 2018).

Muitos tumores retêm a expressão da CASPASE-8, mesmo que sua atividade apoptótica seja prejudicada por níveis de proteína c-FLIP, assim, a expressão dessa proteína é regulada de forma anormal no câncer (HUMPHREYS, et al. 2018).

Por essa expressão anormal, a regulação de c-FLIP tem sido identificada em vários tumores imunológicos e tumores sólidos , sendo que na maioria dos casos

está relacionada com mau prognóstico (DUTTON, et al. 2004; HUMPHREYS, et al. 2018; MATHAS, et al. 2004; SAFA and POLLOK 2011). Sua relação com o mau prognóstico se deve pela c-FLIP interferir na sensibilidade a quimioterapia e radioterapia, interferindo assim na ativação da cascata da CASPASE nos tumores, bem como na indução da apoptose dependente da CASPASE-8 que é desencadeada pela estimulação do receptor de morte (FIANCO, et al. 2018).

A fosforilação de Tyr380 possui papel de interação da CASPASE-8 com c-FLIP ou CASPASE-10; ou pode modular a capacidade da caspase-8 de promover a ativação da NF-kB (modular autofagia e necroptose ainda é desconhecido) (FIANCO, et al. 2018).

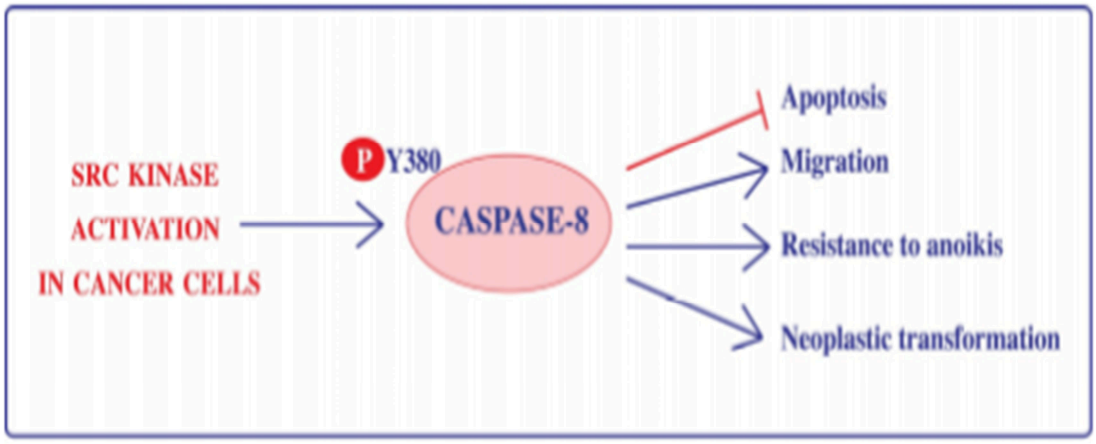


Figura 7 - A fosforilação dependente de quinase Src em Tyr380 refaz a funcionalidade Caspase-8 em células cancerosas. A fosforilação em Tyr380 (P-Y380) prejudica a função apoptótica de Caspase-8 e promove sua capacidade de sustentar a adesão e migração celular, a transformação neoplásica e prejudicar. Setas indicam indução e T-barra indica inibição (FIANCO, et al. 2018)

Estudos futuros visam entender estratégias para direcionar a expressão da proteína c-FLIP, diminuir a fosforilação da CASPASE-8 em Tyr380 ou diminuir a expressão da CASPASE-10 podem ser benéficas a pacientes com GBM. Uma vez que a Src quinase é supra-regulada em muitos GBMs desencadeando a fosforilação da CASPASE-8, o Dasatinib que inibe a Srcquinase, pode representar uma abordagem valiosa para melhorar a ativação da apoptose com a CASPASE-8 em resposta a quimioterapia e radioterapia e estimular o receptor TRAIL (FIANCO, et al. 2018).

