**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA**

CLARA ISABEL LÓPEZ ARAGÓN

**Expressão dos microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210
em neuroesferas e células aderidas de culturas de pacientes com glioblastoma**

**Ribeirão Preto
2019**

CLARA ISABEL LÓPEZ ARAGÓN

**Expressão dos microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210
em neuroesferas e células aderidas de culturas de pacientes com glioblastoma**

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: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

Co-orientadores:

Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior

Ribeirão Preto

2019

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Aragón, Clara Isabel López

Expressão dos microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 em neuroesferas e células aderidas de culturas de pacientes com glioblastoma.

62p.

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli – 2019.

1. Glioblastoma. 2. Células tronco tumorais. 3. Neuroesferas.
4. Células aderidas. 5. microRNAs. 6. miR-23a. 7. miR-27a.
8. miR-181b. 9. miR-203. 10. miR-210.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARAGÓN, Clara Isabel López.

Título: Expressão dos microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 em neuroesferas e células aderidas de culturas de pacientes com glioblastoma.

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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____

Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____

Profa. Dra. Fernanda Maris Peria.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____

Profa. Dra. Camila A. Melo de Carvalho

Instituição: Centro Universitário Barão de Mauá

Julgamento: _____

Dedico esse trabalho a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, por ter colocado pessoas valiosas que me ajudaram nessa caminhada. Aos meus pais Mario López Aristizábal e Nereida Leonor Aragón Bermúdez por ter me trazido a este mundo cheio de bênçãos e por todas as oportunidades dadas ao longo desta jornada denominada “Vida”. Ao meu noivo Jairo Pinheiro da Silva por me amar tanto e ser meu grande colaborador e incentivador tanto pessoal como profissionalmente. Sem vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por uma vida abençoada, cercada de pessoas que me amam e apoiam e por ter me brindado a oportunidade de melhorar a cada dia, tanto como pessoa como profissionalmente. Por ser essencial em minha vida, o autor do meu destino e o meu guia.

Aos meus pais Mario López Aristizábal e Nereida Leonor Aragón Bermúdez, aos meus irmãos Mario Andrés, Luisa Fernanda e Juan Sebastian López Aragón, por seu amor incondicional, por todos os bons momentos e por estar sempre ao meu lado sendo minha maior fonte de inspiração, determinação e persistência, tornando-me a pessoa que sou hoje.

Ao meu noivo, companheiro e amigo Jairo Pinheiro da Silva, por me escolher para caminhar juntos, por ter me transmitido força e coragem através de seu exemplo, entrega e amor. Obrigada pelo seu apoio nos momentos de dificuldades, pela sua paciência, compreensão e por acreditar sempre em mim. Amo e admiro você.

A minha grande amiga Natalia Herrera, por todo o amor e cumplicidade compartilhado nesses anos, por torcer sempre por mim e por todos aqueles momentos que ficaram sempre no meu coração.

Aos meus sogros Zilda e Joel Pinheiro e a minha cunhada Simone Pinheiro Viana, por se tornar a minha segunda família, pelo seu apoio, carinho e dedicação. Por todo o amor que sempre me demonstraram.

Aos meus pais de coração Washington Figueira e Conceição Aparecida Baggio Figueira por ter me recebido na sua vida com tanto amor, compreensão e suas incessantes orações, que me deram forças quando mais precisava.

Aos meus pais adotivos pelo seu grande amor e por ter me apoiado quando mais o necessitava, apoio sem o qual não sei se teria conseguido completar essa jornada.

Agradeço à Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, minha orientadora, por todas as oportunidades, pela confiança, por todos os ensinamentos – os científicos e os não científicos -, por toda a ajuda e carinho ao longo desses três anos e por sua incalculável contribuição para meu crescimento científico, profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli, o meu sincero agradecimento pela oportunidade e confiança em mim e no meu trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Molecular por todo o aprendizado e ajuda no trabalho diário do laboratório e especialmente ao Neto, Rogério e Letícia pela colaboração durante os experimentos na fase final do meu trabalho.

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

Aos membros da banca avaliadora, pelo confiança, interesse e oportunidade de mostrar o resultado do esforço e dedicação nesses anos.

A todos que participaram deste momento direta e indiretamente, o meu muito obrigada.

Finalmente, embora não menos importante, agradeço a todos os pacientes incluídos neste projeto e suas famílias que, mesmo através do sofrimento, têm fé na ciência e esperança no futuro, permitindo a realização deste trabalho. Sem eles, certamente, este estudo não seria possível.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

“Eu agradeço a quem me fortalece, Cristo Jesus
nosso Senhor, porque ele me considerou digno de
confiança e me colocou ao seu serviço”.

(1 Timóteo 1:12)

RESUMO

ARAGÓN, C. I. L. **Análise da expressão dos microRNAs miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 em neuroesferas e células aderidas de culturas de pacientes com glioblastoma.** 2019. 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: Glioblastomas são as neoplasias primárias malignas mais comuns do sistema nervoso central em adultos, com uma sobrevida baixa a um ano do diagnóstico, devido ao seu alto poder tumorigênico, rápida progressão e invasividade, em parte pela presença de uma subpopulação de células neoplásicas com características de células tronco normais (NSCs) denominadas células tronco tumorais (CSCs) REF. Acredita-se que as CSCs sejam as responsáveis pela gliomagenese, heterogeneidade, progressão e reestabelecimento tumoral. Estudos demonstram que muitos microRNAs apresentam níveis de expressão alterados nos tumores cerebrais e têm sido associados a metástase, à patogênese dos glioblastomas, à expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor em CSCs, incluído o GBM, mediante diversos mecanismos moleculares REF. **Objetivo:** Avaliar a expressão dos miRNAs miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210, envolvidos na patogênese do glioma e metástase cerebral, comparando sua expressão em Células Aderidas e Neuroesferas. **Materiais e Métodos:** Foram usadas culturas celulares de dez pacientes adultos com glioblastoma sendo verificada a expressão dos microRNAs utilizando a PCR em tempo real. **Resultados e Conclusões:** Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão dos microRNAs miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 quando comparados em culturas de células aderidas e neuroesferas de tecidos de glioblastoma. Entretanto, apresentaram-se hiperexpressos nas células aderidas nos microRNAs: miR-27a, miR-181b e miR-210 e em neuroesferas no miR 203.

Palavras chave: Glioblastoma, Células tronco tumorais, Neuroesferas, MicroRNAs.

ABSTRACT

ARAGÓN, C. I. L. **Expression of microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 and miR-210 in neurospheres and adhered cells of cultures of glioblastoma patients.** 2019. 62p. Dissertation (Masters) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Glioblastomas are the most common primary malignant neoplasms of the central nervous system in adults, with a one-year low survival of the diagnosis, due to its high tumorigenic power, rapid progression and invasiveness, in part by the presence of a subpopulation of neoplastic cells with characteristics of normal stem cells (NSCs) called cancer stem cells (CSCs). CSCs are believed to be responsible for gliomagenesis, heterogeneity, progression and tumor reestablishment. Studies have shown that many microRNAs have altered levels of expression in brain tumors and have been associated with metastasis, the pathogenesis of glioblastomas, the expression of oncogenes and tumor suppressor genes in CSCs, including GBM, by various molecular mechanisms. **Objective:** To evaluate the expression of the miRNAs miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 and miR-210, involved in the pathogenesis of glioma and cerebral metastasis, comparing its expression in Adhered Cells and Neurospheres. **Materials and Methods:** Cell cultures of ten adult patients with glioblastoma were used and the expression of microRNAs was verified using real-time PCR. **Results and Conclusions:** No statistically significant differences were found in the expression of miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 and miR-210 microRNAs when compared in cultures of adhered cells and glioblastoma tissue neurospheres. However, hyperexpressions were observed in the adhered cells in the miR-203, miR-27a, miR-181b and miR-210 and neurospheres in miR-203.

Key words: Glioblastoma, Tumor stem cells, Neurospheres, MicroRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subtipos de gliomas.	19
Figura 2. Gênese dos gliomas.	21
Figura 3. Patogênese genética e molecular dos GBM	24
Figura 4. Diferenciações normais do SNC e formação de tumores no SNC.	27
Figura 5. Biogênese dos microRNAs.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Nível de expressão do miRNA 23a entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.....	46
Gráfico 2. Nível de expressão do miRNA 27a entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.....	46
Gráfico 3. Nível de expressão do miRNA 181b entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.....	47
Gráfico 4. Nível de expressão do miRNA 203 entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.....	47
Gráfico 5. Nível de expressão do miRNA 210 entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema nervoso central
LCR	Líquido céfalo raquidiano
OMS	Organização Mundial de Saúde
GB	Glioblastomas
GBM	Glioblastoma multiforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BCNU	Carmustina (bis-cloroetilnitrosourea)
TMZ	Temozolomida
SVZ	Zona subventricular
NSCs	Células-tronco neurais
CSCs	Células-tronco cancerígenas
HDACis	Inibidores da histona desacetilase
PVNs	Nichos perivasculares
HNs	Nichos hipóxicos
HIFs	Fatores indutores de hipóxia
VEGF	Fatores de crescimento vasculares endoteliais
OLIG2	Fator de transcrição do oligodendrócito 2
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina
LOH	Perda de heterozigosidade
Amp	Amplificação
INK4A	Inibidor quinase 4 ^a
ARF	Quadro de leitura alternativo
MDM2	Minuto duplo de camundongo 2
RB	Retinoblastoma
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K	Fosfatidilinositol 3- cinase
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
NES	Nestina
NF1	Neurofibroma 1
MET	Met proto-oncogene (receptor do fator de crescimento do hepatocito)
CHI3L1	Quitinase 3 ligando 1
CD44a	Antígeno CD44
MERTK	C-mer tirosina cinase proto-oncogênica
TNF	Fator de necrose tumoral
NFKB	Fator nuclear kappa-B
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
PIK3R1	Fosfatidilinositol 3 quinase, subunidade reguladora 1.
BTIC	Células iniciadoras de tumor cerebral
CREB	Proteína de ligação a elementos de resposta a AMPc
EMT	Transição epitelial-mesenquimal.
BTG2	Gene de translocação de células B 2
SFRP1	Proteína secretada relacionada com a fixação 1
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
REST	Repressor transcricional RE1
GAS41	Sequência amplificada por glioma 41
PLD2	Fosfolipase D2
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia do Câncer	16
1.2 Gliomas	17
1.2.1 Glioblastoma	20
1.2.1.1 Classificação e alterações genéticas dos glioblastomas	22
1.2.2 Tratamento dos Glioblastomas	25
1.3 Células Tronco Tumoral e Glioblastomas	26
1.4 microRNAs	28
1.4.1 Biogênese dos microRNAs	28
1.4.2 Mecanismos de metástases dos MicroRNAs	30
1.4.3 microRNAs e Glioblastoma	32
1.4.3.1 miR-23a e Glioblastoma	32
1.4.3.2 miR-27a e Glioblastoma	34
1.4.3.3 miR-181b e Glioblastoma	35
1.4.3.4 miR-203 e Glioblastoma	36
1.4.3.5 miR-210 e Glioblastoma	37
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Amostras primárias	41
4.2 Processamento e Cultivo celular	41
4.3 Grupos Experimentais	42
4.4 Extração de RNA	42

