**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

THIAGO LINS DA COSTA ALMEIDA

**Expressão dos Genes EGFR, PTEN, MGMT e IDH1/2 e dos
microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em
Neuroesferas em Linhagens de Glioblastoma Submetidos ao
Tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida**

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

THIAGO LINS DA COSTA ALMEIDA

**Expressão dos Genes EGFR, PTEN, MGMT e IDH1/2 e dos
microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em
Neuroesferas em Linhagens de Glioblastoma Submetidos ao
Tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica – Opção: Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior.

Ribeirão Preto

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Thiago Lins da Costa

Expressão dos Genes EGFR, PTEN, MGMT e IDH1/2 e dos microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em Neuroesferas em Linhagens de Glioblastoma Submetidos ao Tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

86 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia. Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior.

1. Glioblastoma. 2. Neuroesferas. 3. microRNA. 4. Genes
5. Temozolomida. 6. Radiação Ionizante.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Lins Da Costa Almeida

Expressão dos Genes EGFR, PTEN, MGMT e IDH1/2 e dos microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em Neuroesferas em Linhagens de Glioblastoma Submetidos ao Tratamento com Radiação Ionizante e Temozolomida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica – Opção: Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A todos os amigos pacientes que me confiaram a vida e permitiram-se fazer parte da minha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e pelo discernimento em conviver e aprender com todos.

Mais que em especial, agradeço a meus pais, **Jamacy e Rosane**, pela vida e pelo exemplo sólido que norteiam meus passos. Serei eterno exemplo da formação humana e do caráter que me deram em convívio, o qual ainda tenho o privilégio em usufruir e dividir esta conquista.

A minha família, meus parceiros irmãos **André e Jamacy Filho**, minha cunhada **Alessandra** e meus sobrinhos **Beatriz e Felipe**. Nossa saudosa ausência foi válida, e já estamos todos juntos para continuar celebrando a vida.

Ao **Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr**, orientador desta tese, minha gratidão pela oportunidade, crédito e paciência. Um grande exemplo de pesquisador, mentor e amigo fraterno. Serei permanentemente grato pelo crescimento profissional e pessoal.

À **Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli**, coorientadora desta tese, meu muito obrigado pelos ensinamentos científicos, pela dedicação profissional e pelo exemplo em agregar, estimular e valorizar o ser humano, incondicionalmente. Sua humildade e paixão pela pesquisa enobrece seus pares e orientandos.

À **Profa. Dra. Fernanda Maris Peria**, professora e amiga, que muito me ensinou sobre medicina, oncologia e pesquisa, com muita serenidade, estimulando e permitindo oportunidades para o meu aperfeiçoamento médico e humano. Agradeço pela inestimável contribuição a minha vida profissional.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Medeiros** pelo convite à iniciação em pesquisa já no início de minha graduação na Universidade Federal da Paraíba. Muito obrigado por sua contribuição ética, profissional e humana.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego** e a todos que fazem da Divisão e Serviço de Oncologia Clínica do HC-FMRP-USP pela atenção e carinho, em especial à querida **Sra. Leida**.

Ao grande amigo **Dr. Fernando Cotait Maluf** pelos ensinamentos e pela presente amizade. Um valioso exemplo profissional e humano a seguir.

À **Sra. Margarida Bliza** por ter gentil e gratuitamente me dedicado seus cuidados durante toda a residência médica e período de pós-graduação. Sua presença tornou tudo possível e mais lúdico.

Aos amigos **Fermino Sanches Lizarte Neto e Andressa Romualdo Rodrigues**, que sempre foram solícitos e compreensivos nos momentos pertinentes. Muito obrigado pelos valiosos ensinamentos.

A todos que fazem o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

RESUMO

Introdução: O glioblastoma multiforme é a neoplasia maligna primária mais prevalente do sistema nervoso central. Enquanto apresenta aumento em sua incidência, mantém a perspectiva de sobrevida global aproximada de 14 meses. **Objetivos:** O presente estudo objetiva avaliar a expressão dos genes EGFR, PTEN, MGMT e IDH1/2 e dos microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em neuroesferas (NE) e células aderidas (CA), a partir das linhagens celulares (T98G e U343) submetidas ao tratamento com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI) isolados e em associação (TMZ+RI). **Material e métodos:** As linhagens celulares T98G e U343 foram tratadas 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:** Observamos: a) o aumento na expressão do IDH1 após RI (4-fold) e TMZ+RI (5-fold) nas NE (T98G); o aumento na expressão do IDH2 (20-fold) nas NE (T98G), após TMZ, e do IDH2 (3-fold) nas CA (U343) submetidas à TMZ+RI; b) a redução na expressão do EGFR após TMZ; o aumento dessa expressão nas NE (T98G), após RI (2-fold) e TMZ+RI (3-fold), e a sua diminuição nas CA (U343) submetidas à TMZ e TMZ+RI; c) a redução na expressão PTEN nas NE (T98G), após TMZ e RI, e sua expressão nas NE (3-fold) frente à TMZ+RI; d) aumento na expressão de MGMT nas NE (T98G) nos grupos RI (10-fold) e TMZ+RI (25-fold). Quanto a expressão de miRNAs, foram identificados os seguintes resultados: a) as CA (U343) expressaram: miR-181b após TMZ (60-fold), RI (20-fold) e TMZ+RI (40-fold); e miR-128a após TMZ (500-fold), RI (200-fold) e TMZ+RI (600-fold); b) as NE (T98G) após TMZ+RI expressaram: miR-181b (30-fold), miR-149 (40-fold), miR-145 (300-fold) e miR-128a (40-fold); c) as NE (U343) após RI hiperexpressaram miR-149 e miR-145 (ambos em 4000-fold). **Conclusão:** A RI apresentou-se como fator independente e determinante para a radiorresistência das NE, entretanto não observamos ação de complementariedade de regulação dos oncomiRs observados sobre a expressão dos genes estudados. Esta é a primeira análise na literatura que correlaciona a expressão de genes e de miRNAs através das intervenções TMZ, RI e TMZ+RI sobre células aderidas e neuroesferas.

Palavras-chave: glioblastoma, neuroesferas, miRNA, genes, temozolomida, radiação ionizante

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme is the most prevalent primary malignant neoplasm of the central nervous system. It has increased its incidence, while the overall survival remains over 14 months. **Objectives:** This study aims to evaluate the expression of the following genes EGFR, PTEN, MGMT and IDH1/2 and microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 and miR-128a in adhered cells (AC) and neurospheres (NS) from cell lines (T98G and U343) which were submitted to temozolomide (TMZ) and ionizing radiation (IR), isolated and associated (TMZ + IR). **Methods:** The cell lines T98G and 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:** This study demonstrated: a) an improvement in the expression of IDH1 after IR (4-fold) and TMZ + IR (5-fold) in the NS (T98G); increased expression of IDH2 (20-fold) in the NS (T98G) after TMZ and IDH2 (3-fold) in AC (U343) submitted to TMZ + IR; b) reduction in EGFR expression after TMZ; increase this expression in NS (T98G) after IR (2-fold) and TMZ + IR (3-fold), and a decrease in AC (U343) submitted to TMZ and TMZ + IR; c) reduction in PTEN expression in NS (T98G) after TMZ and IR, and its improvement in NS (3-fold) when compared to TMZ + IR; d) increase in the expression of MGMT in NS (T98G) in IR groups (10-fold) and TMZ + IR (25-fold). It was also identified the expression of miRNAs results as: a) AC (U343) expressed more miR-181b after TMZ (60-fold), IR (20-fold) and TMZ + IR (40-fold); and miR-128a improved after TMZ (500-fold), IR (200-fold) and TMZ + IR (600-fold); b) NS (T98G) after TMZ + IR expressed: miR-181b (30-fold); miR-149 (40-fold); miR-145 (300-fold) and miR-128a (40-fold); c) NS (U343) after IR huge expressed miR-149 and miR-145 (both in 4000-fold). **Conclusion:** IR was an independent and determining radio resistance factor in NS. However, we observed no complementarity action of oncomiRs regulation. This is the first study in the literature correlating gene expression, and miRNAs through TMZ, IR and IR + TMZ interventions in AC and NS.

Keywords: glioblastoma, neurospheres, miRNA, genes, temozolomide, ionizing radiation.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Viabilidade celular da linhagem T98G 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** – Viabilidade celular da 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 3** – Expressão do gene IDH1 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.44
- Gráfico 4** – Expressão do gene IDH1 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 5** – Expressão do gene IDH2 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.46
- Gráfico 6** – Expressão do gene IDH2 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
- Gráfico 7** – Expressão do gene EGFR na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.48
- Gráfico 8** – Expressão do gene EGFR 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.48
- Gráfico 9** – Expressão do gene PTEN na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.50
- Gráfico 10** – Expressão do gene PTEN 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.50

Gráfico 11 – Expressão do gene MGMT na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.	52
Gráfico 12 – Expressão do microRNA miR-181b na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.	53
Gráfico 13 – Expressão do microRNA miR-181b 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	53
Gráfico 14 – Expressão do microRNA miR-149 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.	55
Gráfico 15 – Expressão do microRNA miR-149 na linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudado, neuroesferas e células aderidas.	55
Gráfico 16 – Expressão do microRNA miR-145 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.	57
Gráfico 17 – Expressão do microRNA miR-145 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.	57
Gráfico 18 – Expressão do microRNA miR-128a na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI), nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.	59
Gráfico 19 – Expressão do microRNA miR-129a 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.	59

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2HG	2-hydroxyglutarate
AKT ou PKB	Protein Kinase B
AMPc1	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCNU:	Nitrosuréia carmustina
bFGF	20ng/ml, Gibco®
CA	Células Aderidas
CCNU:	Nitrosuréia lomustina
cDNA	DNA complementar
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CT	Células-tronco
CTC	Células-tronco do Câncer
CTG	Células-tronco do Glioma
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
EIF2AK1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 1
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FGF	Fator de Crescimento Fibroblastos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GBM	Glioblastoma Multiforme
G-CIMP	Glioma CpG island methylator phenotype
HIF-1a	Hypoxia-Inducible Factor
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IDH1/2	Isocitrate Dehydrogenase
IL-6:	Interleucina
LGm6-GBM	Low grade m6 GBM
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MET	MET gene (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)
MGMT	O6-methylguanine-DNA Methyltransferase
miRNA ou miR	MicroRNAs
MMP-2:	Matrix metalloproteinase
MTIC	3-dimetil-1-triazeno imidazol-4-carboxamida
mTor:	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NE	Neuroesferas
NK-κB:	Factor nuclear kappa B
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDGFRA:	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Fosfatidil-Inositol-3-Quinase
PKB:	protein kinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
QT	Quimioterapia
RHOA:	Ras Homolog Family Member A)
RI	Radiação Ionizante

RNAm	RNA mensageiro
RQ-PCR:	PCR quantitativa em tempo real
RT	Radioterapia
SFB	Soro Fetal Bovino
SG:	Sobrevida global
siRNA:	Small interfering RNA
SLP:	Sobrevida livre de progressão
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 – Sinalização do EGFR via PI3K/Akt/mTor.	24
Figura 2 – Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.....	26
Figura 3 – Gliomagenese a partir das células tronco	29

ANEXOS

ANEXO 1: Expressão de genes e microRNAs na linhagem T98G	85
ANEXO 2: Expressão dos genes e microRNAs na linhagem U3243	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Glioblastoma multiforme.....	19
1.1.1 Epidemiologia dos tumores cerebrais e do GBM	19
1.1.2 Patogênese do GBM	20
1.1.3 Patogenia e diagnóstico do GBM	21
1.1.4 Classificação e subclassificação do GBM	22
1.2 Biologia molecular e o câncer	23
1.2.1 Mecanismos moleculares no GBM	23
1.2.1.1 EGFR	24
1.2.1.2 PTEN.....	25
1.2.1.3 MGMT	25
1.2.1.4 IDH1/2	25
1.3 microRNAs	26
1.3.1 Papel dos microRNAs no GBM	27
1.3.1.1 miR-181b.....	27
1.3.1.2 miR-145.....	27
1.3.1.3 miR-149.....	28
1.3.1.4 miR-128.....	28
1.4 Células-Tronco do câncer	28
1.4.1 Neuroesferas.....	30
1.5 Tratamento do GBM.....	30
1.5.1 Radioterapia	31
1.5.2 Quimioterapia	31
1.5.3 Tratamento multimodal do GBM.....	32
 2 JUSTIFICATIVA.....	 34
 3 OBJETIVOS.....	 35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
 4 HIPÓTESE	 36