Boege e colaboradores em 2017 em seus estudos sugeriram que a inibição da CASPASE-8, que prejudica a indução da apoptose, pode aumentar a

sensibilidade das células tumorais aos agentes que danificam o DNA independentemente da apoptose, representando uma estratégia terapêutica valiosa (BOEGE, et al. 2017).

A expressão da CASPASE-8 é aumentada em alguns gliomas, sugerindo um papel complexo não apenas no desenvolvimento do câncer, mas também na modulação da sensibilidade quimioterápica (FIANCO, et al. 2018; STUPACK 2013; VERHAAK, et al. 2010).

A modulação da CASPASE-8 pode afetar a sensibilidade a quimioterapia não só por interferir na resposta apoptótica, mas também por vias adicionais. A regulação negativa da CASPASE-8 no GBM pode desencadear resistência a apoptose, se correlaciona com uma redução do nível de expressão das citocinas inflamatórias, resultando em uma sensibilidade aumentada a TMZ por meio de uma via molecular ainda desconhecida (FIANCO, et al. 2017).

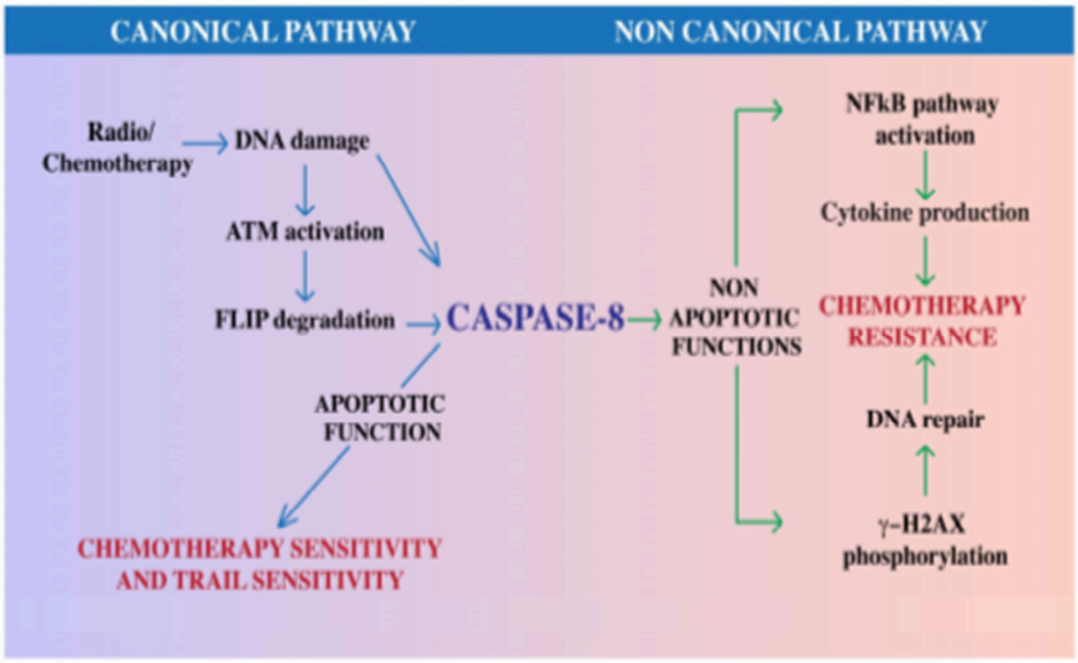


Figura 8 - Papel da Caspase-8 na terapia do câncer. A caspase-8 pode modular a resposta a abordagens terapêuticas por meio de funções canônicas e não canônicas. A quimioterapia e a radioterapia promovem danos no DNA que, por sua vez, ativam enzimaticamente a Caspase-8, seja diretamente ou via downregulation dependente de ATM dos níveis de proteína FLIP. A ativação enzimática da caspase-8 promove a apoptose, melhorando a sensibilidade das células cancerosas à quimioterapia e ao TRAIL. Células cancerosas podem religar a funcionalidade da Caspase-8; nesses contextos, a Caspase-8 pode promover atividade de NF-κB, produção de citocinas e reparo de DNA, promovendo resistência à quimioterapia. No geral, sugerimos que esse duplo papel da Caspase-8 no câncer pode ser explorado para melhorar a terapia do câncer.