4.4.1	Quantificação e qualidade do RNA total.....	43
4.4.2	Síntese do DNA Complementar (cDNA) dos microRNAs.....	43
4.4.3	PCR em tempo real (RT-PCR)	43
4.4.4	Análise estatística	45
5	RESULTADOS.....	46
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	55
8	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, e pertence ao grupo das chamadas, doenças e agravos não transmissíveis (DANT), as quais são responsáveis pela maior parte dos adoecimentos e óbitos da população no mundo, causando um estimado de 36 milhões de mortes em 2008, o que corresponde a um 63% do total das mesmas, com destaque para as doenças cardiovasculares (48%) e para o câncer (21%) (Borges et al., 2018; Ferlay et al., 2015). Atualmente, o câncer ocupa o segundo lugar nas principais causas de morte nos Estados Unidos (Ferlay et al., 2015), sendo o número de óbitos maior do que todas as doenças coronárias ou todos os AVC, segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2011.

De acordo com a variabilidade geográfica em 20 regiões do mundo, a GLOBOCAN 2018 descreve cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer (17 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de mortes por câncer (9,5 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) em 2018 (Bray et al., 2018).

Em 2017 nos Estados Unidos, deverão ocorrer 1.688.780 casos novos de câncer ou seu equivalente de mais de 4.600 novos diagnósticos de câncer a cada dia, e 600.920 mortes por câncer, com uma incidência de 20%, sendo maior em homens do que em mulheres, e uma taxa de mortalidade 40% maior, onde os tumores cerebrais ocupam o décimo lugar em homens e o nono lugar em mulheres como os tumores mais incidentes (Borges et al., 2018), e o décimo lugar de mortes por câncer (Borges et al., 2018; Siegel, Miller, & Jemal, 2017) nas diferentes estatísticas locais e mundiais, sendo mais frequentes em adultos (29/100.000 habitantes) do que em crianças e adolescentes (6/100.000 habitantes) (Ferris, Hofmann, Solomon, & Perry, 2017).

As mortes por câncer em crianças e adultos jovens, correspondem respectivamente ao 30% e 20% (McNeill, 2016). Embora os tumores sólidos são mais comuns em crianças, os gliomas obedecem ao 27% dos tumores primários

do SNC, e a um 80% de todos os tumores primários malignos do SNC (Ferris et al., 2017), por isso a relevância de estudar sobre esse tipo de carcinomas.

1.2 Gliomas

As metástases cerebrais são as neoplasias mais comuns em adultos, embora que os glioblastomas multiformes (GBM) são considerados como as neoplasias primárias malignas mais comuns do sistema nervoso central (SNC) (Castañeda et al., n.d.; Ferris et al., 2017; Gusyatiner & Hegi, 2018).

A era de pesquisa dos gliomas foi conhecida como "era macroscópica", onde os gliomas eram originalmente conhecidos como "sarcomas medulares" pela comunidade médica inglesa e como "fungo medulare" pela comunidade médica alemã. A pesquisa sobre tumores cerebrais primários consistiu em dois períodos principais, o "clássico" de 1860 a 1920 e o "histológico", de 1920 a 1940 (Agnihotri et al., 2013).

Os gliomas são tumores do SNC que afetam o encéfalo e a medula espinhal. As células gliais normais (astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias) se encarregam da função neuronal, contribuindo na formação da barreira hematoencefálica, mielinizar os axônios e revestir os ventrículos como parte da barreira cerebral do líquido céfalo raquidiano (LCR). As células que dão origem aos gliomas ainda não são bem compreendidas, podendo incluir células-tronco neurais primitivas, células progenitoras gliais ou células indiferenciadas de um tipo de célula madura. Essas células progenitoras podem gerar também tumores de linhagens mistas, como tumores glioneuronais (Ferris et al., 2017).

O desenvolvimento de gliomas pode ser atribuído às interações entre fatores ambientais e genéticos. Os fatores ambientais que poderiam contribuir de forma significativa no desenvolvimento do glioma incluem a radiação eletromagnética de telefones celulares, o consumo de álcool, agentes infecciosos, condições alérgicas e tabagismo (Zeng, Cui, & Gao, 2015). Alguns estudos apontam a que determinadas ocupações se associariam a um maior risco de padecer um glioma, como o uso de plásticos e produtos de caucho (Castañeda et al., n.d.). Além dos fatores mencionados, fatores genéticos também podem estar implicados na patogênese do glioma, como mutações em genes entre outras alterações (Zeng et al., 2015).

Os sinais e sintomas de glioma incluem em geral, dor de cabeça, náusea, vômito, convulsões, perda visual, dor, distúrbios do nervo craniano, fraqueza e dormência, variando em cada pessoa e segundo a localização do tumor (Zeng et al., 2015).

Esses tumores causam um número excessivo de mortes em relação a outros tipos de câncer (McNeill, 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os gliomas predominantemente por critérios histopatológicos em: astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e ependimomas, estabelecendo uma gradação relacionada ao prognóstico da doença que identifica os astrocitomas de alto grau em grau III (astrocitoma anaplásico) e grau IV (Glioblastoma –GB–) (Castañeda et al., n.d.).

O 75% de todos os gliomas são os astrocitomas, sendo subtipo mais comum o de maior grau, o glioblastoma, com uma sobrevida global baixa, 5% em 5 anos. (Ferris et al., 2017). Os gliomas são mais prevalentes em homens com um 55% dos casos, afetando mais comumente aos brancos não hispânicos nos Estados Unidos (McNeill, 2016).

Como observado na figura 1, a incidência dos gliomas varia de acordo com a histologia do tumor e a faixa etária, sendo que o tumor de grau I (astrocitoma pilocítico) ocorre predominantemente em crianças e adultos jovens. Os tumores embrionários e os gliomas malignos, grau II (oligodendroglioma), atingem seu máximo na terceira e quarta décadas da vida, com aumento da incidência dos gliomas malignos na velhice na sexta e sétima décadas da vida, incluindo os meningiomas e os tumores hipofisários na idade adulta (McNeill, 2016).

Figura 1. Subtipos de gliomas.

a - Incidência e subtipos de gliomas por idade. b - Idade de diagnósticos.
Tomado de (Ferris et al., 2017)

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e agressivo dos gliomas, com recidivas e resistência às terapias convencionais de forma frequente (de Almeida Sassi, Lunardi Brunetto, Schwartzmann, Roesler, & Abujamra, 2012), sendo umas das razões principais pelas quais é objeto desse estudo.

1.2.1 Glioblastoma

Em 1863, utilizando técnicas macroscópicas e microscópicas ("período clássico"), o Dr. Rudolf Virchow identificou pela primeira vez aos glioblastomas como tumores de origem glial, sugerindo o termo "glioma" e dando origem à classificação atual de tumores cerebrais. O Glioblastoma multiforme (GBM) foi originalmente denominado como espongiblastoma multiforme, mas em 1926 o neurocirurgião e neuropatologista Dr. Percival Bailey junto com o neurocirurgião Dr. Harvey Cushing renomearam o tumor como se conhece hoje (Agnihotri et al., 2013).

Os GBM são considerados como as neoplasias primárias malignas mais comuns do sistema nervoso central (SNC) em adultos, representando mais de 50% dos casos, com uma taxa de incidência de 3,2 por 100.000 população, estando associado a um prognóstico ruim, com uma sobrevivência a 1 ano depois do diagnóstico de 33%, e a 5 anos de apenas um 5% (Castañeda et al., n.d.; Ferris et al., 2017; Gusyatiner & Hegi, 2018).

O GBM pode comprometer qualquer estrutura neuroanatômica, sendo mais comum nos hemisférios cerebrais nos adultos e na fossa posterior. nas crianças. (Castañeda et al., n.d.).

Seu crescimento infiltrativo é extremamente rápido, e quando avaliados radiograficamente, acometem regiões além das margens aparentes, sendo histologicamente compostos por células de grande variabilidade morfológica, que se misturam com células normais, como neurônios e glia nativa, formando estruturas secundárias quando se agrupam em torno dos neurônios (satelitoses), dos vasos sanguíneos e da pia-máter; com formações bizarras, pleomórficas e multinucleadas de alta atividade mitótica; proliferação microvascular; hiperplasia endotelial grave; microtrombos intravasculares e uma extensa necrose de natureza isquêmica ou pseudoempalizada (Castañeda et al., n.d.; Ferris et al., 2017).

Essa grande heterogeneidade é o que fez ganhar o nome de multiforme aos glioblastoma, se caracterizando por padrões e características citológicas variadas, embora apresentem focos bem diferenciados que se alternam com os menos diferenciados em geral. (Castañeda et al., n.d.).

Figura 2. Gênese dos gliomas.

(a) Interações entre o nicho neurogênico (zona subventricular, SVZ) e as células-tronco neurais (NSCs). (b) Papel das células-tronco cancerígenas (CSCs) na progressão tumoral. Tomado de (de Almeida Sassi et al., 2012).

Na figura 2 observa-se o processo de gliomagenese, onde as interações entre o nicho neurogênico (zona subventricular, SVZ) e as células-tronco neurais (NSCs) destacam os tipos celulares mais relevantes e os fatores secretados que afetam a proliferação neural, onde os progenitores de oligodendrócitos são mais propensos a sofrer transformação maligna. As células-tronco tumorais (CSCs) tem um papel importante na progressão tumoral, existindo diferentes subpopulações de CSCs, que contribuem para a heterogeneidade do tumor. Os inibidores da histona desacetilase (HDACis) podem ser eficazes contra as CSCs promovendo a sua diferenciação e, os nichos perivasculares (PVNs) fornecem fatores de crescimento que incrementam a proliferação e a autorregulação das CSCs. Devido ao rápido crescimento do tumor, se formam nichos hipóxicos (HNs) que, através da ação de HIFs (Fatores indutores de hipóxia) secretam fatores de crescimento vasculares endoteliais (VEGF), que ao mesmo tempo pode gerar novos nichos vasculares (de Almeida Sassi et al., 2012).

