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

LETÍCIA PASSI TURRA

**“Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 associada à
regulação de HIF-1 α em neuroesferas de glioblastomas submetidas
ao tratamento com radiação ionizante”**

Ribeirão Preto

2020

LETÍCIA PASSI TURRA

**“Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 associada à
regulação de HIF-1 α em neuroesferas de glioblastomas submetidas
ao tratamento com radiação ionizante”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de mestre em Ciências
Médicas, área de concentração Clínica Cirúrgica –
opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Pretti da Cunha
Tirapelli

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o
Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Turra, Letícia Passi

“Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 associada à regulação de HIF-1 α em neuroesferas de glioblastomas submetidas ao tratamento com radiação ionizante”. Ribeirão Preto, 2020.

98f. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli – 2020.

1. Glioblastoma. 2. Células-tronco tumorais. 3. Radiação Ionizante. 4. HIF-1 α . 5. miR-21. 6. miR-326.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Passi Turra

Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 associada à regulação de HIF-1 α em neuroesferas de glioblastomas submetidas ao tratamento com radiação ionizante

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, minha orientadora, pelas infinitas oportunidades, por compartilhar de sua experiência acadêmica e científica, de modo exigente, porém sutil e carinhoso. Reconheço seu esforço e dedicação, o quanto seus ensinamentos puderam contribuir com minha evolução profissional e pessoal. É humilde e sincera a gratidão recolhida ao longo destes anos pela sua pessoa.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, por ter disponibilizado a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular, onde a prática técnica contribuiu diferencialmente à minha especialização.

Aos Professores que contribuíram em inúmeras etapas à realização dessa dissertação, especialmente, ao Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli, Prof. Dr. José Sebastião dos Santos, Prof. Dr. Benedito Oscar Colli, através de recursos, conhecimentos ofertados por meio das disciplinas, entre outras disposições importantíssimas.

À minha amiga Janaína Regina Lellis, aliás, palavras são insuficientes para expressar o quanto sua disponibilidade, benevolência, paciência, entre outras inúmeras características exemplares foram essenciais à conclusão deste ciclo. Agradeço a Deus e a FMRP-USP por ter dado a honra de conhecer esse grande ser humano que se resume.

Aos meus farmacêuticos preferidos Rogério Lenotti Zuliani e Fermino Sanches Lizarte Neto, os ensinamentos prestados a elaboração de todo processo experimental, onde arregaçaram as mangas e se propuseram em ajudar na obtenção dos resultados. Além, da convivência pacífica e caridosa de todos os dias.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia, à Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), aos neurocirurgiões e toda equipe, que possibilitaram a obtenção dos fragmentos amostrais.

À minha avó, Cleuza Maria de Carvalho Passi, que na verdade poderia chamá-la de mãe, na qual participou desde os incentivos iniciais aos esforços financeiros fundamentais à minha permanência em Ribeirão Preto. Eu devo tudo a você, devo a vida.

Ao meu pai, Francisco Carlos Turra Junior, minha referência profissional, professor nato, dono de um carácter excepcional. Ao meu avô, Gilmar Passi, responsável por

afagar meu coração nos momentos instáveis e acreditar inteiramente em minha capacidade profissional. Não obstante, agradeço a todos meus familiares que direta ou indiretamente colaboraram na construção dos meus planos e ideais.

Ao meu namorado, Argeu Vinícius Batista Rodrigues, por transmitir segurança e estabilidade, pelos aconselhamentos, encorajamento e, principalmente, pela paciência creditada todos os dias. De todo meu coração, obrigada por estar ao meu lado.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, com o código de financiamento 001.

E, por último, mas não menos importante, agradeço a todos os pacientes incluídos neste projeto e suas famílias que, mesmo através do sofrimento, se permitiram em acreditar no futuro, na ciência, na medicina de precisão. Sem eles, certamente, este estudo não seria possível.

RESUMO

TURRA, L.P. Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 associada à regulação de HIF-1 α em neuroesferas de glioblastomas submetidas ao tratamento com radiação ionizante. 2020. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

INTRODUÇÃO: O glioblastoma continua sendo uma neoplasia incurável, a partir dos protocolos terapêuticos bem estabelecidos, os mesmos proporcionam pouco aumento na sobrevida dos pacientes. O mecanismo de hipóxia associado às células-tronco tumorais (CSCs), com destaque à regulação da expressão de HIF-1 α ou HIF-2 α , está diretamente relacionado com o mau prognóstico em vários tipos de tumores. Estudos recentes também comprovam a regulação dos microRNAs em alvos moleculares diretamente envolvidos com a malignidade tumoral, como por exemplo, HIF-1 α . **OBJETIVO:** Nosso objetivo foi analisar a expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 em neuroesferas de pacientes diagnosticados com glioblastoma tratadas com radiação ionizante. Esses microRNAs foram selecionados por apresentarem envolvimento comprovado com as CSCs e a regulação HIF-1 α . **METODOLOGIA:** Neste trabalho, foram utilizadas culturas celulares de dez pacientes com glioblastoma a partir da biopsia intraoperatória. Avaliada a viabilidade celular com azul de Tripán após 48 horas de exposição à radiação ionizante, as expressões dos microRNAs supracitados foram analisados por PCR em tempo real. As expressões de miR-21 e miR-326 foram correlacionadas com óbito e recidiva mediante o grupo amostral, de forma geral e por grupo. A curva ROC identificou o ponto de corte dos respectivos microRNAs em relação ao prognóstico clínico, separando-os por grupo. **RESULTADOS:** Ao analisar a viabilidade celular, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre neuroesferas nos grupos experimentais. Enquanto o miR-21 apresentou-se hiperexpresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante ($p=0,0028$), quando comparado ao grupo controle, contudo, não pode ser associado à recidiva e ao óbito. O miR-326 apresentou-se associado com a recidiva tumoral ($p=0,032$) em ambos os grupos, em que a cada 0,5 unidades de miR-326 o risco de recidivar aumenta 1,024 (2,4%). **CONCLUSÃO:** O miR-21 apresentou-se hiperexpresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante sugerindo que o seu papel na regulação de HIF-1 α está relacionado às neuroesferas

radiorresistentes. O miR-326 apresentou-se associado ao aumento de risco de recidivas em ambos os grupos, neuroesferas tratadas ou não com radiação ionizante, demonstrando também que esta regulação positiva independe do tratamento com radiação ionizante.

PALAVRAS-CHAVE: glioblastoma, células-tronco tumorais, radiação ionizante, HIF-1 α , miR-21, miR-326.

ABSTRACT

TURRA, L.P. Expression of microRNAs miR-21 and miR-326 associated with HIF-1 α regulation in glioblastoma neurospheres submitted to ionizing radiation treatment. 2020. 95f. (Master's Program) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

INTRODUCTION: Glioblastoma continues being an incurable neoplasia, from well established therapeutical protocols, which do not offer much increasing on patients overliving. The hypoxia mechanism associated to cancer stem cells (CSCs), emphasizing the HIF-1 α or HIF-2 α expression regulation, is directly related to bad prognosis in many types of tumors. Recent studies also prove the microRNAs regulation in molecular targets directly involved with tumoral malignancy, such as HIF-1 α , for example. **OBJECTIVE:** Our goal was to analyze microRNAs miR-21 and miR-326 expression in the neurospheres of patients diagnosed with glioblastoma and treated with ionizing radiation. These microRNAs were selected for presenting proved relation to the CSCs and HIF-1 α regulation. **METHODS:** In this paper, cellular culture of ten patients with glioblastoma was used from surgery biopsies. The cellular viability was evaluated through Trypan Blue after 48 hours of ionizing radiation exposure, then, the aforementioned microRNAs expressions were analyzed through real time PCR. MiR-21 and miR-326 expressions were correlated to death and recurrence by means of the sample group, in general and per group. The ROC curve identified the cut point of the respective microRNAs in relation to the clinical prognosis, separating them by group. **RESULTS:** By analyzing cellular viability, significant statistical differences were not identified among the neurospheres in experimental groups. Meanwhile, miR-21 presented itself as hyperexpressed in the neurospheres group submitted to ionizing radiation treatment ($p=0,0028$), when compared to the control group, however, it could not be associated to recurrence and death. MiR-326 presented itself associated to tumoral recurrence ($p=0,032$) in both groups, in which every 0.5 units of miR-326 the chances of recurrence increase 1,024 (2,4%). **CONCLUSIONS:** MiR-21 presented itself hyperexpressed in neurospheres group submitted to ionizing radiation treatment suggesting that its role on HIF-1 α regulation is related to radioresistant neurospheres. MiR-326 presented itself associated to the increasing chances of recurrence in both groups, neurospheres that were and were not treated though ionizing radiation, also demonstrating that this positive regulation does not depend on the ionizing radiation treatment.

KEY-WORDS: glioblastoma, cancer stem cells, ionizing radiation, HIF-1 α , miR-21, miR-326.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alinhamento estrutural das subunidades HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α	28
Figura 2. Biossíntese de HIF-1 α	29
Figura 3. Via de biogênese dos microRNAs.....	36
Figura 4. Ativação de HIF-1 α em microambiente hipóxico para que microRNAs determinem alterações metabólicas e amplifiquem características pró-tumorigênicas.....	38
Figura 5. Tipos de interações da RI com a matéria, em que o Efeito Fotoelétrico (A), Efeito Compton (B) e Produção de Pares (C) são os mais expressivos na radioterapia.....	49
Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação da hiperexpressão não significativa do miR-326 em neuroesferas tratadas com radiação ionizante.....	64
Gráfico 2. Representação da expressão significativamente aumentada do miR-21 em neuroesferas tratadas com radiação ionizante.....	64
Gráfico 3. Representação da mediana do miR-21 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função da recidiva.....	65
Gráfico 4. Representação da mediana do miR-326 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função da recidiva.....	66
Gráfico 5. Representação da mediana do miR-21 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função do óbito.....	67
Gráfico 6. Representação da mediana do miR-326 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função do óbito.....	68
Gráfico 7. Representação da mediana do miR-21 expressa nas neuroesferas em função da recidiva.....	69
Gráfico 8. Representação da mediana do miR-326 expressa nas neuroesferas em função da recidiva.....	70
Gráfico 9. Representação da mediana do miR-21 expressa nas neuroesferas em função do óbito.....	71
Gráfico 10. Representação da mediana do miR-326 expressa nas neuroesferas em função do óbito.....	72
Gráfico 11. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas controle.....	74
Gráfico 12. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas irradiada.....	75
Gráfico 13. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas controle.....	77
Gráfico 14. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas irradiada.....	78

Gráfico 15. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas controle.....	79
Gráfico 16. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas irradiada.....	80
Gráfico 17. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas controle.....	82
Gráfico 18. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas irradiada.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função dos grupos experimentais e recidiva obtida a partir de prontuários clínicos após ressecção cirúrgica e protocolo quimioradioterápico.....	65
Tabela 2. Descrição dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função dos grupos experimentais e óbito obtido a partir de prontuários clínicos após ressecção cirúrgica e protocolo quimioradioterápico.....	67
Tabela 3. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função apenas da recidiva.....	68
Tabela 4. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função apenas do óbito.....	70
Tabela 5. Estimação do risco relativo quanto à recidiva.....	72
Tabela 6. Estimação do risco relativo quanto ao óbito.....	73
Tabela 7. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo controle em função da recidiva mediante ASC = 76%, dado IC 95% = 40,39 – 96%.....	74
Tabela 8. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função da recidiva mediante ASC = 52%, dado IC 95% = 20,14 – 82,68%.....	76
Tabela 9. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo controle em função da recidiva mediante ASC = 68%, dado IC 95% = 32,97 – 92,32%.....	77
Tabela 10. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função da recidiva mediante ASC = 76%, dado IC 95% = 40,39 – 96%.....	79
Tabela 11. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo controle em função ao óbito mediante ASC = 79,17%, dado IC 95% = 43,54 – 97,19%.....	80
Tabela 12. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função ao óbito mediante ASC = 54,17%, dado IC 95% = 21,73 – 84,14%.....	81

Tabela 13. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo controle em função ao óbito mediante ASC = 70,83%, dado IC 95% = 35,51 – 93,73%.....	82
Tabela 14. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função ao óbito mediante ASC = 62,5%, dado IC 95% = 28,27 – 89,32%.....	83
Tabela 15. Expressão de microRNAs em neuroesferas de glioblastoma.....	96
Tabela 16. Expressão do miR-21 em neuroesferas de glioblastoma tratadas com radiação ionizante em função dos grupos etários.....	97
Tabela 17. Expressão do miR-326 em neuroesferas de glioblastoma tratadas com radiação ionizante em função dos grupos etários.....	98
Tabela 18. Características demográficas: sítio tumoral e ressecção cirúrgica.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-HG: oncometabólito 2-hidroxiglutarato
AGO2: proteína argonauta 2
AKT: proteína quinase específica da serina/treonina
ALD: aldolase
ANGPTL: angiopoietina
Anti-oncomiRs: microRNAs supressores tumorais
ARNT: translocador nuclear de receptores de hidrocarbonetos acrílicos
ARRB1: arrestina beta 1
ASC: área sob a curva
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: trifosfato de adenosina
BCL2: linfoma de células B2
BECs: células endoteliais constituintes dos vasos sanguíneos
bHLH: domínio de ligação de DNA de hélice-alça-hélice básico
BMDCs: células derivadas da medula óssea
BMI1: oncogene polycomb de dedo anular
BNIP3: proteína 3 de interação BCL2
BTG2: PC3 proteína NGF-indutível anti-proliferativa
BVS: fator de Von Hippel-Lindau
CAFs: fibroblastos associados ao tumor
CAIX: anidrase carbônica IX
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina
CD: determinante de classificação
CDC25A: fosfatase 1 indutora da fase M
cDNA: DNA complementar
COL4A1: colágeno tipo IV alfa 1
COX-2: cicloxigenase 2
CSCs: células-tronco tumorais
CT: limiar do ciclo
CTL ou TCD8⁺: linfócitos T CD8⁺ citolítico
CXC: alfa-quimiocinas
CXCR4: receptor de quimiocina tipo 4
CyclinD1: ciclina D1
DEPC: inativador de RNAses (dimetilpirocarbonato)
DGCR8: cofator da drosha
DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: trifosfato de nucleosídeo
DROSHA: ribonuclease tipo III
EGF: fator de crescimento epidérmico
ELK1: fator de transcrição ETS
EMT: transição epitélio-mesenquimal

ENO1: α -enolase
EROs: espécies reativas de oxigênio
ESCs: células-tronco embrionárias
Ets-1: proto-oncogene ETS1
FDR: taxa de falsa descoberta
FGF: fator de crescimento fibroblástico
FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FRET: transferência de energia por ressonância de fluorescência
GBM: glioblastoma multiforme
GFAP: proteína ácida fibrilar glial
GLIT3: transportador de glicose neuronal de alta afinidade
GLUT: transportadores de glicose
GSCs: células-tronco do glioma
Gy: Gray (quantidade de radiação ionizante absorvida)
 H^+ : cátion hidrogênio
H19: transcrito materno impresso
H3K4: histona H3 lisina-4
H3K9: histona H3 lisina-9
HDACs: histonas desacetilases
HIFs: fatores induzíveis por hipóxia
HK: hexoquinase
HMGA: proteínas do grupo de alta motilidade A
HOTAIR: RNA antisense transcrito HOX
HRE: elemento de resposta à hipóxia
IC: intervalo de confiança
IDH: gene isocitrato desidrogenase
IFN- γ : interferon-gama
IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL: interleucinas
lncRNAs: RNAs não codificadores longos
iNOS: óxido nítrico sintase
INSM1: proteína 1 associada ao insulinoma
iPSC: células-tronco pluripotentes induzidas
ITGB8: integrina beta-8
JAKs: janus quinases
JNKs: c-Jun N-terminal quinases
L1CAM: molécula de adesão celular L1
LDHA: lactato desidrogenase A
LECs: células endoteliais linfáticas
LET: transferência linear de energia
LIM: quinase 1 do domínio LIM
MAPK: proteína quinase ativada por mitogênio
MCT: transportador de monocarboxilato
MDSCs: células supressoras derivadas da mielóide

MEC: matriz extracelular
MetastamiR: microRNAs metastáticos
MMP-9: metaloproteinase-9
mRNA: RNA mensageiro
MSH2: mutS homólogo 2
mTOR: alvo da rapamicina de mamífero
NADH: ubiquinona oxiredutase
NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NANOG: fator de transcrição homeobox
ncRNA: RNA não codificadores
NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B
NGF: fator de crescimento nervoso
NHE1: antiportante sódio-hidrogênio 1
NOB: proteína de ligação a RNA NOB1
NPs MnO₂: nanopartículas de dióxido de manganês
NSCs: células-tronco neurais
OCT4: fator de transcrição de ligação a octâmero 4
ODD: domínio de degradação dependente de oxigênio
OER: relação do enriquecimento em oxigênio
OLIG2: fator de transcrição de oligodendrócitos
OncomiRs: microRNAs oncogênicos
OxPhos: fosforilação oxidativa
P4HA: prolilhidroxilases de colágeno
PAS: domínio Per-Arnt-Sim
PAX7: proteína da caixa emparelhada 7
Pb: pares de base
PBS: tampão fosfato-salino
PDCD4: proteína 4 de morte celular programada
PDGFB: fator de crescimento derivado de plaquetas B
PD-L1: ligante de morte programada 1
PET: tomografia por emissão de pósitrons
PFKFB-3: frutose 2, 6 bisfosfatase
PFK-L: fosfofrutoquinase tipo hepático
PGK1: fosfogliceratocinase 1
PHD: prolilhidroxilases
pHi: proteínas reguladoras de pH intracelular
PI3: PI 3,4-bifosfato
PI3K: fosfoinositídeo 3-quinases
PINK1: quinase 1 induzida por PTEN
PIP3: fosfatidilinositol(3,4,5-trifosfato)
piRNA: RNA que interage com o Piwi
PKM2: piruvatoquinase
PLOD2: lisilhidroxilases
POU3F2: fator de transcrição 2 classe 3 de domínio POU

PPIC: peptidil-prolil cis-trans isomerase C
PTEN: fosfatase e homólogo de tensina
REST ou NRSF: fator de transcrição silenciador do gene RE1
RI: radiação ionizante
RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA
Ran-GTP: cofator da exportina 5
RNA: ácido ribonucleico
rpm: rotação por minuto
RR: riscos relativos
RT-PCR: reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real
SALL2: fator de transcrição 2 do tipo spalt
SCF: fator de células-tronco
SDF-1: fator 1 derivado do estroma
SH3: domínio SRC de homologia 3
siRNA: pequenos RNAs interferentes
SLUG ou SNAIL: repressor transcricional 2 da família de caracol
Smo: proteína smoothened
SOX: fator de transcrição da SRY-box
STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
S100: domínio de ligação de cálcio do tipo S100/ICaBP
TAECs: células endoteliais associadas a tumores
TAMs: macrófagos associados a tumores
TERT: transcriptase reversa da telomerase
TGFB2: receptor do fator de crescimento beta de transformação tipo 2
TGF- β : fator de crescimento transformador beta
Th17: linfócitos auxiliares 17
TICs: células iniciadoras de tumor
TIE2: receptor da angiopoietina 2
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TP53: proteína supressora de tumor p53
TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Treg: linfócitos T regulares
TWIST: proteína relacionada à torção 1
Ub: ubiquitina
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial
VHL: ubiquitina ligase von Hippel-Lindau
ZEB: fator de transcrição de homeodomínio
ZIC3: fator de transcrição dedo de zinco Cys2His2
ZNF300: repressor transcricional dedo de zinco 300

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Células-tronco tumorais.....	21
2.2 Fatores induzíveis por hipóxia (HIFs)	26
2.3 MicroRNAs, células-tronco tumorais e hipóxia	34
2.4 Glioblastoma multiforme	42
2.5 Efeitos radioterápicos no nicho tumoral hipóxico	48
3. JUSTIFICATIVA	54
4. OBJETIVO.....	54
5. PACIENTES E MÉTODOS	54
5.1 Amostras primárias	55
5.2 Processamento e Cultivo celular	55
5.3 Grupos Experimentais	56
5.4 Avaliação da viabilidade celular através do corante Azul de Tripán.....	57
5.5 Extração de RNA.....	58
5.6 Quantificação e qualidade do RNA total	59
5.7 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	59
5.8 Condições da reação de PCR em tempo real.....	60
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
7. RESULTADOS	62
7.1 Dados clínicos epidemiológicos.....	62
7.2 Quantificação das expressões dos microRNAs em neuroesferas.....	63
7.3 Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 a partir de dados demográficos.....	65
7.4 Risco relativo quanto à recidiva e óbito	72
7.5 Curvas ROC.....	73
7.5.1 Análise da predição do miR-21 em função da recidiva	73
7.5.2 Análise da predição do miR-326 em função da recidiva.....	76
7.5.3 Análise da predição do miR-21 em função do óbito	79
7.5.4 Análise da predição do miR-326 em função do óbito	81
8. DISCUSSÃO	84
9. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE.....	96

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços, a alta taxa de mortalidade devido à recorrência do câncer continua sendo um dos maiores desafios no campo científico. Estudos recentes demonstram o importante papel das células-tronco tumorais (CSCs) associadas a vários mecanismos moleculares tais como: tumorigênese, progressão tumoral, invasão, recidiva, formação de metástases e resistência às opções terapêuticas. Por definição, células-tronco tumorais são células que detêm habilidades de auto-renovação, bem como a capacidade de reconstituir a heterogeneidade do tumor, existentes em inúmeros tumores altamente malignos, como o glioblastoma. Estudos também demonstram importância do mecanismo de hipóxia associado as células-tronco tumorais com destaque a regulação da expressão de HIF-1 α ou HIF-2 α com mau prognóstico na maioria de pacientes (HUANG; TRINH; ALJOUFI; BROXMEYER, 2018).