Em nosso trabalho a expressão de C-FLIP apresentou aumento dos níveis de expressão no grupo tratado com RI isolado tanto em neuroesferas e em células aderidas quanto em células aderidas em linhagem U-343.

Zhao e colaboradores em 2016, concluíram que o miR-126 inibe capacidades migratórias e invasivas das células endometriais (ZHAO, et al. 2016). Em outras pesquisas também relacionam o miR-126 com a migração e invasão em tumores colorretal e osteossarcoma (JIANG, et al. 2014; ZHOU, et al. 2013).

Han e colaboradores em 2018, descobriram que a expressão do miR-126 foi significativamente diminuída nas linhagens celulares de glioma maligno (HAN, et al. 2018).

Tomasetti e colaboradores sugeriram em seu estudo em 2018 que o miR-126 possui papel como biomarcador para diferenciar tipos malignos de formas benignas de neoplásicas nasais (TOMASETTI, et al. 2018).

Nos resultados demonstram que o miR-126 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA quando expostos a TMZ isolada quando comparadas aos demais grupos.

Mokhlis e colaboradores em 2018 mostraram em seu estudo que o miR-873 regula a proliferação celular, apoptose e invasão através de vias oncogênicas como ERK/AKT induzida por KRAS (MOKHLIS, et al. 2018).

Chen e colaboradores em 2015, concluíram que o miR-873 foi regulado negativamente em células de glioma resistentes a cisplatina em comparação com células do tipo selvagem. E este microRNA aumentou a sensibilização a cisplatina ao atingir a Bcl-2. Logo, o miR-873 pode ser um potencial biomarcador e uma estratégia terapêutica promissora para células de glioma resistentes a cisplatina (CHEN, et al. 2015).

Wang e colaboradores concluíram que o miR-873 foi regulado negativamente em tecidos e linhas celulares de GBM, o evidenciando como supressor tumoral no desenvolvimento do GBM, implicando como um alvo potencial para as terapias aplicadas (WANG, et al. 2015).

O miR-873 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA nos grupos TMZ e TMZ+RI quando comparadas aos demais grupos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O gene CASPASE-8 apresentou aumento dos níveis de expressão nas CA no grupo tratado com RI quando comparadas aos demais grupos ;

- O gene C-FLIP apresentou aumento dos níveis de expressão nas CA e NE no grupo tratado com RI quando comparadas aos demais grupos.

- O miR-126 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA quando expostos a TMZ isolada quando comparadas aos demais grupos.

- O miR-873 apresentou aumento nos níveis de expressão nas CA nos grupos TMZ e TMZ+RI quando comparadas aos demais grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAPE, K.; ZADEH, G.; MANSOURI, S.; et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathol**. 129(6):829–48. 10.1007/s00401-015-1432-1, 2015.

ASLAN, E.; AKBAS, E.; YILMAZ, S.; et al. Ear atresia: Is there a role of apoptosis-regulating miRNAs? **North Clin Istanb.** 5(3):238-245, 2018.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**. 116:281–297, 2004.

CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer**. 6:857–866, 2006.

CASCIO, S.; D'Andrea A.; FERLA, R.; et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. **J Cell Physiol**. 224(1):242-9. PMID: 20232316, 2010.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; SHI, Y.; et al. MiR-873 acts as a novel sensitizer of glioma cells to cisplatin by targeting Bcl-2. **Int J Oncol.** 47(4):1603-11, 2015.

CHINNAIVAN, A.M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell** 81, 505–512, 1995.

COSTELLO, J.F.; PLASS, C.; ARAP, W.; et al. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. **Cancer Res** 57:1250–1254, 1997.