5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Grupos experimentais	37
5.1.1 Grupo Controle	37
5.1.2 Grupo tratado com temozolamida	37
5.1.3 Grupo tratado com Radiação Ionizante	37
5.1.4 Grupo tratado com Radiação Ionizante associada à temozolomida.....	38
5.2 Cultivo celular	38
5.2.1 Linhagens celulares	38
5.2.2 Contagem de células em câmara de Neubauer	39
5.3 Estudos de expressão gênica e de miRNAs	40
5.3.1 Extração de RNA.....	40
5.3.2 Síntese do cDNA dos microRNAs: miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a	40
5.3.3 Síntese do cDNA dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN	41
5.3.4 PCR em tempo real	41
5.4 Análise estatística	42
 6 RESULTADOS.....	 43
6.1 Viabilidade celular	43
6.2 Expressão dos genes IDH1 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...44	
6.2.1 Expressão do gene IDH1 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	45
6.2.2 Expressão do gene IDH1 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	45
6.3 Expressão do gene IDH2 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...46	
6.3.1 Expressão do gene IDH2 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	47
6.3.2 Expressão do gene IDH2 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	47
6.4 Expressão dos genes EGFR nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...48	

6.4.1 Expressão do gene EGFR nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	49
6.4.2 Expressão do gene EGFR nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	49
6.5 Expressão do gene PTEN nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	50
6.5.1 Expressão do gene PTEN nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	51
6.5.2 Expressão do gene PTEN nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	51
6.6 Expressão do gene MGMT nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	52
6.6.1 Expressão do gene MGMT nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	52
6.7 Expressão do microRNA miR-181b nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	53
6.7.1 Expressão do miR-181b nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	54
6.7.2 Expressão do miR-181b nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	54
6.8 Expressão do microRNA miR-149 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	55
6.8.1 Expressão do miR-149 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	56
6.8.2 Expressão do miR-149 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	56

6.9 Expressão do microRNA miR-145 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	57
6.9.1 Expressão do miR-145 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	58
6.9.2 Expressão do miR-145 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	58
6.10 Expressão do microRNA miR-128a nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados...	59
6.10.1 Expressão do miR-128a nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	60
6.10.2 Expressão do miR-128a nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI).....	60
6.11 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a	60
6.11.1 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem T98G.....	60
6.11.2 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem U343	61
6.11.3 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem U343 e T98G	61
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÕES	71
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERENCIAS.....	73
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) é acometido por diferentes tipos de tumores. Aproximadamente 50% são tumores que se originam primariamente no cérebro, sendo que 25% desses desenvolvem-se com características malignas. Esses tumores malignos primários do SNC correspondem a menos de 2% entre todas as neoplasias malignas em adultos; entretanto isso representa cerca de 180 mil novos casos anualmente em todo o mundo (RIES et al., 2007; PORTER et al., 2010; OSTROM QT et al., 2015; HOWLADER et al., 2013; NCCN, v1.2015).

1.1 Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é a principal neoplasia maligna primária do SNC. Suas características celulares e histológicas resultam em sobrevida global (SG) mediana de apenas 15 a 18 meses, com prejuízo significativo à qualidade de vida de seus portadores (STUPP et al., 2010). Atualmente apenas 33% dos pacientes permanecem vivos em um ano, e menos de 5% alcançam os cinco anos de sobrevida após o diagnóstico (OSTROM QT et al., 2015; NCCN, v1.2015).

1.1.1 Epidemiologia dos tumores cerebrais e do GBM

Entre os cânceres primários do cérebro, cerca de 80% são tumores malignos classificados como gliomas, de modo que o GBM corresponde a 54% deste total (LOUIS et al., 2007; WEN et al., 2008; NCCN, v1.2015). Os GBM apresentam maior incidência sobre o sexo masculino, os caucasianos e os indivíduos com idade superior a 50 anos (STUPP et al., 2010; OSTROM QT et al., 2015), com pior prognóstico àqueles com maior idade e reduzido desempenho funcional (CURRAN et al., 1993; BERTOLINI et al., 2012).

Dados do *Central Brain Tumor Registry of the United States* (2008-2012) registraram uma incidência de 3,4 e de 7,2 novos casos de tumores cerebrais malignos por 100.000 pessoas-ano, no mundo e nos Estados Unidos respectivamente (OSTROM QT et al., 2015). Dados do *National Cancer Institute* registraram uma incidência de 6,5 novos casos de tumores cerebrais por 100.000 pessoas-ano, enquanto, também para 2014, foram estimados 24 mil novos casos de

tumores malignos primários no SNC (HOWLADER et al., 2013; OSTROM QT et al., 2015). Esses dados sinalizam, aproximadamente, 25 mil novos casos de tumores cerebrais em 2016 e, por consequência, cerca de 16 mil novos óbitos relacionados aos tumores cerebrais (NCCN, v1.2015; OSTROM QT et al., 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

No Brasil, para o ano de 2016, o Instituto Nacional de Câncer estima 5.440 casos novos de tumores cerebrais em homens e 4.830 em mulheres (INCa, 2016). Essas estimativas apontam o crescimento do risco absoluto de 5 para 5,5 casos novos a cada 100 mil homens e de 4 para 4,7 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCa, 2013; INCa, 2015). Ademais, as estimativas nacionais tendem a acompanhar a epidemiologia mundial em progressiva prevalência, em incidência e em morbimortalidade.

Algumas possíveis explicações para a epidemiologia crescente estão em: o aumento da longevidade populacional; o controle das morbidades e a redução da mortalidade, favorecendo a senescência celular associada à instabilidade gênica; a redução da imunocompetência e do reparo ineficaz do material nuclear. Em paralelo à reestruturação da pirâmide populacional, ocorre uma maior acurácia e disseminação de exames, de técnicas e de abordagens para o diagnóstico dos tumores cerebrais, em especial, para o GBM (CHRISTENSEN et al., 2003; HESS et al., 2004; PORTER et al., 2010).

1.1.2 Patogênese do GBM

O GBM surge a partir da carcinogênese de células da neurógliia chamadas de astrócitos, que são células de sustentação e de nutrição dos neurônios. Resulta da adição de mutações consecutivas que promoverão o crescimento e o desenvolvimento desordenado de um clone tumoral (SINGH et al., 2004). Esse clone de GBM evolui com hiper celularidade, com caráter infiltrativo, com pleomorfismo celular e nuclear, além de áreas com proliferação vascular e necrose de coagulação (LOUIS et al., 2007). Dessa forma, apresenta-se como uma massa heterogênea constituída de áreas sólidas, císticas e hemorrágicas, com área necrótica central, circundada por proliferação anaplásica e envolta pela neoangiogênese nutridora. Esses achados histopatológicos caracterizam seu perfil indiferenciado, agressivo e maligno, classificando o GBM como grau IV quanto à diferenciação celular tumoral

(tumor bastante indiferenciado), justificando ser denominado como “multiforme” (KLEIHUES et al., 2002; LOUIS et al., 2007).

Apesar de sua patogênese não estar completamente esclarecida, especula-se que sua iniciação e promoção estejam relacionadas com a senescência, com o tabagismo, com a dieta, com o vírus (citomegalovírus e SV40), com a irradiação ionizante e com a exposição ocupacional (cloreto de polivinil). Entretanto verifica-se também sua associação em síndromes hereditárias de predisposição ao câncer (Neurofibromatose, Esclerose Tuberosa, Von Hippel-Lindau, Turcot e Li-Fraumeni) (LOUIS et al., 2007; NCCN, v1.2015). Ademais, seus fatores de risco e de causa permanecem imprecisos, desfavorecendo métodos de prevenção, de rastreamento e de cura.

1.1.3 Patogenia e diagnóstico do GBM

O GBM apresenta efeito expansivo sobre as estruturas vizinhas e o aumento da pressão intracraniana que se relacionam com a agressividade tumoral e repercutem sobre o exame clínico, caracterizado pela perda funcional das áreas acometidas (LOUIS et al., 2007). Frequentemente surge na substância branca do cérebro e predomina nas regiões frontal e parietal, resultando em graves alterações cognitivas e comportamentais (KLEIHUES et al., 2002). Entretanto pacientes oligossintomáticos também podem apresentar o diagnóstico de grandes massas tumorais, muitas vezes devido ao crescimento lento. Assim os exames complementares de imagem (tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) auxiliam no processo de investigação diante da suspeita tumoral, no monitoramento da resposta ao tratamento, no seguimento e na recorrência (STUPP et al., 2010; NCCN, v1.2015).

O diagnóstico preciso, apesar dos sinais clínicos e dos achados radiológicos, ocorre apenas após análise histopatológica a partir do material de biópsia estereotáxica ou da ressecção cirúrgica. Entretanto, devido à heterogeneidade da massa tumoral, essas análises podem discordar em cerca de 50% dos casos (HART et al., 2000; STUPP et al., 2010; NCCN, v1.2015). Nesse contexto, busca-se um conhecimento aprofundado e detalhado sobre o GBM, principalmente, quanto aos mecanismos moleculares envolvidos, para diagnóstico e tratamento mais eficazes e menos agressivos quanto às sequelas neurológicas e aos efeitos colaterais.

1.1.4 Classificação e subclassificação do GBM

Publicadas nos anos 1979, 1993 e 2000, pela Organização Mundial de Saúde, a classificação dos tumores do SNC fundamentava-se em fatores biológicos, como: proliferação, infiltração, índice mitótico, atipia nuclear e necrose. Em 2007, esse consenso incorporou as características histopatológicas e os marcadores de imunohistoquímica, racionalizando seus valores preditivos e prognósticos para um diagnóstico mais preciso (LOUIS et al., 2007). Nesse sentido, os GBM podem ser classificados histologicamente em GBM de células gigantes, em GBM de pequenas células, em gliossarcoma e em GBM com componente oligodendroglial (KLEIHUES et al., 2002; LOUIS et al., 2007).

Adicionalmente, análises genéticas e epigenéticas contribuíram para o melhor entendimento de seus mecanismos moleculares. Assim evidenciamos os resultados do Atlas do Genoma do Câncer - TCGA (CGARN, 2008) e o surgimento da ferramenta DecisionDx-GBM, que buscam avaliar o prognóstico do portador de GBM com a análise de genes preditos (ALLINGHAM-HAWKINS et al., 2010).

Nesse contexto, inicialmente foi proposta uma nova classificação que busca caracterizar o GBM em subtipos, principalmente, quanto a sua identidade molecular. Assim classificam-se: o subtipo “clássico”, que se identifica pela amplificação do EGFR e mutações no TP53; o subtipo “mesenquimal”, que apresenta mutações no PTEN; o subtipo “pro-neural”, que se caracteriza com as mutações em IDH1 e em alterações em PDGFRA e com as mutações em TP53; e o subtipo “neural”, no qual há marcadores neuronais, como NEFL e SYT1 (VERHAAK et al., 2010).

Recentemente identificou-se que os gliomas mutados nos genes IDH, TP53 e com codeleção 1p19q, apresentaram prognóstico mais favorável (DANIEL et al., 2015). Além disso, foi evidenciado que os gliomas divergem seu prognóstico frente ao polimorfismo das mutações IDH (mutado e não mutado), codeleção do 1p19q (Codel) e metilação do MGMT (G-CIMP high e G-CIMP low). Nesse sentido, uma nova classificação foi sugerida entre sete subgrupos moleculares distintos: G-CIMP-low, G-CIMP-high, Codel, Classic-like, Mesenchymal-like, LGm6-GBM e PA-like (CECCARELLI et al., 2016). Em 2016, a Organização Mundial de Saúde deverá incorporar essas recentes descobertas à nova classificação dos tumores do SNC.

1.2 Biologia molecular e o câncer

O dogma central da biologia molecular, no qual o DNA (gene) é transcrito em RNAmensageiro (RNAm), que é traduzido em proteínas, norteou as pesquisas moleculares e a engenharia genética durante décadas (WATSON, CRICK, 1953). Nesse contexto, a carcinogênese era atribuída principalmente ao desequilíbrio entre os oncogenes e os genes supressores de tumor. Posteriormente, os microRNAs (miRNA ou miR) foram descobertos como moléculas capazes de regular a expressão gênica, incluindo a autorregulação dos genes relacionados ao câncer (LEE et al., 1993). A melhor compreensão da carcinogênese molecular, através da interação entre genes e miRNAs, permitiu uma maior percepção da complexidade desse processo, bem como de seu real potencial para o tratamento do câncer.

1.2.1 Mecanismos moleculares no GBM

O processo de regulação gênica normal é alterado durante a carcinogênese, em que temos uma superexpressão de vias oncogênicas e uma remissão de vias supressoras de tumor. Como resultado final, observamos a proliferação, a diferenciação, a invasão, a migração e a metástase tumoral. Estudos recentes evidenciaram que genes e miRNAs específicos podem desempenhar papéis fundamentais no GBM, através de vias de regulação que comandam e perpetuam sua carcinogênese (VENNETI et al., 2013; BURRIS, 2013).