Dada à plasticidade intratumoral, além da mutabilidade inerente de células cancerígenas, as pesquisas demonstram modular o nicho ao invés de estipularem terapias baseadas nas características intrínsecas das células-tronco tumorais. Embora essa estratégia já tenha apresentado resultados promissores, a agressividade das propriedades celulares tipo tronco mediante à hipóxia as tornam independentes de outros sinais advindos de seus nichos (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Hipóxia intratumoral é uma importante força motriz à progressão do câncer, essencialmente mediada pelo fator induzido por hipóxia (HIFs) *pari passu* a subseqüentes ativações de vias transdutoras de sinais nucleares que inativam genes supressores tumorais e excitam oncogenes, nos quais formam oncosferas com elevadas taxas mitogênicas (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

A bioenergética celular é extensivamente remodelada, do oxidativo mitocondrial ao metabolismo glicolítico, somada ao microambiente ácido, fornecem inúmeras adaptações favoráveis à agressividade do tumoral, incluindo as modulações no perfil de expressão de microRNAs e os mesmos desempenham papéis neste microambiente para propiciar a manutenção do estado precursor (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

O glioblastoma multiforme continua sendo uma neoplasia incurável, em que os protocolos terapêuticos mais agressivos ainda não se habilitam em aumentar a sobrevida média dos pacientes, nos quais se resumem de 12 a 15 meses (CLARKE; MOOSA; ANZIVINO; WANG et al., 2014).

O processo da radioterapia determina que células do glioma sejam expostas a intensidade e durabilidade de estresse oxidativo variáveis, contudo, baixos níveis de oxigênio molecular tornam a radioterapia menos efetiva do que em condições normóxicas, determinando que a presença de oxigênio molecular seja necessária para sensibilizar células radorresistentes (CLARKE; MOOSA; ANZIVINO; WANG et al., 2014).

A radorresistência em glioblastoma multiforme está fundamentada na regulação expressa por HIF-1 α , este, por sua vez, ao estabelecer cooperação com outras vias de sinalização, influencia em processos como a clonogenicidade, reparo de DNA e sobrevivência celular (LIAO; MA; CHEN; LU et al., 2019).

Atuante com a hipóxia, HIF-1 reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estimula a defesa antioxidante das células tumorais, por conseguinte, os EROs são sintonizados com microRNAs desregulados e repercutem na oxidação de tecidos tumorais ou auxiliam na redução deste efeito, contribuindo para resistência à radioterapia (ZHANG, 2019).

É importante ressaltar que os microRNAs podem interromper a expressão de HIF durante a hipóxia, tornando-os importantes alvos terapêuticos, entretanto, HIF-1 α é expresso por progenitores neurais normais em outras condições severamente hipóxicas, limitando seu valor terapêutico, e reforçando a pertinência de investir em estudos que analisem as expressões de microRNAs correlacionadas aos mecanismos envolvidos às células-tronco tumorais, como a regulação HIF-1 α , nos protocolos terapêuticos convencionais recorrentes à radiação ionizante em cânceres de alta malignidade, como o glioblastoma (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Células-tronco tumorais

As CSCs ou também descritas como células iniciadoras de tumor (TICs) definem um subconjunto celular com capacidade de auto-renovação, nas quais geram diferentes tipos de células constituindo a heterogeneidade tumoral. Diferenciar-se não é uma característica obrigatória das CSCs, porém no microambiente, repovoar os tipos celulares constantemente no tumor primário e metastático elenca sua principal intervenção prognóstica, referindo sua potente capacidade de iniciação cancerígena à necessidade de desenvolver protocolos terapêuticos que as erradiquem e tragam bons prognósticos (TOH; LIM; CHOW, 2017).

TICs já foram descritas através de diferentes marcadores da superfície celular que se mostram adequados à identificação específica. Entretanto, subconjuntos de CSCs podem não os expressar ou mesmo a expressão desses podem se alterar de acordo com o estadiamento do tumor, fenômeno encontrado em gliomas malignos descartando a funcionalidade dos marcadores de superfície. Desta forma, estudos sobre CSCs começaram a se afastar da dependência da superfície celular e outros métodos complementares surgiram a fim de mensurar atividades gênicas e vias de sinalização das CSCs que podem servir para identificá-las, como os seus mecanismos moleculares (TOH; LIM; CHOW, 2017).

As CSCs compartilham características semelhantes às células-tronco normais, como expressão dos marcadores de células-tronco, capacidade de auto-renovação proliferativa persistente, formação de esferas celulares, entre outras. Em contraste, as células-tronco do câncer sólido se diferem das células-tronco normais em frequência, proliferação, expressão aberrante de marcadores de diferenciação, anormalidades cromossômicas e formação tumoral. Associam-se à iniciação, progressão, manutenção e recorrência tumoral, juntamente com a resistência terapêutica atual, sugerindo-as essenciais à agressividade do tumor (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Os mecanismos epigenéticos interferem na patogênese dos CSCs, uma vez que a metilação do DNA desempenha papel importante na perda de pluripotência e plasticidade celular. Isto é, as CSCs podem ser geradas a partir da reprogramação epigenética, onde genes específicos de células-tronco recuperam sua expressão e genes específicos à diferenciação são desregulados (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Células-tronco normais e CSCs não são raras e inativas em seus nichos como se afirmavam, ao contrário, se encontram em abundância, proliferam vigorosamente e, de acordo com a hierarquia celular, são substancialmente mais plásticas, fenômeno que dificulta a identificação e erradicação de CSCs. No topo da hierarquia celular encontram-se as células-tronco, nas quais representam a menor subpopulação (0,1-0,8%) entre a heterogeneidade celular e dividem-se em pouca frequência, visto que a quiescência busca reduzir a probabilidade de replicação errônea do DNA e ocasionar mutações (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Segundo a hierarquia celular, os tumores são alimentados pela auto-renovação das CSCs e a maior parte da massa tumoral é composta por não-CSCs, que são capazes apenas de se proliferar transitoriamente e, portanto, não contribuem ao estadiamento em longo prazo e raramente iniciam tumores em ensaios de xenoenxerto. Mesmo que a hierarquia limite a plasticidade celular, as não-CSCs são resistentes ao tratamento convencional com quimioterapia e radiação, ao passo que a recidiva pós-protocolo terapêutico também pode ser justificada pela desdiferenciação das não-CSCs (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Células filhas não exibem destinos intrinsecamente divergentes, uma vez que a divisão de uma célula-tronco pode resultar em zero, uma ou duas novas células-tronco, nas quais competem pelo espaço de nicho disponível, processo denominado de concorrência neutra, contrastante com o modelo clássico – mitose assimétrica invariavelmente cria uma nova célula-tronco e uma célula filha (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Hierarquias de células-tronco podem ser extensivamente plásticas, o que significa que células totalmente diferenciadas podem entrar novamente ao nicho e desdiferenciar para substituir as células-tronco perdidas. A hierarquia de CSCs prevalece em muitos tipos de tumores, porém, há um aumento da apreciação de que nem todo câncer adere ao modelo clássico, evidenciando que tanto as CSCs quanto as não-CSCs são plásticas e capazes de sofrer transições fenotípicas em resposta a estímulos apropriados, entretanto, por não serem conectadas, o potencial tumorigênico parece refletir sua adaptação a sinais ambientais específicos (BATLLE; CLEVERS, 2017).

É importante ressaltar que a resposta regenerativa não se constatou em casos metastáticos, o que implica que a plasticidade das não-CSCs é regulada

diferencialmente pelo microambiente primário em oposição ao metastático. Em nítido contraste, a organização hierárquica do glioblastoma é proposta como unidirecional e amplamente irreversível, como demonstrado à inibição do crescimento tumoral e sobrevida prolongada sem regeneração aparente de células não-CSCs a partir de modelos murinos. Todavia, um estudo recente identificou um conjunto de fatores de transcrição (POU3F2, SOX2, SALL2 e OLIG2) essenciais à propagação de CSCs no glioblastoma, além disso, as não-CSCs poderiam ser reprogramadas somente após a reexpressão desses quatro fatores de transcrição (BATLLE; CLEVERS, 2017).

A metilação do DNA, principalmente a hipermetilação, tem sido associada ao silenciamento de genes supressores tumorais e genes responsivos pela diferenciação celular em vários tipos de câncer, o que contribui à formação de CSCs e manutenção de suas propriedades como a auto-renovação. Portanto, o acúmulo de anormalidades epigenéticas sugere ser um evento que predispõe células tumorais a adquirirem mais mutações e instabilidade genômica (TOH; LIM; CHOW, 2017).

As vias de sinalização Wnt/ β -catenina, Hedgehog e Notch tem funções importantes no desenvolvimento e manutenção do tecido embrionário e adulto por mediar a proliferação e destino celular homeostático, bem como na auto-renovação e diferenciação de CSCs. De fato, verificou-se que estão implicadas na tumorigênese em vários tecidos via metilação gênica, modulação de histonas e microRNAs (TOH; LIM; CHOW, 2017).

Durante a progressão tumoral, a metástase está associada à indução da transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo que resulta na diminuição da adesão célula-célula, perda de polaridade celular, aumento da motilidade celular e aquisição de propriedades mesenquimais invasivas. Há evidências de que a ativação da EMT confere a perda da quiescência das CSCs, tornando-as iniciadoras de tumor, uma vez que células tumorais, ao reativarem propriedades do tipo tronco, disseminam com maior facilidade, aumentando a probabilidade de metastatizar sítios à distância. Várias vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento embrionário, como Wnt, Hedgehog e Notch, foram identificadas para regular o processo EMT, principalmente por estimularem a síntese do fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Consequentemente, a desregulação epigenética dessas vias e seus fatores

de transcrição podem ativar indução de EMT aberrante, resultando em metástase e contribuindo para um pior prognóstico (TOH; LIM; CHOW, 2017).

A ativação da EMT confere propriedades patogênicas às CSCs, pois ao metilar o promotor do gene E-caderina, auxilia no recrutamento de histonas desacetilases (HDACs) ao locus em análise, levando à desacetilação das histonas e ao silenciamento de seu transcrito. OCT4 e NANOG são fatores de transcrição necessários para manter a pluripotência, auto-renovação, vigilância do genoma e a determinação do destino celular. Deste modo, a cromatina transcritionalmente ativa, reforçada por metilação de H3K4 e hiperacetilação de H3K9 induziu a hiperexpressão de OCT4 e NANOG para manutenção da auto-renovação (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

A superexpressão dos fatores de transcrição que induzem a EMT não apenas reforça o fenótipo mesenquimal migratório, mas também agrava o potencial de iniciação tumoral das CSCs. Em muitos tipos de carcinomas, metástases apresentam organização epitelial e carecem de características mesenquimais, determinando que as células tumorais migratórias voltem ao estado epitelial ao atingir o sítio secundário, ou que a EMT não seja necessária para metástase em certos contextos, ou seja, células tumorais epiteliais poderiam migrar sem adotar um fenótipo mesenquimal. De fato, células migratórias originárias de câncer de mama, submetidas à EMT, imediatamente revertem a um estado epitelial ao atingir o local metastático (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Desta forma, estas evidências desacordariam da hipótese de que a EMT é necessária para sustentar o fenótipo tronco, contudo, células tumorais epiteliais adotam estados mesenquimais intermediários que são reversíveis, o que resultaria em um fenótipo plástico de CSC. Como se observou em células basais do câncer de mama ao transitarem entre estados não-CSC e CSC, dependendo da expressão de ZEB1, indutor de EMT. Tomados em conjunto, este e outros estudos sugerem que em muitos tipos de câncer, a hierarquia das CSCs não é rígida, ao contrário, a conversão de CSCs e não-CSCs pode ser um fenômeno relativamente comum que é impulsionado por estímulos ambientais, ou simplesmente pela estocástica (BATLLE; CLEVERS, 2017).

O metabolismo baseado na fosforilação oxidativa (OxPhos) é crucial à geração de energia suficiente para apoiar a manutenção de tecidos complexos, mas

também produz espécies reativas de oxigênio que causam potenciais disfunções em todos os tipos celulares, inclusive nas células-tronco. Atualmente, é sustentado que células-tronco evitam o OxPhos e realizam glicólise como forma de proteção contra EROs (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Semelhante aos tecidos normais, o câncer contém populações celulares metabolicamente distintas, porém, CSCs e não-CSCs preferencialmente utilizam glicólise ou OxPhos, dependendo do tipo de tumor e modelo de sistema usado. Por exemplo, as células-tronco de glioma dependem do OxPhos, mas passam para glicólise quando o metabolismo oxidativo é inibido, visto que CSCs do cérebro se adaptem a condições restritas a nutrientes, regulando positivamente o transportador de glicose neuronal de alta afinidade GLUT3 (BATLLE; CLEVERS, 2017).

A plasticidade celular através do EMT também está associada à reprogramação metabólica para que as CSCs se adaptem à colonização metastática, tal afirmação é confirmada ao analisar células tumorais pancreáticas que, sem o fator de transcrição ZEB1, não são submetidas à EMT e há prejuízos perante a capacidade de mudança ao metabolismo glicolítico quando OxPhos é inibido (BATLLE; CLEVERS, 2017).

Adaptação metabólica mediada pela transcrição do fator HIF-1 α é denominada de Efeito Warburg para que células tumorais exibam metabolismo reduzido de glutamina e OxPhos enquanto transformam piruvato derivado da glicose em lactato. Embora a maioria dos tumores se concentre no metabolismo da glicose, relatos recentes revelaram que alguns tumores obtêm energia através de ácidos graxos, um processo mediado pela expressão do receptor de ácido graxo CD36 em um subconjunto de CSCs agressivas (BATLLE; CLEVERS, 2017).

2.2 Fatores induzíveis por hipóxia (HIFs)

A maioria das respostas à hipóxia é desencadeada por uma família de fatores de transcrição denominada fatores induzíveis por hipóxia (HIFs), que induzem a expressão de um conjunto de genes que auxilia as células tumorais a se adaptarem em ambientes hipóxicos para que processos como angiogênese, linfangiogênese, apoptose, migração e invasão celular, respostas antitumorais, regulação do pH intra e extracelular e metabolismo glicolítico possam ajustar o microambiente tumoral (BALAMURUGAN, 2016).

A hipóxia é uma das características mais comuns do microambiente tumoral sólido, sendo apreciada para manter a proliferação de ciclo lento, estresse oxidativo reduzido e status indiferenciado em várias populações de células-tronco (BALAMURUGAN, 2016).

A perfusão sanguínea inadequada em tumores caracteriza hipóxia transitória ou aguda, enquanto, a difusão de oxigênio limitante determina a hipóxia crônica em massas tumorais aumentadas. HIF-1 e o HIF-2 são acionados pela hipóxia intratumoral, visto que a superexpressão do HIF-1 α está documentada em várias neoplasias com forte associação à prevalência de metástases e mortalidade (BALAMURUGAN, 2016).

Como já mencionado, os efeitos da hipóxia são mediados principalmente por HIFs, os quais se caracterizam como heterodímeros compostos por uma subunidade alfa (HIF- α) e uma subunidade beta (HIF- β), também conhecida como translocador nuclear de receptores de hidrocarbonetos arílicos (ARNT). Até o momento, três subunidades alfa (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) e duas subunidades beta (ARNT, ARNT2) foram identificadas. Todas as subunidades HIF- α contêm um domínio bHLH N-terminal para ligação ao DNA, um domínio PAS para heterodimerização e um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) para regulação da estabilidade de proteínas (HUANG; TRINH; ALJOUFI; BROXMEYER, 2018).

Figura 1. Alinhamento estrutural das subunidades HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α .

Fonte: Retirada de (SAINT-MARTIN; CASTAÑEDA-PATIÁN; ROBLES-FLORES, 2017).

O HIF-1 α é expresso ubiquamente, enquanto as expressões de HIF-2 α e HIF-3 α são restritas a tipos celulares específicos. ARNT e ARNT2 compartilham 57% da sequência de aminoácidos e ambos contêm domínios bHLH e PAS. A subunidade HIF- α é regulada pela degradação proteolítica dependente de oxigênio, enquanto a subunidade HIF- β é expressa constitutivamente. Em normóxia, o HIF- α é hidroxilado em resíduos prolina no domínio ODD por prolihdroxilases (PHD), reconhecido pela ubiquitina ligase von Hippel-Lindau (VHL) e formam um complexo com o fator de Von Hippel-Lindau (BVS). Por sua vez, esse complexo se liga à ubiquitina (Ub) e subsequentemente se degrada no proteassoma, protease dependente de trifosfato de adenosina (ATP) usada para destruir proteínas danificadas ou proteínas com erros de síntese, as quais são marcadas para degradação através da ligação de cadeias de ubiquitina em série, que serão reconhecidas para que o processo se inicie. Este processo é inibido durante a hipóxia, a atividade das PHD diminui, o que estabiliza o HIF-1 α e o acumula no citoplasma para ser fosforilado pela proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Uma vez fosforilado, o HIF-1 α se transloca ao núcleo e se liga à subunidade HIF-1 β para formar o complexo [HIF-1 α /HIF-1 β]. Por meio do elemento de resposta à hipóxia (HRE), esse complexo se liga a

sequências de DNA específicas presentes nas regiões promotoras e potenciadoras de genes alvo (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Os papéis desempenhados por HIF-3 α sob hipóxia e na biologia do câncer não são claros. A visão predominante de que HIF-3 α baseava-se como regulador negativo de HIF-1 α e HIF-2 α já se refutou, uma vez que algumas pesquisas demonstram que tanto o HIF-3 α humano quanto o HIF-3 α do peixe-zebra foram capazes de regular positivamente expressão de genes alvos, sugerindo que a função desse fator é evolutivamente conservada (SAINT-MARTIN; CASTAÑEDA-PATIÁN; ROBLES-FLORES, 2017).

Figura 2. Biossíntese de HIF-1 α .

Fonte: Retirada de (William George Kaelin Jr; Peter John Ratcliffe; Gregg Leonard Semenza, 2019).

