

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

LÍVIA FERREIRA SILVA VERZOLA

**INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM
PARÂMETROS CLÍNICOS DE PACIENTES COM
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

RIBEIRÃO PRETO

2019

LÍVIA FERREIRA SILVA VERZOLA

**INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM PARÂMETROS CLÍNICOS DE
PACIENTES COM GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como requisito para obtenção do título de Doutora
em Ciências, área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Jeremy A. Squire

RIBEIRÃO PRETO

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Verzola, Livia Ferreira Silva

Influência da expressão de miRNAs em parâmetros clínicos de pacientes com glioblastoma multiforme. Ribeirão Preto, São Paulo, 2019.

77p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Squire, Jeremy A.

1. miRNAs; 2. Glioblastoma multiforme; 3. Glioma; 4. Biomarcador; 5. Sobrevida.
6. Bioinformática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Livia Ferreira Silva Verzola

Influência da expressão de miRNAs em parâmetros clínicos de pacientes com glioblastoma multiforme

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Jeremy A. Squire

Aprovada em: _____|_____|_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus filhos, Isabela e Pedro,
que são luzes na minha vida. Ao meu marido, Marcelo,
por ser meu grande incentivador; aos meus pais,
Sandra e Antônio, e à minha irmã, Thaís, por todo o apoio.
Sem vocês nada disso seria possível.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire, pela disponibilidade, atenção, amizade e que durante 4 anos me acompanhou pontualmente, dando o auxílio necessário para a elaboração deste projeto.

Ao meu grande amigo e companheiro de pesquisa Thiago Vidotto que sempre me auxiliou, incentivou, ajudou com toda sua experiência. Com toda certeza seu apoio foi essencial para a conclusão deste projeto. Obrigada por sua amizade, pelo companheirismo, por sempre estar disposto a me ajudar.

À Camila, que, mesmo nos conhecendo e convivendo pouco, me ajudou muito com sua experiência e com a parte burocrática dos departamentos.

Ao Laboratório de Citogenética Molecular Humana, em especial à Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli e seu grupo de pesquisa: Silvio, Alexandra, Clarissa, Carlos, Tati, Flavia e Juliana, por me receber com agrado e por permitir, através de suas experiências, que eu pudesse concluir este trabalho.

As minhas grandes amigas do SERPAT (Serviço de Patologia do HC) Renata, Regina, Rose, Beatriz, Ana e Aninha pela verdadeira amizade e por compartilharmos nossas alegrias e também nossas tristezas fazendo deixar toda a rotina das nossas vidas mais leve e fácil de serem compreendidas.

Aos funcionários do SERPAT Décio, Júnior, Luís e Dr. Fabiano pela colaboração no processo de obtenção dos dados para este trabalho.

Aos Docentes do SERPAT e do Departamento de Patologia – USP/RP por toda paciência e compreensão durante minhas ausências para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Celular e Molecular da USP/RP, sob responsabilidade da Profa. Leandra e Prof. Fernando Ramalho. Agradeço imensamente à funcionária e amiga Deise que realizou o corte das lâminas das minhas amostras – parte essencial para a realização do trabalho –, e também à minha grande amiga Marlei, por me ajudar com toda sua experiência em Biologia Molecular e pela verdadeira amizade que construímos durante 10 anos.

Ao Departamento de Patologia – USP/RP, em especial: Camila, Rosangela, Rodrigo, Neide e Toninho, que me receberam com todo agrado e me ajudaram para que eu me integrasse com as informações devidas do departamento para a realização deste projeto.

Às minhas amigas e companheiras de departamento (Mestrado e Doutorado): Patrícia, Carol, Andressa, Vanessa, Sheila, Sabrina e Rebeca por toda amizade, por trocas de

experiências e por compartilharem todas as vitórias e derrotas que tivemos durante esse processo de pós-graduação, que nos fizeram crescer e nos fortalecer.

Ao Laboratório Multiusuário do Departamento de Patologia da USP/RP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre e Prof. Dr. Fernando Chahud, onde realizei toda a metodologia prática do meu trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone e Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, em especial às responsáveis técnicas Rosane e Veridiana e aos alunos do laboratório, por me ajudarem com o equipamento de PCR em Tempo Real QuantStudio, que foi essencial para a realização das minhas análises.

Aos meus pais, Sandra e Antônio, e à minha irmã, Thaís, que foram e são um grande apoio na minha vida, principalmente com meus filhos, na minha ausência, sendo essenciais para que eu terminasse este trabalho e por me ensinarem a sempre dar o melhor de mim.

Ao meu marido e companheiro Marcelo, um agradecimento especial pelo incentivo, apoio, força, coragem, paciência e humor que tem me dado ao longo destes 23 anos de convivência. Te amo.

Aos meus filhos, Isabela e Pedro, e ao meu afilhado Raul, que, só de existirem, são o meu maior incentivo. Agradeço imensamente por me abraçarem fortemente; me dão força e coragem para seguir, mesmo quando nada está indo muito bem. Tudo que faço é para eles e por eles, para proporcionar melhores condições de vida, e, o principal, para que eles possam ter um exemplo de esforço, dedicação, coragem e caráter que possam seguir e do qual possam se orgulhar.

Aos meus amigos e a todos que, diretamente ou indiretamente, fizeram parte para que este trabalho fosse concluído com toda dedicação, amor e carinho.

Resumo

Influência da expressão de miRNAs em parâmetros clínicos de pacientes com glioblastoma multiforme. 2019, 77p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais agressivo do sistema nervoso central e, em 2018, 241 mil casos da doença evoluíram a óbito. Nos casos em que é possível realizar a ressecção cirúrgica do tumor, a maior parte dos pacientes apresentam recidiva da doença e, por fim, óbito. Por isso, marcadores moleculares são relevantes para definir o prognóstico de pacientes com GBM. Nesse aspecto, miRNAs têm sido alvos recentes de investigações, pois são facilmente quantificáveis em tecidos tumorais. Desse modo, este estudo teve como objetivo investigar o perfil de expressão de miRNAs e o seu potencial uso para prever a recidiva e óbito decorrente de doença. Para isso, investigamos duas coortes: uma com 606 amostras de tumores primários de GBM do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e uma com 67 amostras do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP). Dados Level 3 de expressão de miRNAs foram obtidos pelo portal do TCGA e posteriormente analisados através do *software* Nexus Expression v3.0 e R v.3.6.1. A análise da expressão dos miRNAs da coorte TCGA mostrou que 25 miRNAs foram diferencialmente expressos quando comparamos subtipos moleculares *GBM-like* e *Classical*. Posteriormente, comparamos os miRNAs diferencialmente expressos obtidos pela análise *in silico* e observamos uma sobreposição de 54% dos miRNAs obtidos com os descritos na literatura. Por fim, 47 miRNAs foram selecionados e usados para investigar a coorte HCRP. A expressão destes miRNAs foi investigada através da técnica TaqMan *Low-Density Array* (TLDA). Devido a falhas técnicas, apenas 39 pacientes da coorte HCRP foram investigados. Foi possível observar que os miRNAs miR-199, miR-21 e miR-381 foram os mais expressos na coorte HCRP. Mutações em *IDH1* foram significativamente associadas a uma redução da expressão de miR-516. Além disso, a análise de dados clínicos mostrou que alguns miRNAs são candidatos para predição de óbito, como os miRNAs let-7e ($p < 0,0001$; *Hazard Ratio* [HR]=1,1; Intervalo de Confiança [CI]=1-1,2), miR-124 ($p = 0,02$; HR=1,1; CI=1-1,3) e miR-24 ($p = 0,033$; HR=1,1; CI=1-1,1). Análises *in silico* mostraram que o alvo mais comum destes miRNAs é a via PI3K-AKT-mTOR e outras que regulam a apoptose e ciclo celular. Nosso estudo mostrou que diversos miRNAs possuem potencial para 1) distinguir subtipos moleculares de GBM e 2) determinar quais pacientes podem evoluir a óbito. O uso de miRNAs como biomarcador para classificar GBMs pode ser relevante no âmbito clínico, pois são capazes de distinguir tumores agressivos de menos agressivos.

Palavras-chave: Glioblastoma Multiforme (GBM); miRNAs; Bioinformática; TLDA.

Abstract

Influence of miRNAs expression in clinical parameters of patients with glioblastoma multiforme. 2019, 77p. Ph.D. Thesis. Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive central nervous system tumor. In 2018, approximately 241,000 patients died as a consequence of this disease. In cases where surgical resection of the tumor is possible, the majority later present with disease recurrence and, ultimately, die from their disease. It is therefore critical to develop and characterize molecular biomarkers for more precisely determining GBM patient prognosis. In this regard, miRNAs have been widely investigated because they are easily quantifiable in tumor tissues. Thus, we aimed to investigate the miRNA expression profile and examine their potential for determining which patients will die from the disease. We investigated two cohorts: one composed of 606 samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and another with 67 samples from the Clinics Hospital of Ribeirão Preto (HCRP). Level 3 normalized microarray data were downloaded from the TCGA data portal and analyzed through Nexus Expression v3.0 and R v3.6.1. The expression analysis of the TCGA cohort showed that 25 miRNAs were differentially expressed when comparing the GBM-like to the Classical subtype. We also compared the differentially expressed miRNAs obtained from our *in silico* analysis and found an overlap of 54% of the investigated miRNAs. This comparison resulted in a pool of 47 miRNAs that were selected and investigated using the HCRP cohort through the TaqMan Low-Density Array (TLDA) technique. Due to experimental failures, we were only able to investigate 39 patients from the HCRP cohort. We found that miR-199, miR-21, and miR-381 were the top expressed miRNAs in the HCRP cohort. Mutations in *IDH1* were linked to a lower expression of miR-516. In addition, our clinical analysis showed that some of the investigated miRNAs have clinical potential for predicting death, such as let-7e ($p < 0.0001$; Hazard Ratio [HR]=1.1; Confidence Interval [CI]=1-1.2), miR-124 ($p = 0.02$; HR=1.1; CI=1-1.3), and miR-24 ($p = 0.033$; HR=1.1; CI=1-1.1). *In silico* analyses showed that the primary targets of these miRNAs were part of the PI3K-AKT-mTOR pathway and other apoptosis and cell cycle-related pathways. Our findings indicate that the above-mentioned miRNAs may have the potential for 1) distinguishing molecular subtypes of GBM, and 2) for determining which patients will die as a consequence of the disease. The use of miRNAs as biomarkers may be useful for stratifying patients with GBM.

Keywords: Glioblastoma Multiforme (GBM); miRNAs; Bioinformatics; TLDA.

Lista de figuras

- Figura 1** – Subtipos moleculares de tumores do sistema nervoso central. O cluster de RNA mostra que tumores LGr4 são enriquecidos com GBM. 18
- Figura 2** – Perfil mutacional de subtipos de GBM. Valores em negrito mostram porcentagens significativamente maiores no número de mutações para cada subtipo tumoral. 20
- Figura 3** – Representação esquemática da biogênese de miRNAs e seu efeito na repressão da expressão gênica. 23
- Figura 4** – Esquema mostrando o potencial de miRNAs no diagnóstico, prognóstico e terapia no câncer. 25
- Figura 5** – Heatmap mostrando níveis de expressão dos miRNAs da coorte TCGA. Linhas mostram valores de expressão por miRNA. Colunas representam cada uma das amostras da coorte TCGA. Os clusters de miRNAs observados refletem os subtipos histológicos de GBM presentes na coorte TCGA, como observado na comparação da expressão de miRNAs entre tais subtipos. 38
- Figura 6** – miRNAs observados como hiperexpressos (upregulated) e hipoexpressos (downregulated) em tumores de GBM. Os miRNAs circulos em vermelho são os que apresentaram concordância com os resultados obtidos pela coorte TCGA. 40
- Figura 7.** miRNAs observados em tumores de GBM. Os miRNAs circulos em vermelho são os que apresentaram concordância com os resultados obtidos pela coorte TCGA. Cox et al. 2012. 41
- Figura 8** – Curvas de melting para cada um dos cartões TLDA. O eixo y (ΔR_n) mostra os valores de fluorescência da sonda marcada dividido pela sonda referência. O eixo x mostra os ciclos de PCR. Os cartões C e D apresentaram valores de expressão incertos e, por isso, a maior parte dessas amostras foram removidas deste estudo. 45
- Figura 9** – Gráfico de caixas mostrando o nível de expressão dos 47 miRNAs analisados na coorte HCRP. Os valores apresentados no eixo y são derivados dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. É possível identificar quais são os miRNAs menos e mais expressos na coorte investigada. 46
- Figura 10** – *Plot* de correlação entre os 47 miRNAs avaliados na coorte HCRP. Valores em azul indicam correlações positivas entre miRNAs ao passo que valores em vermelho indicam correlações negativas. Valores de correlação derivados do teste de Spearman. A maior parte das correlações foram significativas ($P < 0,05$), exceto para miR-124, miR128, miR139, miR219, miR381 e miR516 – tais miRNAs apresentaram valores de correlação inferiores aos demais. 48
- Figura 11** – *Heatmap* correlacionando dados de expressão dos 47 miRNAs investigados, dados clínicos de pacientes e alterações genômicas presentes em tumores da coorte HCRP. Linhas mostram cada um dos miRNAs e colunas mostram amostras. Valores em azul e vermelho indicam expressão inferior e superior, respectivamente. Não foi possível identificar nenhum *cluster* de miRNAs diferencialmente expressos entre subtipos moleculares de GBM e dados clínicos dos pacientes. 50

Figura 12 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com a sobrevida global de pacientes. Caixas verdes indicam pacientes vivos após a finalização deste estudo, ao passo que caixas rosas indicam que os pacientes evoluíram a óbito em decorrência do tumor maligno. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01. 51

Figura 13 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com a recorrência de pacientes. Caixas verdes indicam pacientes que não apresentaram recidiva de doença após a finalização deste estudo, ao passo que caixas rosas indicam que os pacientes apresentaram recidiva. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01. 52

Figura 14. Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em IDH1. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com IDH1 selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01. 53

Figura 15 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em IDH1 W09. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com IDH1 W09 selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01..... 54

Figura 16 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em ATRX. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com ATRX selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. Pode-se identificar um aumento não estatisticamente significativo na expressão de diversos miRNAs em tumores com ATRX mutado. *P<0,05. **P<0,01. 55

Figura 17 – Resultados da regressão de Cox univariada para a expressão de miRNAs e predição de recidiva de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos forest plots. O valor de Hazard ratio está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança..... 57

Figura 18 – Resultados da regressão de Cox univariada para a expressão de miRNAs e predição de recidiva de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos forest plots. O valor de Hazard ratio está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança..... 58

Figura 19 – Resultados da regressão de Cox univariada para a predição de morte decorrente de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos forest plots. O valor de Hazard ratio está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança. 59

Figura 20 – miRNAs associados a recidiva de doença e seus alvos obtidos pela plataforma miRTarBase. A coluna ID mostra o número de identificação do miRNA de estudo, ao passo que a coluna miRNA mostra o nome do miRNA-alvo. A coluna Target indica os genes-alvo do miRNA em questão. Além disso, são mostrados os níveis de validação da associação do miRNA e gene-alvo. Na coluna de evidências, em vermelho, encontram-se técnicas de

validação mais robustas; em verde, técnicas de validação menos robustas. A maioria dos miRNAs e seus genes-alvo analisados possuem relações bem estabelecidas na literatura, como mostrado pelo número de artigos publicados indicando tais relações (coluna # of papers).....61

Figura 21 – miRNAs associados a sobrevida de pacientes com GBM e seus alvos obtidos pela plataforma miRTarBase. A coluna Target indica os genes-alvo do miRNA em questão. Além disso, são mostrados os níveis de validação da associação do miRNA e gene-alvo. Na coluna de evidências, em vermelho, encontram-se técnicas de validação mais robustas; em verde, técnicas de validação menos robustas. A maioria dos miRNAs e seus genes-alvo analisados possuem relações bem estabelecidas na literatura, como mostrado pelo número de artigos publicados indicando tais relações (coluna # of papers).62

Figura 22 – Relação funcional entre os genes-alvos definidos pela análise dos miRNAs através da plataforma miRTarBase. A relação funcional dos genes investigados não foi evidente, exceto para miR-221, que mostra que seus alvos FOXO3 e BCL2L11 interagem significativamente com CDKN1B e KIT. Vias geradas através da plataforma String.db (string-db.org).....64

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados clínicos e moleculares da coorte TCGA.....	30
Tabela 2. Análise comparativa da expressão de miRNAs entre subtipos moleculares de GBM.	35
Tabela 3. Análise comparativa da expressão de miRNAs entre subtipos moleculares de GBM e sobrevida global.....	36
Tabela 4. Genes-alvo das comparações entre subtipos de tumores GBM.....	39
Tabela 5. Dados clínicos e moleculares de tumores da coorte HCRP.....	43
Tabela 6. Vias enriquecidas para os genes-alvo de cada um dos miRNAs com papel significativo na predição de recidiva de doença e óbito.....	65

Lista de abreviações

GBM – Glioblastoma Multiforme

miRNA – Micro-RNA

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

HCRP – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

SNC – Sistema nervoso central

OMS – Organização Mundial da Saúde

TLDA – *TaqMan Low-Density Array*

GO – Gene Ontology

HR – *Hazard ratio*

IC – Intervalo de confiança

Nde – Não diferencialmente expresso

Log2FC – Log 2 Fold-change

PCR – *Polymerase chain reaction*

HE – Hematoxilina e Eosina

Sumário

1 Revisão de literatura.....	16
1.1 Tumores do sistema nervoso central.....	16
1.2 Glioblastoma Multiforme.....	19
1.2.1. Diagnóstico e tratamento de glioblastoma multiforme.....	20
1.2.2. Marcadores moleculares para a estratificação de pacientes diagnosticados com glioblastoma multiforme.....	21
1.3 miRNAs.....	22
2 Objetivos.....	28
2.1 Objetivo principal.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 Materiais e métodos.....	30
3.1. Análise <i>in silico</i> de 606 amostras de glioblastoma da coorte The Cancer Genome Atlas ..	30
3.2. Análise da expressão de miRNAs em tumores de uma coorte brasileira (coorte HCRP)..	31
3.2.1 Coorte HCRP	31
3.2.2 Extração e quantificação da expressão de miRNAs	31
3.2.3 Análise da expressão dos miRNAs	32
3.2.4 Correlação entre a expressão de miRNAs e parâmetros clínicos	33
3.2.5 Identificação dos genes-alvo dos miRNAs de estudo.....	33
4. Resultados.....	34
4.1. Análises <i>in silico</i> da coorte TCGA.....	34
4.2. Caracterização da coorte HCRP	42
4.3. Avaliação da expressão de miRNAs da coorte HCRP	44
4.3.1 Correlação entre a expressão de miRNAs e dados clínicos e moleculares da coorte HCRP.....	49
4.3.2 Efeito prognóstico dos miRNAs na coorte HCRP	56
4.3.3. Análise dos alvos dos miRNAs investigados e enriquecimento de vias.....	60
5. Discussão.....	66
6. Conclusões.....	71
7. Referências.....	72

1 Revisão de literatura

1.1 Tumores do sistema nervoso central

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Em 2018, cerca de 18.1 milhões de novos casos foram diagnosticados e aproximadamente 9.6 milhões de pessoas morram devido a esta doença (BRAY et al., 2018).