Entre as moléculas com expressão alterada, estão: tirosino-quinases de membrana celular, como o EGFR (*epidermal growth factor receptor*); enzimas citoplasmáticas das vias de sinalização MAPK (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase*); enzimas de sinalização PI3K (*fosfatidil-inositol-3-quinase*), e AKT (ou PKB – *protein kinase B*), que apresentam autodesempenho exacerbado (Figura 1)

Fonte: Figura adaptada de Discov Med. 2012 Sep;14(76):207-14.

Figura 1 – Sinalização EGFR via PI3K/Akt/mTor. A ativação do EGF induz a fosforilação da PI3K, recrutando as moléculas AKT e mTor para sinalização efetora sobre o DNA, levando a proliferação celular, a angiogênese, a migração e a invasão.

Essa superativação determina uma hiperreplicação celular através do maquinário de ciclinas e de ciclinas dependente de quinases, as quais impedem a latência celular da fase G1 para fase S, perpetuando o clone tumoral com a mutação carcinogênica. Entretanto esse produto também é regulado por cofatores supressores tumorais, como o PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), a IDH1/2 (*isocitrate dehydrogenase*) e pela regulação epigenética da enzima MGMT (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) (LINO et al., 2011; CAMARA-QUINTANA et al., 2012). Em suma, as principais alterações moleculares relacionadas à oncogênese dos gliomas são os genes: EGFR (HEGI et al., 2012), PTEN (KOUL, 2008), MGMT (CAMARA-QUINTANA et al., 2012) e IDH1/2 (VENNETI et al., 2013), os quais serão descritos.

1.2.1.1 EGFR

A amplificação do EGFR ocorre em cerca de 50% dos GBM, principalmente decorrente de sua mutação como variante III (EGFRvIII) (OHGAKI e KLEIHUES, 2007). A hiperexpressão dessa proteína transmembrana resulta na ativação da via PI3K-Akt-mTor sob a supressão contrarreguladora do PTEN (FREDERICK et al.,

2000; BACHOO et al., 2002). Estudos anteriores demonstraram que o aumento da expressão do EGFR promove radiorresistência, enquanto a diminuição da sinalização dessa via torna as células do GBM mais sensíveis à radiação e a quimioterapia (QT) (O'ROURKE et al., 1998; LI et al., 2004).

1.2.1.2 PTEN

Cerca de 40% dos GBM têm mutação no gene PTEN no cromossomo 10q23 (OHGAKI e KLEIHUES, 2007), sendo um de seus polimorfismos mais frequentes. O PTEN é um supressor tumoral capaz de inibir a proliferação tumoral e a sobrevivência celular através da inativação da via PI3K. A perda da atividade supressora do PTEN permite o descontrole dessa via de carcinogênese (OHGAKI e KLEIHUS, 1999; XIE et al., 2005).

1.2.1.3 MGMT

O gene MGMT está localizado no cromossomo 10q26 e transcreve a enzima MGMT – enzima de reparo molecular responsável por desfazer o dano causado pela metilação do DNA (GERSON, 2004). A MGMT possui a capacidade de remover os grupos alquila da posição O6 da guanina no DNA, danificados anteriormente pelos quimioterápicos alquilantes. Essa propriedade é responsável pela resistência aos quimioterápicos alquilantes promotores de metilação, como a temozolomida (HEGI et al., 2004; HEGI et al., 2005). Atualmente, o perfil epigenético dessa metilação da MGMT é um importante fator prognóstico e preditivo para a eficácia da temozolomida, sendo favorável para o prognóstico de sobrevivência clínica, de acordo com a melhor eficácia terapêutica quando “metilado”. Estima-se que a MGMT esteja metilada em cerca de 35% dos GBM (STEWART, 2002; GERSON, 2004; STUPP et al., 2009; NICHOLAS et al., 2011).

1.2.1.4 IDH1/2

A enzima mitocondrial isocitrato desidrogenase é um produto gênico que catalisa o isocitrato para 2-cetoglutarato via descarboxilação oxidativa, no processo de redução da NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Apresenta-se mutada no cromossomo 2q33 em aproximadamente 12% dos GBM, permitindo desregular a neoangiogênese na via HIF-1a (*hypoxia-inducible factor*) e promover a

oncogênese pela via 2HG (*2-hydroxyglutarate*) (VERHAAK, 2010). Essas mutações somáticas são raras, mas conferem melhor prognóstico clínico para sobrevida global e sobrevida livre de progressão (SLP) (WESTPHAL e LAMSZUS, 2011).

1.3 microRNAs

Os miRNAs são RNAs moduladores dos genes e das vias de regulação na pós-transcrição do DNA. São pequenas moléculas constituídas por aproximadamente 22 nucleotídeos (CHEN et al., 2007). Sua biogênese tem origem no núcleo, em que inicialmente apresenta-se como uma estrutura secundária em dupla fita estruturada em forma de alça ou grampo (*hairpin*). Atinge sua estrutura madura e sua função ativa no citoplasma, em que atuam através de adesão por complementariedade sobre o RNAm alvo, resultando na supressão ou na degradação do RNAm com o silenciamento de sua atividade mensageira (ZHANG, et al., 2007; BARTEL, 2009). Dessa forma, a expressão de miRNAs pode ter função de supressão tumoral ou oncogênica, normalmente como resultado do controle oposto à ação primária do RNAm silenciado (BARTEL, 2004; MEISTER et al., 2004; LIM et al., 2005) (Figura 2).

Fonte: Adaptado de Int J Mol Sci. 2016 Mar; 17(3): 280.

Figura 2 – Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

1.3.1 Papel dos microRNAs no GBM

Atualmente é descrita a expressão de 245 miRNAs implicados na carcinogênese de GBM (AMBROS, 2008; CHAUDHRY et al., 2010). Enquanto mais de 30% dos genes são regulados por no mínimo um miRNA, cada miRNA pode ter centenas ou milhares de alvos para regulação (IORIO e CROCE, 2009). Além disso, dependendo do contexto celular, o mesmo miRNA pode exibir atividade oncogênica e supressora tumoral (SASSEN et al., 2008).

Além de observar diferenças entre os perfis de expressão de miRNAs em tecido normal e em tecido tumoral, evidenciaram-se modificações no padrão dessa expressão induzidos por radioterapia (RT) e por quimioterapia (QT) (BURRIS, 2013). Entre a população de miRNAs existente, os miR-181b (KARSY et al., 2012), os miR-145 (SIAJA et al., 2013), os miR-149 (HU et al., 2009) e os miR-128a (GODLEWSKI et al., 2008) se destacam por seus papéis no GBM.

1.3.1.1 miR-181b

O miR-181b participa das vias de gliomagenese e de resistência aos tratamentos. Verifica-se uma redução na expressão do miR-181b na carcinogênese, sugerindo seu papel supressor em declínio, enquanto observou-se uma repressão de sua expressão quando expostos a radiação ionizante (SLABY et al., 2010). Além disso, a transfecção com miR-181b mostrou reduzir a carcinogênese e aumentar a radiosensibilidade; a expressão do miR-181b foi reduzida nos pacientes que responderam ao tratamento combinado de RT+QT ($p = 0,016$), frente à ausência de interferência da metilação do MGMT e dos miR-21 e miR-221/222 nesse cenário (LAKOMY et al., 2011). Dessa forma, o miR-181b apresenta-se como importante marcador prognóstico e como possível alvo terapêutico (SHI et al., 2008; KARSY et al., 2012).

1.3.1.2 miR-145

O miR-145 desempenha função na supressão tumoral, observando-se um bloqueio na fase S do ciclo celular (LEE et al., 2013). De outro modo, a redução na expressão do miR-145 permite a hiperexpressão de genes envolvidos com

proliferação (ciclinas, c-myc e N-myc), com adesão e com invasão (N-cadherin e E-cadherin) (RANI et al., 2013). Esse miR encontra-se hipoexpresso no GBM comparado aos gliomas de baixo grau ($p < 0,05$) e ao tecido neural sadio ($p < 0,0001$), com impacto na sobrevivência celular, de modo que, a elevada expressão do miR-145 relaciona-se com uma melhor sobrevivência ($p < 0,005$) (SIAJA et al., 2013).

1.3.1.3 miR-149

O miR-149 também está envolvido nas vias de regulação da carcinogênese (HU et al., 2009; HSI-FENG TU et al., 2012; YING WANG et al., 2012). Quando hiperexpresso, o miR-149 reprime a proliferação, a migração e a invasão tumoral dos astrocitomas (LI et al., 2011). Já quando hipoexpresso, permite uma diferenciação tumoral e sua perpetuação, principalmente relacionados à via AKT (LAGES et al., 2011; PAN et al., 2012).

1.3.1.4 miR-128

O miR-128 é descrito como um miR supressor da via EGFR (PAPAGIANNAKOPOULOS et al., 2012). Recentemente esse miR foi descrito como hipoexpresso no sangue periférico (SP) de pacientes com GBM, considerado um importante biomarcador diagnóstico e prognóstico (ROTH et al., 2011). Também possui um sugestivo papel na progressão e na recorrência da doença, com elevada sensibilidade (90%) e especificidade (100%) do teste (WANG et al., 2012). Adicionalmente, o miR-128 envolve-se no bloqueio da via de autorreplicação das células tronco do câncer (GODLEWSKI et al., 2008). Digno de nota, a nomenclatura miR-128 refere-se ao mesmo que miR-128a.

1.4 Células-Tronco do câncer

As células-tronco (CT) participam da embriogênese e persistem ativas para a manutenção dos órgãos e tecidos ao longo da vida. Elas se caracterizam pelas propriedades de autorrenovação e de pluripotência (CRAIG et al., 2006). Recentemente, descobriu-se que os tumores malignos também possuem as suas próprias células-tronco, classificadas como células-tronco do câncer (CTC). Digno de

nota, as CTC podem se envolver com a origem e a recorrência do GBM, sendo assim, denominadas de células tronco do GBM (CTG) (SINGH et al., 2004; CHARGARI et al., 2012; BINDA et al., 2012; LIU et al., 2013). Essas evidências sinalizaram que um glioma pode-se constituir e surgir a partir de CTG, as quais poderiam permanecer em quiescência até a carcinogênese do GBM (DIRKS et al., 2008; HUANG et al., 2010). Assim, as CTG mostram-se implicadas na carcinogênese e na recorrência tumoral do GBM, através de sua autoproliferação desregulada (GÓMEZ, 2011).

Fonte: Adaptado de Int J Mol Sci. 2016 Mar; 17(3): 280.

Figura 3 – Gliomagenese a partir de células tronco: As células tronco neurais (CTN) naturais originam células multipotenciais, que formarão neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e gliomas (através de células precursoras de astrocitomas e oligodendrogliomas). As células tronco do glioma (CTG) originarão CTN e CTG progenitoras, que formarão o glioma maligno especialmente o GBM.

Em relação à resposta terapêutica, as CTG mostraram-se radorresistentes (BAO et al., 2006) e quimiorresistentes (AL HAJJ et al., 2004; BACCELLI, TRUMPP, 2012), apresentando capacidade superior de reparo aos danos do DNA, quando expostas ao estresse celular (BAO et al., 2006; BEIER et al., 2011; LIMA et al., 2012). Neste contexto, diversos mecanismos de regulação gênica, incluindo os

miRNAs, passaram a ser estudados com o intuito de obter uma melhor eficácia do tratamento (SUH et al., 2004; BEIER et al., 2007; CHAUDHRY et al., 2010; GÓMEZ et al., 2011). Dessa forma, verificou-se que as CTG possuem um perfil de expressão particular de genes e de miRNAs (BAO et al., 2006; CHARGARI et al., 2012) e que, através de estudos de indução ou de interferência sobre genes e miRNAs, as CTG poderiam contribuir para a otimização no tratamento do GBM (DESANO, XU, 2009; SI et al., 2007). No entanto, até o momento, não existem modalidades de tratamento que considerem ou cujo alvo específico sejam as CTG em GBM.

1.4.1 Neuroesferas

As neuroesferas (NE) são agregados celulares obtidos *in vitro* e são descritas em gliomas como uma subpopulação das CTG (SINGH et al., 2004). Possuem capacidade de proliferação e de expansão em condições pré-estabelecidas (ausência de soro e presença de fatores de crescimento específicos), e representam um importante modelo experimental para estudos das CTG (CRAIG et al., 2006; REYNOLDS et al., 1992).

No GBM, são encontradas menos que 1% de NE viáveis em linhagens primárias do cérebro (SINGH et al., 2003). Apesar da mínima representatividade, essas células possuem plenas propriedades de diferenciação heterogênea e de proliferação ilimitada, sendo consideradas como potenciais responsáveis pela resistência e pela recorrência do GBM (REYNOLDS et al., 1992; DONG, HUANG, 2011).

1.5 Tratamento do GBM

O tratamento padrão do GBM é fundamentado na abordagem multidisciplinar. A ressecção cirúrgica é o tratamento inicial universal, a qual busca a citorredução tumoral máxima e segura. Essa ressecabilidade é fator determinante e independente para o correto diagnóstico da massa clonal heterogênea e, principalmente, para o melhor prognóstico do paciente, quando passível de remoção cirúrgica completa da lesão (LAWS et al., 2003; PARK et al., 2009).