Em 1926, Harvey Cushing e Percival Bailey publicaram o primeiro esquema de classificação para gliomas baseado nos achados clínicos e na aparência histológica à microscopia de luz de células que se assemelhavam morfológicamente a células do sistema nervoso central, com características difusas e invasivas tornando-os cirurgicamente incuráveis e mais agressivos, sendo conhecidos como glioblastomas multiformes (Morokoff, Ng, Gogos, & Kaye, 2015).

1.2.1.1 Classificação e alterações genéticas dos glioblastomas

Bailey e Cushing conseguiram classificar mais de 13 tipos de glioma e observaram vários graus de prognóstico associados a diferentes gliomas, essa cuidadosa caracterização permitiu estabelecer um alicerce para o crescimento da neuro-oncologia e da neurocirurgia (Agnihotri et al., 2013).

Vários sistemas de classificação foram aperfeiçoados com o tempo para o GBM e os outros gliomas, finalizando com o esquema utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) publicado pela primeira vez em 1979, que depois, com os importantes avanços nas pesquisas clínicas, patológicas, moleculares e genéticas, permitem a subclassificação detalhada dos tumores

cerebrais primários como se conhece na atualidade (Agnihotri et al., 2013; Morokoff et al., 2015).

Os subtipos de gliomas difusos compreendem, astrocitomas (astrocitomas difusos: Grau II; astrocitomas anaplásico: Grau III e glioblastomas: Grau IV - classificação da OMS), oligodendrogliomas (incluindo os anaplásicos), e oligoastrocitomas (Ferris et al., 2017).

Tradicionalmente os glioblastomas foram classificados em dois subtipos idênticos morfológicamente, o glioblastoma primário (GB1) e o glioblastoma secundário (GB2). Os GB1 representam a maior parte desses tumores, aparecendo sem lesões prévias, sendo mais comuns na velhice, com uma idade média de 60 anos, com uma rápida evolução e crescimento do tumor. O GB2 representa menos de 10% dos glioblastomas e surgem como progressão de astrocitomas de baixo grau, do tipo astrocitoma difuso ou astrocitoma anaplásico, afetando principalmente a jovens, com uma evolução mais lenta do que o no caso dos GB1, com uma sobrevida média significativamente maior devido à menor idade de apresentação e ao crescimento mais lento do tumor (Castañeda et al., n.d.).

Alterações genéticas e cromossômicas envolvidas na gênese dos GBMs primários e secundários são mostradas na Figura 3, onde se evidencia que os GBMs primários surgem da célula de origem, enquanto os GBM secundários surgem e progridem a partir de um astrocitoma de baixo grau, contendo aberrações semelhantes. Análises genômicas recentes permitiram classificar os GBMs primários e secundários em outros quatro subtipos distintos caracterizados por alterações moleculares específicas (Agnihotri et al., 2013).

Figura 3. Patogênese genética e molecular dos GBM

OLIG2 fator de transcrição do oligodendrócito 2, **PTEN** fosfatase e homólogo de tensina, **LOH** perda de heterozigotidade, **Amp** amplificação, **INK4A** inibidor quinase 4a, **ARF** quadro de leitura alternativo, **MDM2** minuto duplo de camundongo 2, **RB** retinoblastoma, **PDGFR** receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas, **PI3K** fosfatidilinositol 3- cinase, **VEGF** fator de crescimento vascular endotelial, **NES** nestina, **NF1** neurofibroma 1, **MET** met proto-oncogene (receptor do fator de crescimento do hepatócito), **CHI3L1** quitinase 3 ligando 1, **CD44a** antígeno CD44, **MERTK** c-mer tirosina cinase proto-oncogênica, **TNF** fator de necrose tumoral, **NFKB** fator nuclear kappa-B, **IDH1** isocitrato desidrogenase 1, **PIK3R1** fosfatidilinositol 3 quinase, subunidade reguladora 1.

Traduzido de (Agnihotri et al., 2013).

1.2.2 Tratamento dos Glioblastomas

Na década de 1920, o neurocirurgião Dr. Walter Dandy deu um passo radical ao remover todo o hemisfério de dois pacientes em coma que sofriam de GBM. Apesar dessa intervenção, esses pacientes acabaram sucumbindo à doença, fornecendo a primeira evidência de como a GBM realmente é invasivo (Agnihotri et al., 2013).

A era da neurocirurgia moderna foi introduzida quando Rickman Godlee removeu o primeiro tumor cerebral em 1884, no entanto, logo ficou claro que mesmo a cirurgia radical, como a hemisferectomia, como tentou Dandy, fazia pouca diferença para a sobrevivência da maioria dos pacientes com tumores cerebrais. (Morokoff et al., 2015).

De 1926 até 1976, os tratamentos de radioterapia e quimioterapia foram testados, mas apenas levaram a melhorias marginais na sobrevivência. Em 2005, Stupp et al. relataram que a radioterapia concomitante e a quimioterapia com temozolomida como adjuvante, levaram a um modesto aumento de 2,5 meses na sobrevida média, sendo mais significativo (de 10% para 26%) a proporção de pacientes que sobreviveram 2 anos (Morokoff et al., 2015).

O principal tratamento para os glioblastomas (GB) e os astrocitomas anaplásicos continua sendo, a maior ressecção cirúrgica possível do tumor associado ao tratamento adjuvante com radioterapia e quimioterapia, baseado em agentes alquilantes (agentes que transferem grupos alquil para base guanina, danificam o DNA e causam a morte celular), como carmustina (BCNU) ou temozolomida (TMZ), que mostraram um aumento na taxa de sobrevivência (Castañeda et al., n.d.).

Uma possível ferramenta de tratamento de pacientes com tumores agressivos, não ressecáveis e para impedir a metástase do tumor poderia ser a segmentação seletiva das CSCs (J.A. Leal & Lleonart, 2013).

Embora a heterogeneidade do glioblastoma tenha sido estudada por clínicos, biólogos e patologistas há muitos anos, tem sido observada uma grande diversidade biológica desta doença na última década, explicando o fracasso da terapia do câncer e a morte desses pacientes, o que tem aumentado o interesse por aprofundar nos mecanismos moleculares subjacentes e no microambiente tumoral e metastático para ajudar na prevenção, diagnóstico precoce, identificação de novos alvos

terapêuticos e diminuição da sua progressão. Um desses alvos são, com certeza, as células tronco tumorais e os microRNAs.

1.3 Células Tronco Tumoral e Glioblastomas

As células-tronco tumorais (CSCs) correspondem a um grupo de células cancerígenas raras que possuem algumas características de células-tronco normais, podendo também surgir de elas, com a particularidade de serem tumorigênicas, com potencial proliferativo indefinido conduzindo à formação e crescimento de tumores, permitindo a persistência do tumor, causando recidiva e metástase, devido a semelhanças nos mecanismos que regulam a auto-renovação de células-tronco normais e das células cancerígenas (J.A. Leal & Lleonart, 2013; Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). É por isso, que se as CSCs fossem eliminadas, o tumor regrediria devido à diferenciação e morte celular (J.A. Leal & Lleonart, 2013).

O câncer pode ser considerado como uma doença de auto-renovação não regulamentada das células tronco normais, podendo ser transformadas pela aquisição de pelo menos uma mutação, existindo evidência de que muitas vias que são classicamente associadas ao câncer também podem regular o desenvolvimento normal de células-tronco, como por exemplo os mecanismos de morte celular na regulação da homeostase de células progenitoras restritas (Reya et al., 2001).

Células progenitoras restritas são menos propensas do que as células-tronco a sofrer uma transformação neoplásica porque proliferam por um período de tempo muito mais curto antes da diferenciação terminal e precisam adquirir primeiro o potencial extensivo de auto-renovação das células-tronco normais para ter a oportunidade de experimentar mutações adicionais que levariam à transformação (Reya et al., 2001).

Como se observa na Figura 4, as células putativas podem dar origem aos GBM, quando existem alterações na diferenciação normal das células do SNC ocasionando a formação de tumores no SNC, incluindo os glioblastomas. As células-tronco neurais (NSCs) dão origem a progenitores neurais e gliais com capacidade proliferativa e auto-replicativa limitada que se diferenciam posteriormente nos principais tipos de células neurais, oligodendrócitos e astrócitos. Algumas teorias fazem referência a que as células iniciadoras de tumor cerebral (BTIC) se formam a partir de células diferenciadas terminalmente (1) devido a uma lenta acumulação de

mutações críticas conferindo-lhes uma vantagem proliferativa. Outras teorias apontam a que as BTIC se originam das NSCs (2) ou da transformação de uma célula progenitora neural, podendo formar GBMs através da diferenciação de linhagens gliais ou neuronais maduras (3) (Agnihotri et al., 2013).

Figura 4. Diferenciações normais do SNC e formação de tumores no SNC.

A flecha curva representa a capacidade de se renovar

Traduzido de (Agnihotri et al., 2013).

Os microRNAs estão envolvidos em todos os processos biológicos humanos, tendo sido demonstrado seu papel na tumorigênese humana, estando também implicados na regulação de células-tronco e de CSCs. Existe ainda controversa ao respeito da terapia focada em CSC devido a que compartilham com as células tronco normais, vias de sinalização embora oferecem novos alvos terapêuticos (J.A. Leal & Lleonart, 2013).

1.4 microRNAs

1.4.1 Biogênese dos microRNAs

miRNAs são pequenas moléculas de RNAs não- codificantes, conservados evolutivamente, que possuem entre 18-25 nucleotídeos de extensão, com uma média 22, constituindo a classe dominante dos pequenos RNAs na maioria dos tecidos do corpo (Asiaf, Ahmad, Arjumand, & Zargar, 2018; Bertoli, Cava, & Castiglioni, 2015; Zhixin Li et al., 2017).

As primeiras moléculas de miRNAs foram descobertas no ano de 1933 por Lee e Rosalind C, et al. in *Caenorhabditis elegans*, sendo capaz de regular a expressão e função de outra proteína codificadora de mRNA (Bertoli et al., 2015; Wu et al., 2016). El repositório principal das sequências e anotações dos miARN chamado miRBase (www.mirbase.org), foi inaugurado em 2006 com somente 218 loci de miARN, sendo desde então utilizadas novas técnicas de sequenciamento de alto rendimento para analisar tais moléculas, permitindo o descobrimento de más de 28,000 miRNAs maduros até 2014, muitos deles relacionados com a apoptose, tumorigênese, metástase, angiogênese (Bertoli et al., 2015; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014; Xing & Watabe, 2013).