O HIF-1 regula transcrição de centenas de genes em resposta à hipóxia, entre os quais estão transportadores de glicose, enzimas glicolíticas, fatores de crescimento e genes envolvidos na gliconeogênese, metabolismo do fosfato e da heme, eritropoiese, transporte de ferro, regulação vasomotora e síntese de óxido nítrico. Embora o HIF-1 esteja principalmente relacionado a genes que conduzam à

pró-sobrevivência, também atua na apoptose ao promover o aumento da p53 e outras proteínas pró-apoptóticas como BCL2 e BNIP3, as quais mantêm o equilíbrio dinâmico do crescimento celular (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), coordenador chave da imunidade, resulta na ativação da inflamação crônica, por conseguinte, inúmeras evidências sugerem que NF- κ B e HIF-1 se vinculam ao sinalizarem à hipóxia. Em cooperação ao NF- κ B, a via JAK-STAT3 também se vincula fisicamente ao HIF-1 α na sinalização inflamatória ao ativarem genes relacionados à sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e até mesmo imunorresistência mediada por hipóxia. É importante notar que a ativação de STAT3 e NF- κ B promove quimiorresistência e radiorresistência em vários tipos de câncer, semelhantes ao HIF-1. Ou seja, HIF-1 está ligado a hipóxia e inflamação através de aliados para impulsionarem a progressão tumoral (BALAMURUGAN, 2016).

Hipóxia intratumoral, ao operar HIF-1, leva à liberação de fatores que recrutam macrófagos associados a tumores (TAMs), células supressoras derivadas da mielóide (MDSCs) e outras células imunes ao sítio tumoral, nos quais maximizam a angiogênese ao expressarem fatores pró-angiogênicos como, VEGF, IL-6, TNF- α , TIE2, e enzimas pró-angiogênicas incluindo, iNOS, MMP 9 e COX-2, que elevam a probabilidade metastática, bem como a supressão imunológica antitumoral pela secreção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores (BALAMURUGAN, 2016).

Na reação desmoplásica, o ambiente fibroinflamatório limita a administração de medicamentos antitumorais devido à diminuição da perfusão sanguínea. O HIF-1 também contribui à remodelação da matriz extracelular (MEC) facilitando a invasão metastática por meio da ativação de fibroblastos associados ao tumor (CAFs), nas quais secretam proteínas de reestruturação como prolilhidroxilases de colágeno (P4HA1 e P4HA2) e lisilhidroxilases (PLOD2). Deste modo, a remodelação mediada por HIF-1 ao ativar MDSCs, CAFs, células endoteliais associadas a tumores (TAECs), TAMs e MEC assume um papel central nas modificações do microambiente tumoral favorecendo a agressividade do tumor e supressão imunológica antitumoral (BALAMURUGAN, 2016).

Sinais indutores de EMT como SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1, CAIX e principalmente os membros da família de fatores de crescimento TGF- β são ativados por HIF-1. Portanto, a regulamentação da manutenção das CSCs e da EMT ocorre nos nichos hipóxicos ao ativarem HIF-1 para induzirem o perfil gênico característico de CSCs, como OCT4, SOX2, NANOG, MYC, CD44 e CD133, o que pode ser avaliado em glioblastoma, neuroblastoma, câncer de pâncreas, gástrico e mamário (BALAMURUGAN, 2016).

EROs aumentadas, em meio à hipóxia crônica, surgem como estímulos críticos de sinalização tumorigênica ao conduzir a desdiferenciação de células tumorais e acabam por repercutir em metástase. No entanto, no microambiente hipóxico pancreático, a atenuação de EROs suprimiu a EMT e, como consequência, a metástase, demonstrando que EROs e HIF-1 se beneficiam mutuamente por sua geração e ativação, respectivamente, o que aumenta a agressividade dos tumores (BALAMURUGAN, 2016).

A expressão de HIF-1 foi correlacionada com o grau do tumor em gliomas, com a maior expressão encontrada nos gliomas de alto grau como glioblastoma, decorrente da necrose pseudopalicada. Crescimento tumoral depende da neoangiogênese, porém, por mais que os tumores sejam altamente vascularizados, a vascularização é mal organizada e exhibe graves problemas estruturais e anormalidades funcionais, conseqüentemente, o suprimento reduzido de oxigênio ocasiona as regiões hipóxicas. Neste contexto, HIF-1 α aumenta a expressão do ligante de VEGF, CXCL e SDF-1 que promovem a angiogênese por meio de mecanismos diferentes resultando vasos malformados, o que desencadeia o ciclo agressivo do glioblastoma (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Em suma, *in vitro*, a hipóxia, caracteriza a elevação de marcadores de células-tronco, diminuição de marcadores associados à diferenciação e promovem a clonogenicidade, principalmente as neuroesferas em glioblastoma (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

O HIF-1 regula isoformas de enzimas glicolíticas que diferem das encontradas em células não tumorigênicas, potencializando a produção energética por meio das vias de biossíntese que caracterizam o Efeito Warburg, nas quais as células tumorais geram moléculas energéticas de ATP principalmente pela quebra não

oxidativa da glicose (glicólise aeróbica), em vez de fosforilação oxidativa convencional (BALAMURUGAN, 2016).

Os alvos de HIF-1 na via glicolítica incluem transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT1, GLUT3), enzimas tais como hexoquinase 1 e 2 (HK1, HK2), fosfofrutoquinase tipo hepático (PFK-L), aldolase A e C (ALD-A, ALD-C), fosfogliceratocinase 1 (PGK1), α -enolase (ENO1), piruvatoquinase (PKM2), lactato desidrogenase A (LDHA) e frutose 2, 6 bisfosfatase (PFKFB-3) (BALAMURUGAN, 2016).

GLUT1, HK2 e LDHA também são alvos das vias oncogênicas MYC e mTOR, e, em cooperação ao HIF-1, sanam as necessidades metabólicas das células cancerígenas, fornecendo alto fluxo glicolítico ao passo que regulam o efeito Warburg. Transportadores de catabólitos, como o transportador de monocarboxilato 4 (MCT4), responsivos por exportarem o lactato derivado da glicólise, presentes em CAFs dispersos pelo estroma, são ativados por HIF-1. CAFs ativados, além de secretarem moléculas que modulam o potencial proliferativo e invasivo das células tumorais, fornecem acoplamento respiratório permitindo que as mesmas sobrevivam em seu nicho hipóxico (BALAMURUGAN, 2016).

Acidose no microambiente tumoral é consequência do processo glicolítico devido ao aumento dos níveis de lactato e íons H^+ que são ativamente exocitados das células tumorais através das proteínas reguladoras de pH intracelular (pHi) que incluem MCT1 e 4, antiportante sódio-hidrogênio 1 (NHE1) e anidrase carbônica IX (CAIX). Em condições de hipóxia, HIF-1, além de induzir enzimas descritas anteriormente associadas à glicólise, também modula a acidose por ativar a expressão de NHE1, MCT4 e CAIX (BALAMURUGAN, 2016).

A acidose modula respostas inflamatórias e funções celulares para atenuar a imunidade antitumoral e a eficácia da absorção de drogas, somado com novas evidências que sugerem ao efeito Warburg importância na imunidade adaptativa por suprimir células T, o que desabilita a vigilância imunológica. Portanto, o microambiente ácido e a mudança metabólica fornecem inúmeras adaptações favoráveis à progressão e agressividade do tumor (ULLMANN; NURMIK; BEGAJ; HAAN et al., 2019).

As células tumorais, estromais e endoteliais, interagem mediante o controle imposto pela hipóxia, no entanto, como observado nas células cancerígenas

mamárias, ao ativarem o HIF-1 secretam fatores induzíveis como angiopoietina 2 (ANGPTL2), angiopoietina 4 (ANGPTL4), molécula de adesão celular L1 (L1CAM), fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGFB), fator de células-tronco (SCF ou ligante do kit), fator 1 derivado do estroma (SDF1) e VEGF. Esses fatores mediam interações funcionais com células endoteliais constituintes dos vasos sanguíneos (BECs), células endoteliais linfáticas (LECs) e outras células derivadas da medula óssea (BMDCs) que promovem angiogênese, linfangiogênese e, por conseguinte, a metástase (BALAMURUGAN, 2016).

Há constatações que HIF-1 α mantém o estado indiferenciado das células-tronco embrionárias (ESCs) humanas, sugerindo ao gene papel crucial na determinação do destino das células-tronco, por outro lado, relatos conflitantes revelaram que a hipóxia promoveu diferenciação de ESCs humanas em cardiomiócitos e condrócitos. Tais questionamentos podem ser explicados pelo estágio de célula-tronco em que a hipóxia foi introduzida, duração e o grau da hipóxia (HUANG; TRINH; ALJOUFI; BROXMEYER, 2018).

Uma característica distinta entre as ESCs e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) é a dependência do metabolismo glicolítico, independentemente da disponibilidade de oxigênio, confirmando que a bioenergética celular é extensivamente remodelada, do oxidativo mitocondrial ao metabolismo glicolítico. Contudo, iPSC com expressão HIF-1 α interrompida são refratárias à reprogramação. Embora HIF-1 α e HIF-2 α sejam essenciais à troca metabólica, HIF-2 α aplica seu efeito regulatório positivo no início da reprogramação, visto que a estabilização prolongada do HIF-2 α impediu a formação de iPSC através da inibição induzida pelo ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e ativação de caspase 3 (HUANG; TRINH; ALJOUFI; BROXMEYER, 2018).

Frente à resistência à radioterapia, as CSCs são suscetíveis à inibição do metabolismo mitocondrial, no entanto, alterações genéticas, epigenéticas e ambientais das vias metabólicas promovem a reprogramação das CSCs a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial normal para o aumento da atividade glicolítica, ou seja, em células indiferenciadas, o perfil transcriptômico está mais focado no metabolismo glicolítico do que oxidativo, indicando que o estado pluripotente das células se correlaciona com a respiração mitocondrial reduzida (ULLMANN; NURMIK; BEGAJ; HAAN et al., 2019).

Além da glicólise, as CSCs também mostram outras vias metabólicas específicas, como a via do mevalonato ao produzir colesterol e coenzima Q, bem como moléculas envolvidas na transdução de sinais que notificam variados processos celulares que corroboram com a progressão tumoral. A expressão de marcadores de CSCs reduziu-se em neuroesferas em gliomas a partir da diminuição de inibidores da enzima ácido graxo sintase, como a cerulenina (ULLMANN; NURMIK; BEGAJ; HAAN et al., 2019).

Outros aspectos, como o aumento do metabolismo da glutamina, também demonstraram contribuir significativamente a um fenótipo agressivo de CSCs, uma vez a glutaminólise é acionada na falta de glicose. O metabolismo da serina é outra área em destaque no que diz respeito ao câncer. Devido à proliferação excessiva e formação anormal de vasos sanguíneos, a maioria dos tumores humanos sólidos é vascularizada irregularmente e exibe regiões locais de hipóxia. É possível afirmar que a hipóxia intratumoral é resultante da sinalização de HIF-1 α e HIF-2 α , sendo assim, tumores primários com alta expressão da proteína HIF-1 α têm sido associados à baixa taxa de sobrevida de pacientes (ULLMANN; NURMIK; BEGAJ; HAAN et al., 2019).

2.3 MicroRNAs, células-tronco tumorais e hipóxia

Cerca de 70 a 80% do genoma humano é transcrito para RNA e apenas cerca de 2% constitui genes codificadores de proteínas, o que significa que o restante do genoma contém genes não codificadores, principalmente referidos como RNA não codificadores (ncRNA), as quais interagem com PIWI (piRNA), pequenos RNAs interferentes (siRNA) e microRNAs (miR), entre outros. Contudo, aproximadamente 60% de todos os genes codificadores de proteínas são regulados por microRNAs, o que lhes confere um papel fundamental na modulação de numerosos processos e distúrbios celulares, como o câncer. Vários microRNAs desempenham papéis importantes durante a hipóxia, uma característica essencial do microambiente neoplásico por estar associada à manutenção do estado celular indiferenciado, uma vez que a restrição de oxigênio expande a fração de células positivas à marcadores que especificam o estado de células-tronco. Contudo, a hipóxia e o estado de

células-tronco influenciam o perfil de expressão de microRNAs (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Os microRNAs são transcritos de diversas regiões genômicas como longos transcritos primários (pri-miRNA) pela RNA polimerase II, apesar de algumas evidências sugerirem que inúmeros microRNAs possam ser transcritos por uma RNA polimerase III, sendo que esses microRNAs interpõem-se entre sequências repetidas Alu, elementos transponíveis que encontram-se inseridos no genoma. Após a transcrição, os pri-miRNAs são processados por uma RNase III chamada Drosha e uma proteína de ligação denominada DGCR8/Pasha ao RNA dupla-fita, em precursores dupla fita de aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento, os chamados pré-microRNAs (pré-miRNAs), os quais possuem a forma de grampo de cabelo. Após esta etapa, os pré-miRNAs são exportados ao citoplasma pela proteína Exportina 5-Ran-GTP (RAWAT; KADIAN; GUPTA; KUMAR et al., 2019).

No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela proteína Dicer, sintetizando uma molécula intermediária dupla-fita de aproximadamente 20 pares de base (pb). O microRNA maduro, que corresponde a uma das fitas do dúplex de 20pb, é então incorporado em um complexo proteico referido como Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*). O RISC é constituído em parte por enzimas helicases e proteínas Argonautas, as quais promovem o desenovelamento do dúplex ao quebrar as pontes de hidrogênio que unem as duas fitas. Por conseguinte, uma das fitas do dúplex pode então ser incorporada ao RISC como microRNA maduro, enquanto a outra fita do dúplex é degradada (RAWAT; KADIAN; GUPTA; KUMAR et al., 2019).

E aparentemente, a escolha de qual fita servirá como microRNA maduro parece ser determinada pela estabilidade termodinâmica do dúplex, dando-se preferência à fita cuja extremidade 5' possui menor estabilidade termodinâmica. Dessa forma, o microRNA maduro incorporado ao RISC pode conduzir o complexo proteico ao mRNA complementar para promover a repressão da expressão gênica pós-transcricional (RAWAT; KADIAN; GUPTA; KUMAR et al., 2019).

Após a montagem do complexo ribonucleoprotéico, o microRNA incorporado serve de guia para a seleção do RNA-mensageiro (mRNA) a ser silenciado pelo miRISC. A identificação de um mRNA alvo ocorre por complementariedade de base entre as duas moléculas, ainda que os mecanismos não estejam completamente

elucidados. O modelo canônico é baseado na complementariedade perfeita de uma região de 7-8 nucleotídeos no microRNA denominada *seed* (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Após o reconhecimento do alvo e a ligação de miRISC, o processo de silenciamento pode ocorrer por dois mecanismos: clivagem e degradação do mensageiro ou repressão da tradução, que em etapas posteriores também levarão à degradação do mRNA. O principal efetor no complexo de silenciamento é a proteína Argonauta, sendo a isoforma AGO2 a única com atividade de endonuclease. De maneira geral, o grau de complementariedade entre o microRNA e seu alvo é que irá definir o mecanismo através do qual o silenciamento ocorrerá. Um alto grau de complementariedade está ligado à presença de AGO2 e clivagem direta, enquanto pareamentos imperfeitos, os mais comuns em animais, levam inicialmente a um bloqueio da tradução causando posteriormente uma cascata de eventos envolvendo desadenilação do mRNA e perda de Cap 5' 7-metilguanosina, culminando na degradação do transcrito pelas vias canônicas de decaimento de mRNAs (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Figura 3. Via de biogênese dos microRNAs.

Fonte: Retirada de (LIN; GREGORY, 2015).

O conjunto de microRNAs atuantes no processo neoplásico é dividido em dois grupos, os oncomiRs e os anti-oncomiRs, que regulam negativamente os genes

supressores tumorais e os oncogenes, respectivamente; embora o mesmo microRNA possa apresentar as duas funções, dependendo do seu alvo e do tecido. Além dos oncomiRs e dos anti-oncomiRs, alguns trabalhos referem os metastamiR, que possuem efeitos pró e anti-metastático e se superpõem, portanto, aos dois primeiros grupos (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos microRNAs em câncer são similares aos que afetam os genes que codificam proteínas, incluindo modificações epigenéticas ou mutações nas sequências de DNA, como deleções, substituições, inserções, translocações e amplificações (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Os cromossomos humanos 1, 2, 9, 11, 16, 17 e 19 são localizações críticas à metilação de genes codificantes de microRNA, além disso, evidências recentes também mostram que a expressão de microRNAs pode ser modulada pela metilação de outras regiões reguladoras, como potenciadores (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Especificamente, os microRNAs medeiam uma ampla gama de funções, incluindo potencial replicativo ilimitado, migração e invasão celular, evasão de apoptose, angiogênese, resistência à quimioterapia e à radioterapia, independência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais para inibição de crescimento, reprogramação metabólica, transição epitélio-mesenquimal e manutenção do estado de células-tronco, entre outros que culminam na agressividade do câncer (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Em conclusão, alterações nos genes codificadores de proteínas influenciam na tumorigênese e agressividade dos cânceres em que a maioria desses genes é potencialmente modulada por mecanismos epigenéticos, como microRNAs, pelos quais os mesmos também são desregulados (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Já o HIF-2 α oferece esperança como alvo terapêutico no glioblastoma por estar praticamente ausente em células-tronco normais e especificamente elevado nas CSCs, mesmo sob condições hipóxicas modestas. HIF-2 α não é um fenômeno geral de células-tronco, uma vez que não expressam essencialmente o mRNA correspondente, inclusive muitos fatores inibitórios foram identificados, mas nenhum interfere na via HIF-1 em exclusivo, deste modo, regula as mais variadas atividades

metabólicas. Inibidores seletivos de HIF-2 estão em fase de estudos clínicos, contudo, é desafiador o desenvolvimento de terapias baseadas em CSCs porque as vias regulatórias de seu funcionamento coincidem com as que controlam as células-tronco normais, o que bloquearia a regeneração dos tecidos normais (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Células-tronco, hipóxia e microRNAs constituem uma complexa rede de sinalização na efetuação da agressividade de tumores como abordado, os microRNAs estão implicados na regulação das propriedades de CSCs modulando o destino celular e reprogramando o microambiente hipóxico, assim, se faz necessário esclarecer os mecanismos moleculares direcionados aos microRNAs, cujos resultados forneçam melhores perspectivas sobre as abordagens terapêuticas (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

Figura 4. Ativação de HIF-1 α em microambiente hipóxico para que microRNAs determinem alterações metabólicas e amplifiquem características pró-tumorigênicas.

Fonte: Retirada de (ULLMANN; NURMIK; BEGAJ; HAAN et al., 2019).

O miR-21 é substancialmente considerado como oncomiR em glioblastoma e sua superexpressão está associada a mau prognóstico, contudo, atestou-se que sua superexpressão propicia a pró-diferenciação em CSCs, sugerindo que a inibição do miR-21 poderia desencadear recidivas tumorais. É importante ressaltar que os microRNAs podem interromper a expressão de HIF durante a hipóxia, tornando-os

importantes alvos terapêuticos, entretanto, HIF-1 α é expresso por progenitores neurais normais em outras condições severamente hipóxicas, limitando seu valor terapêutico (MACHARIA; WANJIRU; MUREITHI; PEREIRA et al., 2019).

O miR-21 induz diferenciação por ligar-se ao mRNA correspondente de TGFBR2, receptor do fator de crescimento beta de transformação tipo 2. REST, fator de transcrição silenciador do gene RE1, também denominado NRSF, também é regulado pelo miR-21 e pode suprimir a auto-renovação das células-tronco embrionárias de camundongos devido a diminuição de OCT4, NANOG, SOX2 e c-MYC. Incoerentemente, a agressividade das células cancerígenas hipóxicas pancreáticas é devido ao aumento da expressão de miR-21 (CHEN; LIU; SU; YANG et al., 2017).