CURSI, S.; RUFINI, A.; STAGNI, V.; et al. Srckinasephosphorylates Caspase-8onTyr380: A novel mecanism of apoptosis suppression. **EMBO J**. 25, 1895–1905, 2006.

DARLIX, A.; ZOUAOUI, V.; RIGAU, V.; et al. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study **J Neurooncol**, 131 (3), pp. 525-546, 2017.

DeANGELIS, L.M. Brain tumors**. N Engl J Med** 344(2):114–123, 2001.

DUNN, G.P.; RINNE, M.L.; WYKOSKY, J.; et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. **Genes Dev** 26:756–784, 2012.

FIANCO, G.; CENCI, C.; BARILA, D. Caspase-8 expression and its Src-dependent phosphorylation on Tyr380 promote cancer cell neoplastic transformation and resistance to anoikis. **Exp. Cell Res**, 2016.

FIANCO, G.; MONGIARDI, M.P.; LEVI, A.; et al. Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. **eLife,** 2017.

FISCON, G.; CONTE, F.; PACI, P. SWIM tool application to expression data of glioblastoma stem-like cell lines, corresponding primary tumors and conventional glioma cell lines. **BMC Bioinformatics.** 30;19(Suppl 15):436, 2018.

FU, T.; LI, Y.; LU, A.; et al. Cryo-EM structure of Caspase-8 tandem DED filament reveals assembly and regulation mechanisms of the death-inducing signaling complex. **Mol. Cell**, 64, 236–250, 2016.

FULDA, S. Targeting apoptosis for anti câncer therapy. Semin. **CancerBiol**. 31,84–88, 2015.

GUO, W.; LASKY, J.L.; WU, H. Cancer stem cells. **Pediatr Res.** 59:59–64, 2006.

GRAF, R.P.; KELLER, N.; BARBERO, S.; et al. Caspase-8 as a regulator of tumor cell motility**. Curr. Mol. Med**.14, 246–254, 2014.

HAN, L.; LIU, H.; WU, J.; et al. miR-126 Suppresses Invasion and Migration of Malignant Glioma by Targeting Mature T Cell Proliferation 1 (MTCP1). **Med Sci Monit**. 24: 6630–6637, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell** 144, 646–674, 2011.

HARTMANN, C.; HENTSCHEL, B.; WICK, W.; et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. **Acta Neuropathol**. 120(6):707–18. 10.1007/s00401-010-0781-z, 2010.

HEGI, M.E.; DISERENS, A.C.; GORLIA, T.; et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N. Engl. J. Med**., 352, pp. 997-1003, 2005.

HENSON, J.W.; SCHINITKER, B.L.; CORREA, K.M.; et al. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. **Annals Neurol** 36:714–721, 1994.

HUANG, T.; ALVAREZ, A.A.; PANGENI, R.P.; et al. A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. **Nat Commun**. 7:12885. PMID: 27698350, 2016.

HUANG, T.; WAN, X.; ALVAREZ, A.A.; et al. MIR93 (microRNA -93) Regulates Tumorigenicity and Therapy Response of Glioblastoma by Targeting Autophagy. **Autophagy**. doi: 10.1080/15548627.2019.1569947, 2019.

HUMPHREYS, L.; ESPONA-FIEDLER, M.; LONGLEY, D.B. FLIP as a therapeutic target in cancer. **FEBS J**. 2018.

JIANG, L.; HE, A.; ZHANG, Q.; et al. MiR-126 inhibits cell growth, invasion and migration of osteosarcoma cells by downregulating ADAM-9. **Tumour Biol**. 35:12645–12654, 2014.

JOHNSON, D.R.; O'NEILL, B.P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **J. Neurooncol**, 107, pp. 359-364, 2012.

JUO, P.; KUO, C.J.; YUAN, J.; et al. Essential requirement for Caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. **Curr. Biol**. 8, 1001–1008, 1998.