No entanto, a ressecção completa nem sempre é alcançada, devido ao comportamento microinvasor próprio do tumor que acomete áreas eloquentes e

imprescindíveis à vida, às funções específicas e à qualidade de vida. Essas limitações tornam o GBM incurável cirurgicamente, favorecendo a recidiva locorregional, precoce ou tardia (NCCN, v1. 2015).

1.5.1 Radioterapia

Com o objetivo de reduzir as taxas de recorrência local, a RT se consolidou como uma importante ferramenta no tratamento do GBM. A RT é a terapia baseada na emissão de radiação ionizante sobre uma área alvo como campo de tratamento planejado, correspondente a borda – ou margem – da lesão ressecada somada a uma margem de segurança, como tratamento antitumoral. O principal efeito celular das radiações ionizantes consiste em danos à molécula de DNA tumoral, seja direto ou indireto, provocados por elétrons livres e por radicais livres (BERNSTEIN et al., 1981). Após exposto à radiação, o DNA intracelular apresenta danos em bases nitrogenadas e em quebras em filamentos da dupla-hélice. Entretanto as células têm mecanismos enzimáticos de reparo, que determinam sua radiosensibilidade e sua radiorresistência (SALVAJOLI et al., 1999).

A RT realizada, após a ressecção cirúrgica, permitiu uma redução em 19% da mortalidade no primeiro ano de seguimento (WALKER et al., 1978). Esses pacientes alcançaram uma sobrevida de 42%, de 17% e de apenas 3,3%, aos seis meses, a um ano e a dois anos respectivamente (OHGAKI et al., 2004). Como observado, a RT não apresenta eficácia completa como tratamento de consolidação para GBM. Além disso, pode agravar lesões neurais, que favoreçam a piora cognitiva e a redução na qualidade de vida desse paciente já crítico (SOUHAMI et al., 2004).

1.5.2 Quimioterapia

A administração das nitrosuréias carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU) resultava apenas em ganho marginal para SLP no tratamento de GBM, sem incremento na SG, e à custa de graves e de frequentes eventos adversos (THOMAS et al., 2001; STEWART et al., 2002). A descoberta do alquilante temozolomida (TMZ) favoreceu o aumento na SLP e, principalmente, na SG com aceitável toxicidade (STUPP et al., 2002; STUPP et al., 2005; STUPP et al., 2009).

A TMZ é um quimioterápico alquilante do grupo triazeno imidazólico, não nitrosuréia; é uma pró-droga derivada do DTIC (*5-(3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida*) que se converte na forma ativa MTIC (*3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida*) o qual atua inserindo um grupo -alquil (-metil) no DNA, isto é, ele alquila (metila) o DNA no aminoácido guanina do nucleotídeo, resultando em agressão ao DNA, ativando o maquinário, para o reparo celular desse dano ou a encaminha para a apoptose (NEWLANDS et al., 1997). Seus resultados apresentam-se ainda mais favoráveis naqueles com a MGMT “metilada” (STUPP et al., 2009), a qual está insuficiente para este reparo, mesmo que hiperexpressa.

1.5.3 Tratamento multimodal do GBM

A melhor compreensão dessas ferramentas terapêuticas consolidou o tratamento combinado de cirurgia (com máxima ressecção possível), seguida de RT+TMZ e a continuidade da TMZ como tratamento padrão contra o GBM (STUPP et al., 2005). Os resultados evidenciaram um ganho de 2,5 meses na SG mediana, evoluindo de 12,1 para 14,6 meses, em relação à terapia apenas com radiação ionizante. Além disso, alcançou taxas de sobrevida aos dois anos de 10,4% para 26,5%, favorável àqueles submetidos ao tratamento combinado (STUPP et al., 2009). Apesar de discreto, esse ganho em SG foi estatisticamente significativo e mudou o paradigma no tratamento dos GBM: a sobrevida migrou de 17% para 58% aos 12 meses, e de 3,3% para 31% aos 2 anos (OHGAKI et al., 2004; STUPP et al., 2005; STUPP et al., 2009). Em suma, o tratamento padrão vigente para o GBM não resulta em cura, bem como permite sua recorrência (STUPP et al., 2005; BEIER et al., 2011; CHISTIakov et al., 2012).

As pesquisas sobre genes e miRNAs, implicados nas vias moleculares da carcinogênese, favorecem a busca de terapêuticas mais eficazes no tratamento inicial e na recorrência (DIRKS, 2005; KRAKSTAD et al., 2010). Nesse contexto, acredita-se que as CTG sejam as responsáveis pela resistência ao tratamento e pelo restabelecimento do tumor (YU et al., 2008; BEIER et al., 2007; MICHELI et al., 2009). É mister também uma melhor caracterização quanto ao comportamento biológico das CTG (neurosferas) e das células do GBM, quando expostas aos tratamentos vigentes.

Atualmente uma das frentes da pesquisa translacional busca identificar alvos moleculares potenciais, para intervenção terapêutica, modulando a regulação de genes (oncogenes, genes supressores e genes de reparo) e de miRNAs correguladores nas células tumorais do GBM e das CTG. Paralelamente o acompanhamento clínico criterioso e sistematizado dos pacientes com GBM permite identificar subgrupos de pacientes e informações clínicas, radiológicas e histopatológico-moleculares que norteiem as possíveis vias envolvidas nesse processo de invasão e de resistência tumoral. Dessa forma, busca-se enumerar fatores preditivos e prognósticos, para uma possível intervenção personalizada, principalmente, frente à perspectiva de melhores resultados e de menores toxicidades.

2 JUSTIFICATIVA

Reconhecendo que o melhor tratamento padrão atual é ineficaz para o controle e a cura do GBM, bem como considerando a adição do conhecimento molecular na gliomagenese e na recorrência do GBM, nosso estudo incorpora as descobertas da interação entre genes e miRNAs, nas células tumorais e nas células tronco tumorais, especialmente, a fim de compreender a relação dessas interações frente às modalidades terapêuticas vigentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica do EGFR, do PTEN, do MGMT e do IDH1/2, e a expressão dos microRNAs: miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a em neuroesferas e em células aderidas em linhagens celulares de glioblastoma, submetidas ao tratamento com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos genes: MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados;
- Avaliar a expressão dos miRNAs: miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados;
- Relacionar os resultados de expressão gênica com os resultados de expressão dos miRNAs;
- Investigar possíveis variáveis de resistência, e a existência de fatores preditivos aos tratamentos utilizados: temozolomida e radiação ionizante, isolados e associados.

4 HIPÓTESE

H_0 - A radiação ionizante e a quimioterapia favorecem a recidiva tumoral, através da ativação de genes e de miRNAs oncogênicos nas células tronco tumorais.

5 MATERIAL 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 e T98G, 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.

5.1 Grupos experimentais

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

5.1.1 Grupo Controle

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

5.1.2 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.

5.1.3 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.

5.1.4 Grupo tratado com Radiação Ionizante associada à temozolomida

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.

5.2 Cultivo celular

5.2.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares foram estocadas em nitrogênio líquido (-196°C), em alíquotas de 1×10^6 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 cm^2 (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 CO_2 , até atingirem uma confluência de 1×10^6 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 tripsinização, 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 1×10^5 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.

5.2.2 Contagem de células em câmara 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 $0,1 \text{ mm}^2$. 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 $0,1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$ 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 $1 \times 10^4 \text{ ml}$ (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.

5.3 Estudos de expressão gênica e de miRNAs

5.3.1 Extração de RNA

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.

5.3.2 Síntese do cDNA dos microRNAs: miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a

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 MultiScribe™, 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 ° C, trinta minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 ° 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.

5.3.3 Síntese do cDNA dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN

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 MultiScribe™, completando com água DEPC o volume final de 20µl.

5.3.4 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 normalizados. 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 Δ CT. Os valores de Δ CT 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 Δ CT de uma amostra do Δ CT 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Realizamos a quantificação relativa dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN, e dos microRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a, 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*”.

5.4 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.

6 RESULTADOS

6.1 Viabilidade celular

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 1 – Viabilidade celular da linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 2 – Viabilidade celular da linhagem U343 no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

6.2 Expressão dos genes IDH1 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 3 – Expressão do gene IDH1 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados: neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 4 – Expressão do gene IDH1 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.

6.2.1 Expressão do gene IDH1 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) A exposição à TMZ não resultou em modificação da expressão do IDH1, quando comparado ao grupo controle.
- b) A intervenção com RI produziu aumento significativo na expressão IDH1 (4-fold) nas NE, quando comparados aos grupos: CA tratadas com RI, CA tratadas com TMZ+RI, TMZ (isolada) e controle.
- c) Também observamos aumento de expressão de IDH1 (5-fold) no grupo NE tratadas com TMZ+RI, quando comparados aos grupos: CA tratadas com TMZ+RI, CA tratadas com RI, TMZ (isolada) e controle.

6.2.2 Expressão do gene IDH1 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão de IDH1 nas CA em todos os grupos de tratamento, quando comparados às NE em todos os grupos de tratamento.
- b) A exposição à TMZ resultou em maior expressão de IDH1 (1,5-fold) nas CA, quando comparados as NE (0,5-fold).

6.3 Expressão do gene IDH2 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 5 – Expressão do gene IDH2 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 6 – Expressão do gene IDH2 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.

6.3.1 Expressão do gene IDH2 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos aumento de expressão de IDH2 (20-fold) nas NE submetidas à TMZ+RI, quando comparadas aos demais grupos, tanto nas CA quanto nas NE.

6.3.2 Expressão do gene IDH2 nas células aderidas (CA) e neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) No grupo controle, não houve diferença na expressão do IDH2 entre as CA (1,0-fold), quando comparadas as NE (1,0-fold).
- b) A exposição à TMZ e a RI não resultou em modificação na expressão de IDH2 nas CA e nas NE, entre si e em relação ao grupo controle.
- c) A exposição combinada (TMZ+RI) resultou em aumento na expressão de IDH2 nas CA (3-fold), quando comparadas às NE tratadas com (TMZ+RI) e aos outros grupos.

6.4 Expressão dos genes EGFR nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 7 – Expressão do gene EGFR na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 8 – Expressão do gene EGFR 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.

6.4.1 Expressão do gene EGFR nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos uma diminuição na expressão de EGFR tanto nas CA quanto nas NE quando submetidas ao tratamento com TMZ.
- b) Também observamos um aumento na expressão de EGFR nas NE tanto no grupo RI (2-fold) quanto no grupo TMZ+RI (3-fold).

6.4.2 Expressão do gene EGFR nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Nos grupos controle e RI, a expressão EGFR foi semelhante nas NE e na CA.
- b) Quando expostas à TMZ, houve diminuição na expressão do EGFR nas CA dos grupos TMZ e TMZ+RI, quando comparados às NE dos mesmos grupos.

6.5 Expressão do gene PTEN nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 9 – Expressão do gene PTEN na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 10 – Expressão do gene PTEN 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.

6.5.1 Expressão do gene PTEN nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Quando submetidos à TMZ e RI, isoladamente, observamos a diminuição nos níveis de expressão de PTEN nas NE.
- b) Observamos o aumento de expressão de PTEN nas NE (3-fold), quando comparadas aos outros grupos tanto nas CA quanto nas NE.

6.5.2 Expressão do gene PTEN nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento nos níveis de expressão de PTEN nas NE submetidas ao tratamento com RI, quando comparadas às CA tratadas com RI, assim como os demais grupos.

6.6 Expressão do gene MGMT nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 11 – Expressão do gene MGMT na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

6.6.1 Expressão do gene MGMT nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão de MGMT nas NE nos grupos RI (10-fold) e TMZ+RI (25-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e de CA.

6.7 Expressão do microRNA miR-181b nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 12 – Expressão do microRNA miR-181b na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 13 – Expressão do microRNA miR-181b 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

6.7.1 Expressão do miR-181b nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão de miR-181b nas NE no grupo TMZ+RI (30-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e CA.

6.7.2 Expressão do miR-181b nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão de miR-181b nas CA nos grupos TMZ (60-fold), RI (20-fold) e TMZ+RI (40-fold), quando comparadas aos demais grupos de CA e NE.

6.8 Expressão do microRNA miR-149 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 14 – Expressão do microRNA miR-149 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 15 – Expressão do microRNA miR-149 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.

6.8.1 Expressão do miR-149 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-149 nas NE no grupo TMZ+RI (40-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e CA.

6.8.2 Expressão do miR-149 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-149 nas NE no grupo RI (4000-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e CA.

6.9 Expressão do microRNA miR-145 nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 16 – Expressão do microRNA miR-145 na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 17 – Expressão do microRNA miR-145 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.