Contudo, os demais ensaios demonstram que a superexpressão do miR-21 promove a proliferação celular em condições hipóxicas em que a via de sinalização do AKT está envolvida na mediação deste fenômeno. Deste modo, é passível afirmar que condições hipóxicas podem promover a expressão de miR-21 e elevação da taxa proliferativa em células-tronco neurais (CHEN; LIU; SU; YANG et al., 2017).

A influência perante a proliferação celular deve-se à ligação supressora do miR-21 ao mRNA correspondente à expressão de fosfatase e homólogo de tensina (PTEN). Como importante regulador negativo na proliferação celular, o PTEN funciona através da desfosforilação de PIP3 (fosfatidilinositol3,4,5-trifosfato), resultando na inibição da via PI3K, o que poderia explicar o aumento da fosforilação de AKT a partir da superexpressão do miR-21. Os efeitos biológicos provenientes da via AKT são produzidos através da interação com outras vias de sinalização, incluindo MAPK, Wnt, mTOR, NF- κ B, entre outras, que, ao constituírem a rede bioquímica, resultam em manifestações como a replicação e sobrevivência de células tumorais (CHEN; LIU; SU; YANG et al., 2017).

Ressecção cirúrgica máxima, seguida por radiação adjuvante e quimioterapia com agente alquilante oral temozolomida pode não ser curativa, uma vez que a invasividade altamente difusa pela extensão do tecido cerebral saudável continua a empobrecer a sobrevida mediana dos pacientes (NAWAZ; PATIL; PAUL; HEGDE et al., 2016; WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

No cromossomo 11, o primeiro íntron do gene *ARRB1* é responsivo por transcrever o microRNA neuroespecífico denominado miR-326, este, por sua vez, compartilha as mesmas sequências reguladoras que o gene supracitado, visto que ambas as expressões aumentaram em células-tronco neurais quando expostas a estímulos de diferenciação, evidenciadas pela elevação de marcadores de diferenciação astrocítica, como GFAP e S100, e sub-modulação de marcadores de células-tronco. Determinando que as expressões de miR-326 e *ARRB1* correlacionam-se inversamente com o fenótipo indiferenciado de células tumorais (PO; BEGALLI; ABBALLE; ALFANO et al., 2017; WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

O miR-326 e o gene *ARRB1* são altamente expressos em células diferenciadas, onde induzem a parada do ciclo celular, entretanto, em células-tronco tumorais encontram-se regulados negativamente devido às ilhas de CpG estarem hipermetiladas, ou seja, a desmetilação de sua região promotora determinaria níveis de miR-326 maiores, o que reduziria as características indiferenciadas repercutindo no aumento de diferenciação celular (PO; BEGALLI; ABBALLE; ALFANO et al., 2017).

Outros estudos puderam descrever que o miR-326 promove interleucinas 17 (IL-17) ao interceptar Ets-1, um regulador negativo da diferenciação de células Th17, estas podem recrutar células TCD8⁺, promovendo atividades citotóxicas (PO; BEGALLI; ABBALLE; ALFANO et al., 2017).

A proteína Smoothened (Smo) está altamente expressa em gliomas de alto grau e se correlaciona com a baixa sobrevida dos pacientes. Outros estudos demonstram que o miR-326 afeta diretamente a sinalização Hh ao estabelecer Smo como alvo, portanto, o miR-326 está parcialmente associado à capacidade de auto-renovação e diferenciação de células-tronco do glioma CD133⁺ (DU; LIU; CHEN; DOU et al., 2015; TORAIH; ALY; ABDALLAH; AL-QAHTANI et al., 2017).

A regulação positiva do miR-326 reduziu significativamente a expressão de GLI1 e outras proteínas sintetizadas por células-tronco neurais CD133⁺, incluindo N-myc e CyclinD1, além de marcadores de fenótipo indiferenciado tumoral como BMI1, OCT4, SOX2, NANOG e SHH, caracterizando a diminuição do número e volume de esferas tumorais (DU; LIU; CHEN; DOU et al., 2015).

Deste modo, o miR-326, ao promover a inibição de Smo, faz com que o crescimento e invasão de CSCs sejam reprimidos, reduzindo acentuadamente a massa tumoral, isso somado à indução à apoptose otimiza a sensibilidade à quimioradioterapia, prolongando a sobrevida. É importante ressaltar que a inibição de CSCs CD133⁺ através do direcionamento à Smo impede a proliferação celular, enquanto as tentativas de silenciar as vias de sinalização Noth ou Wnt não demonstraram a mesma efetividade (DU; LIU; CHEN; DOU et al., 2015).

Estudos demonstram que a expressão aberrante da sinalização de PI3 quinase regula negativamente a atividade do miR-326, resultando em alterações na gliomagenese, estas incluem interação matriz-receptor extracelular, via de sinalização de integrinas, adesão celular, entre outros mecanismos relacionados a diminuição do potencial migratório, como também há redução significativa da taxa proliferativa, metabolismo energético, capacidade de formação de neuroesferas e indução de apoptose das células tumorais. A via PI3 ao regular fatores de transcrição como ZIC3, SOX6, INSM1 e ZNF300 em glioblastoma também caracteriza a modulação do gene ARRB1, reprimindo-o; por conseguinte, é possível sugerir que a transcrição de miR-326 e ARRB1 esteja sob controle de um promotor comum (NAWAZ; PATIL; PAUL; HEGDE et al., 2016; TORAIH; ALY; ABDALLAH; AL-QAHTANI et al., 2017).

Também altera a sinalização Notch, apresentando Notch2 e NOB1 como alvos. O inverso também procede, visto que a via Notch pode resultar no silenciamento transcricional do locus miR-326. Outros alvos como os genes COL4A1, NOB, PPIC e ITGB8, os quais são regulados negativamente pelo miR-326, justificam as intercorrências aos processos como migração e invasão celular (NAWAZ; PATIL; PAUL; HEGDE et al., 2016; TORAIH; ALY; ABDALLAH; AL-QAHTANI et al., 2017; WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

O miR-326 expresso em linhagens diferenciadas e células-tronco de gliomas resultou na hipoexpressão das vias de sinalização Notch 1 e 2, comprometendo a atividade metabólica ao reduzir a síntese de moléculas energéticas e a sobrevivência celular. Dentre os inúmeros fatores proteicos destas vias, a isoenzima PKM2 determina-se alvo do microRNA supracitado, visto que a hipoexpressão deste RNA não codificante maximiza a expressão de PKM2 (KEFAS; COMEAU; ERDLE; MONTGOMERY et al., 2010; WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

A PKM2 é restritamente expressão em células tumorais em rápida divisão, contudo, o miR-326, ao inibi-la, determina que a clonogenicidade e invasividade de CSCs e não-tronco sejam diminuídas, além da redução dos níveis de glutathione e ATP, juntamente com a ativação do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Ressalta-se que os mecanismos acima descritos e a indução da taxa apoptótica, através da hiperexpressão das caspases 3 e 7, afetam seletivamente células do glioma, mas não astrócitos normais (KEFAS; COMEAU; ERDLE; MONTGOMERY et al., 2010).

Como resultado da regulação do microRNA miR-326 sobre PKM2, as concentrações reduzidas de glutathione permitem que as células tumorais estejam vulneráveis ao estresse oxidativo, inferiorizando as vantagens adaptativas, fato que deve ser investigado como possível colaboração à sensibilização aos tratamentos padrões (KEFAS; COMEAU; ERDLE; MONTGOMERY et al., 2010).

Shuai Wang e colaboradores constataram uma diminuição acentuada da expressão do miR-326 em gliomas de alto e baixo grau ao compararem aos tecidos cerebrais não tumorais, entretanto, níveis reduzidos deste microRNA foram encontrados mais comumente em tecidos de gliomas com grau patológico avançado (WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

A sobrevida global dos pacientes cujo tumor expressou baixos níveis de miR-326 determinou-se significativamente menor, por conseguinte, não houve associação relevante entre a expressão de miR-326 e outros parâmetros clínico-patológicos, incluindo sexo, idade dos pacientes no diagnóstico e tamanho do tumor. Sugerindo, portanto, que o miR-326 possa ser um marcador de agressividade de gliomas (WANG; LU; GENG; MA et al., 2013).

2.4 Glioblastoma multiforme

Os gliomas são tumores primários do sistema nervoso central originados de mutações e alterações epigenéticas das células da macróglia: oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann e células endoteliais. São caracterizados pelo seu crescimento rápido e progressivo, baixas taxas de incidência e altas taxas de mortalidade, ambas com tendência a aumentar nos próximos anos, especialmente em países em desenvolvimento (SOLDATELLI, 2018).

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com base em dados histológicos e epidemiológicos, classificou os tumores do sistema nervoso central nos seguintes parâmetros: tipo celular, grau de malignidade e localização tumoral. Em 2016, a OMS utilizou parâmetros moleculares aliados aos histológicos para classificar entidades tumorais, variantes e padrões recém-reconhecidos e eliminar alguns já descritos que não possuem mais valor diagnóstico e/ou relevância clínica (SOLDATELLI, 2018).

A nova classificação da OMS reestrutura gliomas difusos, meduloblastomas e outros tumores embrionários. Ademais, reorganiza os glioblastomas de acordo com seu perfil de mutação no gene isocitrato desidrogenase (IDH) e adiciona invasão cerebral como critério de meningioma atípico e ao diagnóstico de tumor fibroso solitário/hemangiopericitoma como uma entidade única e não mais como dois tumores distintos (SOLDATELLI, 2018).

O glioblastoma é o tipo mais agressivo de tumores cerebrais malignos primários e consiste em células pouco diferenciadas, com proliferação vascular, necrose pseudopalisante, infiltração e invasão celular acelerada, recidivas frequentes, mau prognóstico e taxas de sobrevida, estes últimos, se devem pelo protocolo terapêutico fornecer benefícios de curto prazo, principalmente, devido à auto-renovação da população de células-tronco do glioma (GSCs) ao regenerarem totalmente o tumor uma vez concluído o tratamento (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

A zona subventricular adulta contém células-tronco neurais (NSCs) que se assemelham à glia radial presente no desenvolvimento do cérebro embrionário, sobre as quais evidências apontam que GSCs derivam-se desse tipo de tronco ao considerar que moléculas envolvidas na manutenção de NSCs como proteínas citoesqueléticas, telomerase, proteínas supressoras de tumor, fatores de transcrição e crescimento estão frequentemente mutadas no glioblastoma. Ademais, as GSCs compartilham características comuns com os NSCs, como expressão de nestina, alta motilidade, diversidade de progênies, potencial proliferativo considerável, associação com vasos sanguíneos e comunicação bilateral com os constituintes do nicho, como células endoteliais, pericitos, astrócitos e matriz extracelular. Lee e colaboradores demonstraram que, em 56,3% dos pacientes com glioblastoma do tipo selvagem IDH1, as células-tronco neurais contidas na zona subventricular

apresentam mutações nos genes TERT, TP53, PTEN e EGFR, o que foi semelhantemente observado em tumores de alto grau (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

Atualmente, supõe-se que NSCs sejam semelhantes a astrócitos inseridos na zona subventricular derivados de células gliais radiais embrionárias, onde recebem sinais advindos do líquido-cefalorraquidiano e do plasma sanguíneo. GSCs dos glioblastomas se localizam no nicho vascular, como consequência, as células endoteliais produzem inúmeros fatores de crescimento que promovem a auto-renovação, a tumorigenicidade e a sobrevivência das GSCs, estas, por sua vez, podem liberar citocinas e quimiocinas que regulam a vasculatura tumoral, podendo transdiferenciar células endoteliais ou pericitos para formarem seus próprios nichos vasculares e contribuir com a iniciação, progressão, invasão e resistência terapêutica (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

A micróglia adquire fenótipos agressivos caracterizados pela liberação de tróficos e fatores angiogênicos que sustentam o crescimento do tumor, enquanto astrócitos e proteínas da matriz extracelular também apoiam à proliferação e migração das GSCs e, da mesma forma, o líquido-cefalorraquidiano baseia-se como fonte de fatores solúveis que contribuem na mediação da quiescência tanto de NSCs e GSCs através de moléculas envolvidas na sinalização de receptor acoplado à proteína G (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

Histologicamente, glioblastomas primários e secundários são indistinguíveis, mas carregam alterações genéticas específicas em determinados genes. Epidemiologicamente 80% dos casos são GBMs primários, que se desenvolvem rapidamente em pacientes idosos sem evidência clínica ou histológica de lesões precursoras malignas. Amplificação dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e perda de PTEN são típicas nos GBMs primários. Especificamente, a deficiência de PTEN leva a uma regulação positiva do PAX7, que, por sua vez, promove a transformação oncogênica das NSCs, enquanto o EGF impede a diferenciação de NSCs e GSCs, associando-o à proliferação celular aumentada, sobrevivência e infiltração no parênquima adjacente. GBMs secundários progridem de gliomas como astrocitomas difusos ou astrocitomas anaplásicos, são prevalentes em pacientes mais jovens e inequivocamente são descritos pela

presença de mutação de IDH1, ausentes nos GBM primários (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

A inativação da proteína supressora de tumor p53, responsiva por induzir apoptose ou parada do ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico, também tem sido considerada uma característica clássica GBMs secundários e raramente nos GBMs primários, porém, estudos recentes indicam que o TP53 é a chave supressora tumoral para ambos os subtipos de GBM. Mutações no promotor do gene TERT são frequentemente identificados nos GBMs e se correlacionam com a reativação da telomerase, responsável pela manutenção de comprimento dos telômeros para evitar encurtamento cromossômico, fusões nas extremidades e apoptose durante sucessivas divisões celulares, por conseguinte, é importante destacar que mutações em TERT nas NSCs permitem ampliar a atividade de auto-renovação, aumentando a probabilidade de adquirir mutações. A ativação da via de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também participa da gliomagenese, visto que a superexpressão PDGF e seu receptor ocorre com frequência semelhante em gliomas de baixo e alto grau (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

Com exceção do IDH-1, todos os itens acima e genes mencionados também controlam essas funções nas NSCs a partir da zona subventricular. Ainda há controvérsia sobre a origem dos GBMs, é sabido que as NSCs se destacam, pois são mais suscetíveis a transformações malignas do que células diferenciadas cerebrais adultas, como astrócitos, oligodendrócitos e neurônios, contudo, já foram descritas como alvos de transformação e de criação de gliomas malignos (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

As NSCs do hipocampo não entram em contato com o líquido-cefalorraquidiano permitindo que propiciem diferenciação neuronal, tornando-as menos propensas à proliferação e migração e, portanto, menos potencialmente tumorigênicas. Micróglia no hipocampo controla a neurogênese através de fagocitose de corpos apoptóticos, enquanto na zona subventricular fornece apoio trófico às NSCs. Curiosamente, descobertas recentes demonstraram que o hipocampo é uma região poupada da invasão GBM, sugerindo que a composição específica da matriz extracelular possa explicar a baixa preferência por migração de GSCs a essa região (MATARREDONA; PASTOR, 2019).

A hipóxia contribui com resistência à irradiação, o método terapêutico mais eficaz para pacientes com glioblastoma, ao passo que impede a radiação de gerar radicais livres que afirmem efeitos antitumorais. Diferenças na tensão de oxigênio promovem as GSCs, o que favorece a expansão tumorigênica em um mecanismo dependente de HIF-1 α , o qual também se associa ao aumento da invasividade e angiogênese, contribuindo ainda mais a agressividade tumoral (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

GSCs e não-GSCs no glioblastoma exibem aumento da expressão de HIF-1 α , porém as GSCs também demonstram aumento nos níveis de HIF-2 α . O glioblastoma é altamente vascularizado, contudo, esses vasos são tortuosos e com vazamentos, impedindo a perfusão, somado aos microtrombos que ao ocluírem acabam por promover ainda mais a hipóxia intratumoral. A população de GSC pode ativar uma variedade de mecanismos adaptativos de neovascularização, incluindo angiogênese, vasculogênese, vaso cooptação, intussuscepção e mimetismo vascular. Exposição repetida à radiação elevou a secreção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) por GSCs, resultando em radorresistência e síntese aprimorada do VEGF com angiogênese associada Colwell, 2017. VEGF e angiopoietina são fatores moduladores de angiogênese, ambos ativados pelo HIF, expressos significativamente em glioblastoma, em que promovem proliferação e a sobrevivência do endotélio, mas também conferem vantagens de sobrevivência ao GSC. Ou seja, a hipóxia não apenas estimula a angiogênese, mas também promove a manutenção das propriedades de células-tronco através da simbiose entre vias de sinalização como Notch, das células endoteliais e de seus produtos, como, por exemplo, o óxido nítrico (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

GSCs, em contraste às células tumorais diferenciadas, inibem preferencialmente a proliferação de células T ativadas, embora os mecanismos não sejam totalmente delineados. Sinais extracelulares como a IL-6, EGF e PDGF- β ativam STAT3 e resultam na sobrevivência de GSCs, resistência ao tratamento e imunossupressão. Esta, por sua vez, pode ser analisada, ao observar como a depleção de STAT3 ou HIF-1 α repercute no aumento da susceptibilidade tumoral à lise mediada por linfócitos T CD8⁺ citolíticos (CTL), sugerindo que as vias de sinalização induzidas por hipóxia às células tumorais possam impedir a atividade dos CTL (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

Os TAMs são predominantes no glioblastoma, localizados próximas à microvasculatura, em que as GSCs são mais propensas a recrutarem TAMs do que as não-GSCs, comportamento que aumenta durante a hipóxia a partir da síntese de fatores solúveis que as quimioatraem como VEGF, MMP-2, TGF- β e SDF-1 (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

TAMs com um fenótipo M2 apresentam efeitos no microambiente do glioma, incluindo angiogênese aumentada, remodelação da matriz extracelular, e invasão aumentada de células tumorais, uma vez que as GSCs impactam a diminuição da fagocitose e a elevação da síntese de citocinas imunossupressoras (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

As GSCs ativam o HIF e, conseqüentemente, há transcrição de genes que codificam transportadores de glicose para facilitar a captação de glicose. Portanto, as GSCs são mais eficientes na absorção de nutrientes do que suas vizinhas não-GSC. Recentemente, foi demonstrado que a inibição de LDHA nas GSCs pode induzir sua diferenciação e/ou apoptose (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

No glioblastoma, descobriu-se que células tumorais sob hipóxia dependiam da glutamina para a produção de citrato através da carboxilação redutiva de α -cetoglutarato catalisado por IDH. Células hipóxicas e carentes de glutamina apresentaram diminuição da viabilidade, sugerindo o importante papel da glutamina na sobrevivência celular. A reprogramação metabólica no câncer baseia-se em mutações gênicas resultantes de disfunções enzimáticas, como foi constatado a partir das mutações envolvendo os genes IDH (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

Ao promover mutações, histonas podem ser metiladas repercutindo no silenciamento gênico, deste modo, os sinais à diferenciação celular são perdidos. O fenótipo IDH mutante, ao reduzir a concentração de NADPH, impede a liberação das espécies reativas de oxigênio resultando na vulnerabilidade tóxica às células tumorais, além disso, há o acúmulo do oncometabólito 2-hidroxiglutarato (2-HG), um potente inibidor de enzimas dependentes de α -cetoglutarato, incluindo histona desmetilases, que permitirão perpetuar a indiferenciação das células-tronco de gliomas. O oncometabólito, ao regular positivamente a expressão de HIF-1 α , espera-se servir como um mecanismo compensatório para facilitar a liberação de espécies

reativas de oxigênio e assim promover a sobrevivência celular. Entretanto, estudos recentes demonstram que em células mutantes IDH, HIF- 1 α foi desestabilizado através de um mecanismo através do qual 2-HG aumentou a atividade da prolinhidroxilase 2 (PHD-2), resultando na distorção metabólica em direção à fosforilação oxidativa, aumento da frequência reguladora das células T (Treg) e redução da polarização do T auxiliar 17 (Th17). Mesmo em células tumorais do tipo selvagem IDH, a hipóxia pode forçá-las a recapitular uma resposta metabólica de imagem espelhada ao produzir a forma enantiômero L-2-HG, também capaz de perturbar enzimas dependentes de α -cetoglutarato, determinando alterações epigenéticas semelhantes (COLWELL; LARION; GILES; SELDOMRIDGE et al., 2017).