Essas moléculas se caracterizam por realizar importantes funções regulatórias postranscripcionais da expressão gênica, na maioria dos processos celulares chave, tanto em animais quanto em plantas, como: a regulação da proliferação, a diferenciação, a angiogênese, a migração e a apoptoses (Bertoli et al., 2015; Wu et al., 2016).

Como se mostra na figura 5, os miRNAs são transcritos no núcleo da célula em pri-miRNA de tamanho variável pela enzima RNA polimerase II (pol II). Ainda no núcleo os pri-miRNAs são reconhecidos e clivados pela enzima RNase III Drosha, ligando-se a ela e ao Pasha (DGCR8), e passa a ter então, aproximadamente, 70 nucleotídeos denominada pré-miRNA, apresentando estrutura “hairpin”. (Asiaf et al., 2018; Garzon, Fabbri, Cimmino, Calin, & Croce, 2006). Posteriormente, o pré-miRNA é exportado do núcleo ao citoplasma da célula pela proteína transportadora exportina 5, sendo processada pela proteína Dicer (enzima RNAase III) que cliva o pré- miRNA em miRNA, perdendo sua estrutura “hairpin”, e passando a conter em

torno de 19-24 nucleotídeos (Asiaf et al., 2018; Croce et al., 2005; Cruz, 2010; Garzon, Fabbri, Cimmino, Calin, & Croce, 2006).

Ainda no citoplasma da célula, o miRNA já maduro (miRNA duplo), se liga as Proteínas Argonautas e ao complexo RISC (complexo de silenciamento induzido de RNA), por complementariedade de bases na região não traduzida 3', o RISC cliva o mRNA ou induz repressão translacional dependendo do grau de sítios complementares entre o miRNA e seu alvo (Asiaf et al., 2018; Croce et al., 2005; Cruz, 2010; Garzon et al., 2006).

Os miRNAs apresentam um mecanismo de regulação pós-transcricional, pois se a ligação por complementariedade de bases com o mRNA for completa, o RNAm é induzido a ser destruído, caso a ligação seja incompleta o mRNA é apenas silenciado, e por tanto não serão traduzidas em proteínas nessas duas formas (Asiaf et al., 2018; Garzon et al., 2006).

Figura 5. Biogênese dos microRNAs

Tomado de (Garzon et al., 2006)

Apesar de toda a sua potencialidade foi apenas no século 21 que se deu início a pesquisa relacionando o miRNA ao câncer. (Wu et al., 2016), os quais apresentam grande potencial para se tornarem biomarcadores na progressão tumoral, pois apresentam expressões diferentes em diversos tipos de câncer, com estudos que demonstram que a expressão de alguns miRNAs diferem em câncer metastático e no seu sítio primário (Xing & Watabe, 2013).

1.4.2 Mecanismos de metástases dos MicroRNAs

A metástases e a causa mais comum de mortalidade associada ao câncer e depende de um processo de vários passos através do quais as células tumorais se espalham do seu local primário e formam crescimentos secundários à distância. Até hoje, são poucas as investigações sobre as metástases associadas, as alterações genéticas e o mecanismo molecular subjacente ao processo metastático, que tem dado resultados. (S. Chen et al., 2017)

A via de sinalização Wnt está envolvida no desenvolvimento embrionário regulando vários processos celulares, incluindo migração celular e metástase e certos genes nesta via podem servir como potenciais biomarcadores metastáticos (S. Chen et al., 2017).

Um grande avanço na pesquisa sobre câncer começou após a descoberta de alterações do microRNA (miRNA) que interviam no câncer humano. Os miRNA são uma grande família de pequenos ARN não codificantes que controlam negativamente a expressão gênica nos níveis de mRNA e proteína. Os miRNAs maduros compreendem 18-25 nucleótidos que silenciam os genes através da ligação consumada ou defeituosa à região 3' não traduzida da transcrição. Estudos de microarray revelaram que os miRNAs individuais são capazes de afetar a expressão de múltiplos genes, indicando que os miRNAs podem ter efeitos pleiotrópicos nos processos celulares, incluindo a diferenciação celular, a proliferação, a sobrevivência e a apoptose e, contribuindo no desenvolvimento normal, na homeostasia celular e no processo de doença (Grisard & Nicoloso, 2017; Zhenyang Li, Gu, Fang, Xiang, & Chen, 2012).

Já foi amplamente estabelecido que o potencial de uma célula tumoral para metástase depende de vários fatores, com evidências que indicam que os miRNAs

poderiam agir de forma chave na regulação da invasão de células tumorais e metástases (Zhenyang Li et al., 2012).

Na realidade é difícil falar de um gene ou uma mudança genética específica encarregada completamente do processo de metástase, em lugar disso, existe uma combinação de alterações oncogênicas que determinam o genótipo metastático das células tumorais no início da tumorigênese. A evidência indica que os microRNAs (miRNAs) podem ser jogadores importantes na regulação da invasão de células tumorais e metástases (Zhenyang Li et al., 2012).

Devido a que as sequências sementes dos miRNAs são tão pequenas, análises de bioinformática e evidências experimentais sustentam a noção de que um único miARN pode atuar em centenas de mRNAs alvo. Os miRNAs são relevantes em todos os aspectos da biologia celular humana, na biologia do câncer e atuam como "roda de micro-comando" no processo de metástases, com um papel ativador ou supressor, que geralmente é denominado metastamiRs (Grisard & Nicoloso, 2017).

As assinaturas de miRNA também permitem distinguir os cânceres primários das metástases. Os miRNAs são usados por células cancerosas para se adaptar ao novo microambiente com o qual devem-se enfrentar. De fato, os níveis de expressão de miRNAs específicos, isolados ou em combinação, foram associados à ocorrência de metástase de forma específica para câncer. Os miRNAs também podem ser segregados ativamente por células cancerosas para modular, por exemplo, o nicho pré-metastático e podem ser encontrados na circulação e poderiam permitir por exemplo, a detecção de lesões que do contrário seriam indetectáveis com tomografia computadorizada ou ressonância magnética (Grisard & Nicoloso, 2017).

A biogênese dos miRNAs depende de uma série de eventos que começam com a transcrição no núcleo pela RNA polimerase II a transcritos primários longos (pri- miRNAs), depois são clivados pelo "complexo de microprocessador" formado pela RNase III, a Drosha e o Dgcr8 (DiGeorge Critical Region 8) /Pasha, num pré-mRNA (precursor de 70 nucleotídeos). Finalmente, no citoplasma, os pré-miRNAs são clivados pela RNase III Dicer, produzindo a forma madura de miARN, com 22 nucleotídeos em média. Por meio da complementaridade consegue completar sua sequência de 7 nucleotídeos de 5 extremidades chamada "sequência semente". Os miRNAs se ligam a elementos de resposta específicos carregados por mRNAs (mas também por outras espécies de RNAs) predominantemente em suas 3-UTRs, e

também dentro de seus 5'-UTR e sua sequência de codificação. A ligação de miRNAs com os mRNA alvo através de proteínas Argo (Argonaute), resulta na clivagem direta de mRNA por nucleases como Dicer e o RISC (Complexo de Silenciamento Induzido com RNA) ou na inibição de sua tradução, afetando os níveis de expressão protéica (Grisard & Nicoloso, 2017).

No nível celular, a metástase ocorre quando as células cancerosas conseguem sair do local do tumor primário, viajando pela circulação para um local de tecido distante, e podem prosperar e estabelecer um tumor secundário. Este processo pode ser arbitrariamente dividido em várias etapas, que são denominadas coletivamente a cascata metastática e incluem: desprendimento e invasão local, intravasamento, sobrevivência na circulação, prisão em locais distantes e extravasamento, formação de micrometástasis e, finalmente, colonização metastática. Existem várias teorias respeito à cascata metastática, entre elas a teoria linear que faz referência à acumulação progressiva de traços dentro da célula do tumor primário, que levam à agressividade; a teoria paralela que postula a progressão independente de metástases, que surgem precocemente de células tumorais disseminadas após diferentes caminhos moleculares e genéticos (Grisard & Nicoloso, 2017).

Para o cumprir com o alvo desse trabalho, serão analisados 5 microRNAs para avaliar sua relevância nas células tronco tumoral do glioblastoma fazendo uma revisão bibliográfica sobre o comportamento desses microRNAs, devido ao papel importante que joga a biologia molecular na tumorigênese, invasão, características clínicas e patológicas dos tumores mamários e sua disseminação, resposta terapêutica e prognóstico.

1.4.3 microRNAs e Glioblastoma

1.4.3.1 miR-23a e Glioblastoma

As expressões de miR-23a nos tecidos de glioma estavam significativamente sobreexpressas, com níveis de expressão maiores nos tecidos quando comparado com tecidos adjacentes correspondentes. Por transfecção do oligonucleotídeo anti-miR-23a, os resultados mostraram que a proliferação, migração e invasão de linhas celulares de glioma foram significativamente suprimidas (Lian et al., 2013).

O miR-23a foi significativamente suprarregulado nos tecidos de glioma em comparação com os tecidos adjacentes correspondentes. O miR-23a também foi altamente expresso nas linhas celulares de glioma: SHG44, U251 e U87 (Hu, Chen, Cui, Li, & Huang, 2013).

A análise de sensibilidade e especificidade indicou que o miR-23a foi regulado positivamente no glioma (Ye et al., 2017).

A proteína de ligação a elementos de resposta do AMPc (CREB), um fator de transcrição proto-oncogênico que é superexpresso em gliomas, podendo promover a gliomagenese pela modulação da expressão do miR-23a oncogênico, que reprime o PTEN diretamente. A supressão do PTEN mediada por miR-23a levou à ativação das vias AKT/ERK e à transição epitelial-mesenquimal (EMT). Um painel de 7 microRNAs incluindo o miR-23a demonstrou alta sensibilidade (88,00%) e especificidade (97,87%) para previsão de astrocitoma maligno, exibindo também uma diminuição global nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais; além disso, esses miRNAs estavam marcadamente elevados no soro após a remoção do tumor. (Sasayama, Tanaka, & Kohmura, 2016).

Encontraram um aumento gradual nos níveis de miR-23a em todos os graus de glioma (Koshkin et al., 2014a).

O estudo mostrou que a inibição de dois glioblastoma aumentou a expressão do miRNA 23a (Y. Zhang, Dutta, & Abounader, 2012a).

O miRNA miR-23a foi encontrado em glioblastomas e sua regulação negativa não teve qualquer efeito significativo na capacidade proliferativa das células (Rao, Santosh, & Somasundaram, 2010)

O miR-23a-3p promove o desenvolvimento de tumores como os gliomas. Em estudos in vitro de carcinomas oral de células escamosas orais o miR-23a-3p contribuiu na inibição do crescimento do tumor de forma direta ou através do aumento da apoptose celular (F. Chen et al., 2019).