6.9.1 Expressão do miR-145 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-145 nas NE no grupo TMZ+RI (300-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e CA.

6.9.2 Expressão do miR-145 nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-145 nas NE no grupo RI (4000-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e CA.

6.10 Expressão do microRNA miR-128a nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos com temozolomida e com radiação ionizante, isolados e associados

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 18 – Expressão do microRNA miR-128a na linhagem T98G no grupo controle e nos grupos submetidos às modalidades de tratamento (TMZ, RI, TMZ + RI) nos subgrupos estudados, neuroesferas e células aderidas.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00)

Gráfico 19 – Expressão do microRNA miR-128a 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.

6.10.1 Expressão do miR-128a nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular T98G, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-128a nas NE no grupo TMZ+RI (40-fold), quando comparadas aos demais grupos de NE e de CA.

6.10.2 Expressão do miR-128a nas células aderidas (CA) e nas neuroesferas (NE) da linhagem celular U343, quando submetidas aos tratamentos com temozolomida (TMZ) e com radiação ionizante (RI), isolados e associados (TMZ+RI)

- a) Observamos um aumento de expressão do miR-128a nas CA nos grupos TMZ (500-fold), RI (200-fold) e TMZ+RI (600-fold), quando comparadas aos demais grupos de CA e de NE.

6.11 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a

6.11.1 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem T98G

- a) Na linhagem celular T98G, houve aumento da expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e dos miR -181b, -145, -149 e -128a apenas quando as NE foram submetidas à modalidade de intervenção combinada TMZ+RI.
- b) Esses mesmos miRs não apresentaram expressão na CA, frente aos diferentes tratamentos isolados, e mesmo quando associados, nessa linhagem.
- c) Dessa forma, esses miRs podem estar implicados com o aumento da expressão desses genes nas NE, quando submetidas à TMZ+RI, através da inibição de seus contrarreguladores.

6.11.2 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem U343

- a) Digno de nota, observamos uma maior expressão dos genes MGMT, EGFR e PTEN e dos miRs -145, -149 e -128a, os quais tiveram sua expressão exuberante e potencializada, quando as NE foram submetidas à RI isolada, nessa linhagem celular U343.
- b) O tratamento combinado também apresentou aumento dessas expressões, mas, em menor escala, talvez pela adição da TMZ.
- c) Nesse contexto, a RI apresenta-se como fator independente e determinante, para a radiorresistência das NE, enquanto é tratamento efetivo sobre às CA.
- d) De outro modo, não observamos ação de complementariedade *downregulation* dos oncomiRs analisados sobre a expressão dos genes analisado.

6.11.3 Análise de correlação entre a expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e a expressão dos miRNAs miR-181b, miR-145, miR-149 e miR-128a na linhagem U343 e T98G

Observamos o aumento da expressão dos genes e dos miRs analisados, em ambas as linhagens, U343 e T98G, em especial, nas NE, quando submetidas à RI e a TMZ+RI, respectivamente. Assim, sugere-se que a RI apresente potencial efeito indutor de perda da quiescência nas NE, e estimule radio e quimiorresistência. Nesse sentido, enquanto o regime Stupp é eficaz sobre as células tumorais, hipotetizamos que o tratamento sequencial baseado em TMZ, seguido de TMZ+RI, possa ser superior ao atualmente vigente de TMZ+RI ,seguido por TMZ, ao incluir as CTG para tratamento.

7 DISCUSSÃO

O Glioblastoma Multiforme é a principal neoplasia maligna primária do sistema nervoso central. Suas características celulares e histopatológicas restringem a sobrevida global mediana de seus portadores em cerca de quinze meses, com prejuízo na qualidade de vida durante esse período, segundo dados de Stupp et al., publicados em 2010.

Sua gliomagenese primária e sua patogênese na recorrência relacionam-se intrinsecamente com a regulação gênica e epigenética em seu DNA. Nesse processo, os astrócitos da neuróglia evoluem com atipia hiper celular pleomórfica e infiltrativa, além de promover neoangiogênese e necrose de coagulação na patogênese do GBM. Essa compreensão permanece sob investigação e, recentemente, foi impulsionada pelas novas descobertas moleculares apresentadas nas publicações de Daniel et al. (2015) e Ceccarelli et al. (2016). Esses autores sugerem uma nova classificação molecular para os gliomas, baseada em seus prognósticos distintos.

Atualmente, o melhor tratamento padrão contra o GBM é baseado na radiação ionizante e no quimioterápico temozolomida, combinados e sequencialmente, padronizados por Stupp et al., em 2005. Apesar de retardar o desfecho mortalidade para seus portadores, não o exclui em definitivo, como observado no seguimento tardio realizado pelo mesmo autor Stupp et al., em 2015. Vale ressaltar que essas modalidades de tratamento também estão implicadas em uma regulação distinta de genes e de miRNAs, de supressores tumorais e de promotores de gliomagenese, com diferentes comportamentos de expressão entre as células normais, as células tumorais de GBM e as células tronco de gliomas CTG, como defendido por Burris et al., em 2013.

Ressaltamos que o entendimento sobre os miRNAs é incorporado nessa compreensão. Por conseguinte, observamos que os mesmos podem comportar-se como supressores ou promotores tumorais, a depender do seu gene alvo para bloqueio de complementaridade sobre o RNAm. Nesse sentido, quando restringe um gene supressor tumoral, esse miRNA determina ação oncogênica, enquanto se torna supressor tumoral ao modular negativamente um oncogene. Além disso, o reconhecimento da existência e da participação das CTG no processo de quiescência, de quimio-radiorresistência e na recorrência tumoral ganham atenção.

No presente estudo, a expressão de genes e de miRNAs relacionados à gliomagenese foi analisada quanto às intervenções de tratamentos vigentes, baseados em temozolomida e em radiação ionizante, isolados e associados, sobre os diferentes grupos celulares de neuroesferas e de células aderidas de linhagem celular de GBM. Com esse objetivo, foram avaliadas as modificações na expressão dos genes EGFR (Hegi et al., 2012), PTEN (Koul, 2008), MGMT (Camara-Quintana et al., 2012) e IDH1/2 (Venneti et al., 2013) e dos miRNAs miR-181b (Karsy et al., 2012), miR-145 (Siaja et al., 2013), miR-149 (Hu et al., 2009) e miR-128a (Godlewski et al., 2008).

Nesse contexto, observamos que o gene IDH1 aumentou sua expressão nas NE (T98G), depois de submetidas à RI (4-fold) e à TMZ+RI (5-fold), mas não modificou sua expressão, após a TMZ isolada; por outro lado, houve tripla expressão do IDH1 nas NE (1,5-fold) frente às CA (0,5-fold), quando a linhagem U343 foi exposta à TMZ. Ainda nesse cenário, observamos um maior aumento na expressão do gene IDH2 (20-fold) nas NE (T98G), e o aumento na expressão de IDH2 (3-fold) nas CA (U343), quando submetidas à TMZ+RI, frente aos demais grupos.

Estudos recentes corroboram com Westphal e Lamszus (2011), ao referir que o GBM com o IDH1/2 mutado, apresenta melhor prognóstico, após o tratamento padrão (TMZ+RI), mas comporta-se como quimiorresistente quando não mutado. No presente estudo, o gene IDH1/2 é selvagem (não mutado), então observamos uma hiporreatividade, após intervenção com TMZ nas CA, enquanto verificamos uma maior hiperreatividade ao estímulo pela RI, especialmente nas NE. Considerando a participação do IDH1/2 na neoangiogênese do GBM, através da via HIF-1 α e na promoção da oncogênese pela via 2HG, como evidenciado por Verhaak (2010), podemos sugerir que a ação da RI sobre as NE interrompe sua quiescência, favorecendo a expressão de genes que modificarão o microambiente tumoral, tornando-o favorável à gliomagenese e a neoangiogênese.

Outro gene estudado através da modulação de sua expressão foi o EGFR. A amplificação da proteína transmembrana EGFR é frequente entre os GBM, e sua hiperexpressão resulta na ativação da via de proliferação PI3K-Akt-mTor, como previamente conhecido por Frederick et al (2000) e por Bachoo et al (2002).

Diversos estudos mostram que o aumento da expressão do EGFR, promove radorresistência no GBM, enquanto a diminuição da sinalização dessa via torna as células do GBM mais sensíveis à radiação e a quimioterapia, conforme O'Rourke et al

(1998) e LI et al (2004). Em nosso estudo, observamos uma redução na expressão do EGFR nas CA e nas NE, após TMZ; enquanto observamos o aumento de sua expressão nas NE, após exposição pela RI (2-fold) e após TMZ+RI (3-fold) (T98G). Ademais, houve diminuição da expressão EGFR nas CA (U343), depois de submetidas à TMZ e à TMZ+RI, quando comparamos às NE entre os mesmos grupos.

Uma possível explicação para esse comportamento foi sugerida por Stockhausen et al (2014), que demonstrou a expressão do EGFR relacionada diretamente com as vias de proliferação e de diferenciação celular, favorecendo a diferenciação, quando hipoexpresso, e a proliferação, quando hiperexpresso. Em maior evidência, Stockhausen afirmou que a desdiferenciação reduz a proliferação tumoral e estabiliza as neuroesferas, sinalizando que o bloqueio do EGFR aumentaria o alvo sobre a população de CTG. Fundamentado em nossos resultados, podemos sugerir que a intervenção com TMZ foi efetiva sobre CA, enquanto estimulou a diferenciação das NE naquelas submetidas à RI. Como comunhão, enquanto Frederick et al (2000) e Bachoo et al (2002) defendem que o aumento na expressão da proteína transmembrana EGFR resulta na ativação da via de proliferação PI3K-Akt-mTor, O'rourke et al (1998) e LI et al (2004) defendem que esse processo pode explicar a hipótese de recorrência da gliomagenese a partir das CTG após estímulo da RI e, em especial, a promoção de sua radiorresistência.

Outro agente supressor estudado por Ohgaki e Kleihues (2007) foi o gene PTEN, que é capaz de inibir a proliferação tumoral e a sobrevivência celular através da via PI3K. A perda da atividade supressora do PTEN permite o descontrole dessa via de carcinogênese, como evidenciado por XIE et al (2005), todavia, em nosso estudo, o gene PTEN é selvagem, isto é, não mutado. Notamos que a expressão do gene PTEN foi reduzida nas NE (T98G), depois de submetidas à TMZ e à RI, ao mesmo tempo em que se mostrou mais expresso nas NE (3-fold) frente à TMZ+RI, e às CA em todos os grupos. Além disso, observamos um aumento na expressão de PTEN nas NE (U343) submetidas ao tratamento com RI. Em suma, verificamos que o gene PTEN íntegro foi mais expresso nas NE, ainda mais evidente depois de exposto à RI.

Segundo Liu et al (2015), a perda da supressão pelo PTEN somada à hiperexpressão PI3K, promove a proliferação celular, enquanto sua hipoexpressão promoverá a diferenciação celular. Para Richmond et al (2015), o PTEN é um

importante modulador das células tronco dormentes, sendo regulado frente ao estímulo de estresse ou de agressão, como representado pela RI, no presente estudo. De acordo com Duan et al (2015), o PTEN localiza-se no núcleo celular das CTG (NE) e inibe o promotor de transcrição Pax7, através da proteína AMPc1; a deficiência de PTEN leva à hiperregulação de Pax7 e, por conseguinte, promove a transformação oncogênica das CTG, o que instaura sua agressividade maligna.

Em concordância com a literatura, observamos que a expressão dos genes IDH1/2, PTEN e EGFR está diretamente implicada na modulação do resultado da via PI3K-Akt-mTor nas CA. De outro modo, esses genes e essa via estão intrinsecamente relacionados com o comportamento de quiescência ou de desdiferenciação nas NE. Como evidenciado, a expressão desses genes não é complementar ou concordante entre às CA e às NE, sendo, em alguns resultados, até antagônicos. Uma possível explicação seria que as NE imaturas, até então quimio e radorresistentes, perdem sua quiescência após estímulos externos, em especial, depois de submetidos à RI, o que desencadeia sua gliomagenese através da expressão de genes selecionados. Essa hipótese poderia explicar a recorrência e a recidiva tumoral tardia dos gliomas após tratamento padrão consolidado por Stupp et al (2015).

Enquanto os genes IDH1/2, EGFR e PTEN relacionam-se diretamente à inibição ou à proliferação celular a partir da via PI3K, o gene MGMT relaciona-se ao mecanismo de reparo de demetilação do DNA, de acordo com Gerson (2004). Nesta pesquisa, observamos um aumento na expressão do gene MGMT nas NE (T98G), após intervenção com RI (10-fold), e, ainda maior, após TMZ+RI (25-fold), o que não foi observado nas CA. Nesse contexto, o efeito da terapia combinada pode ser paradoxal sobre as NE, e promover a carcinogênese nas NE, após ação, em particular, pela administração da RI. De acordo com os resultados do presente estudo, verificamos uma ação antineoplásica citotóxica dominante pela TMZ e observamos uma indução para expressão de oncogenes nas NE submetidas à RI.