2.5 Efeitos radioterápicos no nicho tumoral hipóxico

A radioterapia atua por meio de mecanismos fundamentalmente biológicos ao analisar as espécies reativas – em destaque as moléculas de oxigênio mitocondrial – e sua propriedade de instabilidade energética propagável (MACEDO-SILVA; MIRANDA-GONÇALVES; HENRIQUE; JERÓNIMO et al., 2019).

Figura 5. Tipos de interações da RI com a matéria, em que o Efeito Fotoelétrico (A), Efeito Compton (B) e Produção de Pares (C) são os mais expressivos na radioterapia.

Fonte: Retirada de (TOLEDO; FERRAGUT; DE ALMEIDA, 2015).

O oxigênio molecular presente no citoplasma e principalmente na matriz mitocondrial permite com que a radiação ionizante produza espécies reativas de oxigênio que buscam estabilidade iônica a partir de moléculas orgânicas como lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos. Ao se fixarem no DNA, lesões irreparáveis são ocasionadas, mesmo que as células tumorais contem com o sistema antioxidante para se protegerem. Portanto, para que a radiação seja eficaz é preciso superar as defesas redutoras, causando o desequilíbrio em favor do estresse oxidativo (MACEDO-SILVA; MIRANDA-GONÇALVES; HENRIQUE; JERÓNIMO et al., 2019; ZHANG, 2019).

A radiobiologia é determinada por cinco conceitos, como o reparo, redistribuição, repovoamento, reoxigenação e radiosensibilidade. Espécies reativas de oxigênio, por apresentarem em sua última eletrosfera elétrons desemparelados, são altamente reativas e caracterizam o DNA como o alvo mais vulnerável, repercutindo em mutações que proporcionarão a carcinogênese. A radiação ionizante, ao romper a dupla fita de DNA, determina a morte celular, adotando a

perda da capacidade clonogênica como o principal objetivo da radioterapia. A redistribuição difere-se de acordo com a fase do ciclo celular em que as células em fase S são mais radorresistentes do que células em fase G2-M, enquanto o repovoamento baseia-se em características mitóticas intrínsecas do tecido de origem, visto que o aumento da divisão celular após a irradiação depende da capacidade normal do tecido em recompensar as populações mortas (MACEDO-SILVA; MIRANDA-GONÇALVES; HENRIQUE; JERÓNIMO et al., 2019).

Como já descrito, a partir de exposições crônicas ou agudas à hipóxia, as células adquirem resistência à apoptose, permitindo a seleção de fenótipos mais agressivos, contudo, após a destruição de células tumorais radiosensíveis, a reoxigenação mediante adaptação à oxidação mitocondrial permite com que as espécies reativas de oxigênio lesem uma maior proporção da massa tumoral. Em suma, enquanto o reparo do DNA e o repovoamento celular induzem a resistência, a redistribuição e reoxigenação apresentam efeito oposto, aumentando a radiosensibilidade de células tumorais (MACEDO-SILVA; MIRANDA-GONÇALVES; HENRIQUE; JERÓNIMO et al., 2019).

Embora reconheça que a hipóxia esteja implicada na redução dos níveis de acetilação de histonas, a interação entre a hipóxia e mecanismos epigenéticos permanece pouco compreendida, no entanto, após a radiação ionizante, constatou-se hipometilação global do DNA, ativação da transcrição de oncogenes e reparo insatisfatório devido à incapacidade de polimerases em incorporarem metilcitosina durante a síntese, mas sim citosina. Apesar da crescente associação entre alterações epigenéticas e radiosensibilidade, não foram postulados biomarcadores epigenéticos usados na prática clínica para determinar a resposta à radioterapia (MACEDO-SILVA; MIRANDA-GONÇALVES; HENRIQUE; JERÓNIMO et al., 2019).

Regiões hipóxicas, com pressão parcial de oxigênio (pO_2) < 25-30mmHg, reduzem significativamente a sensibilidade celular, onde a dose de radiação ionizante para obter eficácia semelhante à obtida em células oxigenadas deve ser aumentada em até três vezes. Zhou Xingguo e colaboradores demonstram que a irradiação apenas com radiação ionizante não apresenta competência para reduzir a hipóxia devido ao aumento predominante de HIF-1 α em grupos experimentais (ZHOU; LIU; ZHENG; HAN et al., 2020).

Os agentes desreguladores da vasculatura existente e agentes inibidores de angiogênese são os mais aceitáveis, uma vez que a severa isquemia proporciona a morte de células hipóxicas, as quais já estão privadas de oxigênio e nutrientes, enquanto a radiação atua contra a população de células aeróbicas. No entanto, existem indicações de que os desreguladores da vasculatura existente podem induzir hipóxia em células que não eram anteriormente hipóxicas e de essas sobreviverem ao tratamento (HORSMAN; OVERGAARD, 2016).

Ao identificar regiões hipóxicas, seria possível aumentar a radiação apenas nessas áreas, uma abordagem denominada de “*dose-painting*”, contudo, a PET exhibe problemas de resolução que impossibilita laudos verdadeiramente fidedignos, além do mais, a hipóxia é dinâmica e não estática, deste modo, a hipóxia medida antes do início da terapia pode não ser a mesma durante a terapia (HORSMAN; OVERGAARD, 2016).

Quanto maior a transferência linear de energia (LET), maior a possibilidade de haver interação biológica, ou seja, à medida que a ionização aumenta, a probabilidade de a energia depositar diretamente no alvo biológico também será aumentada, ocasionando lesão celular. Com base nessas afirmações, tornaria sugestivo aumentar a dose de radiação para toda dimensão tumoral, em que a LET aumentada reduziria a relação do enriquecimento em oxigênio (OER), isto é, a resposta celular à irradiação torna-se similar entre células aeróbicas e hipóxicas, reduzindo o efeito do oxigênio. Logo, a radiação de LET suficientemente aumentada extingiria a problematização da hipóxia, porém, estes valores estão acima do alcançável clinicamente (HORSMAN; OVERGAARD, 2016).

É possível concluir que a hipóxia e seus elementos manipuláveis sejam, em grande parte, os responsáveis pela progressão tumoral ao estimular o crescimento agressivo, disseminação metastática e resistência aos protocolos terapêuticos convencionais (HORSMAN; OVERGAARD, 2016).

As CSCs são inerentemente radorresistentes por apresentarem elevada capacidade de reparo de DNA, potencial de repovoamento e por serem altamente adaptáveis à hipóxia, as quais residem nos denominados nichos hipóxicos. Além das CSCs, a radioterapia também modula outros elementos do microambiente tumoral, como os CAFs, em que uma dose única ou fracionada de radiação ionizante resultou na síntese diferencial de determinadas citocinas que puderam modificar as funções

de macrófagos, maximizando suas propriedades tumorigênicas (SPAN; BUSSINK, 2019).

Assim, evidências experimentais apoiam que CSCs inativas em seus nichos são responsáveis pelas recidivas após o início do tratamento convencional antineoplásico. Dada à plasticidade intratumoral, além da mutabilidade inerente de células cancerígenas, as pesquisas demonstram modular o nicho ao invés de estipularem terapias baseadas nas características intrínsecas das CSCs. Embora essa estratégia já esteja apresentando resultados promissores, nas formas mais agressivas as CSCs se tornam independentes dos sinais de seus nichos (BATLLE; CLEVERS, 2017).

EMT entre outras alterações fenotípicas favorecem o enriquecimento de CSCs, como já descrito em outras repartições dessa revisão literária. O genótipo destas células é protegido contra os danos mediados por EROs através do aumento da produção de sequestrados de radicais livres como o citocromo P450, inferiorizando as concentrações dessas partículas oxidantes. Por conseguinte, é possível afirmar que a resistência terapêutica atrelada às recidivas após o protocolo primário se deva às CSCs em constante auto-renovação dentre a alta heterogenicidade celular e fatores físico-químicos presentes no microambiente tumoral (ZHANG, 2019).

Como observado em gliomas e outros tumores agressivos, microRNAs são transportados entre células tumorais a partir de junções de gap e, a sítios à distância, promovem a liberação de exossomos tumorais, contendo mRNA, fragmentos de DNA, polimerases, receptores oncogênicos, fatores de crescimento, que são absorvidos por células não tumorais circundantes e desencadeiam a formação de novas massas tumorais (KOSHKIN; CHISTIYAKOV; CHEKHONIN, 2013). A resistência promovida por hipóxia é transmitida a sítios secundários por meio de exossomos, nos quais os microRNAs circundantes serão responsáveis por afetar os mecanismos de tolerância à hipóxia, como a via HIF-1 (SPAN; BUSSINK, 2019).

Indels ou variantes de polimorfismo único em genes promotores de miR-21 notificaram expressões significativamente mais elevadas deste oncomiR, sobre os quais vários estudos já demonstraram sua influência à resistência às mais diversas

terapias antineoplásicas, inclusive sua perda funcional reduz a frequência de CSCs determinando possível sensibilidade à radiação ionizante (ZHANG, 2019).

Gliomas de IV grau são altamente radorresistentes, notificados por constantes recidivas, visto a existência de CSCs CD133 positivo, as quais apresentam fenótipo substancialmente invasivo, com exacerbada capacidade de auto-renovação, alta expressão de receptores de quimiocinas tipo 4 (CXCR4), propriedades que precediam a formação metastática. Contudo, atualmente a radioterapia continua sendo a abordagem não cirúrgica mais satisfatória para tratamento de Glioblastoma multiforme (KOSHKIN; CHISTIYAKOV; CHEKHONIN, 2013).

Ao silenciar o miR-21, é possível aumentar a sensibilidade à radiação mediante o estímulo a apoptose, pois a inibição da proteína CDC25A interrompe a transição da fase G2 para fase mitótica (M) durante o ciclo celular. Além disso, o miR-21, ao hiperexpressar KRAS e sinalizar ao receptor de EGFR, promove tumorigênese através da estimulação da produção de EROs mediada por MAPK e regulação negativa de SOD2 e 3 (ZHANG, 2019). Deste modo, é necessário desenvolver preparações que inibam a síntese ou funcionamento do miR-21 nos gliomas para otimizar a eficácia da terapia antitumoral (KOSHKIN; CHISTIYAKOV; CHEKHONIN, 2013). Foi demonstrado que tumores glicolíticos são menos responsivos à radioterapia e se comportam mais agressivamente, o que pode ser evidenciado no glioblastoma. Ou seja, o efeito Warburg está vinculado à resistência ao estresse citotóxico induzido pela quimioterapia e radioterapia. Durante a glicólise o estresse oxidativo reduzido resulta em menores concentrações de radicais livres, por conseguinte, durante a conversão de piruvato em lactato, a ubiquinona oxiredutase (NADH) representa um dos sistemas endógenos antioxidantes capazes de efetivamente eliminar os EROs, diminuindo a eficácia da radioterapia. A partir dessas informações, inúmeros agentes radiosensibilizadores estão sendo testados para inativarem a glicólise aumentando o consumo de oxigênio mitocondrial, a atividade da cadeia transportadora de elétrons e por fim geração de EROs, *pari passo* à radioterapia (SHEN; HAU; JOSHI; DILDA et al., 2015).

Reverter o efeito Warburg inibe o crescimento tumoral, contudo, já é constatado que a radioterapia em glioblastoma propicia a indução do metabolismo glicolítico, apesar de ampla disponibilidade de oxigênio após a radiação ter

aniquilado células sensíveis, o que suporta fortemente a modificação à glicólise aeróbica. Radioterapia foi associada à ativação de HIF-1, uma vez que reoxigenação e elevação de EROs podem induzir a estabilização de HIF-1 α . Deste modo, a reversão do efeito Warburg direciona as ações deletérias da radiação ionizante por intensificar o estresse oxidativo e como consequência o desacoplamento da respiração celular reduzindo a síntese energética (SHEN; HAU; JOSHI; DILDA et al., 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Caracterizações moleculares podem contribuir para futuramente estabelecer métodos diagnósticos inovadores, assim como novos protocolos terapêuticos que ultrapassem as barreiras do tratamento do câncer.

Neste contexto, destaca-se o papel promissor dos microRNAs devido às suas características que apresentam vantagens laboratoriais como a alta estabilidade em pH extremo e a temperatura. É necessário investigar os mecanismos que regulam os níveis de expressão dos microRNAs associados ao microambiente hipóxico para que seja possível modular a desregulação dos mesmos, como, por exemplo, pela sensibilização da subpopulação de células-tronco tumorais, sendo elas altamente radorresistentes.

Portanto, descrever a possível regulação do gene HIF-1 α por microRNAs na subpopulação de células-tronco tumorais poderá fornecer novas informações para avanços no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos Glioblastomas.

4. OBJETIVO

Avaliar a expressão dos microRNAs: miR-21 e miR-326 em cultura primária de pacientes diagnosticados com glioblastoma, a fim de identificar uma possível assinatura de malignidade tumoral associada à regulação de HIF-1 α por microRNAs na subpopulação de células-tronco tumorais com radiação ionizante.

5. PACIENTES E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

5.1 Amostras primárias

Neste trabalho utilizamos culturas celulares de dez pacientes (homens e mulheres) adultos com diagnóstico de glioblastoma (glioma grau IV, OMS), atendidos pela Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de agosto de 2014 a abril de 2015. Esse projeto teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (processo nº 17802/2015) e os participantes dessa pesquisa consentiram com a doação do fragmento do tumor ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes da realização da cirurgia de ressecção tumoral.

5.2 Processamento e Cultivo celular

As amostras tumorais foram obtidas de pacientes adultos durante a realização do procedimento cirúrgico. Esses fragmentos foram colocados em tubo Falcon™ (BD Biosciences™) contendo 05 mL de meio de cultura, composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12* (DMEM/F12) e antibiótico (1% de Penicilina, Gibco®), imerso em gelo, sendo levado ao laboratório para processamento.

Na sala de cultura, em fluxo laminar, os fragmentos tumorais foram colocados em placa de Petri e dissociados primeiramente de forma mecânica por uma lâmina de bisturi. E, então, seguiram-se os passos: lavagem dos fragmentos com PBS 1x (*phosphate-buffered saline*), transferência do conteúdo para um tubo de 15 ml, sendo este imerso em 04 mL Colagenase tipo IV (1mg/mL) por, no máximo, 60 minutos em estufa a 27°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células encontravam-se suspensas.

Após digestão enzimática, todo o material foi colocado em um filtro de nylon (*CellStrainer* 70µm – BD Biosciences™) acoplado a um tubo Falcon® e pressionado levemente com uma espátula plástica ao mesmo tempo em que foi adicionado DMEM/F12 em quantidade suficiente para que todo o material digerido atravessasse

o filtro, formando no fundo do tubo uma suspensão celular em meio. A suspensão foi então colocada em centrífuga refrigerada e sedimentada, em 1200 rpm à 24°C por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante é retirado e as células suspensas foram colocadas, delicadamente, em meio de cultura. Para estabelecimento da cultura das neuroesferas, as células foram suspensas em DMEM/F12, com os fatores de crescimento EGF e FGF ([20ng/μL], Life Technologies Corporation, Gaithersburg, MD, USA), e 1% de Penicilina. Enquanto que, para estabelecimento da cultura de células aderidas, essas foram suspensas em DMEM/F12, 10% de soro fetal bovino (Life Technologies Corporation, Gaithersburg, MD, USA) e 1% de Penicilina.

As células foram colocadas em garrafas de cultura de 75cm² (TPP®) em estufa com 5% de CO₂ e 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, e as células permaneceram nessas condições por cerca de duas semanas, até atingirem a confluência necessária para a realização dos experimentos.

5.3 Grupos Experimentais

Após as culturas primárias dos dez pacientes se dividirem em dois grupos iniciais, neuroesferas e células aderidas, os procedimentos experimentais infracitados foram descritos somente no grupo de neuroesferas:

A. Grupo Controle (C): 10⁵ células foram semeadas e cultivadas por 48 horas, sendo então coletadas para as análises sem que nas mesmas fosse aplicado qualquer tipo de tratamento.

B. Grupo tratado com Radiação Ionizante (RI): 10⁵ foram semeadas 24 horas antes do tratamento com radiação ionizante, com taxa de dose de 2,0 Gy/min, (60Co source, Unit Gammatron S-80, Siemens, 1.25 MeV, HC-FMRP/USP), sendo a dose total de 14Gy, e coletadas 48h após o tratamento.

Segundo a padronização de dose de radiação ionizante ao tratamento em linhagens celulares de glioblastoma, executado pelo Dr. Felipe Amstalden Trevisan junto ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), anteriormente já efetuada pela Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), utilizando as linhagens U251, U343 e T98G, comercializadas por meio da American Type Culture Collection

(ATCC) – Rockville, Maryland, Md, USA, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,05$) entre as amostras irradiadas com 6Gy e 14Gy, nas análises realizadas após 24, 48 e 120 horas.

De acordo com a avaliação de viabilidade celular, em que a permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma, determinou-se para obtenção da efetividade apoptótica a dose de radiação de 14Gy em todos os experimentos realizados durante o presente estudo.

Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental

Fonte: elaboração própria

5.4 Avaliação da viabilidade celular através do corante Azul de Tripán

Utilizamos neste trabalho o teste de exclusão com o azul de tripan, um corante marcador para células mortas. Esta marcação é feita de acordo com a permeabilidade da membrana celular, permitindo estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. Células vivas mantêm a membrana celular íntegra, enquanto que células mortas perdem essa integridade e são, portanto, marcadas pelo azul de tripan. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular.

Então, para a realização da contagem celular, após os tratamentos de acordo com os subgrupos, para as células que cresceram em suspensão formando

colônias, denominadas oncoesferas, foi feita centrifugação a 1200 rpm, por 05 minutos, a 24°C; descartando o sobrenadante em seguida, o pellet foi lavado com 01 mL de PBS, e as células suspensas em 01 mL de meio de cultura. Já para as células aderidas foi feita tripsinização, a fim de desprender as células da placa, o que consiste em adicionar 03 mL de tripsina às células, e então levá-las para estufa a 37°C durante 05 minutos. Em seguida, são adicionados 06 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 05 minutos, a 24°C. Após, o sobrenadante é retirado delicadamente e o *pellet* suspenso em 01 ml de meio de cultura. Então, em um microtubo é feita uma alíquota de 50 µL dessas células suspensas homogeneizando-as com 50 µL do corante azul de tripan, e levando-as para contagem em câmaras de Neubauer.

Essa câmara é coberta por uma lamínula específica e pode receber duas amostras para contagem, sendo determinada a quantidade de células/mL, isto é, o número total de células em 01 mL da amostra. A profundidade central da câmara é de 01 mm, e são quatro grandes áreas de 01 mm² subdivididas em 16 áreas com 0,25 mm de cada lado. A grande área central é subdividida em 25 grupos quadrados de 0,2 mm de cada lado. A contagem é feita apenas das células presentes nas laterais externas.

Dos 100 µL de solução de células e azul de tripan descritos, 10µL são colocados na câmara de Neubauer e, então, é feita a contagem das células translúcidas e coradas, aplicando-se a fórmula:

$$\frac{A \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \text{ ou } A \times 5000}{4}$$

4

A: número de células contadas nos quatro quadrantes

Fator de diluição: 2

5.5 Extração de RNA

Às amostras foram adicionados 250µl de PBS e 750µl de Trizol® (Invitrogen), que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl

de clorofórmio gelado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 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 12 horas.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se, então, 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o RNA, agora um precipitado seco, foi dissolvido com água tratada com DEPC (dimetilpirocarbonato) por pelo menos 15 minutos.