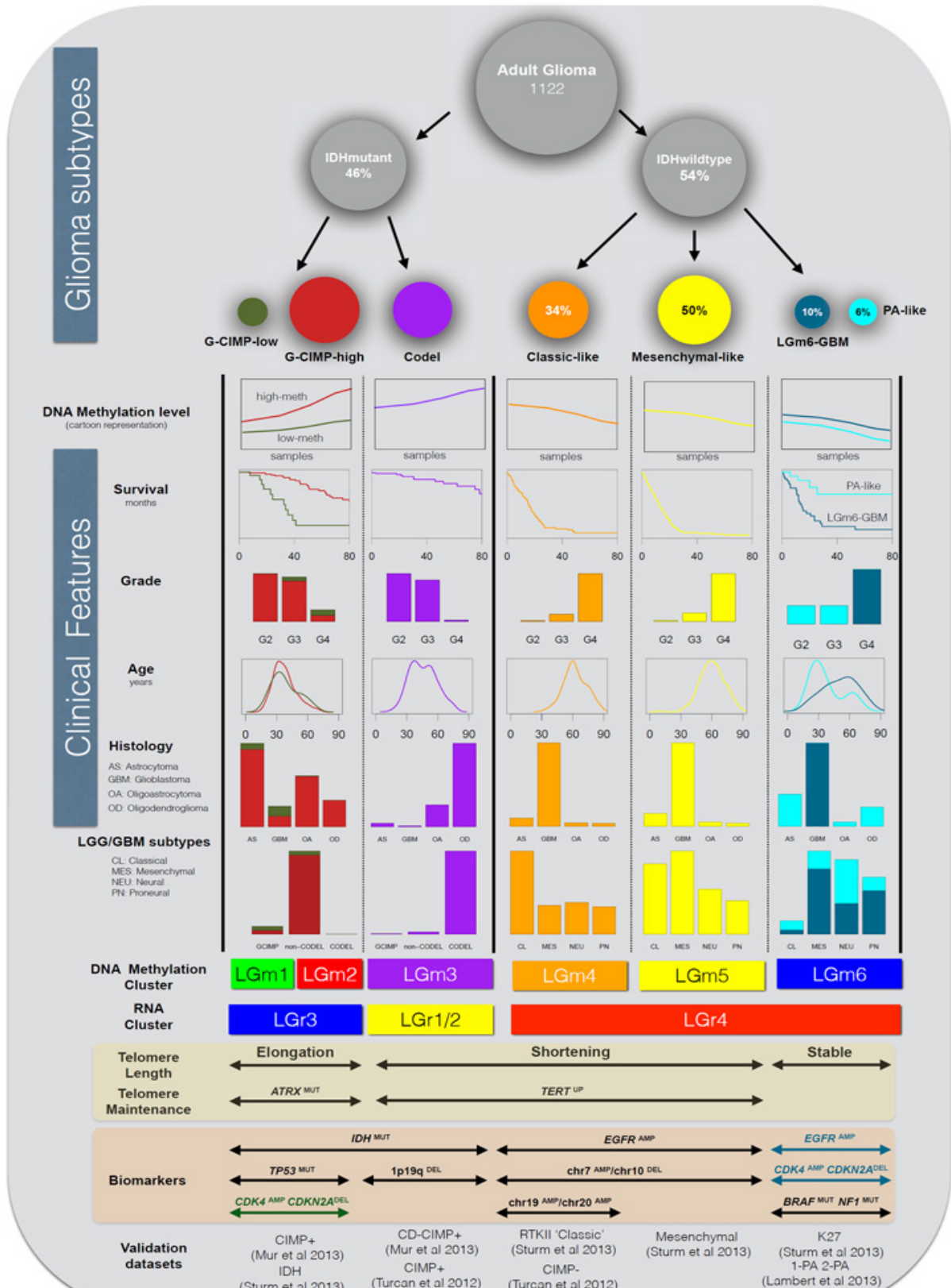
No mundo, aproximadamente 296.851 casos de tumores do sistema nervoso central (SNC) foram diagnosticados em 2018. Destes, 241.037 evoluíram a óbito (BRAY et al., 2018). Portanto, tumores malignos do sistema nervoso central (SNC) são responsáveis por 1.6% de todas as neoplasias malignas. No Brasil, estima-se que aproximadamente 11 mil novos casos de GBM serão diagnosticados no biênio 2018-2019 (INCA, 2018). Observa-se que, nas últimas décadas, a incidência dos tumores do SNC e a mortalidade decorrente deles aumentaram na maioria dos países desenvolvidos, principalmente nas faixas etárias mais avançadas. Atribui-se esse fato não somente à introdução e à otimização de novas tecnologias diagnósticas menos invasivas, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, mas principalmente ao envelhecimento populacional (FURNARI et al., 2007).

Os tumores do SNC são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações genéticas. Em 2007, a OMS subclassificou gliomas em astrocitomas, oligodendrogliomas e ependiomas, além de outros tipos tumorais a partir de diferenças na morfologia celular de cada tumor (LOUIS et al., 2007). Gliomas são também classificados de acordo com o seu comportamento biológico, cujo grau de malignidade varia de I a IV. Em crianças, o tipo tumoral mais comum é o astrocitoma pilocítico de grau I. Por outro lado, outros subtipos de gliomas são considerados difusos e classificados em grau II (glioma de baixo grau) e III e IV (glioma de alto grau.) O glioma de grau III é classificado como astrocitoma anaplásico e o IV é classificado como glioblastoma multiforme (GBM), que assume notável importância ao representar pelo menos 80% dos gliomas de alto grau. Desse modo, GBM representa o maior grupo de gliomas malignos no cérebro (MAHER, 2001).

Em maio de 2016, a OMS divulgou a nova classificação dos tumores do SNC ao incorporar parâmetros moleculares para a classificação destes tumores. O estudo de Ceccarelli et al. (2016) mostrou que existem diferentes *clusters* de subtipos de tumores do SNC (CECCARELLI et al., 2016). Cada um dos *clusters* foi definido a partir de dados moleculares, como padrões de metilação, assinaturas de expressão gênica e mutações em genes críticos para

o desenvolvimento de tumores do SNC. Interessantemente, os autores definiram quatro subtipos moleculares a partir de dados de RNAseq, sendo um deles (LGr4) o *cluster* com maior enriquecimento de amostras de GBM (Figura 1). O cluster LGr4, além disso, possui outros subtipos tumorais inclusos, como os tumores anteriormente classificados como mesenchymal e classical. Por fim, muitos dos subtipos moleculares caracterizados mostraram associação com a sobrevida global de pacientes, que então confirmou a sua utilidade clínica e posterior incorporação à OMS em 2016.

Figura 1 – Subtipos moleculares de tumores do sistema nervoso central. O *cluster* de RNA mostra que tumores LGr4 são enriquecidos com GBM.



Fonte: Ceccarelli et al. (2016).

Desse modo, com os avanços tecnológicos na era molecular, muitas alterações genéticas foram descobertas e associadas na etiogênese de tumores do SNC. Mutações, co-deleções, amplificações e fusões de genes e outras alterações genotípicas passaram a ser identificadas como características essenciais na identidade das lesões estudadas (RAFII et al., 2014; WANGARYATTAWANICH et al., 2015). Portanto, a nova classificação da OMS faz uma reestruturação dos gliomas difusos, meduloblastomas e outros tumores embrionários. Esta nova classificação tem intuito de definir entidades através de dados moleculares para que pacientes sejam tratados de forma mais personalizada. Além disso, novas terapias-alvos, padronização de ensaios clínicos e estudos experimentais poderão contribuir para uma melhor definição da doença.

1.2 Glioblastoma Multiforme

Os GBMs podem desenvolver-se a partir da progressão de um glioma de baixo grau (glioblastoma secundário), ou se desenvolver desde o início como glioblastoma primário (ALDAPE et al., 2015). No entanto, do ponto de vista histológico, tumores GBM primários e secundários são indistinguíveis, além de possuírem taxas de proliferação e invasão equivalentes (MAHER, 2001). Anatomicamente, o GBM localiza-se principalmente na substância branca subcortical. As regiões mais comumente acometidas são: lobo temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%). Mais raramente, lesões podem ser encontradas em região infratentorial e medula espinhal (DAVIS, 2016).

GBM é caracterizado por uma proliferação celular descontrolada, angiogênese, intensa resistência à apoptose, infiltração celular difusa, propensão à necrose tecidual e elevada instabilidade genômica (SCHWARTZBAUM et al., 2006). Estas características são consistentes na maioria dos casos de GBM, devido aos efeitos que sustentam a sinalização da proliferação celular, induzem a angiogênese, evadem dos genes supressores tumorais e ativam a função de invasão e metástase (WANGARYATTAWANICH et al., 2015).

Atribui-se o surgimento do GBM à ocorrência de diferentes tipos de mutações. As mais frequentes são a perda de heterozigiosidade (LOH) no braço do cromossomo 10q (encontrado em 60% a 90% dos casos) e a superexpressão do gene *MDM2*, observada em 15% dos pacientes (CRESPO et al., 2015). A superexpressão de *MDM2* é associada a um pior prognóstico em pacientes diagnosticados com GBM. Outras alterações importantes são a perda do gene receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e mutações no gene supressor tumoral *TP53*.

Apesar do conhecimento sobre essa doença maligna e o avanço nos conhecimentos genéticos e moleculares, além dos avanços na terapia do câncer, o prognóstico desses pacientes

não melhorou significativamente ao longo da última década (WANGARYATTAWANICH et al., 2015).

GBM pode ser caracterizado em quatro subtipos moleculares que apresentam perfis genômicos distintos. Por exemplo, tumores do subtipo Proneural (ou GBM-like) apresentam o mais nível de mutações em TP53 (VERHAAK et al., 2010). Em contraste, tumores Classical não apresentam mutações em TP53 e em IDH1 (Figura 2).

Figura 2 – Perfil mutacional de subtipos de GBM. Valores em negrito mostram porcentagens significativamente maiores no número de mutações para cada subtipo tumoral.

Gene	Proneural (n = 37)	Neural (n = 19)	Classical (n = 22)	Mesenchymal (n = 38)	Total No. of Mutations
<i>TP53</i>	20 (54%)	4 (21%)	0 (0%)	12 (32%)	36
<i>PTEN</i>	6 (16%)	4 (21%)	5 (23%)	12 (32%)	27
<i>NF1</i>	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	14 (37%)	20
<i>EGFR</i>	6 (16%)	5 (26%)	7 (32%)	2 (5%)	20
<i>IDH1</i>	11 (30%)^a	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	12
<i>PIK3R1</i>	7 (19%)	2 (11%)	1 (5%)	0 (0%)	10
<i>RB1</i>	1 (3%)	1 (5%)	0 (0%)	5 (13%)	7
<i>ERBB2</i>	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	1 (3%)	7
<i>EGFRvIII</i>	1 (3%)	0 (0%)	5 (23%)	1 (3%)	7
<i>PIK3CA</i>	3 (8%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (3%)	6
<i>PDGFRA</i>	4 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4

Fonte: Verhaak et al. (2010).

1.2.1. Diagnóstico e tratamento de glioblastoma multiforme

Atualmente, o diagnóstico de GBM é realizado por estudos de ressonância magnética e tomografia, seguidos de biópsia e análise histológica. Considera-se a histologia do tumor determinante no diagnóstico e nas decisões terapêuticas em gliomas; no entanto, esse método é subjetivo e variável (RAY, 2010).

Os tratamentos disponíveis atualmente para o GBM consistem em medidas clínicas para controle do edema cerebral e da epilepsia sintomática (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015). A ressecção cirúrgica do tumor, quando possível, pode ser total ou subtotal. Além disso, o paciente pode ser tratado através de radiocirurgia, radioterapia – em suas formas *standard* ou em cursos abreviados de curta duração, terapia antiangiogênica, terapia gênica, tratamento de suporte com agentes esteroides, além de quimioterapia com os medicamentos nitrosureia e bevacizumab. Por fim, pacientes com GBM podem ser tratados com temozolomida, que é o agente

quimioterápico mais importante para tratamento desta doença (HOTTINGER; ABDULLAH; STUPP, 2016).

A temozolomida, mais recentemente introduzida para a terapêutica de GBM, é um agente alquilante imidazotetracênico com atividade antitumoral que sofre transformação química rápida em pH fisiológico, resultando no composto ativo MTIC (monometil-triacenoimidazol-carboxamida) (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015). Sua propriedade lipofílica faz com que o medicamento atravesse a barreira hemoencefálica, atingindo altas concentrações no liquor, o que facilita, assim, a ação sobre o tumor. Sua dosagem inicial é de $75\text{mg}/\text{m}^2$ ao dia por seis semanas (42 dias) concomitante à radioterapia, seguida da administração adjuvante por seis ciclos. No primeiro ciclo, as doses são de $150\text{mg}/\text{m}^2$ e de $200\text{mg}/\text{m}^2$ no segundo ciclo da fase adjuvante. O efeito citotóxico deriva da metilação de sítios específicos do DNA, mais especificamente da posição O⁶ da guanina (LANZETTA; MINNITI, 2010). Embora a temozolomida seja um medicamento de alta eficácia, a recorrência de doença seguida de morte é bastante comum em pacientes, que geralmente apresentam uma sobrevida média de 15 meses após o diagnóstico (JOHANNESSEN; BJERKVIG, 2012).

Por isso, há uma necessidade urgente de explorar novas opções de tratamento que possam revelar-se eficazes para tumores cerebrais, bem como para melhorar a compreensão das alterações moleculares e celulares que ocorrem em GBM (CARLSSON; BROTHERS; WAHLESTEDT, 2014). Nos últimos anos, tem-se estudado intensivamente formas mais eficazes no diagnóstico, no tratamento e na análise das alterações genéticas e moleculares associadas ao desenvolvimento e progressão de gliomas humanos. Os marcadores tumorais são um conceito moderno em neuro-oncologia, e ainda existe uma vasta área a ser investigada. É esperado que o campo molecular contribua para a melhor resolução dos novos casos de GBM que forem diagnosticados (BAO et al., 2013).

1.2.2. Marcadores moleculares para a estratificação de pacientes diagnosticados com glioblastoma multiforme

Recentes estudos têm sugerido o uso de diferentes marcadores moleculares em pacientes com GBM de forma a melhorar o diagnóstico, o prognóstico e a terapêutica dos pacientes. Tais investigações mostram que a expressão de miRNAs está correlacionada a características biológicas e clínicas de tumores, podendo ser assim um biomarcador para terapia e prognóstico de gliomas (TUMILSON et al., 2014).

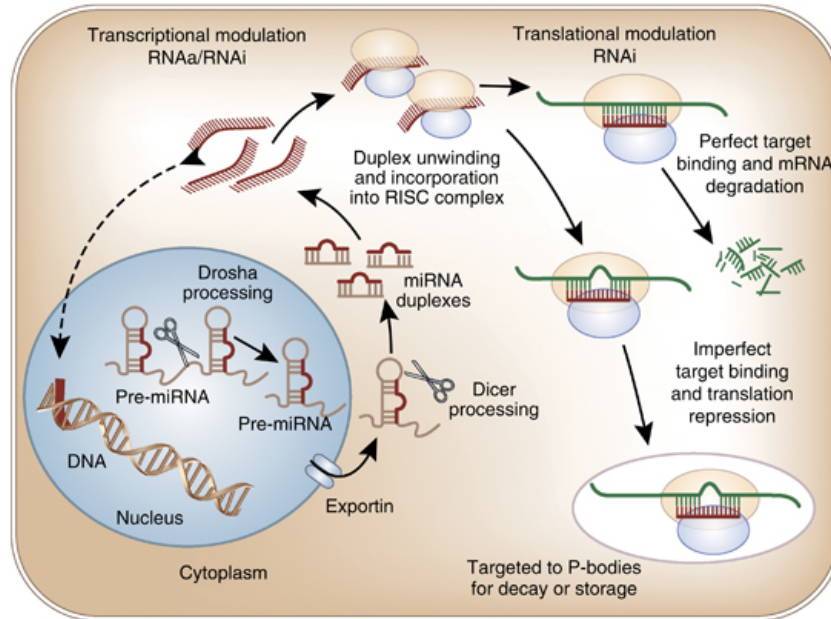
1.3 miRNAs

O RNA é uma molécula de fita simples, contendo sequências de bases transcritas a partir de moldes de DNA, com funções específicas. Dentre os tipos de RNA, podemos citar: o RNA mensageiro (mRNA), o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA). Além destes, há outros tipos de RNA que não participam diretamente da síntese de proteínas, como os RNAs não codificantes (ncRNA, *non-coding RNA*), que apresentam funções específicas, o *small nuclear RNA* (snRNA), o *small nucleolar RNAs* (snoRNAs), o *small interfering RNA* (siRNA) e em especial os miRNAs. Os miRNAs não tem participação direta na tradução de proteínas, porém apresentam papel extremamente significativo na regulação de genes das células eucariotas (HIGA et al., 2014).

Os miRNAs possuem em média entre 17 a 25 nucleotídeos distribuídos em um filamento único. Provenientes de regiões não-codificantes (íntrons), os miRNAs têm papel na regulação gênica, sendo fundamental para a diferenciação tecidual, ciclo celular, proliferação e apoptose (WINTER et al., 2009). Há inúmeras evidências de que eles são essenciais na regulação, desenvolvimento e homeostase celular, além de controlar diversos processos metabólicos e a expressão gênica. Além desses processos celulares vitais, os miRNAs participam de outras atividades celulares, como a secreção de insulina, resposta imune, síntese de neurotransmissores, replicação viral e metabolismo lipídico (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

Os miRNAs regulam a expressão gênica por se ligarem irreversivelmente ao RNA mensageiro no citoplasma (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014). No entanto, até atuarem em moléculas no mRNA, os miRNAs são primeiramente processados tanto no núcleo, quanto no citoplasma de células eucarióticas. A biogênese de miRNAs se inicia no núcleo, onde genes de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II ou III. Essa transcrição produz um miRNA primário longo que consistem em *loops*. Ainda no núcleo, o complexo RNase III Drosha corta o miRNA primário em diversos miRNAs menores, também chamados de miRNAs precursores ou pré-miRNAs. Tais moléculas precursoras são então transportadas para o citoplasma, onde são processadas pelo complexo Dicer em miRNAs maduros de 18-22 nucleotídeos (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014; HA; KIM, 2014; HIGA et al., 2014; MCLOUGHLIN; MUELLER; GROSSMANN, 2018). Então, o miRNA maduro poderá se ligar ao mRNA alvo de duas formas: 1) ligação completa, que leva à degradação do mRNA ou 2) ligação incompleta, que leva à repressão da tradução do mRNA. Esse processo se encontra sistematizado na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática da biogênese de miRNAs e seu efeito na repressão da expressão gênica.



Fonte: Chandrasekaran et al. (2012).

Recentemente, constatou-se que a desregulação na expressão dos miRNAs está relacionada a diversas patologias em humanos, como doenças neurodegenerativas, problemas cardíacos e em vários tipos histológicos tumorais (NADIMINTY et al., 2012; HUANG et al., 2015). Esse efeito é observado, pois miRNAs regulam a expressão de mais de 30% dos genes codificadores de proteínas, indicando que cada miRNA pode controlar centenas de genes alvos, incluindo oncogenes e supressores tumorais. Por isso, miRNAs são críticos em processos celulares que definem o fenótipo da célula incluindo a patogênese do GBM (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

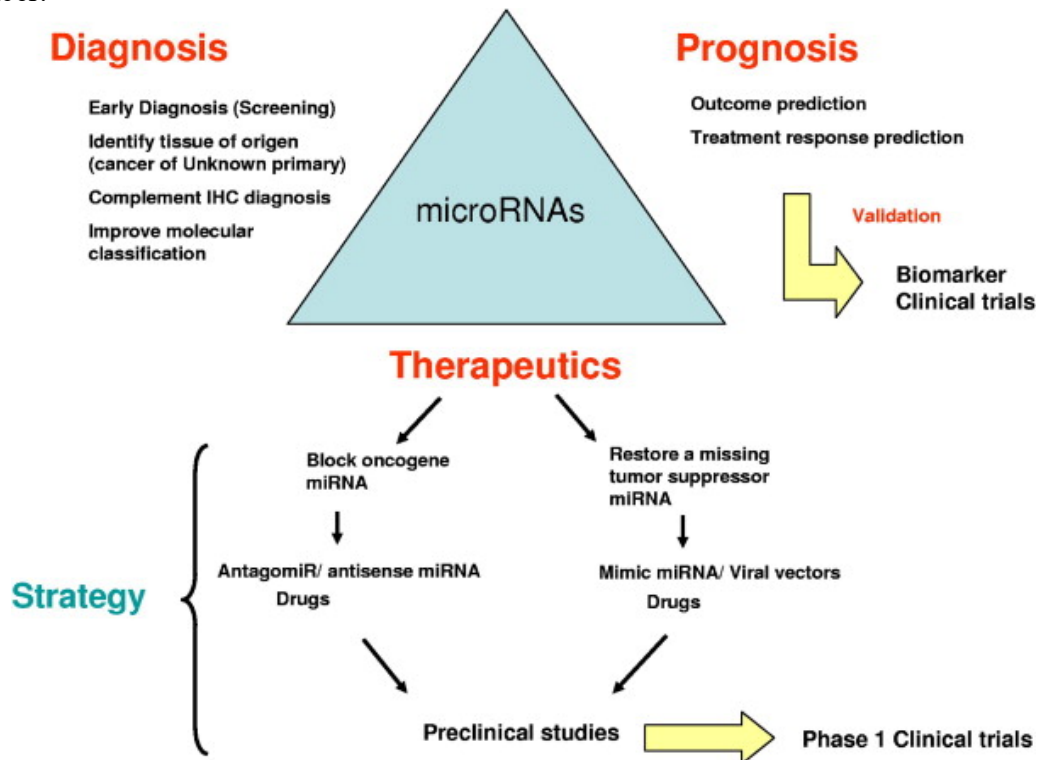
Os padrões de expressão dos miRNAs podem definir um tipo de tumor, mostrando que algumas alterações nos miRNAs podem conduzir a transformação maligna de um câncer em particular. Portanto, dependendo do contexto celular e da regulação gênica, os miRNAs podem atuar como um oncogene (oncoMIR) ou como um supressor tumoral, propiciando aplicações para diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer (CHEN; KANG, 2015).