O miR-23a foi validado por RT-qPCR se mostrando significativamente diminuído em pacientes com astrocitomas de graus II-IV ($p < 0,001$) e também exibiu uma diminuição global nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. Além disso, estava marcadamente elevado no soro após a cirurgia ($p < 0,001$) (Yang et al., 2013).

1.4.3.2 miR-27a e Glioblastoma

Identificada a superexpressão de miR-27a em glioma de baixo grau (Tantawy, Elzayat, Yehia, & Taha, 2018).

A superexpressão de BTG2 (Gene de translocação de células B 2) aumentou a proliferação e invasividade de células de glioblastoma e o funcionamento de BTG2 na hipoexpressão de miR-27a modulou a proliferação e migração de células de glioblastoma. Em conclusão, o miR-27a modula o crescimento e a invasão do glioblastoma humano, quando o objetivo é o BTG2 (LI et al., 2015).

O miR-27a mostrou-se um supressor de tumor significativo, direcionando e diminuindo a expressão da proteína proibitina nas células glioma na linhagem U251 (W. CHEN et al., 2015).

A investigação identificou o papel do miR-27a na inibição do crescimento de glioma, seu ciclo celular, apoptose e invasão/migração após a ativação da sinalização Wnt/beta-catenina por SFRP1 (proteína secretada relacionada com a fixação 1), da família de inibidores de Wnt (K. Wang et al., 2015).

O miR-27a promove a proliferação de células de glioma via segmentação MXI1 regulando-o sinergicamente. Além disso, foi observado que o miR-27a é regulado positivamente nos tecidos de glioma (XU et al., 2013).

O MiR-27a pode ser regulado positivamente no glioblastoma humano, e o antagomiR-27a pode inibir a proliferação e a capacidade de invasão das células do glioblastoma (Ge et al., 2013).

Em um estudo usando microRNA arrays e tecidos de glioma descobriu-se que o miR-27a foi suprarregulado, que também foi identificado nas linhas celulares de glioma e amostras por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (YANG et al., 2012).

Foi demonstrado que o miR-27a pode estar envolvido na progressão do glioma através da junção de aderentes, adesão focal, via de sinalização da neurotrofina, via de sinalização MAPK (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno), fator de crescimento transformador- β (TGF- β) via de sinalização, interações entre receptores de citocinas e citocinas, via de sinalização de p53, via de sinalização apoptótica, entre outras (YANG et al., 2012).

A expressão lentiviral do anti-miR-27a é uma abordagem viável para a supressão de fenótipos malignos de células de glioma (FENG et al., 2012).

1.4.3.3 miR-181b e Glioblastoma

O miR-181b foi identificado inicialmente como miRNA regulado negativamente em células de glioblastoma e tumores por micro arranjos de miRNA e posteriormente descrito como supressor tumoral inibindo o crescimento e induzindo a apoptose de células de glioma. Além disso, o miR-181b foi significativamente regulado de forma negativa em pacientes que responderam à terapia de radiação e temozolomida em comparação com pacientes com doença progressiva sendo proposto que os níveis de expressão de miR-181b pudesse servir como um marcador preditivo de resposta à terapia de radiação e temozolomida em pacientes com glioblastoma (Y. Zhang, Dutta, & Abounader, 2012b).

Uma triagem sistêmica para aberrações miRNA por micro arranjos identificou que miR-181b estava hipoexpresso em tecidos de glioma (Sasayama et al., 2016).

Um estudo que se baseia num estudo prévio que mostrou que o miR-181b estava envolvido na tumorigênese do glioma, explorou as funções e mecanismos do miR-181b na regulação da sensibilidade das células do GBM à temozolamida (TMZ), indicando que o miR-181b foi regulado negativamente de forma significativa em tecidos GBM recorrentes quando comparado com tecidos GBM iniciais. Também descreveram que a superexpressão do miR-181b aumentou a quimio-sensibilidade das células GBM à TMZ e potencializou a apoptose induzida pela TMZ *in vitro* e *in vivo*. Além disso, demonstraram que o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi um alvo direto do miR-181b: a restauração do EGFR resgatou os efeitos inibitórios do tratamento com miR-181b e TMZ (Y. Chen et al., 2017).

Um estudo que investigou se o miR-181b-5p modula a quimiossensibilidade de células de glioma a temozolomida tendo como objetivo o Bcl-2 conclui que a regulação positiva de miR-181b-5p atinge diretamente Bcl-2 e pode funcionar como um modificador importante para sensibilizar células de glioma à TMZ (X. Zhang et al., 2019).

Num estudo sobre o microRNA-181b em relação à proliferação celular e invasão de células de glioma pela via da Sal-Like Protein 4 (SALL4), foi demonstrado que o miR-181b tem um efeito supressor sobre os fenótipos malignos das células de glioma, pelo menos em parte, diretamente visando SALL4 (Zhou, Peng, Liu, & Jiang, 2017).

O miR-181b é regulado negativamente no glioma e atua como um supressor de tumor. O CCAT1 (Transcrição 1 associada ao câncer de cólon) promove a tumorigênese do glioma por meio da lavagem do miR-181b, levando à desrepressão de seus alvos endógenos FGFR3 (receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos) e PDGFR α (receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas), o que proporciona um potencial alvo terapêutico para o tratamento do glioma (Cui, Li, Liu, & Cui, 2017).

O MiR-181b é um regulador positivo importante na sensibilidade das células do glioma ao tenipósido, o qual é um citostático que confere sensibilidade às células de glioma através da ligação à região 3'-UTR de MDM2 (minuto duplo murino 2), levando a sua expressão reduzida (Sun et al., 2014).

1.4.3.4 miR-203 e Glioblastoma

A expressão de miR-203 teve um efeito forte e negativo em vários processos biológicos fundamentais e interligados envolvidos no crescimento e proliferação celular. Os processos biológicos mais influenciados foram a via de sinalização do p53, a via de sinalização da FoxO, a replicação do DNA, o ciclo celular, a via de sinalização da MAPK e a apoptose. No total, foram identificados 847 genes regulados positivamente e regulados negativamente em genes diferencialmente expressos em controle contra células de glioma que expressam miR-203, por tanto, a superexpressão do miR-203 regula coordenadamente várias vias oncogênicas no GBM (Ahir & Lakka, 2019).

O miR-203 é um supressor tumor crítico quando mediado pela repressão tumorigênica pelo REST (Repressor transcricional RE1 -que silencia o fator de transcrição-). Além disso, as vias miR-203 e REST-miR-203 regulam a invasão tumoral (Marisetty et al., 2016).

Um outro estudo mostrou que o miR-203 é um regulador negativo chave do GAS41 (sequência amplificada por glioma 41) e age como microRNA supressor de tumor no glioma (Pal et al., 2016).

A expressão sérica de miR-203 foi significativamente diminuída em pacientes com GBM em comparação com pacientes com glioma de baixo grau e controles saudáveis. Além disso, o miR-203 sérico discriminou pacientes com GBM de pacientes com glioma de baixo grau e indivíduos saudáveis com uma correlação

significativa entre a baixa expressão de miR-203 no soro e o maior tamanho do tumor. A análise multivariada indicou que a baixa expressão de miR-203 é um fator prognóstico independente para a má qualidade de vida em pacientes com GBM (J. Chen, Yang, & Wang, 2017).

As células tronco de GBM transfectados com MicroRNA-203 tiveram capacidade reduzida de auto-renovação no ensaio de esfera celular e aumentaram a expressão de marcadores de diferenciação gliais e neuronais, além de uma taxa de proliferação reduzida e um aumento na taxa de apoptose (Deng, Zhu, Luo, & Zhao, 2016).

O miR-203 controla potencialmente a reparação de danos no ADN através das vias PI3K/AKT e JAK/STAT3 e pode contribuir coletivamente para a modulação da sensibilidade à radiação em células inibindo a reparação de danos no ADN, a sinalização de prosupervivência e a transição do mesênquima epitelial. Em conjunto, estes resultados demonstram que o miR-203 pode ser um alvo para superar a resistência à radiação do GBM (Chang et al., 2016).

Significado clínico do estudo do miR-203 em gliomas sugeriu que o esse micro RNA foi capaz de inibir a proliferação e invasão de células de glioma, pelo menos parcialmente suprimindo a expressão protéica de PLD2 (fosfolipase D2) (Z. CHEN et al., 2014).

O miR-203 faz parte do grupo dos microRNAs que promovem a radiosensibilidade de GBM (Toraih, El-Wazir, Abdallah, Tantawy, & Fawzy, 2019).

1.4.3.5 miR-210 e Glioblastoma

Também foi descoberto que a expressão do miR-210 está diminuída no glioblastoma, e a regulação negativa do miR-210 está relacionada a pior prognóstico em pacientes com esse diagnóstico. Além disso, a superexpressão de miR-210 inibiu a migração e invasão de células de glioblastoma humano (Liu, Jiang, Zhong, & Yu, 2019).

O miR-210 é relatado como um biomarcador potencialmente útil no soro de pacientes com glioma. Lai et al. revelaram que um aumento de aproximadamente sete vezes na expressão do miR-210 foi detectado em amostras de soro de pacientes com GBM em relação a controles saudáveis. O miR-210 foi encontrado para ser regulado positivamente em uma variedade de tumores sólidos e influencia

potencialmente a função celular através de diversas vias. Esse miRNA foi correlacionado com hipóxia e foram descritos vários alvos do miR-210, incluindo o fator 3 de transcrição VEGF, BCL2 e E2F (Sasayama et al., 2016).

Existe uma associação da alta expressão do miR-210 sérico com o grau do tumor e o desfecho ruim do paciente (valores de $P < 0,001$) (N-s Lai et al., 2015).

Foi descoberto que o miR-210 foi regulado positivamente em tecidos GBM e linhas celulares, quando comparado ao tecido cerebral normal. Os resultados do ensaio de contagem de células e citometria de fluxo demonstraram que a regulação positiva de miR-210 induziu proliferação celular e diminuiu a apoptose celular, respectivamente. Além disso, a regulação negativa do miR-210 inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose (S. Zhang, Lai, Liao, Sun, & Lin, 2015).

Um meta-análise e revisão sistemática sugerem que o miR-210 tem um efeito preditivo na sobrevida de pacientes com tipos de câncer estudados, indexados por sobrevida livre de doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de recidiva (J. Wang et al., 2014).