5.6 Quantificação e qualidade do RNA total

Para quantificação e avaliação de pureza do RNA obtido, utilizamos o espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop 2000*, o qual fornece a concentração de RNA em uma amostra de 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 ou maiores do que 2,0 considera-se que o RNA esteja contaminado com algum reagente da extração, sendo a faixa ideal a ser obtida de 1,7 a 2,0 (Sambrook e Russel, 2002), porém, neste trabalho, consideramos uma amostra ideal na faixa de 1,61 a 1,99.

5.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para a síntese do cDNA do microRNA, para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (microRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo

real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

5.8 Condições da reação de PCR em tempo real

Os microRNAs selecionados foram analisados pela ferramenta *MirPath V.3*, disponível na plataforma digital Diana Tools (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Esta ferramenta identifica as vias de sinalização provenientes da base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) que potencialmente são reguladas pela expressão dos microRNAs. Consideram-se as vias significantes para os valores de p ajustado pelo FDR menor que 0.05. Assim, na análise foram identificados os microRNAs: miR-21 e miR-326 que apresentavam como alvos o gene HIF-1α. Os alvos foram confirmados baseado no banco de dados do miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/download.php>).

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos microRNAs miR-21 e miR-326 nas amostras obtidas a partir do cultivo *in vitro* de neuroesferas de Glioblastoma.

A partir do cDNA proveniente das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-PCR), com a utilização da TaqMan *Master Mix* (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão dos microRNAs supracitados, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan *Assay-on-demand*, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente para permitir a detecção de um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade da nucleasse 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do

corante *reporter*, remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde, não inibindo o processo geral da PCR. Moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência.

A técnica de PCR em tempo real consiste em acompanhar o número de cópias formado na reação de PCR a cada ciclo, número este proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho. Esta fluorescência é oriunda do intercalamento de moléculas fluorescentes nos produtos de PCR formados. Uma vez amplificado, um limite de fluorescência (na fase exponencial da amplificação) denominado de CT (*Cycle Threshold*) é estipulado, determinando o ciclo em que cada amostra alcança este limite de detecção.

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 é subtraído do CT determinado para um gene *house-keeping* (neste caso o U6 para o microRNA) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo microRNA, ser comparados de modo diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste alvo em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT), reflete a diferença existente entre as amostras. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7500-Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)* foi utilizado juntamente com o software *Sequence Detection System* para obtenção dos valores de CT.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a expressão dos microRNAs por meio do método quantitativo de PCR em tempo real foram calculados os coeficientes de regressão e aplicação de transformação *log* aos valores de expressão dos microRNAs para estabilização da variância.

Para analisar a relação dos microRNAs miR-21 e miR-326 com óbito e recidiva e, conseqüentemente, estimar os riscos relativos (RR), foi utilizado o modelo de regressão Poisson com variância robusta (Zou, 2004) com função de ligação logarítmica.

A curva ROC (Zweig e Campbell, 1993) é uma ferramenta destinada a descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico cujo resultado pode ser tratado como uma variável contínua ou categórica ordinal. A área sobre a curva ROC é uma medida resumo usual do desempenho de um teste, já que ela é estimada levando em consideração todas as medidas de sensibilidade e especificidade de cada um dos valores dos pontos de corte estipulados. Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos que necessitam de revisão daqueles que não necessitam teria uma área sob a curva de 0,5. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar os indivíduos segundo estes dois grupos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico, e a área sob a curva se aproxima de 1.

A curva ROC é construída através de medidas de sensibilidade e especificidade, onde no eixo das abscissas recebe um vetor com o valor da especificidade, e o eixo das ordenadas recebe os valores da sensibilidade obtidos para cada ponto de corte.

Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do software R, versão 4.0.0 e as análises, através do SAS 9.2. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

7. RESULTADOS

7.1 Dados clínicos epidemiológicos

Para obtenção dos dados clínicos, utilizou-se o prontuário dos pacientes. Neste trabalho, foram analisadas amostras provenientes de 10 pacientes adultos com diagnóstico de glioblastoma (glioma grau IV, OMS), sendo 05 pacientes do sexo masculino e 05 do sexo feminino (1M:1F), com idades entre 36 e 80 anos (mediana=56,5 anos).

Com relação à localização do tumor, quatro casos apresentaram lesão no lobo temporal (D ou E), quatro casos no lobo parietal (D ou E) e dois casos no lobo

frontal. A metade dos pacientes (05 casos – 50%) foi submetida à ressecção macroscópica total da lesão. Após a cirurgia, fora prescrito radioterapia concomitante à temozolomida, seguida de temozolomida adjuvante a todos os pacientes, contudo, devido à perda do seguimento clínico somente sete pacientes (07 casos – 70%) receberam o protocolo antineoplásico. Cinco casos apresentaram recidiva tumoral.

Ao analisar a viabilidade celular das amostras tumorais após o protocolo proposto, com radiação ionizante isolada, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre neuroesferas nos grupos experimentais.

7.2 Quantificação das expressões dos microRNAs em neuroesferas

O miR-326 apresentou-se hiperexpresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante, quando comparado ao grupo controle das neuroesferas (Gráfico 1), porém não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$).

Já o miR-21 apresentou-se diferencialmente expresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante ($p=0,0028$), quando comparado ao grupo controle das neuroesferas (Gráfico 2).

Os gráficos descrevem as expressões dos microRNAs estudados em função das amostras obtidas do cultivo primário dos dez pacientes supracitados, e os *folds* de todos os pacientes foram agrupados para constituir a barra correspondente ao grupo controle e tratado com radiação ionizante, respectivamente.

Gráfico 1. Representação da hiperexpressão não significativa do miR-326 em neuroesferas tratadas com radiação ionizante.

Fonte: Elaboração própria

Gráfico 2. Representação da expressão significativamente aumentada do miR-21 em neuroesferas tratadas com radiação ionizante.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 1. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função dos grupos experimentais e recidiva obtida a partir de prontuários clínicos após ressecção cirúrgica e protocolo quimioradioterápico.

Grupo	RECIDIVA	Variáveis	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
C	NÃO	Fold miR-21	15	1,08	0,54	0,38	0,97	2,89
		Fold miR-326	15	1,39	1,07	0,20	1,02	3,62
	SIM	Fold miR-21	15	1,15	0,64	0,29	0,87	2,46
		Fold miR-326	15	2,81	4,42	0,05	1,05	15,36
R	NÃO	Fold miR-21	15	3,61	5,44	0,17	1,67	21,21
		Fold miR-326	15	1,03	1,26	0,04	0,50	4,53
	SIM	Fold miR-21	15	2,07	1,45	0,14	1,78	5,43
		Fold miR-326	15	4,81	7,78	0,07	1,43	25,22

Fonte: Elaboração própria

7.3 Expressão dos microRNAs miR-21 e miR-326 a partir de dados demográficos

Gráfico 3. Representação da mediana do miR-21 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função da recidiva.

Fonte: Elaboração própria

As neuroesferas do grupo controle expressaram menores níveis de miR-21 em relação as neuroesferas do grupo tratado. A partir do número amostral selecionado para este estudo, dado seguimento terapêutico, é possível afirmar que a concentração do miR-21 fora maior nas neuroesferas tratadas de pacientes que apresentaram recidiva em comparação com o grupo irradiado livre de recidiva. Os *outliers*, também descritos como números atípicos, demonstram a variabilidade amostral.

Gráfico 4. Representação da mediana do miR-326 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função da recidiva.

Fonte: Elaboração própria

Entre os pacientes incluídos neste estudo, as neuroesferas do grupo tratado expressaram maiores níveis de miR-326 em relação as neuroesferas do grupo controle. *In vivo*, dado seguimento terapêutico, os respectivos pacientes apresentaram recidiva. Os *outliers* demonstram a variabilidade amostral.

Tabela 2. Descrição dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função dos grupos experimentais e óbito obtido a partir de prontuários clínicos após ressecção cirúrgica e protocolo quimiorradioterápico.

Grupo	ÓBITO	Variáveis	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
C	NÃO	Fold miR-21	18	1,08	0,44	0,29	0,98	2,46
		Fold miR-326	18	1,64	1,88	0,05	1,04	8,34
	SIM	Fold miR-21	12	1,18	0,76	0,38	0,89	2,89
		Fold miR-326	12	2,79	4,62	0,12	0,94	15,36
R	NÃO	Fold miR-21	18	3,63	4,98	0,17	1,75	21,21
		Fold miR-326	18	4,01	7,31	0,04	0,80	25,22
	SIM	Fold miR-21	12	1,67	1,04	0,14	1,68	3,56
		Fold miR-326	12	1,27	1,12	0,07	0,93	3,17

Fonte: Elaboração própria

Gráfico 5. Representação da mediana do miR-21 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função do óbito.

Fonte: Elaboração própria

Entre os pacientes incluídos neste estudo, as neuroesferas do grupo de controle expressaram menores níveis de miR-21 em relação às neuroesferas do grupo tratado. Após seguimento terapêutico, é possível afirmar que a concentração do miR-21 fora maior nas neuroesferas tratadas de pacientes não óbito em comparação com o grupo irradiado de pacientes que vieram a óbito.

Gráfico 6. Representação da mediana do miR-326 expresso nas neuroesferas entre os grupos estudados em função do óbito.

Fonte: Elaboração própria

No grupo de controle, neuroesferas de pacientes que vieram a óbito após seguimento terapêutico apresentaram maiores níveis do miR-326. No grupo irradiado, após análises dos prontuários clínicos, é possível considerar que neuroesferas de pacientes que não vieram a óbito apresentaram maiores concentrações do miR-326. Os *outliers* demonstram a variabilidade amostral.

Tabela 3. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função apenas da recidiva.

RECIDIVA	Variáveis	N	Média	Desvio		Mínimo	Mediana	Máximo
				Padrão				
NÃO	Fold miR-21	30	2,35	4,01		0,17	1,05	21,21
	Fold miR-326	30	1,21	1,16		0,04	0,84	4,53
SIM	Fold miR-21	30	1,61	1,19		0,14	1,15	5,43
	Fold miR-326	30	3,81	6,30		0,05	1,11	25,22

Fonte: Elaboração própria

Gráfico 7. Representação da mediana do miR-21 expressa nas neuroesferas em função da recidiva.

Fonte: Elaboração própria

Neste estudo, é possível observar que pacientes recidivados apresentaram maiores concentrações de miR-21 em relação aos pacientes não recidivados.

Gráfico 8. Representação da mediana do miR-326 expressa nas neuroesferas em função da recidiva.

Fonte: Elaboração própria

Neste estudo, é possível observar que pacientes recidivados apresentaram maiores concentrações de miR-326 em relação aos pacientes não recidivados.

Tabela 4. Estatística descritiva dos microRNAs miR-21 e miR-326 em função apenas do óbito.

ÓBITO	Variáveis	N	Média	Desvio			
				Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
NÃO	Fold miR-21	36	2,35	3,72	0,17	1,12	21,21
	Fold miR-326	36	2,83	5,40	0,04	0,99	25,22
SIM	Fold miR-21	24	1,42	0,92	0,14	1,04	3,56
	Fold miR-326	24	2,03	3,38	0,07	0,94	15,36

Fonte: Elaboração própria

Gráfico 9. Representação da mediana do miR-21 expressa nas neuroesferas em função do óbito.

Fonte: Elaboração própria

Neste estudo, independente da taxa de mortalidade, pacientes expressaram concentrações de miR-21 semelhantes, exceto os *outliers*.

Gráfico 10. Representação da mediana do miR-326 expressa nas neuroesferas em função do óbito.

Fonte: Elaboração própria

Neste estudo, é possível observar que pacientes que vieram a óbito expressaram maiores concentrações de miR-326.

7.4 Risco relativo quanto à recidiva e óbito

Tabela 5. Estimação do risco relativo quanto à recidiva.

Efeito	RR	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
miR-21	1,004*	0,917	1,099	0,934
miR-21 (Grupo C)	1,050	0,908	1,215	0,509
miR-21 (Grupo R)	0,960	0,878	1,049	0,362
Efeito	RR	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
miR-326	1,024*	1,002	1,047	0,032
miR-326 (Grupo C)	1,027	1,001	1,055	0,046
miR-326 (Grupo R)	1,021	1,003	1,039	0,022

Fonte: Elaboração própria

A cada 0,5 unidades de miR-21 o risco de recidivar aumenta 1,004, deste modo, praticamente não há associação entre a variável e o desfecho clínico, visto que a recidiva independe da ocorrência do miR-21 em ambos os grupos.

A cada 0,5 unidades de miR-326 o risco de recidivar aumenta 1,024 (2,4%), portanto, há evidência de associação entre a variável miR-326 e recidiva ($p=0,032$) em ambos os grupos. O fato de o IC estar todo acima de 1 confirma o aumento do risco de acordo com o miR-326.

Tabela 6. Estimação do risco relativo quanto ao óbito.

Efeito	RR	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
miR-21	0,990	0,880	1,114	0,872
miR-21 (Grupo C)	1,088	0,933	1,268	0,284
miR-21 (Grupo R)	0,902	0,794	1,025	0,114
Efeito	RR	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
miR-326	0,986	0,948	1,025	0,469
miR-326 (Grupo C)	1,027	0,997	1,058	0,076
miR-326 (Grupo R)	0,946	0,887	1,009	0,093

Fonte: Elaboração própria

Não se pôde verificar a associação entre as variáveis microRNAs miR-21 e miR-326 em relação ao óbito em ambos os grupos.

7.5 Curvas ROC

7.5.1 Análise da predição do miR-21 em função da recidiva

Gráfico 11. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas controle.

Fonte: Elaboração própria

O intervalo de confiança (IC) contém, com 95% de confiança, a verdadeira área sob a curva (ASC), deste modo, o elevado IC desconsidera a predição do miR-21 em relação a recidiva no grupo C, mesmo que o resultado da ASC esteja próximo do ideal.

Tabela 7. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo controle em função da recidiva mediante ASC = 76%, dado IC 95% = 40,39 – 96%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥1,0003	0 (0,0 - 52,2)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0003	20 (0,5 - 71,6)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0045	40 (5,3 - 85,3)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0068	60 (14,7 - 94,7)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0078	60 (14,7 - 94,7)	80 (28,4 - 99,5)
>1,0195	80 (28,4 - 99,5)	80 (28,4 - 99,5)
>1,0582	80 (28,4 - 99,5)	60 (14,7 - 94,7)
>1,0905	80 (28,4 - 99,5)	40 (5,3 - 85,3)
>1,2158	80 (28,4 - 99,5)	20 (0,5 - 71,6)
>1,3829	80 (28,4 - 99,5)	0 (0,0 - 52,2)
>1,3918	100 (47,8 - 100,0)	0 (0,0 - 52,2)

Fonte: Elaboração própria

Estabelecendo sensibilidade máxima ao marcador, o IC amplo impossibilita considerarmos o miR-21 como resposta preditiva à recidiva no grupo C. A mesma interpretação sucede a especificidade.

Gráfico 12. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas irradiada.

Fonte: Elaboração própria

A ASC ao encontrar-se próxima a linha de aleatoriedade, descaracteriza o miR-21 como resposta preditiva no grupo R.

Tabela 8. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função da recidiva mediante ASC = 52%, dado IC 95% = 20,14 – 82,68%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥0,7801	0 (0,0 - 52,2)	100 (47,8 - 100,0)
>0,7801	20 (0,5 - 71,6)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0906	20 (0,5 - 71,6)	80 (28,4 - 99,5)
>1,2155	40 (5,3 - 85,3)	80 (28,4 - 99,5)
>1,5257	40 (5,3 - 85,3)	60 (14,7 - 94,7)
>1,8088	60 (14,7 - 94,7)	60 (14,7 - 94,7)
>1,8109	60 (14,7 - 94,7)	40 (5,3 - 85,3)
>1,8847	60 (14,7 - 94,7)	20 (0,5 - 71,6)
>1,8934	80 (28,4 - 99,5)	20 (0,5 - 71,6)
>4,0513	80 (28,4 - 99,5)	0 (0,0 - 52,2)
>12,3759	100 (47,8 - 100,0)	0 (0,0 - 52,2)

Fonte: Elaboração própria

Como ferramenta clínica, espera-se que o marcador de prognóstico apresente elevada sensibilidade, contudo, a reduzida especificidade junto aos IC aumentados não determina desempenho satisfatório ao miR-21 em função da recidiva no grupo R.

7.5.2 Análise da predição do miR-326 em função da recidiva

Gráfico 13. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas controle.

Fonte: Elaboração própria

Não há um consenso científico, entretanto, é comum definir ASC superiores a 75,00, deste modo, tanto ASC quanto o IC desconsideram o miR-326 com valor preditivo à recidiva no grupo C.

Tabela 9. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo controle em função da recidiva mediante ASC = 68%, dado IC 95% = 32,97 – 92,32%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥1,0002	0 (0,0 - 52,2)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0002	20 (0,5 - 71,6)	100 (47,8 - 100,0)
>1,0095	20 (0,5 - 71,6)	80 (28,4 - 99,5)
>1,0176	20 (0,5 - 71,6)	60 (14,7 - 94,7)
>1,2031	40 (5,3 - 85,3)	60 (14,7 - 94,7)
>1,4283	60 (14,7 - 94,7)	60 (14,7 - 94,7)
>1,6145	80 (28,4 - 99,5)	60 (14,7 - 94,7)
>1,719	100 (47,8 - 100,0)	60 (14,7 - 94,7)
>3,1	100 (47,8 - 100,0)	40 (5,3 - 85,3)
>3,5588	100 (47,8 - 100,0)	20 (0,5 - 71,6)
>5,3439	100 (47,8 - 100,0)	0 (0,0 - 52,2)

Fonte: Elaboração própria

Não é possível estabelecer pontos de corte para sensibilidade ou especificidade mediante os elevados valores do IC.

Gráfico 14. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo à recidiva no grupo de neuroesferas irradiada.

Fonte: Elaboração própria

A elevada ASC classifica desempenho preditivo ao miR-326 em relação à recidiva no grupo R, contudo, o elevado IC desconsidera a confiabilidade das estimativas.

Tabela 10. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função da recidiva mediante ASC = 76%, dado IC 95% = 40,39 – 96%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥0,2102	0 (0,0 - 52,2)	100 (47,8 - 100,0)
>0,2102	20 (0,5 - 71,6)	100 (47,8 - 100,0)
>0,4071	40 (5,3 - 85,3)	100 (47,8 - 100,0)
>0,7589	60 (14,7 - 94,7)	100 (47,8 - 100,0)
>0,933	60 (14,7 - 94,7)	80 (28,4 - 99,5)
>1,0297	60 (14,7 - 94,7)	60 (14,7 - 94,7)
>1,0533	80 (28,4 - 99,5)	60 (14,7 - 94,7)
>1,1191	80 (28,4 - 99,5)	40 (5,3 - 85,3)
>1,9715	80 (28,4 - 99,5)	20 (0,5 - 71,6)
>2,708	100 (47,8 - 100,0)	20 (0,5 - 71,6)
>18,9739	100 (47,8 - 100,0)	0 (0,0 - 52,2)

Fonte: Elaboração própria

Mesmo mediante à máxima sensibilidade, não é possível estabelecer o ponto de corte devido aos elevados valores de IC.

7.5.3 Análise da predição do miR-21 em função do óbito

Gráfico 15. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas controle.

Fonte: Elaboração própria

A elevada ASC classifica desempenho preditivo ao miR-21 em relação ao óbito no grupo C, contudo, o elevado IC desconsidera a confiabilidade das estimativas.