Várias pesquisas já constataram uma expressão diferencial dos miRNAs ao comparar células tumorais a células normais. Em alguns tipos de câncer, miRNAs específicos apresentam níveis de expressão diferenciados nas diferentes fases da doença, desde a carcinogênese até invasão e metástase (MEZLINI et al., 2013).

A alteração nesses miRNAs pode contribuir com a carcinogênese de duas maneiras: 1) através da redução da expressão do oncoMIR que regula um oncogene ou 2) quando a expressão de um oncoMIR que controla um gene supressor tumoral está elevada (HA; KIM, 2014). Por afetar diretamente a expressão e regulação de genes em células não neoplásicas, os miRNAs ajudam a manter o equilíbrio entre a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais. A expressão dos miRNAs depende das características do tipo de câncer, do estágio e de várias outras condições clínicas (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

Além das evidências sugerindo os miRNAs como candidatos alvo de terapia gênica em vários tipos de câncer, eles também têm sido utilizados como biomarcadores para predição prognóstica (Figura 4). Testes clínicos demonstraram sensibilidade diferenciada ao fármaco, influenciado pela regulação de miRNAs (HUANG et al., 2015).

Figura 4 – Esquema mostrando o potencial de miRNAs no diagnóstico, prognóstico e terapia no câncer.



Fonte: Sandhu & Garzon (2011).

Diversas pesquisas propuseram o uso dos miRNAs em conjunto com a terapia tradicional e constataram sua habilidade de mediar a resposta terapêutica. Porém, as práticas clínicas ainda precisam que mais estudos sejam desenvolvidos (HUANG et al., 2015).

Em 2005, foi identificada a primeira alteração em um miRNA no GBM, onde foi detectado uma superexpressão do miR-21 no tecido quando comparado ao tecido não-neoplásico (VISVANATHAN et al., 2007a). A superexpressão do miR-21 levou à diminuição do número de apoptose celular, sugerindo então que o miR-21 é um fator anti-apoptótico para GBM. Desde então, tem sido documentada a desregulação dos miRNAs nos GBM que desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão dos tumores (SRINIVASAN; PATRIC; SOMASUNDARAM, 2011; SATHYAN et al., 2015).

Além disso, outros miRNAs importantes, como o miR-210, têm sua expressão induzida por hipóxia do tecido (MEZLINI et al., 2013). Esse miRNA foi previamente identificado como um marcador independente para vários tipos de câncer, como mama, pâncreas, cabeça e pescoço, pois sua função é extremamente importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, além de regular a proliferação celular e apoptose. O miR-1 também é um miRNA envolvido na proliferação celular, apoptose e desenvolvimento do sistema nervoso central (MEZLINI et al., 2013). Também foi observada a superexpressão do mir-221/222, que estão relacionados com a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos e funcionam como um fator anti-apoptótico (ZHANG et al., 2010).

A identificação da complexa rede formada por miRNAs está entre as descobertas mais importantes de investigação nas últimas décadas, contribuindo grandemente para a compreensão da iniciação, progressão e disseminação do GBM. Portanto, a utilização dos miRNAs como alvos terapêuticos é aceita como uma alternativa na oncologia molecular (VERHAAK et al., 2010).

Diante do exposto, evidencia-se que os estudos dos miRNAs merecem destaque no cenário científico atual. Por participarem da regulação da expressão gênica, sabe-se que sua expressão afeta o ciclo celular, a modulação de oncogenes e genes supressores tumorais, participando na patogênese dos tumores. Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de melhor elucidar os perfis de modulação dos miRNAs que envolvem variações na expressão gênica e proteica, sendo esses perfis significantes para compreender a função dos miRNAs nas doenças, principalmente no câncer.

O GBM é o tipo tumoral mais agressivo do SNC (DAVIS, 2016). Inúmeros estudos mostram que o tratamento dessa doença é ainda um desafio, pois a maior parte dos pacientes apresenta recidiva de doença após o tratamento com quimioterápicos e radioterapia

(HOTTINGER; ABDULLAH; STUPP, 2016). Por essa razão, o enfoque principal de estudos moleculares tem sido a identificação de alvos e marcadores genômicos que predizem eventos de recorrência e morte.

Os miRNAs têm apresentado resultados satisfatórios na investigação molecular de diversos tipos tumorais (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014; HUANG et al., 2015). No entanto, a investigação da expressão de miRNAs em GBM ainda não mostrou resultados significativos para a predição de ocorrência de óbito e recidiva de doença. Além disso, além de apresentarem um potencial significativo para o diagnóstico e prognóstico, miRNAs também podem ser analisados através de biópsias líquidas; porém, é necessário determinar quais miRNAs são mais expressos em tumores de GBM primários. Por isso, neste estudo, realizamos uma análise *in silico* extensiva para definir quais miRNAs são mais e menos expressos em GBM e quais as suas associações com a recidiva e óbito de paciente.

2 Objetivos

2.1 Objetivo principal

Avaliar o potencial prognóstico da expressão de miRNAs em pacientes com Glioblastoma Multiforme primário.

2.2 Objetivos específicos

Identificar miRNAs diferencialmente expressos em amostras de GBM obtidas a partir de bancos de dados públicos.

Caracterizar a expressão de miRNAs obtidos através de amostras de GBM primários de uma coorte brasileira.

Correlacionar a expressão de miRNAs com a presença de alterações genômicas atualmente utilizadas para definir diferentes tumores do SNC, como mutações em *IDH1* e *ATRX*.

Determinar os genes-alvo dos miRNAs diferencialmente expressos obtidos pela análise da coorte brasileira.

Definir quais miRNAs possuem associação com recorrência de doença e morte através da análise da coorte brasileira.

3 Materiais e métodos

3.1. Análise *in silico* de 606 amostras de glioblastoma da coorte The Cancer Genome Atlas

Para identificar quais miRNAs estão diferencialmente expressos entre diferentes subtipos moleculares de GBM, realizamos o *download* de dados de expressão gênica Level 3 do 606 amostras de GBM do TCGA. A expressão dos genes foi obtida através de experimentos utilizando a plataforma *Illumina miRNAs 44K*. Dados Level 3 do TCGA já estão normalizados e, portanto, foram diretamente analisados, sem processamento prévio. Os dados foram então investigados através do *software Nexus Expression 3.0* (Biodiscovery, Santa Clara, USA).

Dados moleculares das 606 amostras foram obtidos e utilizados na comparação da expressão dos miRNAs. Dados moleculares consistiram na presença da metilação do gene *MGMT*, responsável pela resistência à temozolomida, e também na ocorrência concomitante de ganhos no cromossomo 7 e perdas no cromossomo 10 (chr7/chr10). Além disso, dados de sobrevida global foram utilizados nas comparações.

Tabela 1 – Dados clínicos e moleculares da coorte TCGA.

Característica		
Idade (anos) (mediana, range)	59	(10-89)
Tempo para recidiva (meses) (mediana, range)	6,67	(0-82,69)
Tempo para morte (meses) (mediana, range)	12,16	(0-127,5)
Recidiva	Sim	394 (88%)
	Não	53 (12%)
Morte	Sim	504 (83%)
	Não	103 (17%)
Sexo	Masculino	374 (61%)
	Feminino	235 (39%)

Tumores com alterações chr7/chr10 foram comparados com casos cujos cromossomos não apresentavam alterações numéricas. Por fim, comparamos tumores de pacientes que faleceram em decorrência da doença com aqueles que sobreviveram ao tratamento.

Também obtivemos dados moleculares de outros tipos de glioma, como tumores clássicos e mesenquimais. A expressão dos miRNAs de GBM foi comparada com esses dois subtipos tumorais.

A comparação da expressão de cada miRNA foi realizada através do teste-T pareado. O valor de \log_2FC (*fold-change*) e valor de P foram calculados para cada miRNA em comparação. Por fim, geramos *Heatmaps* para a visualização da expressão dos miRNAs entre subtipos tumorais e classes de miRNAs. Comparações cujos valores de P foram inferiores a 0,05 foram consideradas como estatisticamente diferentes.

3.2. Análise da expressão de miRNAs em tumores de uma coorte brasileira (coorte HCRP).

3.2.1 Coorte HCRP

Coletamos blocos de parafina de 64 casos de GBM arquivados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP). Os casos obtidos foram derivados de cirurgias realizadas entre 2011 e 2018. Dados clínicos de todos os pacientes foram obtidos, como data de recorrência de doença (definido como diagnóstico de novo tumor por imagem após a ressecção total do tumor primário), tempo de seguimento (última data em que o paciente retornou ao HCRP), data de óbito decorrente de doença e idade.

Para a coorte HCRP, também obtivemos dados moleculares de cada um dos tumores coletados, como status de mutação em *IDH1-R132H*, *IDH1-WO9*, *ATRX*, *GFAP*, p16, p53 e *EGFR*. Os dados de mutação em *IDH1* foram obtidos através de imunoistoquímica. A ausência de co-deleções 1p/19q foram utilizadas para a confirmação de do diagnóstico dos tumores como GBMs, uma vez que tais alterações genômicas caracterizam oligodendrogliomas. Todos os dados moleculares foram previamente obtidos para a caracterização do tumor e consequente definição de tratamentos no HCRP.

3.2.2 Extração e quantificação da expressão de miRNAs

Lâminas marcadas com HE de cada um dos casos selecionados foram avaliadas por um patologista. As áreas tumorais foram marcadas na lâmina e, então, cortes em micrótomo foram realizados a fim de obter 4 lâminas com 10 μm de cada amostra.

A seleção dos miRNAs investigados na coorte HCRP foi definida pelos miRNAs diferencialmente expressos obtidos pelas comparações dos diferentes subtipos histológicos dos tumores da coorte TCGA. Todos os miRNAs diferencialmente expressos foram comparados com os reportados por estudos já publicados em GBM. Todos os miRNAs que apresentaram concordância na nossa análise e com dados já publicados foram selecionados para a construção do experimento descrito a seguir. Por fim, obtivemos 47 miRNAs para análise da coorte HCRP.

Posteriormente, foi realizada a raspagem da área previamente marcada na lâmina. A área raspada foi coletada em um tubo Eppendorf e o material então foi utilizado para a extração de RNA utilizando o Kit Recoverall (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração do RNA total das amostras, foi realizada uma reação para síntese de cDNA a partir do RNA extraído (reação da transcriptase reversa). Para essa reação, por amostra, foi utilizado 6,0 μL do *Custom RT primer pool*, 0,30 μL de dNTPs com DTTP 100mM, 3,0 μL de *MuLtiScribe Reverse Transcriptase*, 1,50 μL de 10x RT Buffer, 0,19 μL de inibidor de RNase e 1,01 μL de *Nuclease-Free Water*. O volume total de cada amostra teve 3,0 μL e apresentou entre 1-350 ng de RNA total. As reações foram realizadas em Termociclador.

Posteriormente, foi realizada a reação de pré-amplificação, que teve como objetivo aumentar a concentração dos RNAs analisados. A reação consistiu em 12,50 uL de *TaqMan PreAmp Mater Mixi 2x*, 3,75 uL de *Custom PreAmp Primer Pool*, 6,25 uL de *Nuclease Free Water* e 2,5 uL do produto final da Transcriptase Reversa. A reação foi realizada em 2,5 uL do produto final da Transcriptase Reversa Termociclador e o produto final recebeu 175 uL de Tris EDTA pH 8.0 em cada tubo.

Para a reação de TLDA, utilizamos 56,25 uL de *TaqMan Universal Master Mix II – UNG*, 1,13 uL do Produto pré-amplificado e diluído em TE e 55,12 uL de *Nuclease Free Water*. No cartão TLDA, foi inserido o volume de 112,50 uL e então o material foi centrifugado por 1 minuto a 1200 rpm.

Posteriormente, foi realizada a reação de PCR no cartão TLDA através do equipamento *QuantStudio Real Time (Thermofisher)*. O experimento foi inteiramente conduzido com apoio do *software RealTime QuantStudio*. Após o experimento, os dados de expressão de cada um dos miRNAs foi obtido através da equação de *Comparative Delta CT*. Os dados foram obtidos pelo *software RealTime QuantStudio* e analisados posteriormente.

3.2.3 Análise da expressão dos miRNAs

Os dados normalizados de expressão dos miRNAs foram utilizados para a identificação dos top miRNAs mais e menos expressos na coorte HCRP. Além disso, a correlação entre todos os miRNAs investigados foi avaliada pelo teste de Spearman. O pacote *corrplot* (R v3.6.1) foi utilizado para gerar gráficos de correlação.

Posteriormente, avaliamos se a expressão de cada miRNA possuía diferença entre tumores com alterações genômicas versus tumores sem tais alterações. Para avaliar a significância desses achados, utilizamos o teste de Wilcoxon. Os dados foram manipulados e avaliados no *software R v.3.6.1* através dos pacotes *ggplot2* e *ComplexHeatmap*.

3.2.4 Correlação entre a expressão de miRNAs e parâmetros clínicos

Para identificar quais miRNAs podem prever a ocorrência de recidiva de doença e óbito, realizamos análises de Regressão de Cox univariadas e multivariadas. Os modelos multivariados foram conduzidos com miRNAs que apresentaram significância no modelo univariado. Além disso, para visualização dos resultados, geramos *forest plots* para cada um dos miRNAs através do pacote *survutils*.

3.2.5 Identificação dos genes-alvo dos miRNAs de estudo

Para identificar quais os genes-alvo dos miRNAs com potencial preditor clínico, utilizamos a plataforma miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) para determinar quais as interações miRNAs-genes fundamentadas por dados experimentais. Foram selecionados apenas miRNAs que apresentaram evidências experimentais que comprovassem a interação com genes-alvo. Posteriormente, selecionamos os alvos dos miRNAs e realizamos uma análise de enriquecimento de vias através da plataforma String.db (string-db.org).

4. Resultados

4.1. Análises *in silico* da coorte TCGA

Primeiramente, comparamos subtipos histológicos de gliomas (*GBM-like*, *Classical* e *Mesenchymal*) para identificar quais miRNAs estão mais ou menos expressos em cada um desses grupos. A partir da análise da expressão dos miRNAs da coorte TCGA, foi possível identificar diversos alvos que apresentaram expressão diferencial entre as comparações realizadas. Através dessa comparação, caracterizamos os miRNAs que apresentaram expressão superior no grupo de base (valor de $P < 0,05$ e $\text{Log}_2\text{FC} > 0$), denominados hiperexpressos. Além disso, obtivemos miRNAs que apresentaram expressão inferior no grupo de base (valor de $P < 0,05$ e $\text{Log}_2\text{FC} < 0$); tais miRNAs serão denominados hipoexpressos. A comparação entre os subtipos *GBM-like* vs. *Classical* mostrou que 17 miRNAs estavam significativamente hipoexpressos no grupo *GBM-like* (hsa-let-7a, hsa-let-7e, hsa-miR-100, hsa-miR-106a, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-15b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181d, hsa-miR-195, hsa-miR-204, hsa-miR-20a, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-590, hsa-miR-9, hsa-miR-92b e hsa-miR-99a) (Tabela 2). Nenhum dos miRNAs hipoexpressos atingiu $\log_2\text{FC}$ inferior a -1.0, o que indica que a expressão inferior no grupo *GBM-like* não foi substancial. Além disso, observamos que 6 miRNAs estavam hiperexpressos no grupo *GBM-like* (hsa-miR-199a, hsa-miR-214, hsa-miR-218, hsa-miR-381, hsa-miR-504 e hsa-miR-623). Nenhum dos miRNAs hiperexpressos atingiu valor superior a 1.0 (Tabela 2).

A comparação entre os subtipos *Mesenchymal* e *Classical* mostrou que apenas dois miRNAs estavam hipoexpressos no grupo *Mesenchymal* (hsa-miR-181c e hsa-miR-181d). Por fim, a comparação entre os subtipos *GBM-like* e *Mesenchymal* mostrou que apenas um miRNA estava hiperexpresso no grupo *GBM-like* (hsa-miR-381) (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise comparativa da expressão de miRNAs entre subtipos moleculares de GBM.

miRNA	GBM-like vs. Classical	Log2FC	P	Mesenchymal vs. Classical	Log2FC	P	GBM-like vs. Mesenchymal	Log2FC	P
hsa-let-7a	Hipoexpresso	-0,3392	0,0083	Nde	-0,0174	0,8815	Nde	-0,3217	0,0154
hsa-let-7e	Hipoexpresso	-0,3935	0,0083	Nde	-0,1005	0,3463	Nde	-0,2930	0,0623
hsa-miR-100	Hipoexpresso	-0,4469	0,0021	Nde	-0,1272	0,2538	Nde	-0,3197	0,0496
hsa-miR-106a	Hipoexpresso	-0,3886	0,0083	Nde	-0,1265	0,3574	Nde	-0,2621	0,1758
hsa-miR-10a	Hipoexpresso	-0,6026	0,0032	Nde	-0,0903	0,6530	Nde	-0,5123	0,0127
hsa-miR-10b	Hipoexpresso	-0,8129	0,0083	Nde	-0,0216	0,9502	Nde	-0,7913	0,0159
hsa-miR-128a	Nde	0,1048	0,4838	Nde	0,0145	0,9174	Nde	0,0903	0,6303
hsa-miR-128b	Nde	0,1414	0,4151	Nde	0,0262	0,8815	Nde	0,1152	0,6135
hsa-miR-148a	Nde	-0,1430	0,6697	Nde	0,1034	0,5873	Nde	-0,2464	0,3822
hsa-miR-15b	Hipoexpresso	-0,4483	0,0003	Nde	-0,0351	0,8257	Nde	-0,4132	0,0127
hsa-miR-181c	Hipoexpresso	-0,5662	0,0000	Hipoexpresso	-0,3580	0,0000	Nde	-0,2082	0,2088
hsa-miR-181d	Hipoexpresso	-0,5172	0,0000	Hipoexpresso	-0,2527	0,0027	Nde	-0,2645	0,0742
hsa-miR-186	Nde	0,1079	0,3567	Nde	0,0340	0,6732	Nde	0,0739	0,5430
hsa-miR-195	Hipoexpresso	-0,5360	0,0052	Nde	-0,1119	0,4561	Nde	-0,4241	0,0345
hsa-miR-199a	Hiperexpresso	0,5201	0,0016	Nde	0,1987	0,1888	Nde	0,3214	0,1721
hsa-miR-204	Hipoexpresso	-0,9523	0,0006	Nde	-0,3661	0,1259	Nde	-0,5861	0,0623
hsa-miR-20a	Hipoexpresso	-0,5424	0,0013	Nde	-0,1783	0,2489	Nde	-0,3641	0,0623
hsa-miR-214	Hiperexpresso	0,7721	0,0024	Nde	0,1659	0,3076	Nde	0,6062	0,0345
hsa-miR-218	Hiperexpresso	0,4003	0,0083	Nde	0,0697	0,6046	Nde	0,3306	0,0663
hsa-miR-222	Nde	-0,3291	0,1742	Nde	0,0395	0,8772	Nde	-0,3685	0,2088
hsa-miR-30a-3p	Nde	-0,2315	0,0360	Nde	-0,0928	0,3080	Nde	-0,1387	0,2566
hsa-miR-30a-5p	Nde	-0,3760	0,0260	Nde	-0,0988	0,4690	Nde	-0,2772	0,1637
hsa-miR-30b	Nde	-0,0600	0,7702	Nde	-0,0577	0,5809	Nde	-0,0023	0,9914
hsa-miR-329	Hiperexpresso	0,2066	0,0038	Nde	0,0848	0,1153	Nde	0,1218	0,2052
hsa-miR-335	Nde	-0,4171	0,0162	Nde	-0,0703	0,6411	Nde	-0,3468	0,0353
hsa-miR-339	Nde	-0,2561	0,0615	Nde	0,0676	0,5384	Nde	-0,3237	0,0127
hsa-miR-34a	Nde	-0,4334	0,0535	Nde	-0,0594	0,7634	Nde	-0,3740	0,1529
hsa-miR-381	Hiperexpresso	0,3261	0,0003	Nde	0,0757	0,1153	Hiperexpresso	0,2503	0,0060
hsa-miR-425-5p	Hipoexpresso	-0,2165	0,0083	Nde	-0,0712	0,2489	Nde	-0,1453	0,1144
hsa-miR-504	Hiperexpresso	0,1621	0,0003	Nde	0,0638	0,1888	Nde	0,0983	0,2052
hsa-miR-590	Hipoexpresso	-0,2372	0,0086	Nde	-0,0253	0,7854	Nde	-0,2119	0,0353
hsa-miR-623	Hiperexpresso	0,2531	0,0016	Nde	0,0413	0,6411	Nde	0,2118	0,0998
hsa-miR-9*	Hipoexpresso	-0,7868	0,0013	Nde	-0,2382	0,1363	Nde	-0,5486	0,0512
hsa-miR-92b	Hipoexpresso	-0,4914	0,0001	Nde	-0,1360	0,2410	Nde	-0,3554	0,0127
hsa-miR-99a	Hipoexpresso	-0,4365	0,0093	Nde	-0,1089	0,4029	Nde	-0,3276	0,0512

Cada coluna mostra o resultado da análise de expressão diferencial e os valores de P e Log2FC obtidos pela comparação entre dois subgrupos amostrais. Tal expressão diferencial refletiu em um *cluster* bem definido entre amostras de GBM (Figura 4). Nde – genes não diferencialmente expressos, evidenciados por um $P > 0,05$. Hipoexpresso – genes com expressão inferior no grupo de base ($P < 0,05$ e Log2FC com valores negativos). Hiperexpresso – genes com expressão superior no grupo de base ($P < 0,05$ e Log2FC com valores positivos).