O MGMT selvagem é um gene promotor de uma enzima supressora tumoral, que promove a demetilação do DNA, isto é, retira o grupo -alquil (-metil) previamente inserido inadvertidamente na guanina do DNA. Segundo Everhard et al (2016), vários estudos corroboram com a teoria na qual o gene promotor da O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) inativo (metilado ou hipoexpresso) é fator determinante para eficácia da TMZ, o que favorece o prognóstico desses

pacientes. Já a TMZ é um quimioterápico alquilante do grupo triazeno imidazólico, responsável por promover esse dano de alquilação no DNA, como observado por Stupp et al (2010). Dessa maneira, aqueles com metilação do gene MGMT apresentaram sobrevida livre de eventos significativamente maior, quando tratados com TMZ em relação à RT isolada, enquanto o oposto foi observado naqueles que não apresentavam metilação do MGMT.

No estudo NOA-08, que avaliou 373 idosos portadores de GBM, Wick et al (2012) sugeriram que àqueles MGMT metilados podem ser tratados apenas com TMZ, enquanto os MGMT não metilados podem ser submetidos apenas à RT isolada. Segundo Slaby et al (2010), o MGMT metilado (não selvagem) é fator preditivo de resposta especialmente para TMZ, mas não entre aqueles submetidos ao tratamento combinado de TMZ+RI. Por conseguinte, o perfil MGMT assumiu relevante papel preditivo e também prognóstico, para o tratamento de GBM. Digno de nota, o gene MGMT em nosso estudo é selvagem, não mutado, ampliando a análise qualitativa para quantitativa, através da expressão desse gene entre CA e NE. Essa melhor compreensão quantitativa foi corroborada pela recente publicação de Ceccarelli et al (2016), na qual foi incorporada a classificação MGMT, quanto à expressão dessa metilação, entre G-CIMP low e G-CIMP high.

Atualmente o conhecimento sobre os microRNAs foi incorporado à patogênese do GBM, na tentativa de melhor compreender a regulação gênica e epigenética sobre a gliomagenese primária e em sua recorrência. Há pouco, Tokudome T et al (2015) evidenciou que a administração de RI, em linhagem celular de CTG (GBM A172), promoveu uma redução na expressão do PTEN, que foi contrarregulado pela hiperexpressão dos miRNAs miR-17-5p, -19a-3p, -19b-3p, -21-5p, -130b-3p, -221-3p e -222-3p. Nesse mesmo sentido, Haapa-Paananen et al (2013) validou outros nove miRNAs (hsa-miR-129, -136, -145, -155, -181b, -342-5p, -342-3p, -376a/b) e seus seis genes alvo (ROCK1, RHOA, MET, CSF1R, EIF2AK1, FGF7) relacionados com a gliomagenese. Além desses, outros cinco miRNAs supressores estiveram hipoexpressos (hsa-miR-136, -145, -342, -129, -376a), enquanto o supressor hsa-miR-145 esteve hiperexpresso, relacionando-se com melhor sobrevida ($p < 0,005$).

Dessa forma, diversos estudos exploram o TCGA em busca de miRNAs promissores. Segundo Slaby et al (2010), que analisou a expressão genômica de 22 glioblastomas, houve redução na expressão do miR-221 ($p = 0,016$), do miR-222 (p

= 0,038), do miR-181b ($p = 0,036$), do miR-181c ($p = 0,043$) e do miR-128a ($p = 0,001$), sinalizando que os miR-181b e os miR-181c hipoexpressos são fatores preditivos nos melhores respondedores aos tratamentos com RT e TMZ, ($p = 0,016$; $p = 0,047$, respectivamente). De outro modo, encontramos pacientes portadores da metilação MGMT pouco respondedores ao tratamento com TMZ e ainda menos respondedores à TMZ+RI. Através da análise dos miRNAs nas CTG, Tezcan et al (2014) evidenciaram que a radiorresistência relacionou-se com a baixa expressão do miR-181b e alta expressão do miR-455-3p ($p = 0,053$, $p = 0,004$; respectivamente) nas CTG. Uma possível explicação para radiorresistência é baseada na existência de células tronco neurais de gliomas moduladas por miRNAs, as quais perdem a quiescência e tornam a se indiferenciar, de acordo com seu microambiente e estímulos indutórios.

Em nosso estudo, as CA (U343) apresentaram um aumento na expressão do miR-181b nos grupos tratados com TMZ (60-fold), RI (20-fold) e TMZ+RI (40-fold); e apresentaram um aumento na expressão do miR-128a após TMZ (500-fold), RI (200-fold) e TMZ+RI (600-fold). Nesse contexto, observamos que a soma das intervenções combinadas (TMZ+RI) não incrementou a expressão dos miR-181b e dos miR-128a nas CA, tendo mesmo reduzido a expressão do miR-181b, quando comparado à exposição de TMZ isolada. De outro modo, as NE (T98G) apresentaram hiperexpressão de miRNAs após submetidas à TMZ+RI: miR-181b (30-fold); miR-149 (40-fold); miR-145 (300-fold) e miR-128a (40-fold). Ainda nas NE (U343), houve uma maior expressão do miR-149 e do miR-145, ambos muito elevados em 4000-fold após intervenção com RI. No presente estudo, evidenciamos uma expressão diferenciada dos miRNAs entre as CA e as NE, sugerindo a participação especial dos miR-145 e dos miR-149, na recorrência da gliomagenese, a partir das NE submetidas à intervenção com RI.

Segundo Wang et al (2015), quando a família miR-181 é hiperexpressa, torna-se fator preditivo para maior sobrevida global ($p = 0,0031$). Em especial, a hiperexpressão do miR-181b relaciona-se inversamente com a expressão de NF- κ B e EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), inibindo os mecanismos de migração e de invasão, favorecendo melhor sobrevida. Em outro estudo sobre a expressão do miR-128 e do miR-149, She et al (2014) demonstraram que estes miRNAs hiperexpressos inibem a invasão do GBM e aumentaram sua sensibilidade ao tratamento com TMZ. Entretanto, quando hipoexpressos, permitem a progressão do

GBM. Da mesma forma, no estudo de Peruzzi et al (2013), identificamos diferentes comportamentos no que se refere à expressão do miR-128a, quando diferenciamos as células de glioblastomas, de células cerebrais normais e de células tronco de gliomas. Segundo Bao et al (2006) e Trumpp et al (2012), as CTG são radorresistentes e quimiorresistentes, apresentando capacidade superior de reparo aos danos do DNA, quando expostas ao estresse celular – ratificado pelos estudos de Beier et al (2011) e de Lima et al (2012). Ainda de acordo com Peruzzi et al (2013), a expressão do miR-128 torna as CTG menos radorresistentes e, por isso, a perda da expressão do miR-128 deve ser um evento precoce da gliomagenese.

Analisando a patogênese de gliomas de baixo grau para transformação em perfil mais agressivos de alto grau, Li et al (2011) observaram que os miR-107, miR-124, miR-138 e miR-149 estiveram hipoexpressos nos astrocitomas, enquanto houve hiperexpressão dos miR-124 e miR-149, com inibição de sua proliferação e migração. Nesse contexto, Pan et al (2012), em estudo de intervenção na linhagem GBM U251, evidenciaram que a indução com o miR-149 inibiu a expressão da via AKT, PCNA, CyclinD1 e MMP-2, reduzindo suas atividades proliferativas e invasivas. Isso representa um potencial alvo terapêutico citoestático anti-GBM, uma vez que induziu uma pausa no momento G0/G1 da mitose. De outro modo, Koo et al (2015) evidenciaram que a propriedade de invasão das linhagens U87-IM3 e U251-IM3 foi atenuada após transfecção do antisense miR-145. Em oposição, a hiperexpressão do miR-145 promove invasividade e agressividade.

Enquanto o GBM é considerado um dos tumores sólidos mais neovascularizados, favorecendo sua infiltração adjacente, Fidoamore et al (2016) observaram que injúrias de hipóxia celular alteram o microambiente das CTG, interrompendo sua quiescência e favorecendo sua desdiferenciação e sua invasão no tecido adjacente. De acordo com Morgado et al (2016), um dos miRs implicados nesse processo é o miR-145, que se torna hiperexpresso, reduzindo a via Sox2 e Lin28/let7, além de aumentar a expressão de let-7a e let-7b no processo de gliomagenese nas CTG.

Estudando o impacto desta expressão, Yang et al (2014) analisaram dezoito trabalhos relacionados com a expressão do miR-145 e observou que o miR-145 hiperexpresso é fator preditor de sobrevida global ($HR=0.47$, 95% CI 0.31-0.72), mas não relacionou-se com a sobrevida livre de progressão de doença. De fato, resultou em sobrevida global favorável quando o miR-145 foi hiperexpresso

(HR=0.72, 95% IC 0.52 - 0.99). Em acordo com Lee et al (2013), a baixa expressão do miR-145 relacionou-se a um pior prognóstico. Ainda sobre o miR-145, Shi et al (2014) evidenciaram uma baixa expressão do miR-145, nos gliomas de alto grau e nas CTG, e que sua hiperexpressão relaciona-se à maior migração e à invasão pelo GBM. O oposto também se mostrou verdadeiro, sendo implicada a ação do miR-145 sobre o RNAm do ABCG2, desempenhando importante função na via de sinalização e de proliferação celular no GBM.

No presente estudo, evidenciamos expressões distintas entre genes e miRNAs após intervenção entre TMZ e RI, isolados ou combinados. Ainda, destacam-se os diferentes comportamentos de expressão entre as CA e as NE. Enquanto as CA apresentaram-se responsivas à intervenção, as NE sinalizaram perda da quiescência e promoção à desdiferenciação, através de miRNAs e de genes proliferativos através da via EGFR e PI3K-AKT-mTor. Paul-Samojedny et al (2016) registraram que a via PI3K/AKT/PTEN é comumente desregulada durante a carcinogênese. Uma possível explicação é defendida por Hardee et al (2012), que avaliaram a ação da radiação ionizante sobre linhagens celulares de gliomas (U251, U87MG) e observaram uma redução em 28% na formação de neuroesferas primárias e nenhum impacto sobre as neuroesferas secundárias. Xu et al (2015) evidenciaram que a RI danifica o DNA e promove ativação de NK- κ B (IL-6, IL-8 e Bcl-xL). Como produto final, estimula a proliferação e invasão tumoral. Nesse processo, de acordo com Hardee (2012), evidenciou-se a participação do promotor TGF- β e, por isso, sugeriu-se que sua inibição pode aperfeiçoar o resultado de tratamento. De acordo com Paul-Samojedny, a combinação do siRNA AKT/PI3K com TMZ nas T98G, resultou na redução de viabilidade celular, além de induzir apoptose e necrose, também evidenciado por Shingu (2016), através da inibição entre CTG.

Em síntese, frente ao presente estudo, na linhagem celular T98G houve aumento da expressão dos genes MGMT, IDH1/2, EGFR e PTEN e dos miR -181b, -145, -149 e -128a apenas quando as NE foram submetidas à modalidade de intervenção combinada TMZ+RI. Dessa forma, sugerimos que esses miRs podem estar implicados com o aumento da expressão desses genes nas NE, quando submetidas à TMZ+RI, através da inibição de seus contrarreguladores. Já na linhagem celular U343, observamos uma maior expressão dos genes MGMT, EGFR e PTEN e dos miRs -145, -149 e -128a, os quais tiveram sua expressão

potencializada quando as NE foram submetidas à RI isolada. Nesse contexto, sugerimos que a RI apresenta-se como fator independente e determinante para a radiorresistência das NE, enquanto é tratamento efetivo sobre as CA. De outro modo, não observamos ação de complementariedade *downregulation* dos oncomiRs analisados sobre a expressão dos genes analisado.

Em suma, destacamos como pontos positivos de nosso estudo que observamos o aumento da expressão dos genes e miRs analisados, em ambas as linhagens U343 e T98G, em especial nas NE, quando submetidas à RI e à TMZ+RI, respectivamente. Sugere-se que a RI apresente potencial efeito indutor para a perda da quiescência nas NE, e, assim, promova radio e quimiorresistência. Nesse sentido, enquanto o regime Stupp (2005) é mais eficaz sobre as células tumorais de glioblastomas, hipotetizamos que o tratamento sequencial iniciado com TMZ isolada (TMZ seguido por TMZ+RI) possa ser superior ao atualmente vigente (TMZ+RI seguido por TMZ), especialmente ao considerar as CTG como alvo para tratamento.

Este é o primeiro estudo que correlaciona um *pool* de genes e de miRNAs sobre análise de tratamentos focando distinguir sua expressão em células tumorais e em células pluripotentes.