Tabela 11. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo controle em função ao óbito mediante ASC = 79,17%, dado IC 95% = 43,54 – 97,19%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥1,0003	0 (0,0 - 45,9)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0003	16,67 (0,4 - 64,1)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0045	33,33 (4,3 - 77,7)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0068	50 (11,8 - 88,2)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0078	50 (11,8 - 88,2)	75 (19,4 - 99,4)
>1,0195	66,67 (22,3 - 95,7)	75 (19,4 - 99,4)
>1,0582	83,33 (35,9 - 99,6)	75 (19,4 - 99,4)
>1,0905	83,33 (35,9 - 99,6)	50 (6,8 - 93,2)
>1,2158	83,33 (35,9 - 99,6)	25 (0,6 - 80,6)
>1,3829	100 (54,1 - 100,0)	25 (0,6 - 80,6)
>1,3918	100 (54,1 - 100,0)	0 (0,0 - 60,2)

Fonte: Elaboração própria

Não é possível estabelecer pontos de corte para sensibilidade ou especificidade mediante os elevados valores do IC.

Gráfico 16. Curva ROC do miR-21 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas irradiada.

Fonte: Elaboração própria

A ASC, ao encontrar-se próxima à linha de aleatoriedade, descaracteriza o miR-21 como resposta preditiva de óbito no grupo R.

Tabela 12. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-21 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função ao óbito mediante ASC = 54,17%, dado IC 95% = 21,73 – 84,14%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥0,7801	0 (0,0 - 45,9)	100 (39,8 - 100,0)
>0,7801	16,67 (0,4 - 64,1)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0906	16,67 (0,4 - 64,1)	75 (19,4 - 99,4)
>1,2155	33,33 (4,3 - 77,7)	75 (19,4 - 99,4)
>1,5257	50 (11,8 - 88,2)	75 (19,4 - 99,4)
>1,8088	66,67 (22,3 - 95,7)	75 (19,4 - 99,4)
>1,8109	66,67 (22,3 - 95,7)	50 (6,8 - 93,2)
>1,8847	66,67 (22,3 - 95,7)	25 (0,6 - 80,6)
>1,8934	66,67 (22,3 - 95,7)	0 (0,0 - 60,2)
>4,0513	83,33 (35,9 - 99,6)	0 (0,0 - 60,2)
>12,3759	100 (54,1 - 100,0)	0 (0,0 - 60,2)

Fonte: Elaboração própria

Não é possível estabelecer pontos de corte para sensibilidade ou especificidade mediante os elevados valores do IC.

7.5.4 Análise da predição do miR-326 em função do óbito

Gráfico 17. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas controle.

Fonte: Elaboração própria

Os valores de ASC e IC desconsideram o miR-326 com valor preditivo em relação ao óbito no grupo C.

Tabela 13. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo controle em função ao óbito mediante ASC = 70,83%, dado IC 95% = 35,51 – 93,73%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
≥1,0002	0 (0,0 - 45,9)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0002	16,67 (0,4 - 64,1)	100 (39,8 - 100,0)
>1,0095	16,67 (0,4 - 64,1)	75 (19,4 - 99,4)
>1,0176	33,33 (4,3 - 77,7)	75 (19,4 - 99,4)
>1,2031	50 (11,8 - 88,2)	75 (19,4 - 99,4)
>1,4283	66,67 (22,3 - 95,7)	75 (19,4 - 99,4)
>1,6145	83,33 (35,9 - 99,6)	75 (19,4 - 99,4)
>1,719	83,33 (35,9 - 99,6)	50 (6,8 - 93,2)
>3,1	83,33 (35,9 - 99,6)	25 (0,6 - 80,6)
>3,5588	100 (54,1 - 100,0)	25 (0,6 - 80,6)
>5,3439	100 (54,1 - 100,0)	0 (0,0 - 60,2)

Fonte: Elaboração própria

Não é possível estabelecer pontos de corte para sensibilidade ou especificidade mediante os elevados valores do IC.

Gráfico 18. Curva ROC do miR-326 como valor preditivo ao óbito no grupo de neuroesferas irradiada.

Os valores de ASC e IC desconsideram o miR-326 com valor preditivo em relação ao óbito no grupo R.

Tabela 14. Ponto de corte, sensibilidade e especificidade do miR-326 expresso em neuroesferas do grupo irradiado em função ao óbito mediante ASC = 62,5%, dado IC 95% = 28,27 – 89,32%.

Critério	Especificidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
$\geq 0,2102$	0 (0,0 - 45,9)	100 (39,8 - 100,0)
$> 0,2102$	16,67 (0,4 - 64,1)	100 (39,8 - 100,0)
$> 0,4071$	33,33 (4,3 - 77,7)	100 (39,8 - 100,0)
$> 0,7589$	50 (11,8 - 88,2)	100 (39,8 - 100,0)
$> 0,933$	50 (11,8 - 88,2)	75 (19,4 - 99,4)
$> 1,0297$	66,67 (22,3 - 95,7)	75 (19,4 - 99,4)
$> 1,0533$	66,67 (22,3 - 95,7)	50 (6,8 - 93,2)
$> 1,1191$	66,67 (22,3 - 95,7)	25 (0,6 - 80,6)
$> 1,9715$	66,67 (22,3 - 95,7)	0 (0,0 - 60,2)
$> 2,708$	83,33 (35,9 - 99,6)	0 (0,0 - 60,2)
$> 18,9739$	100 (54,1 - 100,0)	0 (0,0 - 60,2)

Fonte: Elaboração própria

Estabelecendo sensibilidade máxima ao marcador, o IC amplo impossibilita considerarmos o miR-326 como resposta preditiva ao óbito no grupo R.

8. DISCUSSÃO

O miR-21 apresentou-se hiperexpresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante ($p=0,0028$) quando comparado ao grupo de controle. O que seria possibilitou afirmar que o miR-21 em CSCs normóxicas é um dos interferentes resultantes em radiorresistencia, em concordância aos atuais registros literários.

Estudos puderam demonstrar que a hiperexpressão de miR-21 em células radiorresistentes está relacionada à superexpressão de HIF-1 α , que determinou a retroalimentação positiva de HIF-1 α e miR-21 através da via PTEN / Akt / HIF-1 α em células de câncer cervical (SONG; LIU; ZHANG; YAO et al., 2016).

Como os resultados encontrados em células epiteliais brônquicas, a sinalização de HIF-1 α ao regular PTEN que se encontra inibido por miR-21 ocorre dependentemente de outras vias como Akt e NF- κ B para determinação da malignidade tumoral (LU; XU; YANG; XUE et al., 2018).

Como já mencionado, a hipóxia e o Efeito Warburg propiciam um microambiente ácido, este, por sua vez, promove a liberação de exossomos. Neste presente estudo, as neuroesferas foram cultivadas em condições normóxicas e os níveis de miR-21 no grupo irradiado mostraram-se elevados. Ou seja, esperava-se que a radioterapia pudesse eliminar as células tumorais e, como consequência, reduzir os níveis de miR-21. Portanto, a radiação ionizante corroborou positivamente com a progressão celular.

Deste modo, a partir de outros estudos em que as condições de cultivos estiveram sob hipóxia, sabe-se que o microambiente ácido desencadeia a ativação de HIF-1 α e HIF-2 α , o que estimula a expressão de miR-21 exossômico, promovendo substancialmente a proliferação, migração e invasão do carcinoma hepatocelular (TIAN; WANG; JIN; LI et al., 2019).

Estudos recentes demonstraram que exossomos derivados de células-tronco do glioma abrigavam elevadas concentrações de miR-21 e VEGF para atuarem em células endoteliais, no entanto, estes mecanismos ainda permanecem desconhecidos. Sabe-se que os exossomos acima citados aumentam a capacidade angiogênica de células endoteliais, uma vez que o VEGFR2, responsivo por efeitos

angiogênicos, potencializa a migração, invasão e proliferação endotelial (SUN; MA; WANG; ZHAO et al., 2017).

No glioblastoma, a superexpressão do miR-21 induziu a resistência significativa à radiação, enquanto sua inibição aumentou a sensibilidade celular por permitir a co-expressão de PDCD4 e MSH2, genes responsáveis por ocasionar a morte celular. Deste modo, a hipoexpressão do miR-21 aumentou consideravelmente a taxa apoptótica e a parada do ciclo celular em G2 após a radioterapia (CHAO; XIONG; LIU; CHEN et al., 2013).

Contudo, neste presente estudo, o miR-21 não pode ser associado as recidivas e ao óbito, visto que a recidiva e óbito independem da ocorrência do miR-21 em ambos os grupos.

Sugere-se que o miR-21 não apresente correlação aos marcadores putativos de CSCs como OCT4, SOX2 e CD133, porém, a dificultada caracterização molecular das mesmas não exclui a possibilidade do miR-21 intervir nas propriedades do estado estaminal, sugerindo, portanto, seu papel pró-angiogênico no glioblastoma. Além disso, por imunohistoquímica, em áreas positivas para miR-21 não fora notado regulação negativa de PTEN, o que sugere que o miR-21 talvez não seja o principal mecanismo que eleve os níveis de HIF-1 α e VEGF (HERMANSEN; NIELSEN; AABERG-JESSEN; KRISTENSEN, 2016).

Explicações como pseudogenes ao sequestrarem o miR-21 causariam uma redução em sua expressão em direção a transcrição funcional do PTEN, enquanto, outros estudos sugerem que PTEN não seja alvo por não apresentar o local de ligação ao miR-21, sobretudo, a perda da heterozigosidade no cromossomo do gene referido (10q23.3) é frequente em glioblastomas primários e, em homozigotos a exclusão de PTEN é rara (<2%), contudo, PTEN é mutado em aproximadamente 25% dos glioblastomas, denunciando vieses (HERMANSEN; NIELSEN; AABERG-JESSEN; KRISTENSEN, 2016).

É extremamente raro que glioblastomas metastatizem sistematicamente, contudo, vesículas extracelulares oriundas de células-tronco tumorais são direcionadas às células diferenciadas afetando seu fenótipo, o contrário também é verdadeiro. No glioblastoma, concentrações significativas do miR-21 foram detectadas no conteúdo vesicular, no qual a micróglia e monócitos foram suprimidas. Além deste resultado, microRNAs derivados de vesículas extracelulares do

glioblastoma não são embalados aleatoriamente, pois se concentram em apenas 31-64 genes-alvos, em que o PTEN fora demasiadamente silenciado e vias KEGG (por exemplo, PI3-AKT) ativadas. Também é sabido que a hipóxia altera os conteúdos vesiculares em transferência (DE MOOIJ; PETERSON; EVANS; MCCUTCHEON et al., 2020).

Estudos demonstraram que o miR-21 transferido através de vesículas extracelulares pode desregular mRNAs específicos da micróglia selvagem, *in vitro* e *in vivo*, visto que a proliferação microglial aumenta após a entrega do miR-21 ao regular negativamente o BTG2. Este, por sua vez, ao diminuir a atividade de ciclina D1, reduz a proliferação celular por inibir a transição da fase G1 à S, como demonstrado em fibroblastos (ABELS; MAAS; NIELAND; WEI et al., 2019).

O miR-326 expressou regulação positiva não estatisticamente significativa no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante, quando comparado ao grupo controle, porém, há evidência de associação entre o miR-326 e recidiva ($p=0,032$) em ambos os grupos, em que a cada 0,5 unidades de miR-326 o risco de recidivar aumenta 1,024 (2,4%). Com estes dados é possível afirmar que a expressão do miR-326 independe da radioterapia, uma vez que a radiação ionizante deveria aumentar os níveis do microRNA supracitado.

Em processos biológicos, o miR-326 está relacionado à via de sinalização do receptor de efrina, orientação de axônios, axonogênese, entretanto, ele é capaz de inibir proliferação, migração e invasão celular em vários tipos de cânceres mediante a regulação de fatores como KRAS, TWIST1, LIM, SH3, ELK1, entre outros sistemas combinatórios. Estudos discutem a possibilidade de as funções e concentrações de miR-326 variarem nos estágios tumorais, sugerindo que níveis aumentados desse microRNA possa estar correlacionado com pior sobrevida (CHEN; GAO; YUAN; ZHAO et al., 2019).

Especulam-se que outros agentes moleculares interajam com o miR-326, regulando positivamente o glioblastoma, estabelecendo o miR-326 como uma espécie de retroalimentação (FAWZY; ELLAWINDY; HUSSEIN; KHASHANA et al., 2018).

Ao contrário dos dados encontrados neste estudo, a hipoexpressão de miR-326 está associada com o desenvolvimento metastático e menor sobrevida global, pois estabelece como alvo genes relacionados à atividade de desintegrinas,

metaloproteases e proteínas constituintes da dinâmica de nucleossomos, entretanto, os mecanismos específicos ainda não foram elucidados (PAN; WAN; WANG, 2019).

Ao investigar o câncer pulmonar de células não pequenas, a função prognóstica do miR-326 fora correlacionada com a supraexpressão de HIF-1 α (CHEN; GAO; YUAN; ZHAO et al., 2019).

O fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGF1) e o fator de crescimento nervoso (NGF) regulam a expressão de miR-326, por conseguinte, podem reparar vasos sanguíneos ao promoverem a proliferação e invasão de células endoteliais e pericitos, além de estimularem o crescimento tumoral e resistência quimioradioterápica, uma vez que sinalizam às vias mitogênicas MAPK, PI3K, RAS e JNK. A hiperexpressão do miR-326, ao diminuir FGF1 e NGF, inibe o comportamento maligno, mas a sinalização anormal de PI3 resulta na regulação do microRNA supracitado de modo negativo em glioblastomas (JADIDESLAM; ANSARIN; SAKHINIA; BABALOO et al., 2019; PAN; WAN; WANG, 2019). Contudo, no presente estudo, não se pôde verificar a associação entre o miR-326 em relação ao óbito em ambos os grupos.

O gene PINK1 está envolvido na regulação mitocondrial, procedendo à geração de ATP, consumo de oxigênio molecular e produção de EROs e funções anti-apoptóticas e citoprotetoras através da via AKT-mTOR. Além disso, a hipoeexpressão do gene supracitado diminui a síntese da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador de astrócitos, e também se encontra relacionada à regulação negativa do miR-326. Portanto, a hipoeexpressão de miR-326 pode ser relacionada com a indiferenciação de células-tronco neurais, visto que astrócitos indiferenciados não são demarcados por GFAP e apresentam hipoeexpressão de PINK1 (CHOI; WOO; JOU; JOE, 2016).

O miR-326 Regula positivamente genes antifibróticos, negativamente genes profibróticos, fatores de transformação do crescimento β 1 e metaloproteinases, o que determina sua função corroborativa ao fenótipo epitelial. Evidências a partir de estudos em gliomas demonstram o miR-326 como supressor tumoral. Além disso, as proteínas do grupo de alta motilidade A1 (HMGA1) e A2 (HMGA2), implicadas na invasão e recorrência tumoral, são sugeridas como possíveis alvos do miR-326. Abordagens bioinformatas, detectaram que o fator oncogênico HOTAIR também é alvo do miR-326, no qual seu silenciamento reduziu significativamente o FGF1

(JADIDESLAM; ANSARIN; SAKHINIA; BABALOO et al., 2019). No entanto, nossos dados demonstraram a hiperexpressão do miR-326 em função corroborativa à taxa recidiva, sugerindo o investimento em estudos com elevada variabilidade amostral para demonstrarem as mais diversas sinalizações do miR-326 e seus possíveis genes alvos e as possíveis soberanias sobre os microRNAs que constituem a epigenética e os diversos fenômenos da tumorigênese.

RNAs não codificadores longos (lncRNAs) podem atuar como esponjas à microRNAs, limitando sua disponibilidade e reduzindo seus efeitos regulatórios. A hiperexpressão do H19 foi demonstrada em glioblastomas e se confirmou aumento da invasividade e angiogênese, o que contradiz com a superexpressão do miR-326 em gliomas, resultante na diminuição da proliferação celular e aumento apoptótico (FAWZY; ELLAWINDY; HUSSEIN; KHASHANA et al., 2018).

As ASC nos grupos C, em ambos os microRNAs, se encontram razoáveis, porém, o reduzido número amostral não permite afirmar pontos de cortes adequados às instâncias recidiva e óbito. No entanto, a heterogenicidade tumoral aumenta significativamente a variabilidade populacional, deste modo, amplo IC seria um aspecto inerente à malignidade no glioblastoma.

Por meio deste presente estudo, não é possível definir os microRNAs miR-21 e miR-326 como marcadores de prognóstico e avaliação de estadiamento em relação à radioterapia. Deste modo, o número amostral deve ser aumentado em futuros estudos para que os pontos de cortes atinjam o máximo de acurácia diagnóstica e prognóstica. O desenho experimental também deve ser aplicado às biopsias líquidas a partir do plasma e líquido cefalorraquidiano.

Por limitações econômicas, não podemos amplificar o HIF-1 α , contudo, sua atividade fora quantificada indiretamente através dos microRNAs supracitados, selecionados a partir dos bancos de dados digitais já descritos na seção de metodologia.

No presente estudo, o cultivo celular fora realizado em condições normóxicas, porém, estudos apontam significativo crescimento tumoral após radioterapia em regiões onde houve elevada incidência de estase vascular intermitente, portanto, afirmam que células ciclicamente hipóxicas possam ser mais radorresistentes por modularem processos angiogênicos, caracterizando radorresistência também ao endotélio tumoral (HSIEH; LEE; LIANG; YU et al., 2010). Deste modo, experimentos

futuros devem ser executados em condições hipóxicas para que os achados possam ser compatíveis com a pO_2 de tumores sólidos *in vivo*.

Células expostas à hipóxia em ciclo apresentam expressões mais consideráveis de HIF-1 do que células que são cronicamente hipóxicas, no qual o ciclo induziu maior expressão da proteína HIF-1. A hipóxia ciclável desencadeia a produção de ERO nas células do glioma e, por conseguinte, promove a estabilização de HIF-1 por aumentar sua atividade transcricional e síntese proteica, enquanto a hipóxia ininterrupta resulta na diminuição da degradação de HIF-1, isto é, redução de hidroxilação pelas prolinhidroxilases. Por estes motivos, o HIF-1 baseia-se como mediador-chave envolvido na radiosensibilidade em GBMs hipóxicos. Contudo, outros estudos mostram que ininterruptos ou ciclo, a resistência celular aumenta significativamente durante a radiação ionizante em comparação a células normóxicas (HSIEH; LEE; LIANG; YU et al., 2010).

Fornecer oxigênio durante a radioterapia na tentativa de imobilizar os danos ao DNA encontra-se insatisfatório, uma vez que as células tumorais proliferativas consomem o oxigênio suplementado rapidamente, tornando a degradação de HIF-1 α incompleta. Estudos apontam que os atuais agentes de oxigenação de tumores, incluindo catalase, nanopartículas de manganês, dióxido de carbono e perfluorocarbono induzem de 25 a 70% da degradação de HIF-1 α durante a radioterapia, onde o HIF-1 α residual continua a dimerizar e transcrever mRNA relacionados à malignidade tumoral (MENG; CHENG; TONG; GAN et al., 2018).

O efeito abscopal decorrente de procedimentos convencionais radiológicos é relativamente raro na clínica, uma vez que mediadores inflamatórios circulantes, como o IFN- γ , regula positivamente a PD-L1, induzindo a exaustão de linfócitos T no estroma neoplásico. Deste modo, reduzir a malignidade tumoral está vinculado com um conjunto terapêutico baseado na oxigenação tumoral, por conseguinte, degradação de HIF-1 α , inibição de HIF-1 residual e hipoexpressão significativa de PD-L1 em tumores primários e abscopais (MENG; CHENG; TONG; GAN et al., 2018).

Níveis elevados de HIF-1 e HIF-2 se relacionam à progressão tumoral, contudo, a exclusão de HIF-1 causou aumento compensatório nos níveis de HIF-2 durante a oferta limitada de oxigênio, o que sugere a HIF-1 suficientemente capaz de acionar vias de sinalização como resposta à hipóxia. O efeito compensatório

mediante a elevação de HIF-2 pode ocorrer dependendo do tipo celular ao passo que a tradução proteica se aprimora, ao invés de aumentar os níveis de mRNAs, uma vez que a inibição de HIF-2 promoveu atividade apoptótica via p53, porém, HIF-1 na ausência de HIF-2 não compromete sua resposta radiobiológica (MORENO ROIG; GROOT; YAROMINA; HENDRICKX et al., 2019).