Tabela 3 – Análise comparativa da expressão de miRNAs entre subtipos moleculares de GBM e sobrevida global.

miRNA	MGMT não-metilado vs. metilado	Log2FC	P	Óbito vs. não-óbito	Log2FC	P
hsa-let-7a	Nde	-0,0980	0,7340	Nde	-0,0057	0,9909
hsa-let-7e	Nde	-0,0317	0,9685	Nde	-0,0422	0,9909
hsa-miR-100	Nde	-0,0507	0,9562	Nde	-0,0321	0,9909
hsa-miR-106a	Nde	-0,1244	0,7340	Nde	-0,0121	0,9909
hsa-miR-10a	Nde	0,0574	0,9577	Nde	0,0918	0,9909
hsa-miR-10b	Nde	-0,1087	0,9562	Nde	0,0014	0,9964
hsa-miR-128a	Nde	-0,1160	0,7340	Nde	-0,0093	0,9909
hsa-miR-128b	Nde	-0,1273	0,7340	Nde	-0,0352	0,9909
hsa-miR-148a	Nde	0,1758	0,7340	Nde	0,1204	0,9909
hsa-miR-15b	Nde	-0,0742	0,9222	Nde	0,0067	0,9909
hsa-miR-181c	Nde	-0,1169	0,7340	Nde	-0,0703	0,9909
hsa-miR-181d	Nde	-0,0656	0,9222	Nde	-0,0947	0,9909
hsa-miR-186	Nde	-0,0253	0,9577	Nde	-0,0579	0,9909
hsa-miR-195	Nde	-0,0848	0,9222	Nde	-0,0041	0,9947
hsa-miR-199a	Nde	0,1696	0,7340	Nde	0,0243	0,9909
hsa-miR-199a*	Nde	0,2461	0,7340	Nde	-0,0209	0,9909
hsa-miR-204	Nde	-0,0388	0,9764	Nde	0,1517	0,9909
hsa-miR-20a	Nde	-0,0870	0,9222	Nde	-0,0340	0,9909
hsa-miR-214	Nde	0,1818	0,7340	Nde	-0,0121	0,9909
hsa-miR-218	Nde	0,0203	0,9764	Nde	0,0889	0,9909
hsa-miR-222	Nde	0,1023	0,9562	Nde	0,1525	0,9909
hsa-miR-30a-3p	Nde	0,0118	0,9764	Nde	-0,0492	0,9909
hsa-miR-30a-5p	Nde	-0,0146	0,9960	Nde	-0,0534	0,9909
hsa-miR-30b	Nde	-0,0477	0,9562	Nde	-0,0013	0,9950
hsa-miR-329	Nde	0,0269	0,9562	Nde	-0,0047	0,9909
hsa-miR-335	Nde	0,1216	0,7340	Nde	0,0607	0,9909
hsa-miR-339	Nde	0,0780	0,8285	Nde	-0,0143	0,9909
hsa-miR-34a	Nde	0,2912	0,5314	Nde	0,1341	0,9909
hsa-miR-381	Nde	0,0590	0,7340	Nde	0,0205	0,9909
hsa-miR-425-5p	Nde	0,0163	0,9708	Nde	0,0114	0,9909
hsa-miR-504	Nde	-0,0270	0,9562	Nde	-0,0520	0,9909
hsa-miR-590	Nde	-0,0760	0,7340	Nde	-0,0235	0,9909
hsa-miR-623	Nde	0,0777	0,7340	Nde	0,0246	0,9909
hsa-miR-9*	Nde	-0,2208	0,7340	Nde	-0,0984	0,9909
hsa-miR-92b	Nde	0,0013	1	Nde	-0,1245	0,9909
hsa-miR-99a	Nde	-0,0353	0,9685	Nde	-0,1387	0,9909

Cada coluna mostra o resultado da análise de expressão diferencial e os valores de P e Log2FC obtidos pela comparação entre dois subgrupos amostrais. Os miRNAs mostrados aqui são os mesmos dos descritos na Tabela 1. Nde – genes não diferencialmente expressos, evidenciados por um $P > 0,05$. Hipoexpresso – genes com expressão inferior no grupo de base ($P < 0,05$ e Log2FC com valores negativos). Hiperexpresso – genes com expressão superior no grupo de base ($P < 0,05$ e Log2FC com valores positivos).

Um *Heatmap* foi gerado para a visualização do padrão de expressão dos miRNAs entre amostras da coorte TCGA. Na figura, não foi possível identificar um padrão claro de diferenciação de expressão dos miRNAs analisados (Figura 5). No entanto, alguns *clusters* de

expressão de miRNAs podem ser identificados – potencialmente, tais *clusters* podem ser derivados da comparação entre os diferentes subtipos moleculares de GBM que constituem a coorte TCGA.

Comparando os miRNAs diferencialmente expressos encontrados em nossa análise *in silico* com os obtidos por outros dois estudos (COX et al., 2012; SAADATPOUR et al., 2016), encontramos uma sobreposição de 54% dos miRNAs diferencialmente expressos. Esses miRNAs foram então selecionados para análises posteriores com pacientes da coorte HCRP (Figura 6 e Figura 7).

Para identificar qual o efeito dos miRNAs investigados na transcrição gênica, analisamos os alvos de cada um dos miRNAs diferencialmente expressos obtidos pelas análises da coorte TCGA (Tabela 4).

Figura 5 – *Heatmap* mostrando níveis de expressão dos miRNAs da coorte TCGA. Linhas mostram valores de expressão por miRNA. Colunas representam cada uma das amostras da coorte TCGA. Os clusters de miRNAs observados refletem os subtipos histológicos de GBM presentes na coorte TCGA, como observado na comparação da expressão de miRNAs entre tais subtipos.

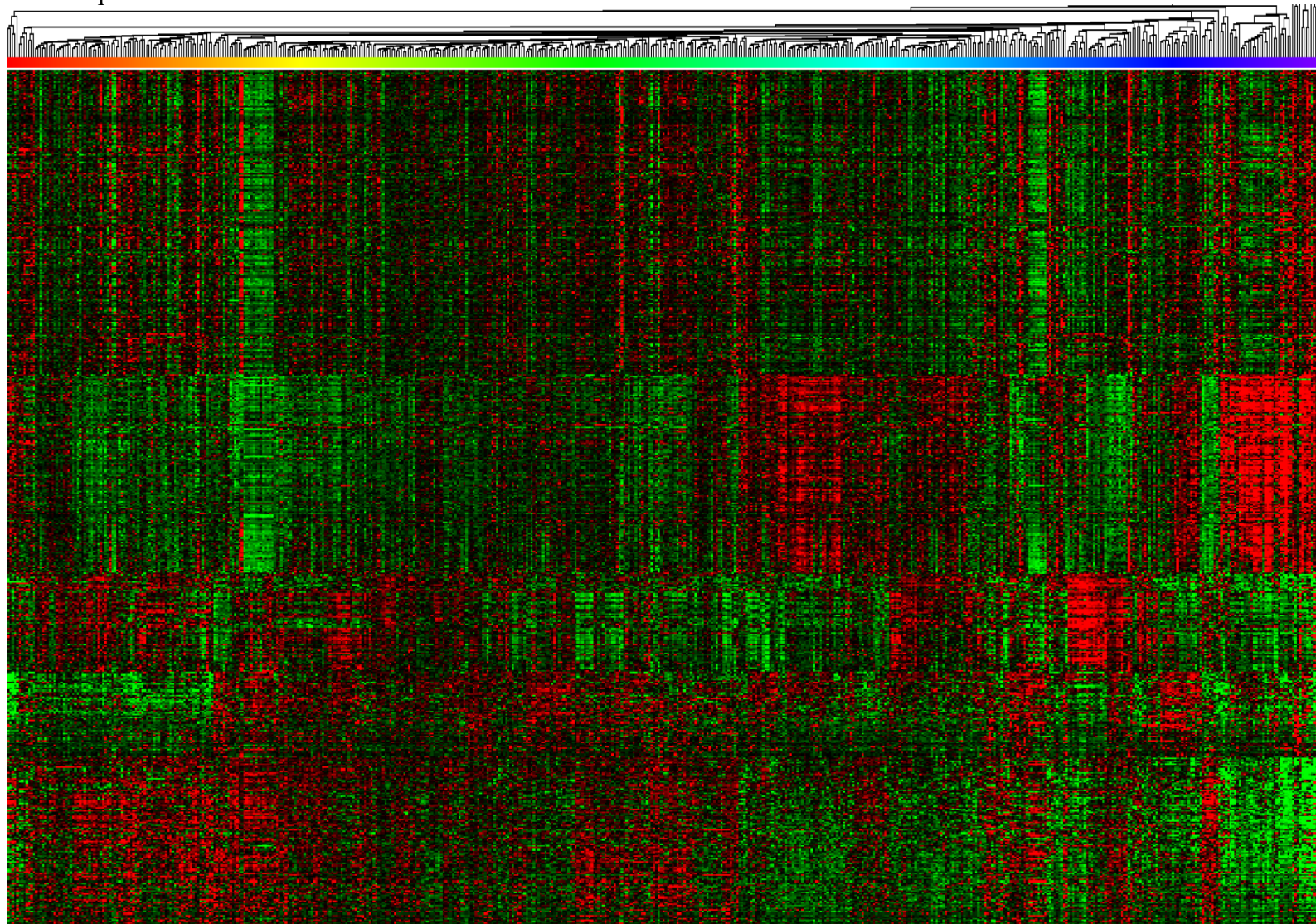


Tabela 4 – Genes-alvo das comparações entre subtipos de tumores GBM.

miRNA	Expressão diferencial	Gene-alvo
GBM-like vs. Mesenchymal		
miR-381	Hiperexpresso	
GBM-like vs. Classical		
miR-7a	Hipoexpresso	<i>BACH1, BZW1, UHRF2, GNPTAB, GDF6, SCD, KIAA1274, IL13, ARID3B, KLHDC8B e PPP1R15B</i>
miR-7e	Hipoexpresso	<i>GDF6, KIAA1274, ARID3B, GAN, KLHDC8B, DDX26B, BZW1, RDH10, GNPTAB, ZFYVE26, ULK2 e PPP1R15B</i>
miR-100	Hipoexpresso	
miR-106a	Hipoexpresso	
miR-10a	Hipoexpresso	<i>TRIM2 e CNOT6</i>
miR-10b	Hipoexpresso	<i>CNOT6</i>
miR-15b	Hipoexpresso	<i>RECK, CCNE1, GNAI3, SEMA6D, HTR4, ZHX3, SLC13A3, USP15 e AKT3</i>
miR-181c	Hipoexpresso	<i>GRM5, HOXC8, ARSJ, CLIP1, ABI3BP e KIAA0528</i>
miR-181d	Hipoexpresso	
miR-195	Hipoexpresso	<i>PLAG1, RAD23B, SLC12A2, CPEB2, CPEB3, E2F7, C1orf21, CCNE1, ATXN2, N4BP1, SNRK, KIF21A e USP15</i>
miR-204	Hipoexpresso	<i>ESRRG e PPARGC1A</i>
miR-20a	Hipoexpresso	<i>HLF, LIMA1, ZNFX1, SACS, ABCA1, PGM2L1, MYCN, RPS6KA5, ZNF236, EREG, F3, PLS1 e ZFPM2</i>
miR-425-5p	Hipoexpresso	
miR-590	Hipoexpresso	
miR-9	Hipoexpresso	
miR-92b	Hipoexpresso	
miR-99a	Hipoexpresso	<i>FGFR3 e SMARCA5</i>
Mesenchymal vs. Classical		
miR-181c	Hipoexpresso	
miR-181d	Hipoexpresso	

Figura 6 – miRNAs observados como hiperexpressos (*upregulated*) e hipoexpressos (*downregulated*) em tumores de GBM. Os miRNAs circulosados em vermelho são os que apresentaram concordância com os resultados obtidos pela coorte TCGA.

miRNA	Expression in GBM	Target gene(s)	Ref
miR-9	Upregulation	CAMTA1, REST, TrkC	37
miR-25	Upregulation	Mdm2, TSC1	6
miR-23	Upregulation	Mdm2, TSC1	38
miR-10b	Upregulation	HOXD10, RhoC	39
miR-15a	Upregulation	BCL2	40
miR-16	Upregulation	BCL2	40
miR-23a	Upregulation	HOXD10	41
miR-23b	Upregulation	VHL	42
miR-204	Upregulation	SOX4, EphB2	43
miR-222	Upregulation	PUMA, P57, PTP μ , AKT	44
miR-221	Upregulation	PUMA	44
miR-130a	Upregulation	-	1
miR-125b	Upregulation	E2F2	45
miR-92	Upregulation	CTGF	46
miR-28	Upregulation		47
miR-24	Upregulation	ST7L	35
miR-328	Downregulation	SFRP1	48,49
miR-19a	Downregulation	CTGF	50
miR-451	Downregulation	PI3K/AKT	51
miR-145	Downregulation	Oct4, SOX2	52
miR-106a	Downregulation	SLC2A3	53
miR-410	Downregulation	MET	54
miR-15b	Downregulation	NRP-2, CCNE1	55
miR-152	Downregulation	MMP-3	56
miR-195	Downregulation	E2F3, CCND3	57
miR-633	Downregulation	CXCR4	58
miR-136	Downregulation	AGE1, Bcl2	59
miR-148	Downregulation	Npm1, Akt2	60
miR-634	Downregulation	CYR61, mTOR	61
miR-491-5p	Downregulation	MMP9	62
miR-885-5p	Downregulation	MMP9	63
miR-483-5p	Downregulation	ERK1	64
miR-7	Downregulation	AKT	65
miR-31	Downregulation	Radixin (RDX)	66
miR-32	Downregulation	MDM2, TSC1	67
miR-101	Downregulation	EZH2	68
miR-34a	Downregulation	SIRT1, c-Met, Notch1/2	69
miR-128	Downregulation	EGFR	70
miR-124	Downregulation	STAT3	36,71
miR-137	Downregulation	STAT3	36
miR-330	Downregulation	Endophilin-1	72

Abbreviations: GBM, glioblastoma; miRNA, microRNA.

Fonte: Saadatpur et al., 2016.

Figura 7. miRNAs observados em tumores de GBM. Os miRNAs circulos em vermelho são os que apresentaram concordância com os resultados obtidos pela coorte TCGA. Cox et al. 2012.

Table 1 Deregulated miRNAs identified in primary glioblastomas

Ciafre et al. [Ref. 16] (n = 9)	Godlewski et al. [Ref. 32] (n = 3)	Silber et al. [Ref. 76] (n = 4)	Gal et al. ^a [Ref. 29] (n = 3)
Upregulation			
miR-9-2	miR-10b	miR-10b	miR-16
miR-10b	miR-21	miR-21	miR-107
miR-21	miR-26a	miR-155	miR-185
miR-25	miR-383	miR-210	miR-425
miR-123	miR-451		miR-451
miR-125b-1	miR-486		miR-486
miR-125b-2	miR-516-3p		
miR-130a	miR-519d		
miR-221			
Downregulation			
miR-128-1	miR-124	miR-7	miR-138
miR-181a	miR-128-1	miR-29b	miR-139
miR-181b	miR-128-2	miR-31	miR-149
miR-181c	miR-137	miR-101	miR-153
	miR-139	miR-107	miR-154*
	miR-190	miR-124	miR-185
	miR-218	miR-124-2	miR-187
	miR-299	miR-128-1	miR-203
	miR-323	miR-129	miR-218
	miR-483	miR-132	miR-323
	miR-511-1	miR-133a	miR-328
		miR-133b	miR-330
		miR-137	

Bold indicates miRNA identified by at least two profiling studies

^a CD133-negative versus CD133-positive cells isolated from glioblastomas

Fonte: Cox et al. 2012.

4.2. Caracterização da coorte HCRP

Dos blocos de parafina derivados de 67 pacientes com GBM da coorte HCRP, apenas 39 casos foram analisados, pois algumas amostras não mostraram dados de expressão confiáveis. Duas das placas de reação de hibridação mostraram resultados inferiores ao esperado, além da presença de ruído (Figura 8 C e D). A exclusão das 28 amostras foi realizada para evitar a interpretação incorreta dos dados e o viés na normalização das sondas de miRNA. Dessa maneira, descreveremos os dados clínicos e resultados das análises de expressão exclusivamente para os casos com qualidade satisfatória de dados de expressão.

A descrição dos dados clínicos dos pacientes do HCRP pode ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados clínicos e moleculares de tumores da coorte HCRP.

Característica		Número	Porcentagem
Idade (anos) (mediana, <i>range</i>)	64 (5-91)		
Tempo para recidiva (meses) (mediana, <i>range</i>)	13 (1-30)		
Tempo para morte (meses) (mediana, <i>range</i>)	14 (1-28)		
Tempo de seguimento	15 (2-34)		
Recidiva	Sim	5	14,3
	Não	30	85,7
Morte	Sim	17	48,6
	Não	18	51,4
IDH1 R132H	Mutado	6	17,1
	Não mutado	10	28,6
	Dados ausentes	19	54,3
IDH1 W09	Mutado	2	5,7
	Não mutado	14	40,0
	Dados ausentes	19	54,3
1p/19q	Presente	0	0,0
	Ausente	19	54,3
	Dados ausentes	16	45,7
ATRX	Mutado	22	62,9
	Não mutado	2	5,7
	Dados ausentes	11	31,4
p53	Mutado	18	51,4
	Não mutado	0	0,0
	Dados ausentes	17	48,6

4.3. Avaliação da expressão de miRNAs da coorte HCRP

Dos 40 miRNAs selecionados para análise, dois deles foram utilizados como controle interno experimental. Para determinar quais miRNAs eram mais ou menos expressos na coorte HCRP, um diagrama de caixas (boxplot) com valores crescentes das medianas dos valores de expressão foi desenvolvido (Figura 9).