8 CONCLUSÕES

1. Os genes **MGMT**, **IDH1/2**, **EGFR** e **PTEN** aumentaram sua expressão, quando as **NE** foram submetidas à modalidade de intervenção combinada **TMZ+RI**, na linhagem celular T98G. Houve uma maior expressão dos genes **MGMT**, **EGFR** e **PTEN**, quando as **NE** foram submetidas à **RI** isolada, na linhagem celular U343.

2. Os **miR -181b**, **-145**, **-149** e **-128a** aumentaram sua expressão, quando as **NE** foram submetidas à modalidade de intervenção combinada **TMZ+RI**, na linhagem celular T98G. Os **miRs -145**, **-149** e **-128a** tiveram sua expressão potencializada, quando as **NE** foram submetidas à **RI** isolada, na linhagem celular U343.

3. Houve aumento na expressão dos genes **MGMT**, **IDH1/2**, **EGFR** e **PTEN** e dos **miR -181b**, **-145**, **-149** e **-128a**, quando as **NE** foram submetidas à modalidade de intervenção combinada **TMZ+RI**. Não houve diferença de expressão na CA e na linhagem celular T98G.

4. Houve uma maior expressão dos genes **MGMT**, **EGFR** e **PTEN** e dos **miRs -145**, **-149** e **-128a** que tiveram sua expressão exuberante e potencializada quando as **NE** foram submetidas à **RI** isolada e na linhagem celular U343.

5. Não identificamos **ação restrita** de complementariedade *downregulation* dos oncomiRs analisados sobre a expressão dos genes estudados.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os **miRNAs** podem estar implicados com o aumento da expressão dos genes analisados nas **NE**, quando submetidas à **TMZ+RI**, através da inibição de seus **contrarreguladores**.

O tratamento combinado **RI+TMZ** resultou no aumento da expressão dos **genes e miRNAs** analisados nas **NE** mas, em menor escala, possivelmente, pela adição da **TMZ**;

A **RI** apresenta-se como fator independente e determinante para a **radiorresistência das NE**, enquanto é **tratamento efetivo sobre as CA**.

Observamos o aumento da expressão dos **genes e miRs** analisados, em ambas as linhagens **U343 e T98G**, em especial, nas **NE**, quando submetidas à **RI** e à **TMZ+RI**, respectivamente. Dessa forma, sugere-se que a **RI determine potencial efeito indutor de perda da quiescência nas NE e que estimule radio e quimiorresistência**.

Nesse sentido, enquanto o regime Stupp é eficaz sobre as células tumorais, hipotetizamos que a eficácia do tratamento seqüencial baseado em **TMZ seguido por TMZ + RI**, possa ser superior ao atualmente vigente **TMZ + RI seguido por TMZ**, ao considerar as CTG para o tratamento inicial.

REFERENCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta, 2016.

AL-HAJJ, M. et al. Therapeutic implications of cancer stem cells. **Curr Opin Genet Dev.**, v.14, n.1, p.43-47, 2004.

ALLINGHAM-HAWKINS, D.; LEA, A.; LEVINE, S. DecisionDx-GBM Gene Expression Assay for Prognostic Testing in Glioblastoma Multiform. **PLoS Curr.**, v.2, RRN1186, 2010.

AMBROS, V. The evolution of our thinking about microRNAs. **Nat Med.**, v.14, p.1036-1040, 2008.

BACCELLI, I.; TRUMPP, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. **JCB.**, v.198, n.3, p.281-293, 2011.

BACHOO, R.M. et al. Epidermal Growth Factor Receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. **Cancer Cell**, v.1, n.3, p.269–277, 2002.

BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v.44, p.756-760, 2006.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, n.2, p.281–297, 2004.

_____. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v.136, n.2, p.215–233, 2009.

BEIER, D. et al. CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. **Cancer Res.**, v.67, p.4010-4015, 2007.

BERG, M.; Soreid, K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. **Discov Med.**, v.14, n.76, p.207-214, 2012.

BERNSTEIN, M.; GUTIN, P.H. Intesticial irradiation of brain tumors: a review. **Neurosurgery**, v.9, p.741-750, 1981.

BERTOLINI, F. et al. Gruppo Neuro Oncologico Modena (GNO-MO). Survival in patients with newly diagnosed conventional glioblastoma: a modified prognostic score based on a single-institution series. **Tumori**, v.98, n.6, p.756-761, 2012.

BINDA, E. et al. Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma. **Front Biosci.**, v.4, p.1235-1248, 2012.

BURRIS, H.A. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v.71, n.4, p.829-842, 2013.

CAMARA-QUINTANA, J.Q.; NITTA, R.T.; LI, G. Pathology: commonly monitored glioblastoma markers: EGFR, EGFRvIII, PTEN, and MGMT. **Neurosurg Clin N Am.**, v.2, p.237-246, 2012.

CANCER Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v.455. p1061-1068, 2008.

CECCARELLI, M. et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. **Cell**, v.164, n.3, p.550-563, 2016.

CHARGARI, C. et al. Cancer stem cells, cornerstone of radioresistance and perspectives for radiosensitization: glioblastoma as an example. **Bull Cancer**, v.99, p.1153-1160, 2012.

CHAUDHRY, M.A.; SACHDEVA, H.; OMARUDDIN, R.A. Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways. **DNA Cell Biol.**, v.29, n.9, p.553-561, 2010.

CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Nature Reviews Genetics**, v.8, n.2, p.93–103, 2007.

CHISTIYAKOV, D.A.; CHEKHONIN, V.P. Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. **European Journal of Pharmacology**, v.684, p.8-12, 2012.

CHRISTENSEN, H.C.; KOSTELJANETZ, M.; JOHANSEN, C. Incidences of gliomas and meningiomas in Denmark, 1943 to 1997. **Neurosurgery**, v.52, n.6, p.1327-1333, 2003.

CRAIG, T.J.; MONICA, L.G.; MARK, N. Cancer Stem Cells. **N Engl J Med.**, v.355, p.1253-1261, 2006.

CURRAN, W.J. JR. et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. **J Natl Cancer Inst.**, v.85, n.9, p.704-710, 1993.

DANIEL, J.B. et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. **N Engl J Med.**, v.372, p.2481-2498, 2015.

DESANO, J.T.; XU L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. **The AAPS Journal**, v.11, n.4, 2009.

DIRKS, P.B. Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. **J Clin Oncol.**, v.26, n.17, p.2916-2924, 2008.

_____. Brain Tumor Stem Cells. **Biol Blood and Marrow Transplantation**, v.11, p.12-13, 2005.

DONG, J.; HUANG, Q. Targeting glioma stem cells: enough to terminate gliomagenesis? **Chin Med J (Engl.)**, v.124, n.17, p.2756-2763, 2011.

DUAN, S. et al. PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. **Nat Commun.**, v.3, n.6, p.10068, 2015.

ESTIMATIVA 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

ESTIMATIVA 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2015.

EVERHARD, S. et al. MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. **Ann Neurol.**, v.60, n.6, p.740-743, 2006.

FREDERICK, L. et al. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. **Cancer Res.**, v.60, n.5, p.1383-7, 2000.

FIDOAMORE, A. et al. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. **Stem Cells Int.**, 2016

GERSON, S.L. MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v.4, p.296-307, 2004.

GODLEWSKI, J. et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. **Cancer Res.**, v.68, p.9125-9130, 2008.

GÓMEZ, P.G.; SÁNCHEZ, P.; MIRA, H. MicroRNAs as Regulators of Neural Stem Cell-Related Pathways in Glioblastoma Multiforme. **Mol Neurobiol.**, v.44, n.3, p.235-249, 2011.

HAAPA-PAANANEN, S. et al. Functional Profiling of Precursor MicroRNAs Identifies MicroRNAs Essential for Glioma Proliferation. **PLoS One**, v.8, n.4, 2013.

_____. Functional profiling of precursor MicroRNAs identifies MicroRNAs essential for glioma proliferation. **PLoS One**, v.8, n.4, p.e60930, 2013.

HAYES, C.N.; CHAYAMA, K. MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. **Int J Mol Sci.**, v.17, n.3, p. 280, mar.2016.

HARDEE, M.E. et al. Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β . **Cancer Res.**, a.15, v.72, n.16, p.4119-4129; 2012.

HART, M.G.; GRANT, R.; METCALFE, S.E. Biopsy versus resection for high grade glioma. **Cochrane Database Syst Rev.**, 2000

HEGI, M.E. et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. **Clin Cancer Res.**, v.10, p.1871-1874, 2004.

_____. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med.**, v.352, p.997–1003, 2005.

_____. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. **Curr Opin Neurol.**, v.25, n.6, p.774-779, 2012.

HESS, K.R.; BROGLIO, K.R.; BONDY, M.L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. **Cancer**, v.101, p.2293-2299, 2004.

HOWLADER, N. et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/ Acesso em: 10/05/16.

HSI-FENG, T. et al. The Association between genetic polymorphism and the processing efficiency of miR-149 Affects the Prognosis of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **PLoS One**, v.7, 2012.

HU, Z. et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. **Hum Mutat.**, v.30, p.79–84, 2009.

HUANG, Z. et al. Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting. **Protein Cell**, v.1, n.7, p.638–655, 2010.

IORIO, M.V.; CROCE, C.M. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact; **Journal of Clinical Oncology**, v.27, p.5848-5856, 2009.

KANG, M.K. et al. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. **BMC Neuroscience**, v.9, p.15, 2008.

KARSY, M.; ARSLAN, E.; MOY, F. Current progress on understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. **Genes Cancer**, v.3, n.1, p.3–15, 2012.

KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.61, p.215–225, 2002.

KOO, S.; MARTIN, G.; TOUSSAINT, L.G. MicroRNA-145 Promotes the Phenotype of Human Glioblastoma Cells Selected for Invasion. **Anticancer Res.**, v.35, n.6, p.3209-3215, Jun, 2015.

KOUL, D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. **Cancer Biol Ther.**, v.7, n.9, p.1321-1325, 2008.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol Cancer**, v.1, n.9, p.135, 2010.

LAGES, E. et al. MicroRNA and Target Protein Patterns Reveal Physiopathological Features of Glioma Subtypes. **PLoS ONE**, v.6, 2011.

LAKOMY, R. et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. **Cancer Sci.**, v.102, p.2186-2190, 2011.

LAWS, E.R. et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. **J Neurosurg.**, v.99, p.467-473, 2003.

LEE, H.K. et al. MicroRNA-145 is downregulated in glial tumors and regulates glioma cell migration by targeting connective tissue growth factor. **PLoS One**, v.8, n.2, 2013.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v.75, p.843–854, 1993.

LI, B. et al. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. **Oncogene**, v.23, p.4594-4602, 2004.

LI, D. et al. Grade-specific expression profiles of miRNAs/mRNAs and docking study in human grade I-III astrocytomas. **OMICS**, v.15, p.673–682, 2011.

LIM, L.P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v.433, n.7027, p.769–773, 2005.

LIM, Y.C. et al. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.11, n.9, p.1863–1872, 2012.

LINO, M.M.; MERLO, A. PI3Kinase signaling in glioblastoma. **J Neurooncol.**, v.103, n.3, p.417-427, 2011.

LIU, J. et al. Glioblastoma tumor initiating cells: therapeutic strategies targeting apoptosis and microRNA pathways. **Curr Mol Med.**, v.13, n.3, p.352-357, 2013.

LIU, J.C. et al. Common and distinct features of mammary tumors driven by Pten-deletion or activating Pik3ca mutation. **Oncotarget**, 22 Jan. 2016. [Epub ahead of print].

LOUIS, D.N. et al. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. In: World Health Organization Classification of Tumours of the Nervous System. France, **IARC Press**, 2007.

MEISTER, G. et al. Sequence-specific inhibition of microRNA - and siRNA-induced RNA silencing. **RNA**, v.10, n.3, p.544–550, 2004.

MORGADO, A.L.; RODRIGUES, C.M.; SOLÁ, S. MicroRNA-145 Regulates Neural Stem Cell Differentiation Through the Sox2-Lin28/let-7 Signaling Pathway. **Stem Cells**. 6 Feb. 2016.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network. Central Nervous System Cancers. Clinical Practice Guidelines in Oncology. **NCCN Guidelines™**. v1, 2015.

NEWLANDS, E.S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treat.**, v.23, n.1, p. 35–61, 1997.

NICHOLAS, M. et al. Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Therapeutic Opportunities and Challenges. **Semin Oncol.**, v.38, p.243-253, 2011.

O'ROURKE, D.M. et al. Conversion of a radioresistant phenotype for a more sensitive one by disabling erbB receptor signaling in human cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.10842-10847, 1998.

OSTROM, Q.T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro Oncol.**, v.17, n.4, p.iv1-iv66, 2015.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res.**, v.64, n.19, p.6892-6899, 2004.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.64, p.479-489, 2005.