O miR-210 regula o crescimento celular, a angiogênese, a invasão e a apoptose de muitos tumores humanos. Houve um nível de expressão significativamente maior de miR-210 entre os tecidos de glioma, em comparação com tecidos cerebrais normais e foi significativamente associada com grau patológico avançado e baixo resultado na escala de capacidade de Karnofsky. Além disso, níveis aumentados do miR-210 foram associados com baixas taxas de sobrevida livre de progressão (PFS) e sobrevida global (OS) quando comparado ao controle normal (Nian-sheng Lai, Dong, Ding, Miao, & Lin, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

O glioblastoma (GBM), o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos, constitui um grave problema social devido as altas taxas de incidência e prevalência e a sua elevada taxa de mortalidade a curto prazo. Recentes estudos destacam o papel dos microRNAs nos avanços da elucidação das vias moleculares associadas a malignidade desses tumores. Também existem na literatura atual muitos estudos que demonstram o importante papel das células tronco tumorais associadas os GBMs, assim como estudos comprovam o envolvimento das CSCs com a formação de metástases. Visto que nos GBMs esse o surgimento de metástase é raro torna-se interesse avaliar os miRNAs associados a esse mecanismo em neuroesferas de pacientes com diagnóstico de GBMs.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos microRNAs: miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203, miR-210 envolvidos na patogênese dos gliomas e metástase cerebral em culturas primárias de Células Aderidas e Neuroesferas.

4 MATERIAL 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).

4.1 Amostras primárias

Neste trabalho foram utilizadas 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 (processos nº 17802/2015 e 2995/2016) 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.

4.2 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. 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, o material todo 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/ μ L], 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.

4.3 Grupos Experimentais

As avaliações das culturas primárias dos dez pacientes foram realizadas nos dois grupos, neuroesferas e células aderidas, 10⁵ células de ambos os grupos foram semeadas e cultivadas por 48 horas, sendo então coletadas para as análises sem que nas mesmas fosse aplicado qualquer tipo de tratamento.

4.4 Extração de RNA

Às amostras foram adicionados 250 μ l de PBS e 750 μ l de Trizol® (Invitrogen), que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200 μ l 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 500 μ l 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, 1000 μ l 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.

4.4.1 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.

4.4.2 Síntese do DNA Complementar (cDNA) dos microRNAs

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA, a transcrição reversa foi feita utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados 0,75µl de RT Buffer, seguido de 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de primers específicos (miRNAs e controles endógenos –U6–), e 0,5µl da enzima MultiScribe TM, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, e sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a 16 ° C, 30 min a 42°C, 5 min a 85 ° C e, em seguida, a 4°C. Para o PCR em tempo real, foram utilizados 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

4.4.3 PCR em tempo real (RT-PCR)

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos miRNAs nas amostras de culturas primárias de glioblastoma multiforme.

A partir do cDNA obtido 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 do miRNAs supracitado, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand (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 nuclease 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 repórter, 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 (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o GAPDH para o mRNA e o U6 para o miRNA) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste

gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT 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 a obtenção dos valores de CT.

4.4.4 Análise estatística

Para a avaliação do nível de expressão dos microRNAs no tecido tumoral, foi realizada uma análise estatística utilizando o teste não paramétrico Mann Whitney Test, mediante o programa *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*) que também serviu para transformar os dados em gráficos e apresentar os dados científicos, considerando estatisticamente significantes valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Os resultados abaixo demonstram a expressão dos microRNAs miR- 23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 nas células aderidas e neuroesferas em pacientes com glioma.

A expressão miR-23a, representada no gráfico 1, onde podemos observar que não houve significância estatística significativa entre os grupos analisados de Células Aderidas e Neuroesferas ($p=0,6842$ Mann Whitney Test).

Gráfico 1. Nível de expressão do miRNA 23a entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.

A expressão miR-27a, representada no gráfico 1, onde podemos observar que não houve significância estatística significativa entre os grupos analisados de Células Aderidas e Neuroesferas ($p= 0,9307$ Mann Whitney Test).

Gráfico 2. Nível de expressão do miRNA 27a entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.

A expressão miR-181b, representada no gráfico 1, onde podemos observar que não houve significância estatística significativa entre os grupos analisados de Células Aderidas e Neuroesferas ($p= 1,000$ Mann Whitney Test).

Gráfico 3. Nível de expressão do miRNA 181b entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.

A expressão miR-203, representada no gráfico 1, onde podemos observar que não houve significância estatística significativa entre os grupos analisados de Células Aderidas e Neuroesferas ($p= 0,8534$ Mann Whitney Test).

Gráfico 4. Nível de expressão do miRNA 203 entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.

A expressão miR-210, representada no gráfico 1, onde podemos observar que não houve significância estatística significativa entre os grupos analisados de Células Aderidas e Neuroesferas ($p= 0,8968$ Mann Whitney Test).

Gráfico 5. Nível de expressão do miRNA 210 entre os grupos Células Aderidas e Neuroesferas.

6 DISCUSSÃO

Os GBM são considerados como as neoplasias primárias malignas mais comuns do sistema nervoso central (SNC) em adultos, representando mais de 50% dos casos, estando associado a um prognóstico ruim, com uma sobrevivência a 1 ano depois do diagnóstico de 33%, e a 5 anos de apenas um 5% (Castañeda et al., n.d.; Ferris et al., 2017; Gusyatiner & Hegi, 2018). É por isso que no presente trabalho, foram avaliadas dez amostras de tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de glioblastoma atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP). A partir da coleta das amostras tumorais, foram estabelecidas culturas celulares primárias sendo obtidas células aderidas e neuroesferas pelos métodos antes descritos. Também foram coletadas informações de alguns dados clínicos desses pacientes, os quais apresentaram características clínicas semelhantes aos dados da literatura mundial (Aldape, Zadeh, Mansouri, Reifenberger, & von Deimling, 2015; Behin, Hoang-Xuan, Carpentier, & Delattre, 2003) em relação à média etária dos pacientes (56,5 anos). Sessenta por cento dos pacientes que forneceram amostra tumoral para este trabalho estavam vivos em 2017 (média de sobrevida de 26,2 meses), com uma sobrevida maior que a média descrita na literatura (Castañeda et al., n.d.; Ferris et al., 2017; Gusyatiner & Hegi, 2018), no entanto, há certos fatores limitantes na aquisição dessa informação, uma vez que alguns dos casos analisados atualmente não se encontram em seguimento no HCRP.

A partir das dez amostras de glioblastoma, foram estabelecidas culturas celulares e investigada a expressão de 5 microRNAs nesses tumores. As culturas celulares foram divididas em células aderidas, onde estão as células diferenciadas justapostas à superfície de cultura e neuroesferas, as quais contêm células tronco tumorais e formaram aglomerados celulares em suspensão, para poder comparar a expressão desses microRNAs em cada uma dessas culturas. As células-tronco cancerígenas (CSCs) tem um papel importante gliomagenese e na progressão tumoral, existindo diferentes subpopulações de CSCs, que contribuiriam para a heterogeneidade do tumor (Agnihotri et al., 2013; Morokoff et al., 2015). Durante o período de cultura, foi observada que a proliferação celular é consideravelmente maior nas células aderidas do que nas neuroesferas.

O principal tratamento para os glioblastomas (GB) continua sendo, a maior ressecção cirúrgica possível do tumor associado ao tratamento adjuvante com

radioterapia e quimioterapia, baseado em agentes alquilantes, que mostraram um aumento na taxa de sobrevivência (Castañeda et al., n.d.), onde a segmentação seletiva das CSCs poderia ser uma ferramenta de tratamento de pacientes com tumores agressivos, não ressecáveis e para impedir a metástase do tumor (Jose A. Leal, Feliciano, & LLeonart, 2013).

Embora o glioblastoma tenha sido estudada por diferentes especialistas há muitos anos, tem sido observada uma grande diversidade biológica desta doença, explicando o fracasso da terapia do câncer e a morte desses pacientes, o que gera interesse em aprofundar nos mecanismos moleculares subjacentes e no microambiente tumoral e metastático para ajudar na prevenção, diagnóstico precoce, identificação de novos alvos terapêuticos e diminuição da sua progressão, podendo corresponder com certeza, às células tronco tumorais e aos microRNAs, dos quais há evidências crescentes de que regulam múltiplas vias de sinalização gênica e estão relacionados ao desenvolvimento, diagnóstico, tratamento e prognóstico do glioblastoma (Grisard & Nicoloso, 2017; Zhenyang Li et al., 2012).

Os microRNAs têm sido relacionados com a regulação da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor em células-tronco cancerosas, incluindo as do GBM-SCs, embora isso, pouco tem se investigado comparando o comportamento dos microRNAs em células aderidas (células diferenciadas justapostas à superfície) e em neuroesferas (contêm células tronco tumorais) pelo qual foram objeto do nosso trabalho.

Fazendo uma revisão de artigos o miR-23a foi encontrado hiperexpresso nos tecidos de glioma quando comparado com os tecidos adjacentes correspondentes, com um aumento gradual dos seus níveis em todos os graus de glioma e estavam marcadamente elevados no soro após a remoção do tumor (Hu et al., 2013; Koshkin et al., 2014b; Sasayama et al., 2016; Yang et al., 2013; Ye et al., 2017). Também foi altamente expresso nas linhas celulares de glioma: SHG44, U251 e U87 (Hu et al., 2013).. O miR-23a-3p promoveu o desenvolvimento de tumores como os gliomas (F. Chen et al., 2019). Por transfecção do oligonucleotídeo anti-miR-23a, os resultados mostraram que a proliferação, migração e invasão de linhas celulares de glioma foram significativamente suprimidas (Lian et al., 2013). A proteína de ligação a elementos de resposta do AMPc (CREB), um fator de transcrição proto-oncogênico que é superexpresso em gliomas, podendo promover a gliomagenese pela modulação da expressão do miR-23a oncogênico, que reprime o PTEN diretamente

(Sasayama et al., 2016). Apesar disso, sua regulação negativa não teve qualquer efeito significativo na capacidade proliferativa das células de glioblastoma (Rao et al., 2010) e se mostrou significativamente diminuído em pacientes com astrocitomas de graus II-IV, exibindo também uma diminuição global nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais em um outro estudo (Yang et al., 2013).

Nesse trabalho foi observado que quando comparada a expressão do miR-23a na cultura primária do tecido tumoral nas células aderidas e nas neuroesferas, não houve significância estatística entre os grupos analisados, com um valor de $p > 0.005$. ($p = 0,6842$ Mann Whitney Test).