Através desse gráfico, foi possível identificar que os miRNAs miR-9, miR-100, miR-99a, let-7e, miR26a e miR-222 foram os top 5 miRNAs menos expressos na coorte HCRP. Em contraste, os miRNAs miR-199, miR-21, miR-381, miR-326 e miR-125 foram os 5 miRNAs mais expressos nessa coorte. Foi possível observar a presença de *outliers* distribuídos uniformemente na maior parte dos miRNAs investigados.

Figura 8 – Curvas de *melting* para cada um dos cartões TLDA. O eixo y (ΔRn) mostra os valores de fluorescência da sonda marcada dividido pela sonda referência. O eixo x mostra os ciclos de PCR. Os cartões C e D apresentaram valores de expressão incertos e, por isso, a maior parte dessas amostras foram removidas deste estudo.

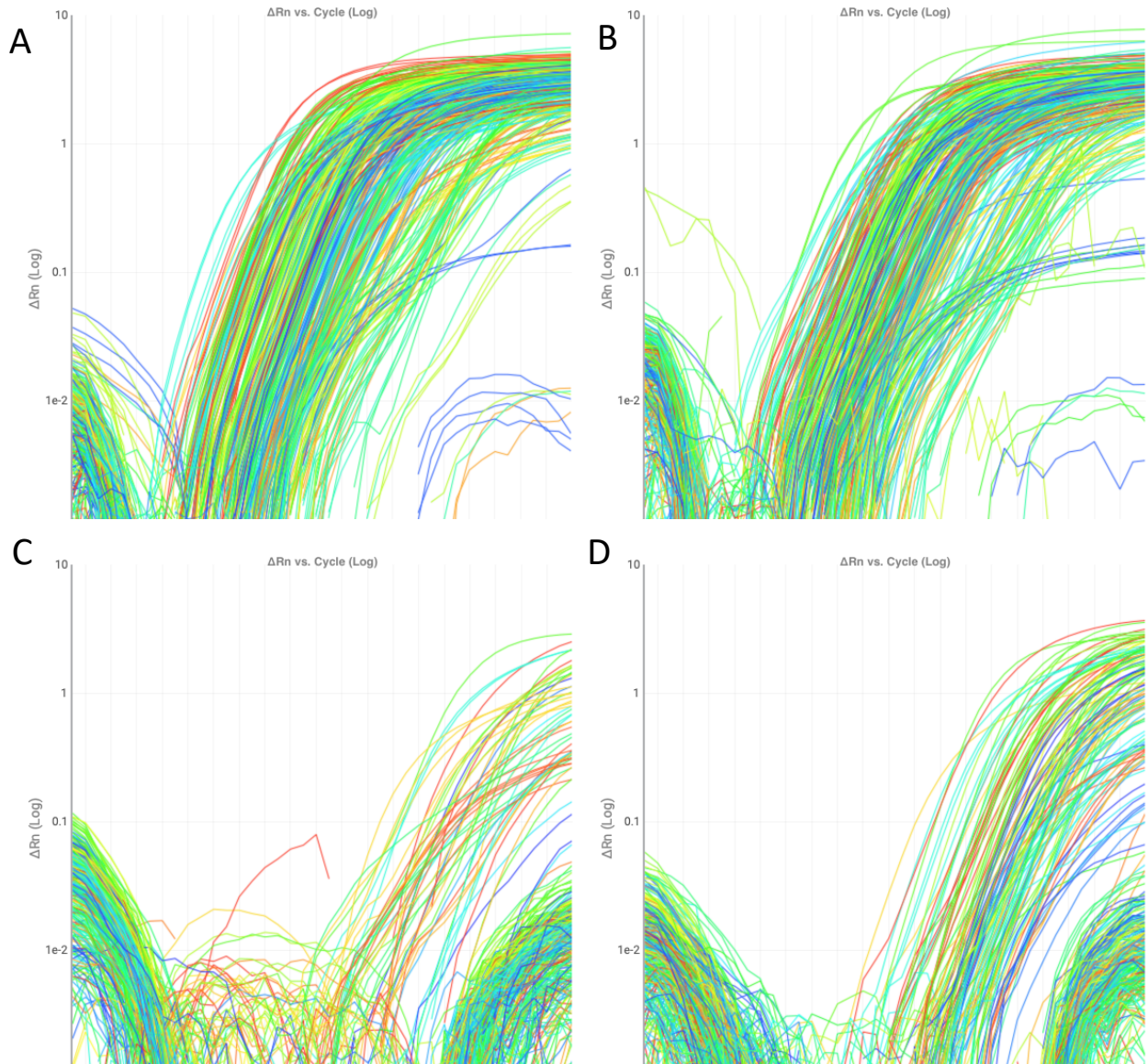
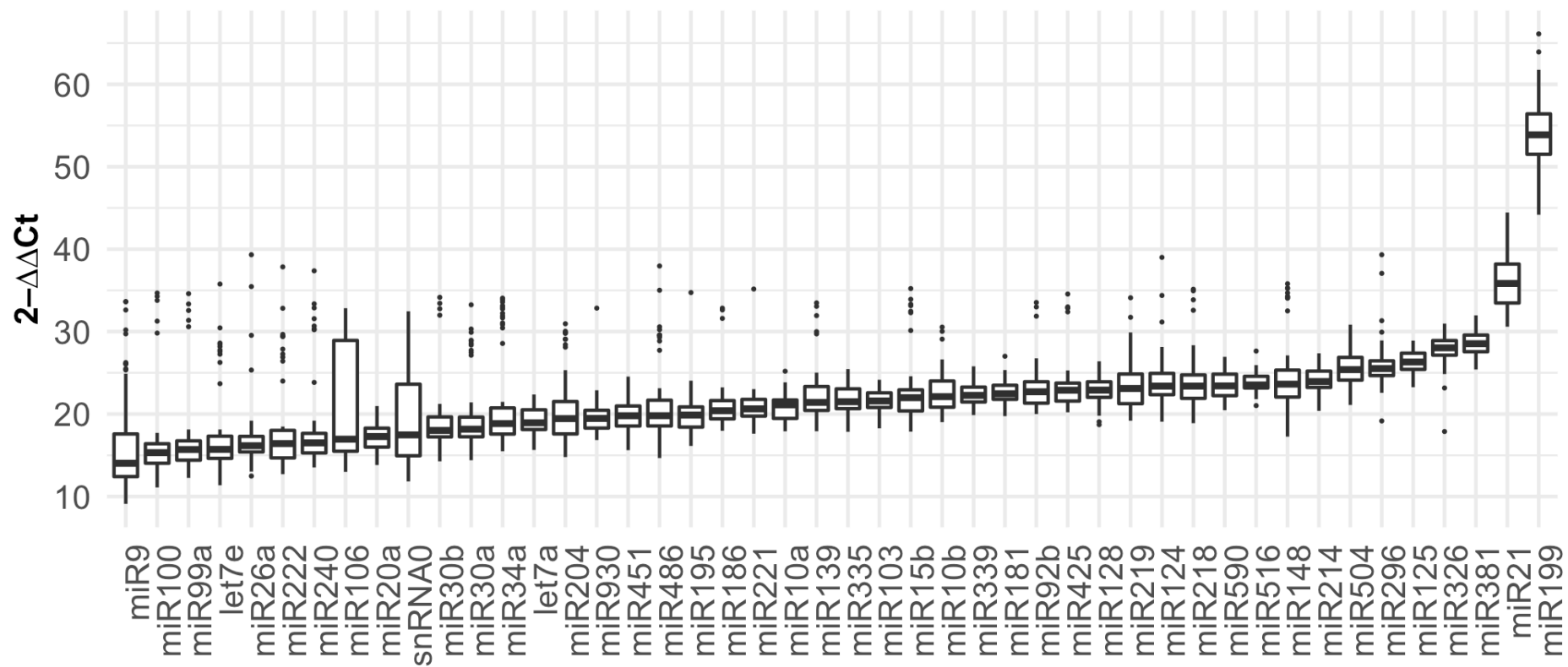
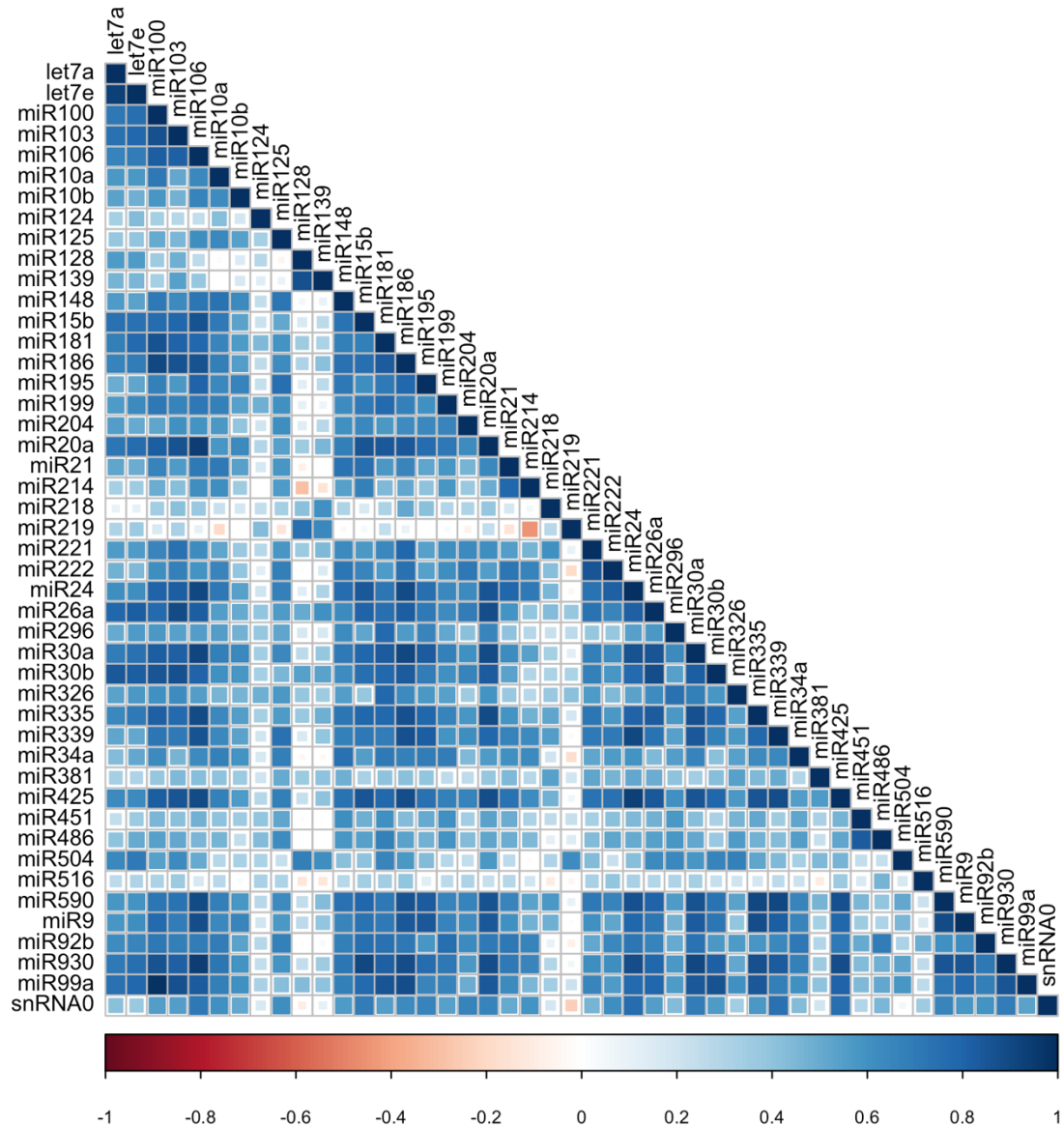


Figura 9 – Gráfico de caixas mostrando o nível de expressão dos 47 miRNAs analisados na coorte HCRP. Os valores apresentados no eixo y são derivados dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. É possível identificar quais são os miRNAs menos e mais expressos na coorte investigada.



Posteriormente, avaliamos a correlação da expressão de todos os miRNAs analisados na coorte HCRP. Foi possível identificar uma correlação significativa e positiva na expressão de grande parte dos miRNA avaliados. No entanto, observamos que a expressão de miR-214 se correlacionou negativamente com a expressão de miR-219. Além disso, a expressão de miR-214 apresentou uma correlação negativa com a expressão de miR-128 e miR-139. Por fim, miR-219 apresentou uma correlação negativa com miR-10a (Figura 10).

Figura 10 – *Plot* de correlação entre os 47 miRNAs avaliados na coorte HCRP. Valores em azul indicam correlações positivas entre miRNAs ao passo que valores em vermelho indicam correlações negativas. Valores de correlação derivados do teste de Spearman. A maior parte das correlações foram significativas ($P < 0,05$), exceto para miR-124, miR128, miR139, miR219, miR381 e miR516 – tais miRNAs apresentaram valores de correlação inferiores aos demais.



4.3.1 Correlação entre a expressão de miRNAs e dados clínicos e moleculares da coorte HCRP

Para identificar a presença de *clusters* entre miRNAs diferencialmente expressos, geramos um *Heatmap* com os dados clínicos da coorte HCRP, como recorrência de doença, sobrevida global e também dados de alterações moleculares dos tumores investigados, como mutações em *IDH* e *ATRX* (figura 11).

O *Heatmap* gerado não evidenciou nenhum *cluster* de miRNAs associado a parâmetros clínicos e moleculares dos tumores investigados (figura 11). Posteriormente, geramos *boxplots* para identificar o efeito isolado de cada parâmetro clínico e moléculas sobre a expressão dos miRNAs investigados.

A mediana do valor de expressão de cada miRNA não foi diferente entre tumores de pacientes que evoluíram a óbito (Figura 12). Em contraste, observamos que tumores recorrentes apresentaram uma redução significativa na expressão de miR-10b (Figura 13). Em relação às alterações genômicas nos tumores, foi possível identificar uma redução significativa nos miRNAs snRNA e miR-516 em tumores que apresentavam mutações em *IDHI* R132H (Figura 14). Não encontramos alterações significativas na expressão dos miRNAs investigados em tumores com e sem mutações em *IDHI* W09 e *ATRX* (Figura 15 e Figura 16, respectivamente).

Figura 11 – *Heatmap* correlacionando dados de expressão dos 47 miRNAs investigados, dados clínicos de pacientes e alterações genômicas presentes em tumores da coorte HCRP. Linhas mostram cada um dos miRNAs e colunas mostram amostras. Valores em azul e vermelho indicam expressão inferior e superior, respectivamente. Não foi possível identificar nenhum *cluster* de miRNAs diferencialmente expressos entre subtipos moleculares de GBM e dados clínicos dos pacientes.

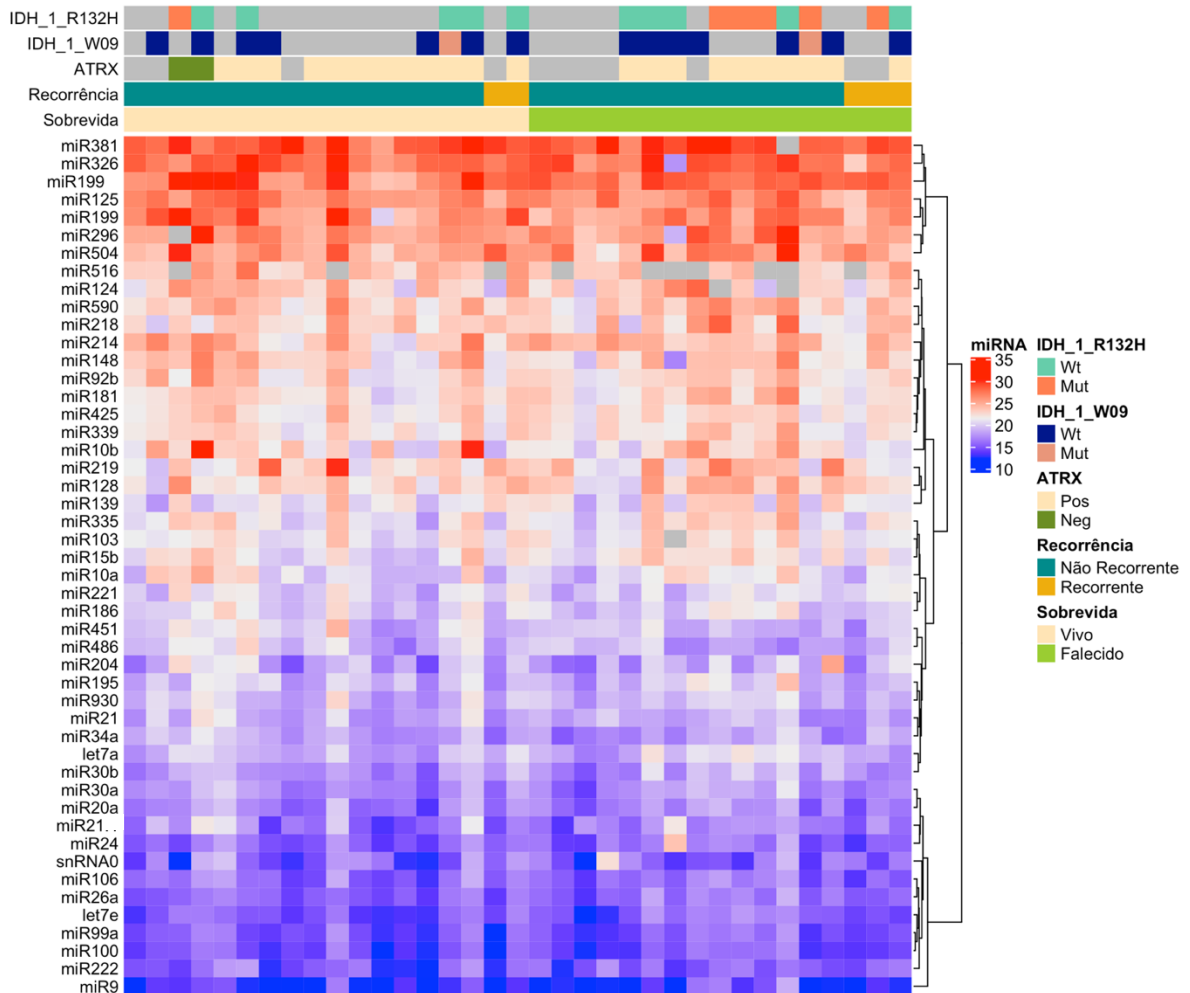


Figura 12 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com a sobrevida global de pacientes. Caixas verdes indicam pacientes vivos após a finalização deste estudo, ao passo que caixas rosas indicam que os pacientes evoluíram a óbito em decorrência do tumor maligno. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01.