PAN, S.J. et al. MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.25, p.871–881, 2012.

PAN, S.J. et al. MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, v.25, n.4, p.871-881, 2012.

PAPAGIANNAKOPOULOS, T. et al. Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. **Oncogene**, v.31, p.1884-1895, 2011.

PARK, C.K.; LEE, S.H.; HAN, J. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in WHO grade III glioma patients treated with radiotherapy or radiotherapy plus chemotherapy **BMC Cancer**, v.18, n.9, p.450, 2009.

PATEL, M. et al. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. **Expert Opin Investig Drugs**. v.21, n.9, p.1247-1266, 2012.

PAUL-SAMOJEDNY, M. et al. Combination Therapy with AKT3 and PI3KCA siRNA Enhances the Antitumor Effect of Temozolomide and Carmustine in T98G Glioblastoma Multiforme Cells. **BioDrugs**, 22 Feb. 2016. [Epub ahead of print].

PERUZZI, P. et al. MicroRNA-128 coordinately targets Polycomb Repressor Complexes in glioma stem cells. **Neuro Oncol.**, v.15, n.9, p.1212-1224, 2013.

PORTER, K.R. et al. Prevalence estimates for primary brain tumors in the US by age, gender, behavior, and histology. **Neuro-Oncology**, v.12, n.6, p.520-527, 2010.

RANI, S.B. et al. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. **Neuro Oncol.**, 2013.

REYNOLDS, B.A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v.255, p.1707-1710, 1992.

RICHMOND, C.A. et al. Dormant Intestinal Stem Cells Are Regulated by PTEN and Nutritional Status. **Cell Rep.**, v.13, n.11, p.2403-2411, 2015.

RIES, L. et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2007.

ROTH, P. et. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. **J Neurochem.**, v.118, n.3, p.449-457, 2011.

RYCAJ, K.; TANG, D.G. Cancer stem cells and radioresistance. **Int J Radiat Biol.**, v.90, n.8, p.615-621, 2014.

SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro. MEDSI; p.93-94, 1999.

SASSEN, S.; MISKA, E.A.; CALDAS, C. MicroRNA – implications for cancer. **Virchows Arch**, v.452, p.1-10, 2008.

SHI, L. et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. **Brain Res.**, v.1236, p.185-193, 2008.

SI, M.L. et al. MiR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, v.26, p.2799-2803, 2007.

SINGH, S.K. et al. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene**, v.23, n.43, p.7267-7273, 2004.

_____. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Res.**, v.63, p.5821-5828, 2003.

SLABY, O. et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. **Neoplasma**, v.57, n.3, p.264-269, 2010.

SOUHAMI, L. et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with GBM: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.60, p.853-860, 2004.

STEWART, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet**, v.59, n.9311, p.1011-1018, 2002.

STOCKHAUSEN, M.T. et al. Differentiation of glioblastoma multiforme stem-like cells leads to downregulation of EGFR and EGFRvIII and decreased tumorigenic and stem-like cell potential. **Cancer Biol Ther.**, n.2, p.216-224; 2014.

STUPP, R. et al. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, a.21, v.5, p.190-193, 2010.

_____. 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.**, v.10, p.459-466, 2009.

_____. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med.**, v.352, p.987-996, 2005.

SHE, X. et al. miR-128 and miR-149 enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeletal remodeling in glioblastoma. **Oncol Rep.**, v.32, n.3, p.957-964, 2014.

SHI, L. et al. miR-145 inhibits migration and invasion of glioma stem cells by targeting ABCG2. **Neuromolecular Med.**, v.16, n.2, p.517-528, 2014.

SHINGU, T. et al. Suppression of RAF/MEK or PI3K synergizes cytotoxicity of receptor tyrosine kinase inhibitors in glioma tumor-initiating cells. **J Transl Med.**, v.14, n.1, p.46, 2016.

SUH, M.R. et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. **Dev Biol.**, v.270, p.488-498, 2004.

TEZCAN, G. et al. microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells. **Cell Mol Neurobiol.**, v.34, n.5, p.679-692, 2014.

THOMAS, D.; BRADA, M.; STENNING, S. Medical research council brain tumour working party. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: A Medical Research Council Trial. **J Clin Oncol.**, v.19, n.2, p.509-518, 2001.

TOKUDOME, T. et al. Reduced PTEN expression and overexpression of miR-17-5p, -19a-3p, -19b-3p, -21-5p, -130b-3p, -221-3p and -222-3p by glioblastoma stem-like cells following irradiation. **Oncol Lett.**, v.10, n.4, p.2269-2272, 2015.

UCHIDA, N. et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **Proc Natl Acad Sci.**, v.97, p.14720-14725, 2000.

VENNETI, S.; THOMPSON, C.B. Metabolic modulation of epigenetics in gliomas. **Brain Pathol.**, v.23, n.2, p.217-221, 2013.

VERHAAK, R.G.W. et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell**, v.17, n.1, p. 98-110, 2010.

WALKER, M.D. et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. **J Neurosurg.**, v.49, n.3, p.333-343, 1978.

WANG, H. et al. Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma. **Sci Rep.**, v.18, n.5, p.13072, Aug 2015.

WANG, Y. et al. MicroRNA-149 inhibits proliferation and cell cycle progression through the targeting of ZBTB2 in human gastric cancer. **PLoSOne**, v.7, n.10, 2012.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v.171, p.737-738, 1953.

WEN, P.Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med.**, v.359, p.492-507, 2008.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews**, v.12, n.9, p.495-508, 2011.

WICK, W. et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol.**, v.13, n.7, p.707-715, 2012.

YANG, J. et al. Prognostic role of microRNA-145 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis of 18 related studies. **World J Surg Oncol.**, v.12, p.254, 2014.

YU, S.C. et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. **Cancer Lett.**, v.265, n.1, p.124-134, 2008.

XIE, D. et al. Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in glioblastomas of Chinese patients correlates with patient's age but not with tumor's clinicopathological pathway. **Acta Neuropathol.**, v.110, n.5, p.481-489, 2005.

XU, R.X. et al. DNA damage-induced NF- κ B activation in human glioblastoma cells promotes miR-181b expression and cell proliferation. **Cell Physiol Biochem.**, v.35, n.3, p.913-925, 2015.

ZHANG, C. et al. Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells. **Int J Oncol.**, v.36, n.6, p.1503-1512, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1: Expressão de genes e microRNAs na linhagem T98G.

Esferas		MGMT	IDH1	IDH2	PTEN	EGFR	miR181b	miR128a	miR145	miR149
Controle	1	0,727580479	0,73494	0,823554	1,056286	0,72526819	1,14320723	1,15250775	0,1863603	0,203511768
	2	1,090007151	3,073222	1,372783	1,313339	1,54084443	0,87536351	0,92813534	0,7650343	0,596487302
	3	1,260926043	0,442745	0,884516	0,720845	0,89483421	0,99927863	0,93485625	7,0139991	8,237762543
RI	1	24,5867365	11,26921	0,005994	0,031413	5,5891971	0,13802722	0,1817303	0,2626616	0,292211194
	2	0,174110126	0,196737	0,386587	0,183433	0,38300297	2,19660751	12,7663071	2,7688159	0,159990603
	3	0,210580453	0,819158	0,349924	0,381757	0,22712339	0,4508513	0,60618489	0,3985108	0,41668748
TMZ	1	0,890616669	1,015499	0,697762	0,588417	0,61015015	1,46870221	1,70919502	1,6074754	4,030888587
	2	0,296436788	1,571279	0,456841	0,677085	0,43292256	0,11392015	0,09508582	0,1207498	0,179271836
	3	0,259948347	1,85119	0,467996	0,880793	0,27762237	0,22712423	0,34709619	0,229932	0,325323017
RI + TMZ	1	34,78335904	0,62166	16,0108	3,347471	3,3234644	35,7654844	60,2064771	243,2382	52,24206318
	2	36,965679	1,479294	17,12067	2,57399	3,97111056	34,8688154	28,1000841	569,57581	59,84501371
	3	1,202408009	12,62272			2,14012944	12,0373141	16,3402591	62,108949	18,12912977
Aderidas										
Controle	1	0,840511924	1,087186	1,025449	1,824783	1,37017075	0,98931368	1,52287333	0,3578935	0,468682544
	2	0,840750171	1,207138	1,405766	1,533135	0,62424239	1,01553011	1,20096188	0,9824703	1,0975654
	3	1,4151066	0,761972	0,693702	0,357444	1,16915489	0,99534395	0,54677292	2,8439813	1,943975618
RI	1	0,470878844	0,556089	0,906129	1,200706	0,83477861	0,76685837	0,39041423	0,0638721	0,247190634
	2	0,71529476	0,762884	1,226371	1,352577	1,09046877	1,12438421	0,82762576	0,3343719	0,375527223
	3	1,346596505	1,769604	2,48291	1,709982	1,18464192	0,77461009	0,52128357	0,1064871	0,172567747
TMZ	1	1,957999198	2,453728	2,479781	2,768844	0,92197909	1,32941223	1,04157107	0,8813847	1,937751877
	2	0,472737749	0,986958	0,76378	1,455198	0,61902571	1,15420589	1,06892354	0,0368581	0,126918273
	3	0,557587603	0,638657	0,907119	1,208507	0,5950712	0,89396143	1,06847848	0,2071699	0,412143074
RI + TMZ	1	0,696983931	1,378899	0,926975	1,303086	1,0155322	2,14878389	2,61410299	0,2609941	0,586131665
	2	0,650095673	1,227732	0,819527	1,061782	0,67871244	2,50263384	2,94763245	0,1656869	0,466347717
	3	0,819437646	0,789078	1,250686	0,916092	0,72958053	1,46809425	1,47370614	0,1305897	0,269171206

ANEXO 2: Expressão dos genes e microRNAs na linhagem U3243.

Esferas		IDH1	IDH2	PTEN	EGFR	miR181b	miR128a	miR145	miR149
Controle	1	0,49599393	0,9970972	1,165652	1,0202169	2,88000102	2,9595716	3,54111528	3,48138488
	2	1,38805811	1,2803203	0,978978	0,7919983	0,6187457	0,68232087	0,96071917	0,98931804
	3	1,4524995	0,7833284	0,87631	1,2376084	0,56117093	0,49520212	0,29394324	0,29034345
RI	1	0,44314218	0,8922371	1,335672	1,33097	1,05881011	0,82995527	1,23374208	1,46706656
	2	0,75279645	1,3308783	1,638974	0,9877824	2,13767609	1,40649851	1,39181472	1,70561379
	3	1,12372048	1,6185111	1,761997	1,6742852	3,53545583		12372,1852	11373,6178
TMZ	1	0,20100483	1,5800741	0,818583	1,2227803	0,34631192	0,50085567	0,53599398	0,91434116
	2	0,74836571	1,4895958	0,754658	1,1181519	0,20272263	0,17833286	0,24460054	0,26756372
	3	0,70917813	1,4020372	0,666431	1,1593919	0,17186713	0,14700984	0,78740585	0,37514158
RI + TMZ	1	0,61867092	1,4678201	1,464706	1,1494903	0,81252008	1,55220179	0,89848962	1,41625456
	2	0,36596458	1,2430122	1,001112	1,1587674	1,31126687	0,25040582	0,21837152	0,3712144
	3	1,30034577	1,4160893	1,634028	0,7630081	0,81534317	7,88680693	10,799411	15,330372
Aderidas									
Controle	1	1,7922791	1,3624137	0,914025	1,4867598	0,26958302	0,1032305	0,70990891	0,65618061
	2	0,31553743	0,7378062	0,981291	0,687865	0,42217762	0,34712755	0,60223134	0,58629623
	3	1,7682492	0,9948296	1,114921	0,9778134	8,78642617	27,906341	2,33902043	2,59931856
RI	1	1,1220571	1,0799352	0,868764	1,4299544	19,9350148	190,889218	14,8669743	8,3355655
	2	1,72502259	1,0797144	0,845276	1,0783985	19,2833645	169,358626	3,92113296	1,04420245
	3	1,89168591	1,1168537	0,70087	1,1584693	9,39813097	96,2080356	17,3876645	9,24861756
TMZ	1	1,21087446	1,2531911	1,218571	0,7042266	16,010947	81,5740766	9,68136439	12,2294465
	2	2,05579444	1,5707818	1,119986	0,8268414	89,3892599	942,324137	20,5862116	18,6199137
	3	1,29526991	1,8905625	0,652658	0,7404586	68,9365163	561,12324	29,3932851	31,7270398
RI + TMZ	1	1,04036266	3,225297	0,697469	0,3645995	15,5542896	190,767489	31,2791566	56,6494306
	2	1,55878405	2,5774158	1,227566	0,3991395	61,2147286	812,635269	30,0283577	47,4814703
	3	1,76676274	2,9622905	1,475359	0,8410868	56,2571114	720,664719	8,56679094	10,4899269