Contudo, outros pesquisadores tentam afirmar que ambos os HIFs supracitados parecem exibir funções biológicas distintas, de modo a dependerem do tipo celular. Estudos demonstram que a indução hipóxica de determinados genes alvos é reprimida em células endoteliais deficientes em HIF-1, sugerindo que sua perda não pode ser compensada por HIF-2 ou outras proteínas induzíveis por hipóxia (MORENO ROIG; GROOT; YAROMINA; HENDRICKX et al., 2019).

Observou-se células irradiadas sob hipóxia, quando deletados HIF-1 e HIF-2, um aumento da parada do ciclo celular, em que ambas as proteínas devem ser inibidas para anular o ciclo celular. Desta forma, seria possível propor que o bloqueio de HIF-1 seja concomitante com a inibição de HIF-2 a fim de sensibilizar as células tumorais (MORENO ROIG; GROOT; YAROMINA; HENDRICKX et al., 2019).

Ensaio multimodais revelaram que a utilização da quimioterapia associada à radioterapia otimiza o tratamento oncológico. Futuras investigações devem esclarecer a contribuição dos nanomateriais que aumentem níveis de oxigênio aos tumores, principalmente, em relação ao período de oxigenação à radioterapia. Nesse sentido, os radiosensibilizadores são mais promissores devido à meia-vida e eficácia estável (LI; SHANG; LI; FU et al., 2018).

Nanopartículas de dióxido de manganês (NPs MnO_2) atuam sinergicamente com a oxigenação tumoral e inibição de HIF-1 por mediar a hipoexpressão de PD-L1 nos pontos de verificação e, como consequência, promover a defesa antitumoral. Deste modo, a imunoterapia exige menos dependência do oxigênio podendo ignorar as limitações impostas pela hipóxia durante a radioterapia (ZHANG; YAN; GU; ZHAO, 2019).

Elevadas doses de radiação ionizante como tratamento adjuvante à imunoterapia podem ampliar os efeitos imunomoduladores, contudo, lesões graves ao tecido normal adjacente e o bloqueio à rejeição tumoral levaram ao desenvolvimento de nanomateriais à base de metais pesados, associados a anticorpos inibidores, que garantem a redução da dose de raios-X e aprimoram o

bloqueio dos pontos de verificação antitumoral, repercutindo na efetivação da radioterapia local e nos efeitos abscopais (ZHANG; YAN; GU; ZHAO, 2019).

Nosso trabalho confirma o papel do miR-21 na regulação da subpopulação de células-tronco tumorais. Nossos resultados também reforçam a discussão de que a concentração e função dos microRNAs, como, por exemplo, o miR-326 tenham uma assinatura personalizada tanto nos diferentes estágios tumorais como no surgimento de recidivas e respostas aos tratamentos. Sobretudo, os resultados salientam que novas pesquisas devam investigar os diversos interferentes que se sobrepõem aos efeitos regulatórios dos microRNAs supressores tumorais. Deve-se investir em pesquisas que constituam um conjunto terapêutico baseado em manobras relacionadas à oxigenação tumoral, degradação de HIF-1 α e HIF-2 α , inibição de HIF-1 α residual, associando-os a imunoterapia para que a malignidade do glioblastoma seja silenciada.

9. CONCLUSÃO

O miR-21, sob condições normóxicas, apresentou-se hiperexpresso no grupo de neuroesferas submetidas ao tratamento com radiação ionizante sugerindo que o seu papel na regulação de HIF-1 α está relacionado às neuroesferas radiorresistentes.

O miR-326, sob condições normóxicas, apresentou-se associado ao aumento de risco de recidivas em ambos os grupos (neuroesferas tratadas ou não com radiação ionizante), demonstrando também que esta regulação positiva independe do tratamento com radiação ionizante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELS, E. R.; MAAS, S. L. N.; NIELAND, L.; WEI, Z. et al. Glioblastoma-Associated Microglia Reprogramming Is Mediated by Functional Transfer of Extracellular miR-21. **Cell Rep**, 28, n. 12, p. 3105-3119.e3107, 09 2019.

BALAMURUGAN, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. **Int J Cancer**, 138, n. 5, p. 1058-1066, Mar 2016.

BATLLE, E.; CLEVERS, H. Cancer stem cells revisited. **Nat Med**, 23, n. 10, p. 1124-1134, Oct 2017.

CHAO, T. F.; XIONG, H. H.; LIU, W.; CHEN, Y. et al. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulating PDCD4 and hMSH2. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 33, n. 4, p. 525-529, Aug 2013.

CHEN, B.; GAO, T.; YUAN, W.; ZHAO, W. et al. Prognostic Value of Survival of MicroRNAs Signatures in Non-small Cell Lung Cancer. **J Cancer**, 10, n. 23, p. 5793-5804, 2019.

CHEN, R.; LIU, Y.; SU, Q.; YANG, Y. et al. Hypoxia stimulates proliferation of rat neural stem/progenitor cells by regulating mir-21: an in vitro study. **Neurosci Lett**, 661, p. 71-76, Nov 2017.

CHOI, I.; WOO, J. H.; JOU, I.; JOE, E. H. PINK1 Deficiency Decreases Expression Levels of mir-326, mir-330, and mir-3099 during Brain Development and Neural Stem Cell Differentiation. **Exp Neurobiol**, 25, n. 1, p. 14-23, Feb 2016.

CLARKE, R. H.; MOOSA, S.; ANZIVINO, M.; WANG, Y. et al. Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and in vitro models of tumor hypoxia. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e111199, 2014.

COLWELL, N.; LARION, M.; GILES, A. J.; SELDOMRIDGE, A. N. et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. **Neuro Oncol**, 19, n. 7, p. 887-896, Jul 2017.

DE MOOIJ, T.; PETERSON, T. E.; EVANS, J.; MCCUTCHEON, B. et al. Short non-coding RNA sequencing of glioblastoma extracellular vesicles. **J Neurooncol**, 146, n. 2, p. 253-263, Jan 2020.

DU, W.; LIU, X.; CHEN, L.; DOU, Z. et al. Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness. **Neuro Oncol**, 17, n. 2, p. 243-253, Feb 2015.

FAWZY, M. S.; ELLAWINDY, A.; HUSSEIN, M. H.; KHASHANA, M. S. et al. Long noncoding RNA H19, and not microRNA miR-326, is over-expressed and predicts survival in glioblastoma. **Biochem Cell Biol**, 96, n. 6, p. 832-839, 12 2018.

HERMANSEN, S. K.; NIELSEN, B. S.; AABERG-JESSEN, C.; KRISTENSEN, B. W. miR-21 Is Linked to Glioma Angiogenesis: A Co-Localization Study. **J Histochem Cytochem**, 64, n. 2, p. 138-148, 02 2016.

HSIEH, C. H.; LEE, C. H.; LIANG, J. A.; YU, C. Y. et al. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. **Oncol Rep**, 24, n. 6, p. 1629-1636, Dec 2010.

HORSMAN, M. R.; OVERGAARD, J. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. **J Radiat Res**, 57 Suppl 1, p. i90-i98, Aug 2016.

HUANG, X.; TRINH, T.; ALJOUFI, A.; BROXMEYER, H. E. Hypoxia Signaling Pathway in Stem Cell Regulation: Good and Evil. **Curr Stem Cell Rep**, 4, n. 2, p. 149-157, Jun 2018.

KEFAS, B.; COMEAU, L.; ERDLE, N.; MONTGOMERY, E. et al. Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. **Neuro Oncol**, 12, n. 11, p. 1102-1112, Nov 2010.

KOSHKIN, P. A.; CHISTIYAKOV, D. A.; CHEKHONIN, V. P. Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy. **Biochemistry (Mosc)**, 78, n. 4, p. 325-334, Apr 2013.

JADIDESLAM, G.; ANSARIN, K.; SAKHINIA, E.; BABALOO, Z. et al. Diagnostic biomarker and therapeutic target applications of miR-326 in cancers: A systematic review. **J Cell Physiol**, 234, n. 12, p. 21560-21574, 12 2019.

LI, J.; SHANG, W.; LI, Y.; FU, S. et al. Advanced nanomaterials targeting hypoxia to enhance radiotherapy. **Int J Nanomedicine**, 13, p. 5925-5936, 2018.

LIAO, K.; MA, X.; CHEN, B.; LU, X. et al. Upregulated AHIF-mediated radioresistance in glioblastoma. **Biochem Biophys Res Commun**, 509, n. 2, p. 617-623, 02 2019.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 6, p. 321-333, Jun 2015.

LU, L.; XU, H.; YANG, P.; XUE, J. et al. Involvement of HIF-1 α -regulated miR-21, acting via the Akt/NF- κ B pathway, in malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. **Toxicol Lett**, 289, p. 14-21, Jun 2018.

MACEDO-SILVA, C.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C. et al. The Critical Role of Hypoxic Microenvironment and Epigenetic Deregulation in Esophageal Cancer Radioresistance. **Genes (Basel)**, 10, n. 11, 11 2019.

MACHARIA, L. W.; WANJIRU, C. M.; MUREITHI, M. W.; PEREIRA, C. M. et al. MicroRNAs, Hypoxia and the Stem-Like State as Contributors to Cancer Aggressiveness. **Front Genet**, 10, p. 125, 2019.

MATARREDONA, E. R.; PASTOR, A. M. Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications. **Front Oncol**, 9, p. 779, 2019.

MENG, L.; CHENG, Y.; TONG, X.; GAN, S. et al. Tumor Oxygenation and Hypoxia Inducible Factor-1 Functional Inhibition via a Reactive Oxygen Species Responsive Nanoplatfrom for Enhancing Radiation Therapy and Abscopal Effects. **ACS Nano**, 12, n. 8, p. 8308-8322, 08 2018.

MORENO ROIG, E.; GROOT, A. J.; YAROMINA, A.; HENDRICKX, T. C. et al. HIF-1 α and HIF-2 α Differently Regulate the Radiation Sensitivity of NSCLC Cells. **Cells**, 8, n. 1, 01 2019.

NAWAZ, Z.; PATIL, V.; PAUL, Y.; HEGDE, A. S. et al. PI3 kinase pathway regulated miRNome in glioblastoma: identification of miR-326 as a tumour suppressor miRNA. **Mol Cancer**, 15, n. 1, p. 74, 11 2016.

PAN, Y. J.; WAN, J.; WANG, C. B. MiR-326: Promising Biomarker for Cancer. **Cancer Manag Res**, 11, p. 10411-10418, 2019.

PO, A.; BEGALLI, F.; ABBALLE, L.; ALFANO, V. et al. -Arrestin1/miR-326 Transcription Unit Is Epigenetically Regulated in Neural Stem Cells Where It Controls Stemness and Growth Arrest. **Stem Cells Int**, 2017, p. 5274171, 2017.

RAWAT, M.; KADIAN, K.; GUPTA, Y.; KUMAR, A. et al. MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. **Genes (Basel)**, 10, n. 10, 09 2019.

SAINT-MARTIN, A.; CASTAÑEDA-PATIÁN, M. C.; ROBLES-FLORES, M. The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance. **J Cell Signal**. 2: 154 p. 2017.

SHEN, H.; HAU, E.; JOSHI, S.; DILDA, P. J. et al. Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. **Mol Cancer Ther**, 14, n. 8, p. 1794-1804, Aug 2015.

SOLDATELLI, J. S. EFEITOS NA COMBINAÇÃO DE TEMOZOLOMIDA E DITELURETO DE DIFENILA EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA. Caxias do Sul, RS.: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, UNIVERSIDADE CAXIAS DO SUL: 71f p. 2018.

SONG, L.; LIU, S.; ZHANG, L.; YAO, H. et al. MiR-21 modulates radiosensitivity of cervical cancer through inhibiting autophagy via the PTEN/Akt/HIF-1 α feedback loop and the Akt-mTOR signaling pathway. **Tumour Biol**, 37, n. 9, p. 12161-12168, Sep 2016.

SPAN, P. N.; BUSSINK, J. The Role of Hypoxia and the Immune System in Tumor Radioresistance. **Cancers (Basel)**, 11, n. 10, Oct 2019.

SUN, X.; MA, X.; WANG, J.; ZHAO, Y. et al. Glioma stem cells-derived exosomes promote the angiogenic ability of endothelial cells through miR-21/VEGF signal. **Oncotarget**, 8, n. 22, p. 36137-36148, May 2017.

TIAN, X. P.; WANG, C. Y.; JIN, X. H.; LI, M. et al. Acidic Microenvironment Up-Regulates Exosomal miR-21 and miR-10b in Early-Stage Hepatocellular Carcinoma to Promote Cancer Cell Proliferation and Metastasis. **Theranostics**, 9, n. 7, p. 1965-1979, 2019.

TOH, T. B.; LIM, J. J.; CHOW, E. K. Epigenetics in cancer stem cells. **Mol Cancer**, 16, n. 1, p. 29, 02 2017.

TOLEDO, H. V.; FERRAGUT, M. A.; DE ALMEIDA, D. B. NOÇÕES BÁSICAS DE RADIOBIOLOGIA. O Que um Neurocirurgião Precisa Saber? : J Brasil de Neurocirur. 25: 193-199 p. 2015.

TORAIH, E. A.; ALY, N. M.; ABDALLAH, H. Y.; AL-QAHTANI, S. A. et al. MicroRNA-target cross-talks: Key players in glioblastoma multiforme. **Tumour Biol**, 39, n. 11, p. 1010428317726842, Nov 2017.

ULLMANN, P.; NURMIK, M.; BEGAJ, R.; HAAN, S. et al. Hypoxia- and MicroRNA-Induced Metabolic Reprogramming of Tumor-Initiating Cells. **Cells**, 8, n. 6, 06 2019.

WANG, S.; LU, S.; GENG, S.; MA, S. et al. Expression and clinical significance of microRNA-326 in human glioma miR-326 expression in glioma. **Med Oncol**, 30, n. 1, p. 373, Mar 2013.

ZHANG, C.; YAN, L.; GU, Z.; ZHAO, Y. Strategies based on metal-based nanoparticles for hypoxic-tumor radiotherapy. **Chem Sci**, 10, n. 29, p. 6932-6943, Aug 2019.

ZHANG, W. C. microRNAs Tune Oxidative Stress in Cancer Therapeutic Tolerance and Resistance. **Int J Mol Sci**, 20, n. 23, Dec 2019.

ZHOU, X.; LIU, H.; ZHENG, Y.; HAN, Y. et al. Overcoming Radioresistance in Tumor Therapy by Alleviating Hypoxia and Using the HIF-1 Inhibitor. **ACS Appl Mater Interfaces**, 12, n. 4, p. 4231-4240, Jan 2020.

ZOU, G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. **Am J Epidemiol**, 159, n. 7, p. 702-706, Apr 2004.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clin Chem**, 39, n. 4, p. 561-577, Apr 1993.

APÊNDICE

Tabela 15. Expressão de microRNAs em neuroesferas de glioblastoma.

	GM1	GM2	GM3	GM4	GM5
miR-21	CONTROLE				
	0,729378359	1,312044901	1,178360618	0,971569405	1,126399003
	2,329602432	0,856028143	0,873977399	1,135845057	1,042282318
	0,588525542	0,890355118	0,971005251	0,906164569	0,851770064
	RI				
	0,138363696	6,719105026	1,116723635	0,959804041	1,142047813
	3,564375207	9,201822041	3,361516263	1,666021435	1,031332983
	1,951469668	21,20667388	0,954479414	2,800528938	0,166908006
miR-326	CONTROLE				
	0,117000172	1,024793109	1,047668678	1,761680219	3,069869006
	15,35813252	0,981707287	1,153178622	2,885169992	0,815612159
	0,556512713	0,993989482	0,827712392	0,196744008	0,399389336
	RI				
	0,067655894	0,037111562	3,174699971	0,278873681	0,662436424
	1,429749954	0,22851539	2,179510817	0,086693588	2,931448049
	1,301539445	0,364994371	0,560308132	0,855783912	4,530193711
	GM6	GM7	GM8	GM9	GM10
miR-21	CONTROLE				
	0,759374437	1,033345193	0,824826668	1,399210886	0,903126911
	1,766535635	0,994180048	1,58456515	0,290656717	0,383282964
	0,74545533	0,973395946	0,765115863	2,458875056	2,888894619
	RI				
	1,776635026	1,848153462	1,621864679	5,429741955	2,326446812
	0,637600725	0,741007085	1,118299809	3,663092504	1,69189977
	0,85761687	1,057299609	1,836922051	3,060996243	1,661794871
miR-326	CONTROLE				
	0,293826099	0,3878758	1,0589319	8,335987953	1,324072911
	0,395245592	1,483634116	1,219767744	0,052428587	0,208369771
	8,610782032	1,737722818	0,774202954	2,288098778	3,624544069
	RI				
	0,290105493	0,74177881	0,87877103	12,35152092	0,386666796
	0,13938164	0,47491928	0,568865233	25,2164325	0,495493323
	2,927733069	1,059902535	1,641413586	19,35363476	2,277751921

Fonte: Elaboração própria

Tabela 16. Expressão do miR-21 em neuroesferas de glioblastoma tratadas com radiação ionizante em função dos grupos etários.¹

GRUPOS ETÁRIOS	EXPRESSÃO DO miR-21 EM NEUROESFERAS IRRADIADAS				
0-19					
20-39	GM1 ^R 0,138363696 3,564375207 1,951469668				
40-59	GM3 ^R 1,116723635 3,361516263 0,954479414	GM5 1,142047813 1,031332983 0,166908006	GM6 ^R 1,776635026 0,637600725 0,85761687	GM8 ^R 1,621864679 1,118299809 1,836922051	GM9 ^R 5,429741955 3,663092504 3,060996243
60-79	GM2 6,719105026 9,201822041 21,20667388	GM4 0,959804041 1,666021435 2,800528938	GM10 2,326446812 1,69189977 1,661794871		
> 80	GM7 1,848153462 0,741007085 1,057299609				

Fonte: Elaboração própria

¹ R = Pacientes recidivados

Tabela 17. Expressão do miR-326 em neuroesferas de glioblastoma tratadas com radiação ionizante em função dos grupos etários.

GRUPOS ETÁRIOS	EXPRESSÃO DO miR-326 EM NEUROESFERAS IRRADIADAS				
0-19					
20-39	GM1 ^R 0,067655894 1,429749954 1,301539445				
40-59	GM3 ^R 3,174699971 2,179510817 0,560308132	GM5 0,662436424 2,931448049 4,530193711	GM6 ^R 0,290105493 0,13938164 2,927733069	GM8 ^R 0,87877103 0,568865233 1,641413586	GM9 ^R 12,35152092 25,2164325 19,35363476
60-79	GM2 0,037111562 0,22851539 0,364994371	GM4 0,278873681 0,086693588 0,855783912	GM10 0,386666796 0,495493323 2,277751921		
> 80	GM7 0,74177881 0,47491928 1,059902535				

Fonte: Elaboração própria

Tabela 18. Características demográficas: sítio tumoral e ressecção cirúrgica.

	SÍTIO TUMORAL	RESSECÇÃO CIRÚRGICA
GM1 ^R	TEMPORAL E	SUBTOTAL
GM2	TEMPORAL D	TOTAL
GM3 ^R	TEMPORAL D	TOTAL
GM4	PARIETAL E	SUBTOTAL
GM5	TEMPORAL E PARIETAL D	SUBTOTAL
GM6 ^R	GIROS FRONTAIS SUPERIOR-MÉDIO E	TOTAL
GM7	FRONTAL E	TOTAL
GM8 ^R	PARIETAL D	TOTAL
GM9 ^R	PARIETAL E	SUBTOTAL
GM10	FRONTO-PARIETAL EM DIMÍDIO	SUBTOTAL

Fonte: Elaboração própria