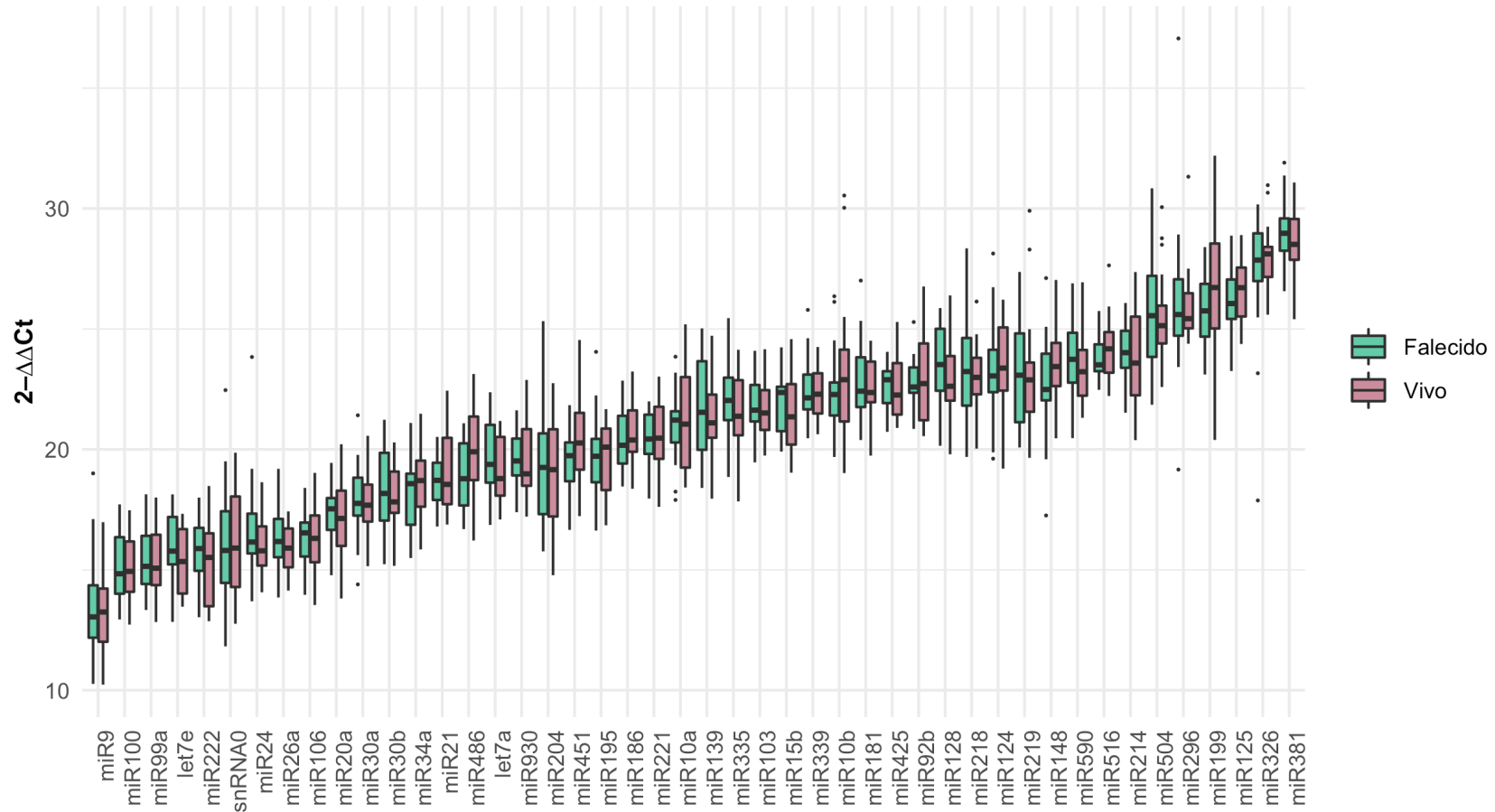


Figura 13 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com a recorrência de pacientes. Caixas verdes indicam pacientes que não apresentaram recidiva de doença após a finalização deste estudo, ao passo que caixas rosas indicam que os pacientes apresentaram recidiva. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01.

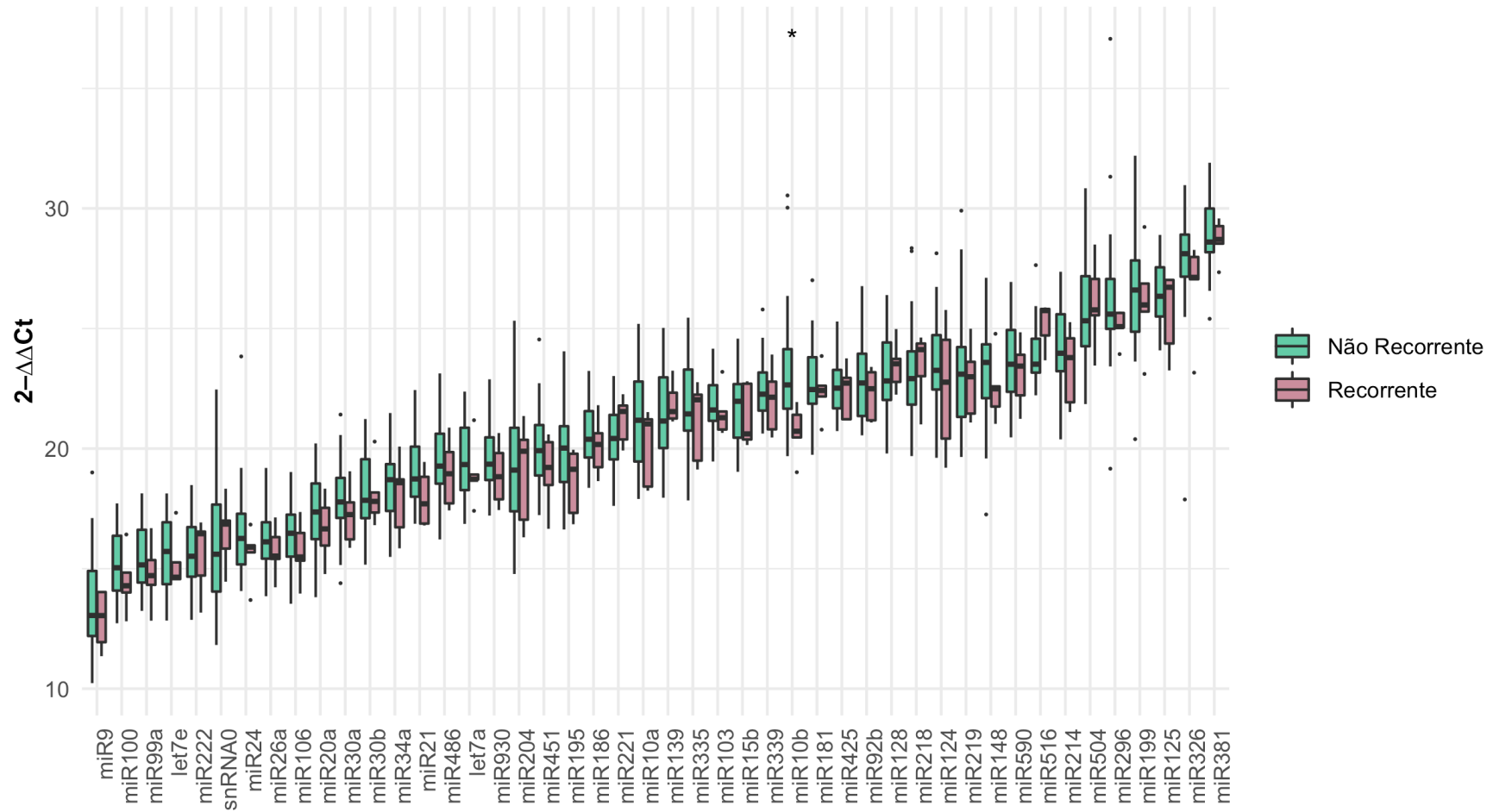


Figura 14. Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em IDH1. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com IDH1 selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01.

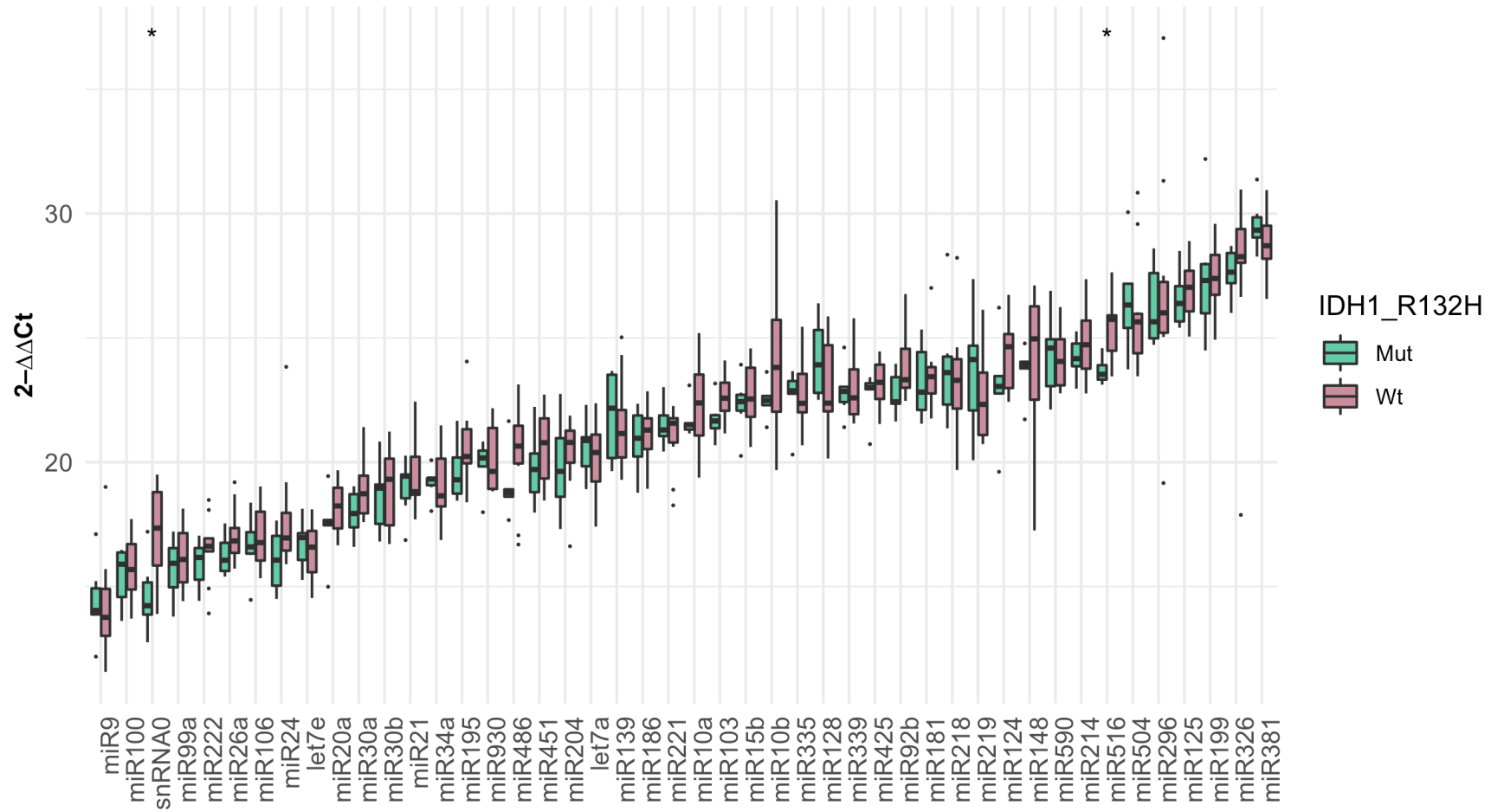


Figura 15 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em IDH1 W09. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com IDH1 W09 selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. *P<0,05. **P<0,01.

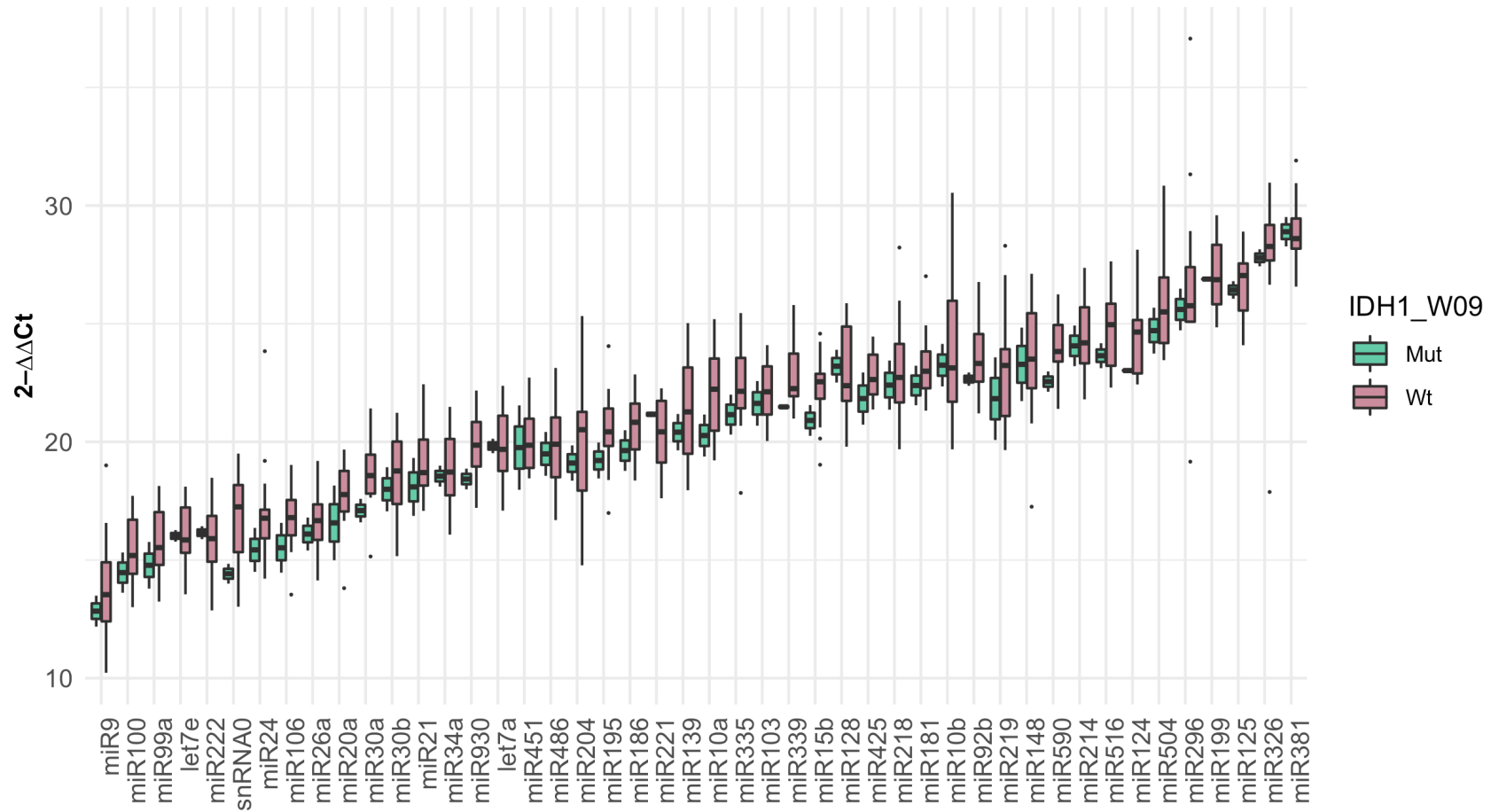
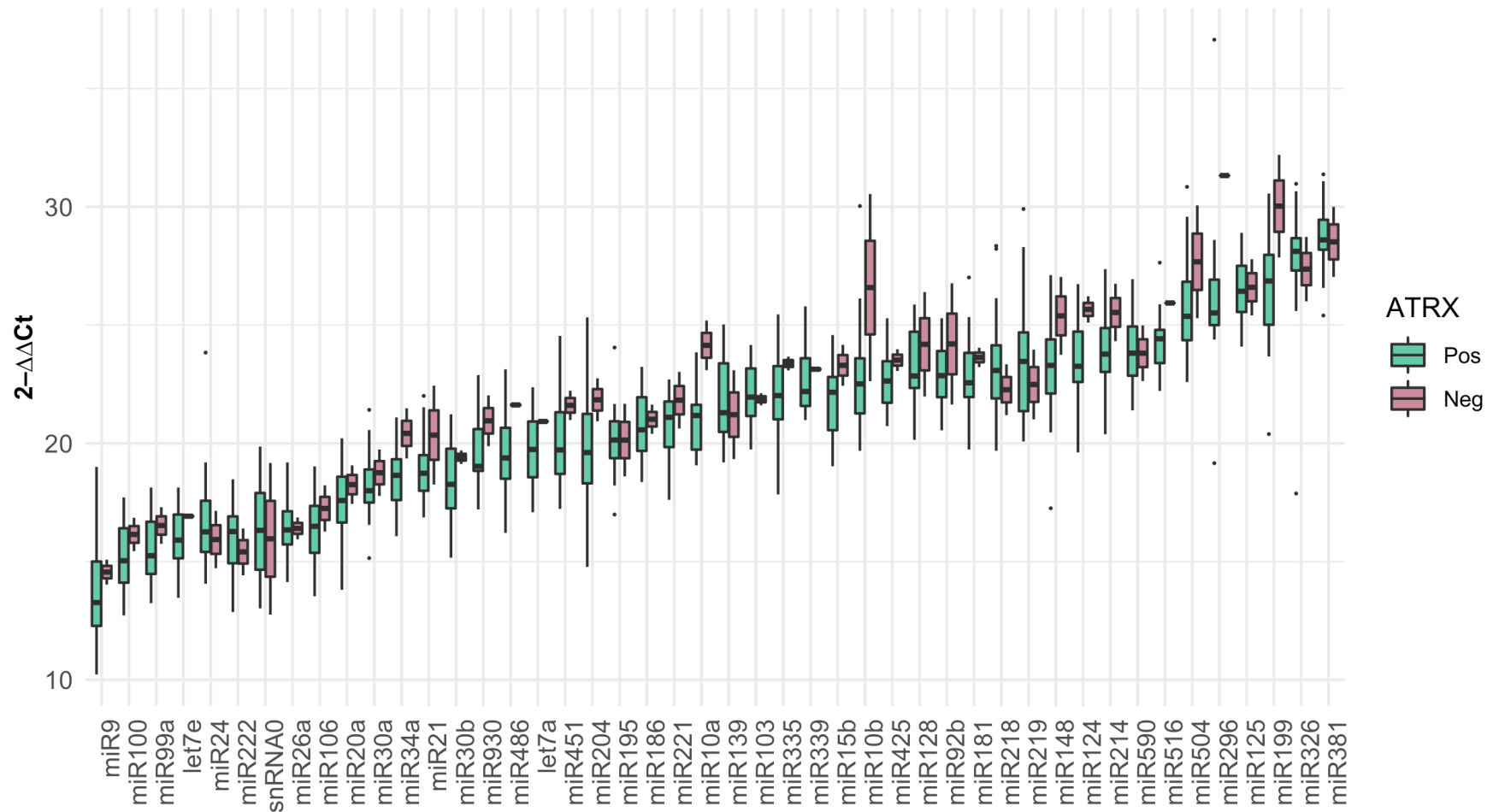


Figura 16 – Gráfico de caixas mostrando a expressão de cada um dos 47 miRNAs investigados na coorte HCRP e a sua associação com mutações em ATRX. Caixas verdes indicam tumores que possuem a mutação; caixas rosas mostram tumores com ATRX selvagem. Resultados mostram resultados do teste de Wilcoxon. Pode-se identificar um aumento não estatisticamente significativo na expressão de diversos miRNAs em tumores com ATRX mutado. *P<0,05. **P<0,01.



4.3.2 Efeito prognóstico dos miRNAs na coorte HCRP

Para identificar o efeito prognóstico da expressão dos miRNAs investigados, conduzimos testes de regressão de Cox univariados para cada um dos miRNAs investigados. Na análise de recorrência de doença, observamos que os miRNAs miR-99a ($p=0,013$; *Hazard Ratio* [HR]=1,2; Intervalo de Confiança [CI]=1-1,2), miR-9 ($p=0,016$; HR=1,1; CI=1-1,2) e miR-221 ($p=0,01$; HR=1,3; CI=1,1-1,6) mostraram efeito preditor significativo para este parâmetro clínico (Figura 17). Outros miRNAs apresentaram uma tendência próxima à significância para a predição de recorrência de doença, como miR-30b ($p=0,072$), miR-100 ($p=0,058$), miR-30a ($p=0,056$), miR-139 ($p=0,053$) e miR-425 ($p=0,076$) (Figura 18).

Com relação à sobrevida global, observamos que os miRNAs let-7e ($p<0,0001$; HR=1,1; CI=1-1,2), miR-124 ($p=0,02$; HR=1,1; CI=1-1,3) e miR-24 ($p=0,033$; HR=1,1; CI=1-1,1) mostraram uma relação significativa para a predição de morte decorrente de doença (Figura 19). Observamos uma tendência próxima à significância para a predição de morte decorrente de doença para os seguintes miRNAs: miR-30a ($p=0,073$) e miR-100 ($p=0,089$).

Figura 17 – Resultados da regressão de Cox univariada para a expressão de miRNAs e predição de recidiva de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos *forest plots*. O valor de *Hazard ratio* está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança.