KAISER, W.J.; UPTON, J.W.; LONG, A.B.; et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of Caspase-8-deficient mice. **Nature** 471, 368–372, 2011.

KEIME-GUIBERT, F.; CHINOT, O.; TAILLANDIER, L.; et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. **N. Engl. J. Med.** 356, pp. 1527-1535, 2007.

KELLER, N.; GRUTTER, M.; ZERBE, O. Studies of the molecular mechanism of Caspase-8 activation by solution NMR. **Cell Death Differ**. 17, 710–718, 2010.

KELLER, N.; MARES, J.; ZERBE, O.; et al. Structural and biochemical studies on procaspase-8: New insights on initiator caspase activation. **Structure** 17, 438–448, 2009.

KELLER, N.; OZMADENCI, D.; ICHIM, G.; et al. Caspase-8 function, and phosphorylation, in cell migration. **Semin. Cell Dev. Biol.** 82, 105–117, 2018.

KISCHKEL, F.C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO J**. 14, 5579–5588, 1995.

LIANG, Y.; ZHANG, P.; LI, S.; et al. MicroRNA-873 acts as a tumor suppressor in esophageal cancer by inhibiting differentiated embryonic chondrocyte expressed gene 2. **Biomed Pharmacother.** 105:582-589, 2018.

LI, D.; IINYTSKYY, Y.; KOVALCHUK, A.; et al. Crucial role for early growth response-1 in the transcriptional regulation of miR-20b in breast cancer. **Oncotarget**. 4(9):1373-87. PMID: 23945289, 2013.

LIEBERMAN, F. Glioblastoma update: molecular biology, diagnosis, treatment, response assessment, and translational clinical trials**. F1000Res.** 2017 Oct 26;6:1892, 2017.

LIU, Y.; ZHOU, Y.; FENG, X.; et al. MicroRNA-126 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer cells by targeting CXCR4 via the AKT and ERK1/2 signaling pathways. **Int J Oncol**. 44:203–210, 2014.

LOUIS, D.N. The p53 gene and protein in human brain tumors. **J Neuropathol Exp Neurol** 53:11–21, 1994

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 114:97–109, 2007.

LOUIS, D.N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathol** 131(6):803–820, 2016.

LOUIS, D.N. The next step in brain tumor classification: “Let us now praise famous men”… or molecules? **Acta Neuropathol** 124:761–762. doi: 10.1007/s00401-012-1067-4, 2012.

LOUIS, D.N.; PERRY, A.; BURGER, P.; et al. International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. **Brain Pathol** 24:429–435. doi: 10.1111/bpa.12171, 2014.

MALMSTROM, A.; GRONBERG, B.H.; MAROSI, C.; et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial **Lancet Oncol**., 13 pp. 916-926, 2012.

MCNEILL, K.; ALDAPE, K.; FINE, H.A. Adult High-Grade (Diffuse) Glioma.In: Karajannis MA, Zagzag D, editors. Molecular Pathology of Nervous System Tumors New York, **NY: Springer New York**; 77–93. 10.1007/978-1-4939-1830-0_6, 2015.

MOKHLIS, H.A.; BAYRAKTAR, R.; KABIL, N.N.; et al. The Modulatory Role of MicroRNA-873 in the Progression of KRAS-Driven Cancers. **Mol Ther Nucleic Acids.** 13;14:301-317, 2018.

MUZIO, M.; CHINNAIVAN, A.M.; KISSCHKEL, F.C.; et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell** 85, 817–827, 1996.

OBERST, A.; DILLON, C.P.; WEINLICH, R.; et al. Catalytic activity of the Caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. **Nature**, 471, 363–367, 2011.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res** 19:764–772, 2013.

OLAR, A.; ALDAPE, K.D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. **J Pathol**. 232(2):165–77. 10.1002/path.4282, 2014.

OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; FULOP, J.; et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. **Neuro Oncol** 17(Suppl 4):iv1–iv62, 2015.

OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; LIAO, P.; et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014 **Neuro Oncol**, 19 (suppl_5), pp. v1-v88, 2017.

OTSUBO, T.; AKIYAMA, Y.; HASHIMOTO, Y.; et al. MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. **PloS One**. 6:e16617., 2011.

PANNER, A.; JAMES, C.D.; BERGER, M.S.; et al. mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. **Mol Cell Biol.** 25(20):8809-23, 2005.

PETER, M.E. The flip side of FLIP. **Biochem. J**. 382, e1–e3, 2004.

PINGOUD-MEIER, C.; LANG, D.; JANSS, A.J.; et al. Loss of Caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. **Clin. Cancer Res**. 9, 6401–6409, 2003.

POP, C.; SALVESEN, G.S. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. **J. Biol. Chem.** 284, 21777–21781, 2009.

POP, C.; FITZGERALD, P.; GREEN, D.R. Role of proteolysis in Caspase-8 activation and stabilization. **Biochemistry** 46, 4398–4407, 2007.

REIFENBERGER, J.; REIFENBERGER, G.; LIU, L.; et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. **Am J Pathol** 145:1175–1190, 1994.

SAHM, F.; CAPPER, D.; JEIBMANN, A.; et al. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. **Arch Neurol** 69:523–526, 2012.

SALVESEN, G.S.; WALSH, C.M. Functions of Caspase-8: The identified and the mysterious. **Semin. Immunol**. 26, 246–252, 2014.

SCHUG, Z.T.; GONZALVEZ, F.; HOUTKOOPER, R.H.; et al. BID is cleaved by Caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. **Cell Death Differ**. 18, 538–548, 2011.

SCHULTE, A.; GUNTHER, H.S.; PHILLIPS, H.S.; et al. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses cxcr4 as therapeutic target. **Glia.** 59(4):590–602, 2011.

SEYSTAHL, K.; WICK, W.; WELLER, M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. Crit **Rev Oncol Hematol.** 99:389–408. 10.1016/j.critrevonc.2016.01.018, 2016.

SO, A.Y.; ZHAO, J.L.; BALTIMORE, D. The Yin and Yang of microRNAs: leukemia and immunity. **Immunol Rev.** 253(1):129-45, 2013.

SOLIER, S.; FONTENAY, M.; VAINCHENKER, W.; et al. Non-apoptotic functions of Caspases in myeloid cell differentiation. **Cell Death Differ.** 24, 1337–1347, 2017.

STUPACK, D. Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. **Cancer Lett.** 332, 133–140, 2013.

STUPP, R.; HEIGI, M.E.; MASON, W.P.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol** 10:459–466, 2009.

STUPP, R.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; et al. Taphoorn, et al.Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N. Engl. J. Med.,** 352, pp. 987-996, 2005.

STUPP, R.; TAILLIBERT, S.; KANNER, A.A.; et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**. 314(23):2535–43. 10.1001/jama.2015.16669, 2015.

SUN, X.; LIU, Z.; YANG, Z.; et al. Association of microRNA-126 expression with clini-copathological features and the risk of biochemical recurrence in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. **Diagnostic Pathol.** 8:208. doi: 10.1186/1746-1596-8-208,02013.

TABATABAI, G.; WELLER, M. Glioblastoma stem cells. **Cell Tissue Res.** 343(3):459–65, 2011.

TANG, Z.; TAKAHASHI, Y.; CHEN, C.; et al. Atg2A/B deficiency switches cytoprotective autophagy to non-canonical Caspase-8 activation and apoptosis. **Cell Death Differ**. 24, 2127–2138, 2017.

TEITZ, T.; WEI, T.; VALENTINE, M.B.; VANIN, E.F.; et al. Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in chidhood neuroblastomas with amplification of MYCN. **Nat. Med.** 6, 529–535, 2000.