O miR-27a encontra-se também superexpresso em glioma de baixo grau, sendo identificado nas diferentes linhas celulares de glioma (Ge et al., 2013; Tantawy et al., 2018; YANG et al., 2012), promovendo a proliferação de células de glioma via segmentação MXI1 regulando-o sinergicamente (XU et al., 2013). Foi demonstrado que o miR-27a pode estar envolvido na progressão do glioma através da junção de células aderentes, adesão focal, via de sinalização da neurotrofina, interações entre receptores de citocinas e citocinas, vias de sinalização MAPK, TGF- β , p53 e apoptótica, entre outras (YANG et al., 2012).

Além disso, o miR-27a modula o crescimento e a invasão do glioblastoma humano, quando o objetivo é o BTG2 (LI et al., 2015). O antagomiR-27a pode inibir a apoptose, proliferação e a capacidade de invasão das células do glioblastoma de forma significativa, após a ativação da sinalização Wnt/beta-catenina por SFRP1, da família de inibidores de Wnt direcionando e diminuindo a expressão da proteína proibitina nas células glioma na linhagem U251 (W. CHEN et al., 2015; Ge et al., 2013; K. Wang et al., 2015).

Nesse trabalho foi observado que quando comparada a expressão do miR-27a na cultura primária do tecido tumoral nas células aderidas e nas neuroesferas, não houve significância estatística entre os grupos analisados, com um valor de $p > 0.005$, embora demonstra uma diferença visível no gráfico, sendo maior a expressão para células aderidas. ($p = 0,9307$ Mann Whitney Test).

No caso do miR-181b, encontra-se regulado negativamente em células de glioblastoma e outros tumores (Y. Chen et al., 2017; Cui et al., 2017; Sasayama et al., 2016; Sun et al., 2014; Y. Zhang et al., 2012b), agindo também como supressor tumoral, inibindo o crescimento e induzindo a apoptose de células de glioma (Y. Zhang et al., 2012b; Zhou et al., 2017).

Não houve significância estatística entre os grupos de Células Aderidas e Neuroesferas, com um valor de $p > 0.005$ ($p = 1,000$ Mann Whitney Test), nesse trabalho para o miR181b, embora demonstra uma expressão maior na expressão para células aderidas.

A expressão sérica de miR-203 foi significativamente diminuída em pacientes com GBM em comparação com pacientes com glioma de baixo grau e controles saudáveis. A análise multivariada indicou que a baixa expressão de miR-203 é um fator prognóstico independente de má qualidade de vida em pacientes com GBM (J. Chen et al., 2017).

As células tronco de GBM transfectados com MicroRNA-203 tiveram capacidade reduzida de auto-renovação no ensaio de neuroesferas e aumentaram a expressão de marcadores de diferenciação gliais e neuronais, além de uma taxa de proliferação reduzida e um aumento na taxa de apoptose (Deng et al., 2016). Ao mesmo tempo, o miR-203 funciona como um supressor tumoral crítico quando mediado pelo REST ou pelo GAS41, ou quando suprime a expressão protéica de PLD2, regulando ao mesmo tempo, a invasão tumoral (Z. CHEN et al., 2014; Marisetty et al., 2016; Pal et al., 2016).

O miR-203 teve um efeito forte e negativo em vários processos biológicos fundamentais e interligados envolvidos no crescimento e proliferação celular. Os processos biológicos mais influenciados foram a via de sinalização do p53, a via de sinalização da FoxO, a replicação do DNA, o ciclo celular, a via de sinalização da MAPK e a apoptose. No total, foram identificados 847 genes regulados positiva e negativamente em controle das células de glioma que expressam miR-203, portanto, a superexpressão do miR-203 regula coordenadamente várias vias oncogênicas no GBM (Ahir & Lakka, 2019). Além disso, controla potencialmente a reparação de danos no ADN através das vias PI3K/AKT e JAK/STAT3 e pode contribuir coletivamente na modulação da sensibilidade à radiação em células (Chang et al., 2016).

No nosso trabalho, a expressão no tecido tumoral do miR-203, demonstra-nos uma diferença entre os grupos de Neuroesferas e Células Aderidas, sendo maior em neuroesferas, porém não houve significância estatística entre os grupos analisados com um valor de $p > 0.005$ ($p = 0,8534$ Mann Whitney Test).

Estudos recentes descobriram que a expressão do miR-210 está diminuída no glioblastoma, e que a sua hiperexpressão inibiu a migração e invasão de células de glioblastoma humano (Liu et al., 2019).

Um meta-análise e revisão sistemática sugerem que o miR-210 tem um efeito preditivo na sobrevida livre de doença, livre de progressão e livre de recidiva (Nian-sheng Lai et al., 2014; J. Wang et al., 2014), existindo uma associação entre a alta expressão desse miRNA sérico com o grau do tumor e o desfecho ruim (N-s Lai et al., 2015; Nian-sheng Lai et al., 2014), embora em um estudo mais recente descrevem que a sua regulação negativa está relacionada a pior prognóstico em pacientes com esse diagnóstico (Liu et al., 2019).

Vários estudos referem uma regulação positiva do miR-210 em pacientes com GBM, assim como em uma variedade de tumores sólidos em relação a controles saudáveis, induzindo proliferação celular, regulando a angiogênese e a invasão, e diminuindo a apoptose (Nian-sheng Lai et al., 2014; Sasayama et al., 2016; S. Zhang et al., 2015). A regulação negativa do miR-210 inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose (S. Zhang et al., 2015).

Além disso influencia a função celular através de diversas vias e foi correlacionado com hipóxia. Foram descritos vários alvos do miR-210, incluindo o fator 3 de transcrição VEGF, BCL2 e E2F (Sasayama et al., 2016).

Na expressão no tecido tumoral do miR-210 do nosso trabalho, é demonstrada uma diferença entre os grupos analisados, sendo maior para as Células Aderidas do que nas Neuroesferas, porém não houve significância estatística entre os grupos analisados com um valor de $p > 0.005$ ($p = 0,8968$ Mann Whitney Test).

Nos nossos resultados entre neuroesferas e as células aderidas não houve diferenças estatísticas significativas para esses 5 microRNAs. Alguns estudos, questionam o quanto o microambiente *in vitro* pode interferir nas características celulares, inclusive no estímulo de proliferação e na interação célula-célula, essenciais para a proliferação das células tronco tumorais (Beier, Schulz, & Beier, 2011; Plaks, Kong, & Werb, 2015; Schneider et al., 2016) sendo que os microRNAs são essenciais em diversas vias e processos celulares, como a proliferação celular, migração e invasão, assim como a apoptose e a morte induzida de células em vários tipos de câncer, incluído o GBM (Bertoli et al., 2015; Wu et al., 2016).

De acordo com os nossos achados e com a literatura, o desenvolvimento de inibidores ou estimuladores de microRNAs e, ainda, da identificação do papel dos microRNAs nas vias em que estão envolvidos, como as mencionadas neste trabalho, poderiam aumentar o entendimento do glioblastoma e a eficiência na prevenção, diagnóstico e tratamento deste e outros tumores, principalmente no relacionado às células tronco tumorais, sendo necessários estudos complementares.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo não foram observadas diferenças estatísticas significativas na expressão dos microRNAs miR-23a, miR-27a, miR-181b, miR-203 e miR-210 quando comparados em culturas de células aderidas e neuroesferas de tecidos de glioblastoma de 10 pacientes. Entretanto, os níveis de expressão dos microRNAs: miR-27a, miR-181b e miR-210 foram maiores no grupo de células aderidas, assim como a expressão miR-203 foi menor no grupo das neuroesferas.

8 REFERÊNCIAS

- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 25–41. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0203-0>
- Ahir, B. K., & Lakka, S. S. (2019). Elucidating the microRNA-203 specific biological processes in glioblastoma cells from comprehensive RNA-sequencing transcriptome profiling. *Cellular Signalling*, 53, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.014>
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 829–848. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
- Asiaf, A., Ahmad, S. T., Arjumand, W., & Zargar, M. A. (2018). MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1699, pp. 23–43). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7435-1_2
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., & Delattre, J.-Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 361(9354), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12328-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12328-8)
- Beier, D., Schulz, J. B., & Beier, C. P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Molecular Cancer*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-128>
- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122–1143. <https://doi.org/10.7150/thno.11543>
- Borges, A. K. da M., Schilithz, A. O. C., Lima, F. C. da S. de, Ferreira, J. D., Moraes, L. A. de, Santos, M. de O., ... Costa Renata Maria de Oliveira. (2018). *ESTIMATIVA 2018 Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro. Retrieved from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Castañeda, C. A., Casavilca, S., Orrego, E., García-Corrochano, P., Deza, P., Heinike, H., ... Ojeda, L. (n.d.). [Glioblastoma: Molecular analysis and its clinical implications]. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(2), 316–325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338394>
- Chang, J. H., Hwang, Y. H., Lee, D. J., Kim, D. H., Park, J. M., Wu, H.-G., & Kim, I. A. (2016). MicroRNA-203 Modulates the Radiation Sensitivity of Human Malignant Glioma Cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 94(2), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.10.001>
- Chen, F., Qi, S., Zhang, X., Wu, J., Yang, X., & Wang, R. (2019). miR-23a-3p suppresses cell proliferation in oral squamous cell carcinomas by targeting FGF2 and correlates with a better prognosis. *Pathology - Research and Practice*, 215(4), 660–667. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.12.021>
- Chen, J., Yang, L., & Wang, X. (2017). Reduced circulating microRNA-203 predicts poor prognosis for glioblastoma. *Cancer Biomarkers*, 20(4), 521–526. <https://doi.org/10.3233/CBM-170335>
- Chen, S., Wang, Y., Zhang, L., Su, Y., Zhang, M., Wang, J., & Zhang, X. (2017). Exploration of the mechanism of colorectal cancer metastasis using microarray analysis. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7044>
- CHEN, W., QI, J., BAO, G., WANG, T., DU, C.-W., & WANG, M.-D. (2015). Emerging role of microRNA-27a in human malignant glioma cell survival via targeting of prohibitin. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1515–1523. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3475>
- Chen, Y., Li, R., Pan, M., Shi, Z., Yan, W., Liu, N., ... Wang, X. (2017). MiR-181b modulates chemosensitivity of glioblastoma multiforme cells to temozolomide by targeting the epidermal growth factor receptor. *Journal of Neuro-Oncology*, 133(3), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2463-3>
- CHEN, Z., LI, D., CHENG, Q., MA, Z., JIANG, B., PENG, R., ... WAN, X. (2014). MicroRNA-203 inhibits the proliferation and invasion of U251 glioblastoma cells by directly targeting PLD2. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 503–508. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1814>
- Croce, C. M., Calin, G. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., Mendell, J. T., Peck, D., ... al., et. (2005). miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 122(1), 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.036>