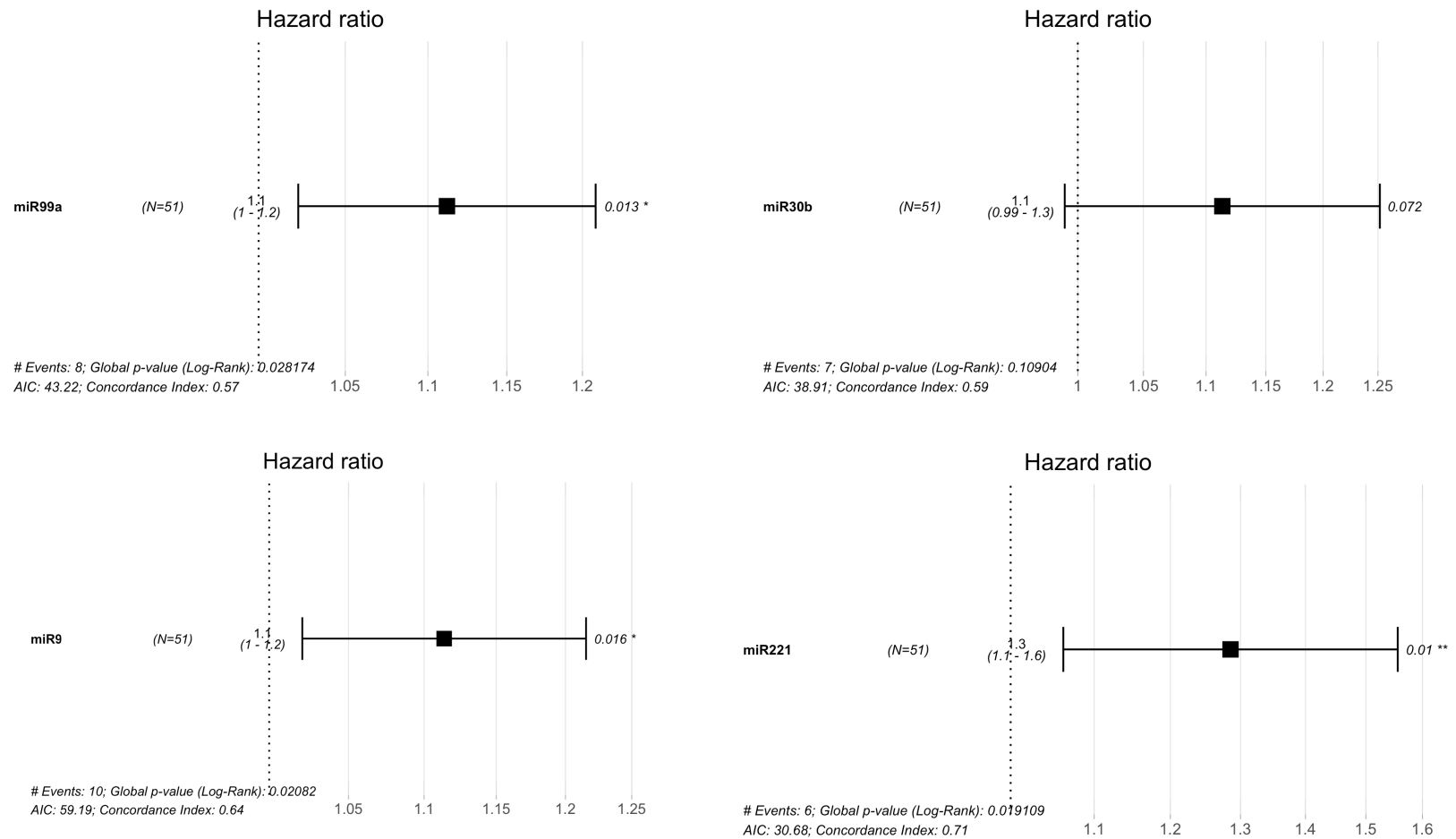


Figura 18 – Resultados da regressão de Cox univariada para a expressão de miRNAs e predição de recidiva de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos *forest plots*. O valor de *Hazard ratio* está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança.

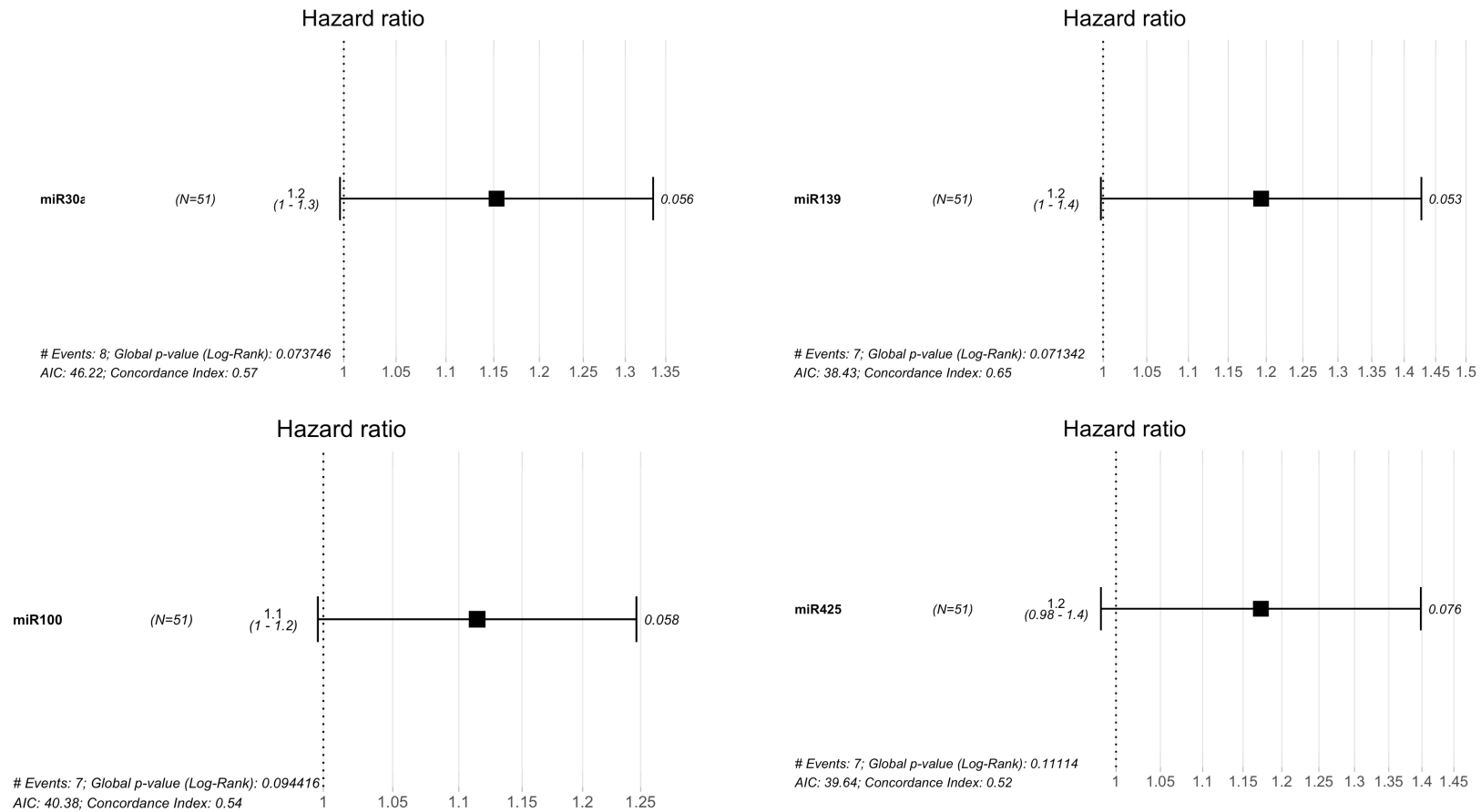
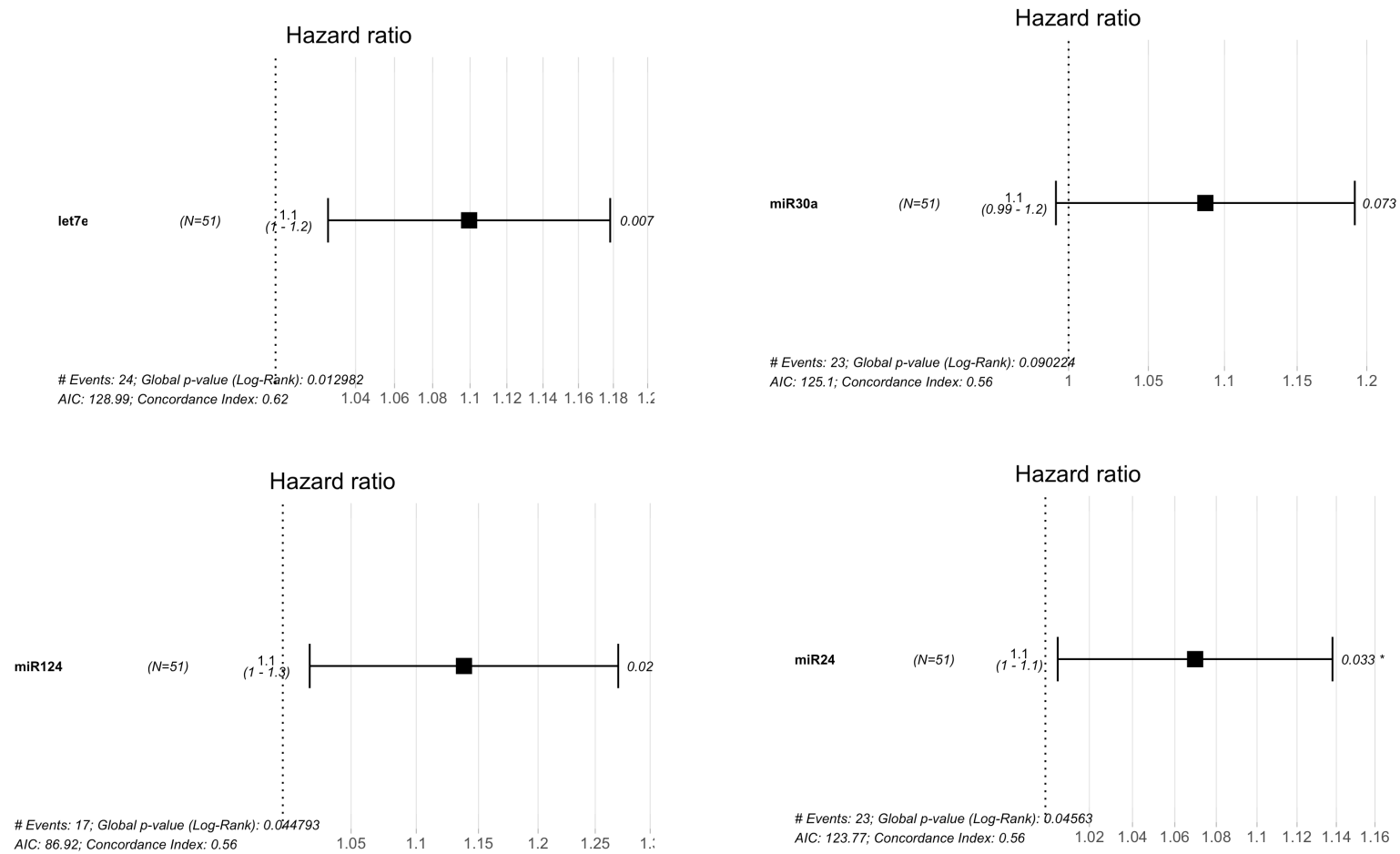


Figura 19 – Resultados da regressão de Cox univariada para a predição de morte decorrente de doença. O número amostral está indicado para cada comparação (N). Valores de P estão indicados à direita de cada um dos *forest plots*. O valor de *Hazard ratio* está indicado no canto esquerdo de cada gráfico, juntamente com os valores do intervalo de confiança.



4.3.3. Análise dos alvos dos miRNAs investigados e enriquecimento de vias

Para identificar se o efeito prognóstico dos miRNAs descritos possui relação com a expressão de genes cruciais para o desenvolvimento de tumores, caracterizamos os genes-alvo dos miRNAs associados com a recidiva de doença e morte. Foi possível observar que, dos seis miRNAs associados com a recidiva de doença e morte, quatro deles têm como alvo genes associados à proliferação celular, morte celular e apoptose (*e.g.*, *mTOR*, *FGFR3*, *KIT*, *FOXO3* e *CDKN1B*). Além disso, observamos que alguns miRNAs atuam em genes específicos para o desenvolvimento do SNC, como miR-124 e seu alvo *EFNB1* (Figura 20 e Figura 21). Os miRNAs miR-30, miR-24, miR-139 e miR-425 não apresentaram alvos com evidência significativa como resultado dos métodos de validação. Portanto, apenas os resultados dos miRNAs miR-99a, miR-221, miR-124 e let-7e foram apresentados.

Figura 20 – miRNAs associados a recidiva de doença e seus alvos obtidos pela plataforma miRTarBase. A coluna ID mostra o número de identificação do miRNA de estudo, ao passo que a coluna miRNA mostra o nome do miRNA-alvo. A coluna Target indica os genes-alvo do miRNA em questão. Além disso, são mostrados os níveis de validação da associação do miRNA e gene-alvo. Na coluna de evidências, em vermelho, encontram-se técnicas de validação mais robustas; em verde, técnicas de validação menos robustas. A maioria dos miRNAs e seus genes-alvo analisados possuem relações bem estabelecidas na literatura, como mostrado pelo número de artigos publicados indicando tais relações (coluna # of papers).

ID 	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT002306	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-99a-5p	RAVER2	✓	✓						3	1
MIRT004243	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-99a-5p	FGFR3	✓	✓	✓					4	3
MIRT005973	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-99a-5p	SERPINE1	✓							1	1
MIRT006145	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-99a-5p	IGF1R	✓	✓	✓					4	7
MIRT006146	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-99a-5p	MTOR	✓	✓	✓	✓	✓			6	17

ID 	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT000137	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-221-3p	CDKN1B	✓	✓	✓	✓	✓			6	30
MIRT000140	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-221-3p	BCL2L11	✓	✓	✓		✓			5	5
MIRT000141	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-221-3p	BMF	✓	✓	✓					4	1
MIRT000434	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-221-3p	FOXO3	✓	✓	✓					4	1
MIRT001780	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-221-3p	KIT	✓	✓	✓	✓				5	12

Figura 21 – miRNAs associados a sobrevida de pacientes com GBM e seus alvos obtidos pela plataforma miRTarBase. A coluna Target indica os genes-alvo do miRNA em questão. Além disso, são mostrados os níveis de validação da associação do miRNA e gene-alvo. Na coluna de evidências, em vermelho, encontram-se técnicas de validação mais robustas; em verde, técnicas de validação menos robustas. A maioria dos miRNAs e seus genes-alvo analisados possuem relações bem estabelecidas na literatura, como mostrado pelo número de artigos publicados indicando tais relações (coluna # of papers).

ID 	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT000360	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-124-3p	SOX9					✓		✓	2	3
MIRT000362	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-124-3p	BDNF	✓						✓	2	2
MIRT000478	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-124-3p	EFNB1	✓	✓	✓				✓	4	1
MIRT001168	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-124-3p	NR3C2	✓		✓				✓	3	1
MIRT001825	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-124-3p	BACE1	✓						✓	2	1
ID 	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT002081	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-let-7e-5p	HMGA2	✓		✓		✓		✓	4	4
MIRT003932	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-let-7e-5p	EIF3J	✓						✓	2	1
MIRT004469	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-let-7e-5p	SMC1A	✓				✓		✓	3	5
MIRT005718	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-let-7e-5p	WNT1	✓		✓	✓			✓	4	1
MIRT006122	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-let-7e-5p	CCND1	✓	✓	✓		✓			4	4

Para identificar quais são as vias atuantes de cada um dos miRNAs, realizamos uma análise de enriquecimento com os 5 genes-alvo observados através da plataforma miRTarBase. Tal seleção se restringiu aos top 5 genes-alvo dadas as condições de evidência mais elevadas para esse grupo de genes. A Figura 22 mostra a relação funcional entre os genes-alvos dos miRNAs caracterizados pela plataforma miRTarBase.

Posteriormente, a análise de enriquecimento pelo *Gene Ontology* mostrou que as vias mais significativamente alterada foram as relacionadas a apoptose e ciclo celular, uma vez que muitos miRNAs possuem supressores tumorais e oncogenes como alvo (Tabela 6). Apenas os alvos dos miRNAs miR-221, miR-99a e let-7e apresentaram vias enriquecidas.

Figura 22 – Relação funcional entre os genes-alvos definidos pela análise dos miRNAs através da plataforma miRTarBase. A relação funcional dos genes investigados não foi evidente, exceto para miR-221, que mostra que seus alvos *FOXO3* e *BCL2L11* interagem significativamente com *CDKN1B* e *KIT*. Vias geradas através da plataforma String.db (string-db.org).

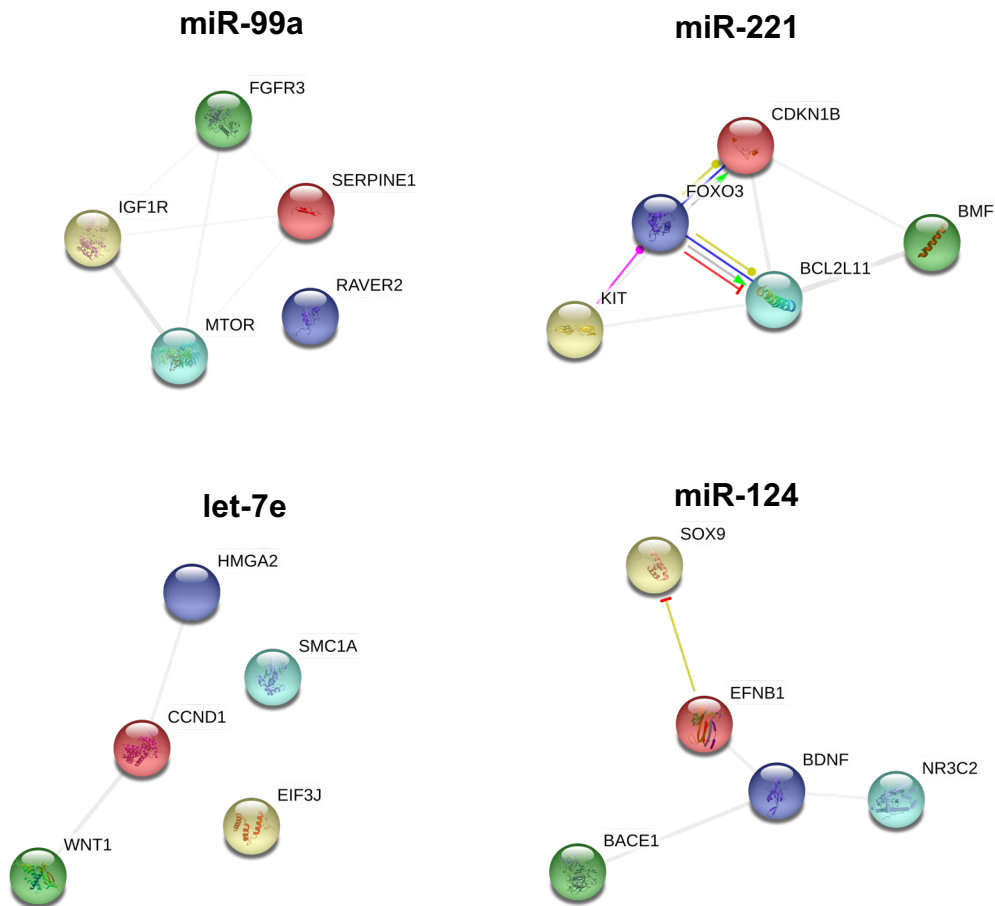


Tabela 6 – Vias enriquecidas para os genes-alvo de cada um dos miRNAs com papel significativo na predição de recidiva de doença e óbito.