THAKKAR, J.P.; DOLECEK, T.A.; HORBINSKI, C.; et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomark Prevent Pub Am Assoc Cancer Res Cosponsored **Am Soc Prevent Oncol** 23:1985–1996, 2014.

TOMASETTI, M.; RE, M.; MONACO, F.; et al. MiR-126 in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas: exosomal transfer of MiR-126 promotes anti-tumour responses**.** **BMC Cancer.** 17;18(1):896, 2018.

TUMMERS, B.; GREEN, D.R. Caspase-8: Regulating life and death. **Immunol. Rev.** 277, 76–89, 2017.

VARFOLOMEEV, E.E.; SCHUCHMANN, M.; LURIA, V.; et al. Targeted disruption of the mouse Caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. **Immunity** 9, 267–276, 1998.

VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R.W.; SMYTH, M.J. SnapShot: extrinsic apoptosis pathways. **Cell.** 143:1192–1192. e1192, 2010.

VERGHO, D.; KNEITZ, S.; ROSENWALD, A.; et al. Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma. **BMC Cancer.** 14:25. doi: 10.1186/1471-2407-14-25, 2014.

VERHAAK, R.G.; HOADLEY, K.A.; PURDOM, E.; et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, 17, 98–110, 2010.

YE, C.P.; QIU, C.Z.; HUANG, Z.X.; et al. Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterol.** 13, 6264–6268, 2007.

YU, L.; ALVA, A.; SU, H.; et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by Caspase-8. **Science**, 304, 1500–1502, 2004.

WANG, R.J.; LI, J.W.; BAO, B.H.; et al. MicroRNA-873 (miRNA-873) inhibits glioblastoma tumorigenesis and metastasis by suppressing the expression of IGF2BP1. **J Biol Chem.** 3;290(14):8938-48, 2015.

WATANABE, T.; YOKOO, H.; YOKOO, M.; et al. Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. J Neuropathol Exp Neurol 60:1181–1189, 2001

WELLER, M.; CLOUGHESY, T.; PERRY, J.R. WickStandards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet. **Neuro Oncol**. 15, pp. 4-27, 2013.

WELLER, M.; VAN DEN BENT, M.; HOPKINS, K.; et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **Lancet Oncol.** 15, pp. e395-403, 2014

WICK, W.; PLATTEN, M.; MEISNER, C.; et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol.** 13, pp. 707-715, 2012.

WOHRER, A.; WALDHOR, T.; HEINZL, T.; et al. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. **J Neurooncol,** 95 (3), pp. 401-411, 2009.

ZHAO, X.; ZHU, D.; LU, C.; et al. MicroRNA-126 inhibits the migration and invasion of endometrial cancer cells by targeting insulin receptor substrate 1. **Oncol Lett**; 11(2): 1207–1212, 2016.

ZARAVINOS, A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer. **J Oncol:**865816, 2015.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, H.P.; et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol** 302: 1-12, 2007.

ZHANG, H.; ZHOU, X.; MCQUADE, T.; et al. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. **Nature**. 471, 373–376, 2011.

ZHANG, G.M.; LUO, L.; DING, X.M.; et al. MicroRNA-126 inhibits tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in renal cell carcinoma. **Mol Med Rep**. 13(6):5029-2036, 2016.

ZHENYI, S.; ZUOZHANG, Y.; YONGGING, X.; et al. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. **Oncotarget.** 20; 6(11): 8474–8490, 2015.

ZHOU, Y.; FENG, X.; LIU, Y.; et al. Down-regulation of miR-126 is associated with colorectal cancer cells proliferation, migration and invasion by targeting IRS-1 via the AKT and ERK1/2 signaling pathways. **PLoS One.** 8:e81203, 2013.

ZONI, E.; VAN DER PLUJIM, G.; GRAY, P.C.; et al. Epithelial plasticity in cancer: unmasking a microRNA network for TGFβ, Notch, and Wnt-mediated EMT. **J Oncol**: 198967, 2015.