- Cruz, A. T. da [UNIFESP]. (2010). Componentes do ciclo celular ao longo da gênese do melanoma e seus possíveis reguladores.
- Cui, B., Li, B., Liu, Q., & Cui, Y. (2017). lncRNA CCAT1 Promotes Glioma Tumorigenesis by Sponging miR-181b. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), 4548–4557. <https://doi.org/10.1002/jcb.26116>
- de Almeida Sassi, F., Lunardi Brunetto, A., Schwartzmann, G., Roesler, R., & Abujamra, A. L. (2012). Glioma Revisited: From Neurogenesis and Cancer Stem Cells to the Epigenetic Regulation of the Niche. *Journal of Oncology*, 2012, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2012/537861>
- Deng, Y., Zhu, G., Luo, H., & Zhao, S. (2016). MicroRNA-203 As a Stemness Inhibitor of Glioblastoma Stem Cells. *Molecules and Cells*, 39(8), 619–624. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0118>
- FENG, S. Y., DONG, C. G., WU, W. K. K., WANG, X. J., QIAO, J., & SHAO, J. F. (2012). Lentiviral expression of anti-microRNAs targeting miR-27a inhibits proliferation and invasiveness of U87 glioma cells. *Molecular Medicine Reports*, 6(2), 275–281. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.915>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferris, S. P., Hofmann, J. W., Solomon, D. A., & Perry, A. (2017). Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Archiv*, 471(2), 257–269. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2181-4>
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 12(12), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.006>
- Ge, Y.-F., Sun, J., Jin, C.-J., Cao, B.-Q., Jiang, Z.-F., & Shao, J.-F. (2013). AntagomiR-27a targets FOXO3a in glioblastoma and suppresses U87 cell growth in vitro and in vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(2), 963–968. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.2.963>
- Grisard, E., & Nicoloso, M. S. (2017). Following MicroRNAs Through the Cancer Metastatic Cascade. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 333, pp. 173–228). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.04.005>

- Gusyatiner, O., & Hegi, M. E. (2018). Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Seminars in Cancer Biology*, 51, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.010>
- Hu, X., Chen, D., Cui, Y., Li, Z., & Huang, J. (2013). Targeting microRNA-23a to inhibit glioma cell invasion via HOXD10. *Scientific Reports*, 3(1), 3423. <https://doi.org/10.1038/srep03423>
- Koshkin, P. A., Chistiakov, D. A., Nikitin, A. G., Konovalov, A. N., Potapov, A. A., Usachev, D. Y., ... Chekhonin, V. P. (2014a). Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades. *Clinica Chimica Acta*, 430, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.001>
- Koshkin, P. A., Chistiakov, D. A., Nikitin, A. G., Konovalov, A. N., Potapov, A. A., Usachev, D. Y., ... Chekhonin, V. P. (2014b). Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades. *Clinica Chimica Acta*, 430, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.001>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D68–D73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
- Lai, N-s, Wu, D., Fang, X., Lin, Y., Chen, S., Li, Z., & Xu, S. (2015). Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *British Journal of Cancer*, 112(7), 1241–1246. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.91>
- Lai, Nian-sheng, Dong, Q., Ding, H., Miao, Z., & Lin, Y. (2014). MicroRNA-210 overexpression predicts poorer prognosis in glioma patients. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(5), 755–760. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.06.024>
- Leal, J.A., & Lleonart, M. E. (2013). MicroRNAs and cancer stem cells: Therapeutic approaches and future perspectives. *Cancer Letters*, 338(1), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.020>
- Leal, Jose A., Feliciano, A., & LLeonart, M. E. (2013). Stem cell MicroRNAs in senescence and immortalization: novel players in cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 33(1), 112–138. <https://doi.org/10.1002/med.20246>
- LI, W.-Q., YU, H.-Y., ZHONG, N.-Z., HOU, L.-J., LI, Y.-M., HE, J., ... LU, Y.-C. (2015). miR-27a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2. *International Journal of Oncology*, 46(4), 1601–1608. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2843>

- Li, Zhenyang, Gu, X., Fang, Y., Xiang, J., & Chen, Z. (2012). microRNA expression profiles in human colorectal cancers with brain metastases. *Oncology Letters*, 3(2), 346–350. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.497>
- Li, Zhixin, Peng, Z., Gu, S., Zheng, J., Feng, D., Qin, Q., & He, J. (2017). Global Analysis of miRNA-mRNA Interaction Network in Breast Cancer with Brain Metastasis. *Anticancer Research*, 37(8), 4455–4468. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11841>
- Lian, S., Shi, R., Bai, T., Liu, Y., Miao, W., Wang, H., ... Fan, Y. (2013). Anti-miRNA-23a oligonucleotide suppresses glioma cells growth by targeting apoptotic protease activating factor-1. *Current Pharmaceutical Design*, 19(35), 6382–6389. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23865473>
- Liu, S., Jiang, T., Zhong, Y., & Yu, Y. (2019). miR-210 inhibits cell migration and invasion by targeting the brain-derived neurotrophic factor in glioblastoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), 11375–11382. <https://doi.org/10.1002/jcb.28414>
- Marisetty, A. L., Singh, S. K., Nguyen, T. N., Coarfa, C., Liu, B., & Majumder, S. (2016). REST represses miR-124 and miR-203 to regulate distinct oncogenic properties of glioblastoma stem cells. *Neuro-Oncology*, 19(4), now232. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now232>
- McNeill, K. A. (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 34(4), 981–998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
- Morokoff, A., Ng, W., Gogos, A., & Kaye, A. H. (2015). Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(8), 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.02.008>
- Pal, D., Mukhopadhyay, D., Ramaiah, M. J., Sarma, P., Bhadra, U., & Bhadra, M. P. (2016). Regulation of Cell Proliferation and Migration by miR-203 via GAS41/miR-10b Axis in Human Glioblastoma Cells. *PLOS ONE*, 11(7), e0159092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159092>
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>
- Rao, S. A. M., Santosh, V., & Somasundaram, K. (2010). Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(10), 1404–1417. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.135>

- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Sasayama, T., Tanaka, K., & Kohmura, E. (2016). The Roles of MicroRNAs in Glioblastoma Biology and Biomarker. In *Neurooncology - Newer Developments*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63243>
- Schneider, M., Ströbele, S., Nonnenmacher, L., Siegelin, M. D., Tepper, M., Stroh, S., ... Halatsch, M.-E. (2016). A paired comparison between glioblastoma "stem cells" and differentiated cells. *International Journal of Cancer*, 138(7), 1709–1718. <https://doi.org/10.1002/ijc.29908>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
- Sun, Y., Wang, J., Guo, C., Sai, K., Wang, J., Chen, F., ... Chen, Z. (2014). MiR-181b sensitizes glioma cells to teniposide by targeting MDM2. *BMC Cancer*, 14(1), 611. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-611>
- Tantawy, M., Elzayat, M. G., Yehia, D., & Taha, H. (2018). Identification of microRNA signature in different pediatric brain tumors. *Genetics and Molecular Biology*, 41(1), 27–34. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0334>
- Toraih, E. A., El-Wazir, A., Abdallah, H. Y., Tantawy, M. A., & Fawzy, M. S. (2019). Deregulated MicroRNA Signature Following Glioblastoma Irradiation. *Cancer Control*, 26(1), 107327481984722. <https://doi.org/10.1177/1073274819847226>
- Wang, J., Zhao, J., Shi, M., Ding, Y., Sun, H., Yuan, F., & Zou, Z. (2014). Elevated Expression of miR-210 Predicts Poor Survival of Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 9(2), e89223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089223>
- Wang, K., Xie, D., Xie, J., Wan, Y., Ma, L., Qi, X., & Yang, S. (2015). MiR-27a regulates Wnt/beta-catenin signaling through targeting SFRP1 in glioma. *NeuroReport*, 26(12), 695–702. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000410>
- Wu, K., Sharma, S., Venkat, S., Liu, K., Zhou, X., & Watabe, K. (2016). Non-coding RNAs in cancer brain metastasis. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 8, 187–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709907>
- Xing, F., & Watabe, K. (2013). miRNAs as biomarkers for brain metastasis of breast cancer. *Biomarkers in Medicine*, 7(3), 387–390. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.43>

- XU, W., LIU, M., PENG, X., ZHOU, P., ZHOU, J., XU, K., ... JIANG, S. (2013). miR-24-3p and miR-27a-3p promote cell proliferation in glioma cells via cooperative regulation of MXI1. *International Journal of Oncology*, 42(2), 757–766. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1742>
- Yang, C., Wang, C., Chen, X., Chen, S., Zhang, Y., Zhi, F., ... Zhang, C. (2013). Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *International Journal of Cancer*, 132(1), 116–127. <https://doi.org/10.1002/ijc.27657>
- YANG, S., WANG, K., QIAN, C., SONG, Z., PU, P., ZHANG, A., ... WANG, Y. (2012). A predicted miR-27a-mediated network identifies a signature of glioma. *Oncology Reports*, 28(4), 1249–1256. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1955>
- Ye, X., Wei, W., Zhang, Z., He, C., Yang, R., Zhang, J., ... Jiang, Q. (2017). Identification of microRNAs associated with glioma diagnosis and prognosis. *Oncotarget*, 8(16), 26394–26403. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14445>
- Zeng, T., Cui, D., & Gao, L. (2015). Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 20, 1104–1115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25961548>
- Zhang, S., Lai, N., Liao, K., Sun, J., & Lin, Y. (2015). MicroRNA-210 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting regulator of differentiation 1 in glioblastoma cells. *Folia Neuropathologica*, 3(3), 236–244. <https://doi.org/10.5114/fn.2015.54424>
- Zhang, X., Yu, J., Zhao, C., Ren, H., Yuan, Z., Zhang, B., ... Feng, B. (2019). MiR-181b-5p modulates chemosensitivity of glioma cells to temozolomide by targeting Bcl-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2192–2202. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.074>
- Zhang, Y., Dutta, A., & Abounader, R. (2012a). The role of microRNAs in glioma initiation and progression. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, 700–712. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201769>
- Zhang, Y., Dutta, A., & Abounader, R. (2012b). The role of microRNAs in glioma initiation and progression. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, 700–712. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201769>
- Zhou, Y., Peng, Y., Liu, M., & Jiang, Y. (2017). MicroRNA-181b Inhibits Cellular Proliferation and Invasion of Glioma Cells via Targeting Sal-Like Protein 4. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(6), 947–957. <https://doi.org/10.3727/096504016X14791732531006>