ID	Via de sinalização	Nº de genes observados	Nº genes na via	FDR
miR-221 (FGFR3, SERPINE1, IGF1R, RAVR2 e MTOR)				
GO:0001844	Proteína de inserção da membrana mitochondrial envolvida na via apoptótica	2	7	0,00041
GO:0012501	Apoptose	5	1042	0,00041
GO:0032464	Regulação positive homooligomerização protéica	2	10	0,00041
GO:0043067	Regulação da apoptose	5	1516	0,00041
GO:0044089	Regulação positiva da biogênese celular	4	498	0,00041
let-7e (HMGA2, SMCIA, CCND1, WNT1 e EIF3J)				
GO:0006974	Resposta celular ao dano de DNA	4	749	0,0075
GO:0010948	Regulação negativa do ciclo celular	3	273	0,0075
GO:0090344	Regulação da senescência celular	2	23	0,0075
GO:0001889	Desenvolvimento do fígado	2	123	0,0209
GO:0007346	Regulação do ciclo mitótico	3	608	0,0209
miR-99a (CDKN1B, FOXO3, KIT, BCL2L11 e BMF)				
GO:0046777	Autofosforilação protéica	3	198	0,0095
GO:1904036	Regulação negativa da apoptose de células epiteliais	2	38	0,0182
GO:0007569	Senescência celular	2	66	0,0215
GO:0030335	Regulador positive da migração celular	3	452	0,0215
GO:0090303	Regulação positiva da cicatrização	2	51	0,0215

Valores de FDR (*False Discovery rate*) indicam que o enriquecimento dos genes foi significativo quando comparado com o número de proteínas da via. Destaca-se que as principais vias associadas à apoptose e ciclo celular se apresentaram enriquecidas para os três miRNAs investigados.

5. Discussão

Neste estudo, identificamos que subtipos moleculares de GBM apresentam também um perfil diferencial na expressão de miRNAs. Além disso, identificamos que diversos miRNAs apresentam-se hiperexpressos em tumores de GBM. Por fim, nossos resultados mostraram que os miRNAs miR-99a, miR-221, miR-9, miR-124, miR-24 e let-7a possuem potencial prognóstico, uma vez que foram significativamente associados a uma maior agressividade de doença determinada por recidiva e morte.

Através da nossa investigação *in silico*, pudemos mapear o perfil de expressão de miRNAs em uma coorte de 606 tumores GBM. Tal avaliação se mostrou efetiva e com potencial para distinguir os subtipos GBM-like, Mesenchymal e Classical, uma vez que diversos miRNAs foram diferencialmente expressos na comparação entre esses grupos de tumores. Note-se que tais subtipos foram previamente definidos a partir de assinaturas de expressão gênica (VERHAAK et al., 2010). No entanto, os autores desse estudo não investigaram os efeitos e correlações presentes entre cada um dos subtipos de GBM com a expressão de miRNAs. Portanto, pode-se afirmar que a investigação do perfil de expressão de miRNAs pode contribuir para a diferenciação desses subtipos tumorais – uma vez que encontramos 25 miRNAs diferencialmente expressos na comparação *GBM-like* e *Classical*.

O subtipo *Classical* é definido por apresentar uma maior resposta à terapia. Tais tumores apresentam ampliações no cromossomo 7 e perdas de regiões do cromossomo 10 – inclusive, 100% dos tumores *Classical* apresentam tais alterações cromossômicas. Além disso, esses tumores apresentam um aumento da expressão do gene EGFR. Importaneamente, observamos que o miRNA miR-99a encontrou-se hiperexpresso no grupo *Classical*. miR-99a regula diretamente o eixo *FGFR3-EGFR*, portanto, pode-se especular que esse miRNA possa ter relação com o aumento significativo da expressão de *EGFR* em tumores *Classical* (PARKER et al., 2013).

Em adição à análise de miRNAs diferencialmente expressos por subtipos de tumores, não encontramos miRNAs diferencialmente expressos quando comparamos tumores de pacientes que evoluíram a óbito *versus* pacientes ainda vivos. Essa observação, no entanto, se deve ao tipo de análise conduzida, pois não consideramos o tempo para ocorrência dos eventos neste modelo. Por outro lado, diversos estudos mostram relações significativas entre miRNAs e sobrevida (SRINIVASAN; PATRIC; SOMASUNDARAM, 2011; SATHYAN et al., 2015), como observamos através do modelo de Regressão de Cox descrito abaixo. Em resumo,

observamos que existem miRNAs que podem ser relevantes para diferenciar tumores GBM mais agressivos, bem como podem ser úteis para o prognóstico através de biópsias menos invasivas. Nesse caso, incluem as biópsias líquidas (sangue e urina), que consistentemente apresentam resultados na definição de perfis tumorais sem a necessidade de biópsia tecidual (CROWLEY et al., 2013; SANTIAGO-DIEPPA et al., 2014; SHANKAR et al., 2017).

Na coorte HCRP, identificamos cinco miRNAs altamente expressos: miR-199, miR-21, miR-381, miR-326 e miR-125. Tais miRNAs também podem contribuir para o prognóstico e estratificação de doença. Por exemplo, o miRNA miR-199 no plasma foi identificado como hipoexpresso em pacientes diagnosticados com glioma (SHEN et al., 2015) – observação esta contrária às nossas. No entanto, os autores do estudo identificaram que miR-199 possui potencial prognóstico para diferenciar pacientes com tumores quando comparado com pacientes sem a doença. Em tumores de cabeça e pescoço, a expressão de miR-199 foi capaz de inibir a migração de células tumorais (KOSHIZUKA et al., 2017). Tal observação sugere que a hiperexpressão de miR-199 pode impedir o crescimento tumoral, e portanto leva a um melhor prognóstico para pacientes. No entanto, isso não foi observado na nossa coorte.

Também identificamos que o miRNA miR-21 se apresentou altamente expresso na coorte HCRP. miR-21 é um miRNA bastante estudado e sua hiperexpressão resulta na desregulação de diversas vias de sinalização, como as mediadas por p53, TGF- β e vias de apoptose mitocondriais (COSTA et al., 2013; LIU et al., 2015). Além do seu efeito antiapoptótico, miR-21 regula a expressão do gene supressor tumoral PTEN, que controla diversas vias intracelulares, como ciclo celular, apoptose, estabilidade genômica e, mais recentemente descrito, também tem efeito na resposta imune anti-tumoral (LI et al., 2015; PULIDO, 2015; CAO et al., 2018). O aumento da expressão de miR-21 leva a uma redução da expressão de *PTEN*, que, portanto, desencadeia a ativação da via PI3K-AKT (ZHOU et al., 2010). Com isso, as células passam a se dividir com maior frequência, além de também acumularem mais mutações e alterações cromossômicas, pois PTEN regula a estabilidade cromossômica (PUC et al., 2005; FENG et al., 2015; MURPHY et al., 2016). Em adição ao efeito sob PTEN, miR-21 também regula 169 genes relacionados ao ciclo celular e sinalização intracelular (ZHOU et al., 2010). Portanto, esse miRNA possui um papel crucial para o desenvolvimento e progressão tumorais.

O miRNA miR-381 apresentou-se como hiperexpresso quando comparado a outros miRNAs investigados. O miR-381 regula negativamente a expressão de LRRC4 em gliomas, levando a proliferação de células de glioma (TANG et al., 2011). Tal associação tem relação com uma menor inibição das vias MEK/ERK e AKT, que regulam diretamente o ciclo celular.

Ademais, estudos realizados com linhagens celulares de GBM mostraram que miR-381 é crucial para a resistência à temozolomida em GBM (WANG et al., 2015b). Esse miRNA atua diretamente no gene *NEFL*; portanto, a inibição seletiva de miR-381 ou a desinibição de *NEFL* em gliomas pode contribuir para a resposta à temozolomida.

O miR-326 também foi um miRNA que apresentou elevada expressão quando comparado aos outros miRNAs investigados. A hipoexpressão de miR-326 possui relevância prognóstica para pacientes com gliomas (WANG et al., 2013). Esse estudo mostrou que a expressão de miR-326 é inferior em glioma quando comparado a cérebro normal. Em glioblastoma, a elevada expressão de miR-326 foi associada a um pior prognóstico; observação esta contrária ao observado em gliomas em geral.

Por fim, o miRNA miR-125, que se encontra altamente expresso em GBM, também possui relação com a progressão tumoral. Ensaios experimentais mostraram que let-7a e miR-125 interagem e regulam genes de uma mesma via, como os da cascata JAK-STAT (SHENOY; DANIAL; BLELLOCH, 2015). Desse modo, ambos os miRNAs possuem capacidade de regular o processo de gênese de astrócitos. Em GBM, miR-125 atua como um oncogene e regula a apoptose através de p53 e p38MAPK (WU et al., 2013). Portanto, maiores níveis de expressão desse miRNA estão associados a um maior grau de malignidade de gliomas. Nesse estudo, o *knockdown* de miR-125 inibiu a proliferação celular e promoveu apoptose. Desse modo, miR-125 também pode contribuir para a definição do quadro clínico de pacientes após a cirurgia de ressecção total do tumor. Dadas as condições amostrais deste estudo, não foi possível determinar o papel prognóstico da combinação dos miRNAs miR-199, miR-21, miR-381, miR-326 e miR-125. No entanto, essa limitação pode ser testada em outros estudos.

Nosso estudo possui limitações no número de amostras avaliadas e de miRNAs investigados. O número amostral da coorte experimental também possui um valor reduzido, dadas as falhas experimentais no método TLDA. Dessa maneira, sugere-se que estudos com maiores grupos amostrais sejam realizados a fim de validar os achados desta pesquisa. Além disso, ensaios clínicos e experimentais, como os com linhagens celulares, precisam ser conduzidos para validar os resultados obtidos pelo nosso estudo.

A análise de correlação da expressão de todos miRNAs mostrou que eles são coexpressos em tumores GBM. Tal observação pode indicar que 1) a seleção dos miRNAs baseada na análise *in silico* possui viés, pois selecionamos miRNAs altamente expressos em GBM, ou 2) os miRNAs investigados interagem em vias-alvo e, portanto, são positivamente correlacionados. Uma vez que assinaturas gênicas são importantes para determinar o perfil clínico de pacientes diagnosticados com GBM, é possível elaborar assinaturas de expressão de

miRNAs que possuem potencial prognóstico (BAO et al., 2013). Por exemplo, a combinação de dez miRNAs gerou uma assinatura que permite identificar pacientes que terão sobrevidas diferentes (SRINIVASAN; PATRIC; SOMASUNDARAM, 2011).

Ao analisarmos a expressão e distribuição global de miRNAs na coorte HCRP, observamos que não houve a diferenciação em *clusters*, como observado na coorte TCGA. Isso pode ser em decorrência de uma maior homogeneidade do grupo amostral, bem como a uma seleção de miRNAs que apresentou correlação altamente positiva. Desse modo, a diferenciação dos tumores em grupos distintos não foi observável. Além disso, a coorte HCRP é composta exclusivamente de tumores GBM-like. Portanto, as diferenças observadas na coorte TCGA não foram evidentes, pois elas se basearam primariamente na diferenciação de subtipos moleculares de GBM.

Ao analisar o perfil molecular da coorte HCRP, não identificamos relações significativas entre a expressão de miRNAs e mutações em genes críticos para o diagnóstico de GBM. Por exemplo, a única associação significativa encontrada foi a do miR-516 e mutações em IDH1 R132H. Atualmente, na literatura, não existem estudos que descrevam a relação entre tal mutação e a expressão de miR-516. Desse modo, sugere-se que estudos de validação sejam conduzidos para identificar se tal relação se mantém positiva e se há potencial de uso clínico. Além disso, a função de miR-516 ainda se encontra pouco clara em GBM.

A análise de sobrevida na coorte HCRP mostrou que três miRNAs estão associados à recidiva de doença, ao passo que outros três foram associados à sobrevida global. O miR-99a foi um dos miRNAs com capacidade de predizer a ocorrência de recidiva de doença. Esse miRNA pertence a uma família de outros RNAs com potencial prognóstico, pois regulam diversos processos de migração celular e invasão (PARKER et al., 2013). Ademais, miR-221, que se apresentou significativamente associado a recidiva de doença, regula a apoptose através do silenciamento do mRNA do gene PUMA (ZHANG et al., 2010), uma proteína pró-apoptótica. Por fim, miR-9, outro miRNA com poder preditor de recidiva de doença, possui um efeito crucial no controle da progressão de tumores GBM (NASS et al., 2009). Esse miRNA regula diretamente a via p38, que é um potencial alvo para o tratamento de diversos tipos tumorais (BEN-HAMO; EFRONI, 2011).

Ao considerar o efeito na sobrevida, observamos que a hipoexpressão de miR-124 e let-7a se mostrou significativamente associada à morte decorrente de GBM. O miR-124 tem como alvo o mRNA de SCP1, uma proteína que inibe a proliferação de células neurais (VISVANATHAN et al., 2007b). Além disso, let-7a é significativamente correlacionado à ocorrência e desenvolvimento de tumores malignos, pois regula vias oncogênicas em diversos

tipos tumorais (WANG et al., 2015a). Em pacientes com a síndrome mielodisplásica, a hipoexpressão de let-7a foi inferior em pacientes quando comparados com controles normais (ZUO et al., 2011). Em adição, os autores observaram que let-7a possui um efeito significativo na predição de morte decorrente de doença. Em tumores de pulmão, a hipoexpressão de let-7 inibiu o crescimento celular *in vitro* (KUMAR et al., 2008). Desse modo, pode-se afirmar que a expressão de let-7a é relevante para distinguir pacientes com doenças menos agressivas daqueles com doenças mais agressivas. Importaneamente, nossas análises focaram em regressões de Cox univariadas, pois o número amostral da nossa coorte de estudo é reduzido e o número de eventos de recidiva e morte não é suficiente para comportar modelos multivariados. Dessa maneira, novos estudos são necessários para avaliar o papel clínico dos miRNAs em destaque.

Ao analisar os alvos dos miRNAs significativamente associados com parâmetros clínicos, observamos que a maior parte dos mRNAs-alvo regulam genes que fazem parte de vias reguladoras de proliferação celular, apoptose e invasão. Dentre eles, a regulação da via PI3K-AKT-mTOR é relevante, pois a hiperativação dessa cascata é estabelecida na literatura como uma das mais relevantes para a progressão tumoral (EL-HABR et al., 2014).

Em resumo, nosso estudo mostrou que 1) tumores GBM podem ser diferenciados a partir da expressão diferencial de miRNAs, 2) miR-516 possui associação com mutações IDH1 R132H e 3) os miRNAs miR-99a, miR-221, miR-9, miR-124, miR-24 e let-7a possuem potencial prognóstico para GBM.

6. Conclusões

GBM é um tumor maligno que apresenta grande heterogeneidade molecular e clínica, de modo que o tratamento dessa doença é pouco efetivo para a maioria dos pacientes. Identificar novos marcadores moleculares pode ajudar no processo de decisão clínica, bem como na distinção de tumores mais agressivos de menos agressivos. Nosso estudo mostrou que alguns miRNAs podem ser facilmente mensuráveis a partir de tecidos tumorais e usados para determinar quais pacientes podem ou não evoluir a óbito. Deste modo, após futuras validações, espera-se que o uso de biomarcadores prognósticos para GBM sejam incorporados à prática clínica.

7. Referências

- ALDAPE, K. et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 6, p. 829–848, 6 jun. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1432-1>. Acesso em: set. 2019.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63–82, ago. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725815000960>. Acesso em: set. 2019.
- BAO, Z.-S. et al. Whole-Genome mRNA Expression Profiling Identifies Functional and Prognostic Signatures in Patients with Mesenchymal Glioblastoma Multiforme. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, n. 9, p. 714–720, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/cns.12118>. Acesso em: set. 2019.
- BEN-HAMO, R.; EFRONI, S. Gene expression and network-based analysis reveals a novel role for hsa-miR-9 and drug control over the p38 network in glioblastoma multiforme progression. **Genome Medicine**, v. 3, n. 11, p. 77, 2011. Disponível em: <http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm293>. Acesso em: set. 2019.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CAO, Y. et al. PTEN-L promotes type I interferon responses and antiviral immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 15, n. 1, p. 48–57, 23 jan. 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2017.102>. Acesso em: set. 2019.
- CARLSSON, S. K.; BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1359–1370, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emmm.201302627>. Acesso em: set. 2019.
- CECCARELLI, M. et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 550–563, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741501692X>. Acesso em: set. 2019.
- CHEN, L.; KANG, C. miRNA interventions serve as ‘magic bullets’ in the reversal of glioblastoma hallmarks. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 1–12, 17 nov. 2015. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/5926>. Acesso em: set. 2019.
- COSTA, P. M. et al. MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 5, p. 904–918, 1 mar. 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/dd5496>. Acesso em: set. 2019.
- COX, J. L. et al. Elevating SOX2 Levels Deleteriously Affects the Growth of Medulloblastoma and Glioblastoma Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–12, 28 ago. 2012.

Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044087>. Acesso em: set. 2019.

CRESPO, I. et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 7, p. 1820–1833, jul. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944015001972>. Acesso em: out. 2019.

CROWLEY, E. et al. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2013. Acesso em: set. 2019.

DAVIS, M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n. 5, p. S2–S8, 1 out. 2016. Disponível em: <http://cjon.ons.org/cjon/20/5/supplement/glioblastoma-overview-disease-and-treatment>. Acesso em: set. 2019.

DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 287–314, 22 fev. 2014. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781466576773>. Acesso em: set. 2019.

EL-HABR, E. A. et al. Complex interactions between the components of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and with components of MAPK, JAK/STAT and Notch-1 pathways, indicate their involvement in meningioma development. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 4, p. 473–485, 2014. Acesso em: set. 2019.

FENG, J. et al. PTEN Controls the DNA Replication Process through MCM2 in Response to Replicative Stress. **Cell Reports**, v. 13, n. 7, p. 1295–1303, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.016>. Acesso em: set. 2019.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v. 21, n. 21, p. 2683–2710, 1 nov. 2007. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1596707>. Acesso em: set. 2019.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 16 ago. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrm3838>. Acesso em: set. 2019.

HIGA, G. S. V. et al. MicroRNAs in Neuronal Communication. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 1309–1326, 3 jan. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-013-8603-7>. Acesso em: set. 2019.

HOTTINGER, A. F.; ABDULLAH, K. G.; STUPP, R. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: **Glioblastoma**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 73–80.

HUANG, J. et al. MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 1, p. 20–31, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628918>. Acesso em: set. 2019.

INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva**, 2018.

JOHANNESSEN, T. C. A.; BJERKVIG, R. **Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme** *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10 maio 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/era.12.37>. Acesso em:

set. 2019.

KOSHIZUKA, K. et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. **Cancer Science**, v. 108, n. 8, p. 1681–1692, 2017.

KUMAR, M. S. et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3903–3908, 11 mar. 2008. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712321105>. Acesso em: set. 2019.

LANZETTA, G.; MINNITI, G. Treatment of Glioblastoma in Elderly Patients: An Overview of Current Treatments and Future Perspective. **Tumori Journal**, v. 96, n. 5, p. 650–658, 29 set. 2010. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/030089161009600502>. Acesso em: set. 2019.

LI, S. et al. The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity. **Nature Immunology**, v. 17, n. 3, p. 241–249, 2015.

LIU, Z. et al. microRNA-21 mediates epithelial-mesenchymal transition of human hepatocytes via PTEN/Akt pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 69, p. 24–28, fev. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332214001577>. Acesso em: set. 2019.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441>. Acesso em: set. 2019.

MAHER, E. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & Development**, v. 15, n. 11, p. 1311–1333, 1 jun. 2001. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.891601>. Acesso em: set. 2019.

MCCLOUGHLIN, N. M.; MUELLER, C.; GROSSMANN, T. N. The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 1, p. 19–29, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.009>. Acesso em: set. 2019.

MEZLINI, A. M. et al. Identifying Cancer Specific Functionally Relevant miRNAs from Gene Expression and miRNA-to-Gene Networks Using Regularized Regression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2 out. 2013. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073168>. Acesso em: set. 2019.

MURPHY, S. J. et al. Integrated analysis of the genomic instability of PTEN in clinically insignificant and significant prostate cancer. **Modern Pathology**, v. 29, n. 2, p. 143–156, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2015.136>. Acesso em: set. 2019.

NADIMINTY, N. et al. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of myc expression in prostate cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1527–1537, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: set. 2019.

NASS, D. et al. MiR-92b and miR-9/9* Are Specifically Expressed in Brain Primary Tumors and Can Be Used to Differentiate Primary from Metastatic Brain Tumors. **Brain Pathology**, v. 19, n. 3, p. 375–383, jul. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2008.00184.x>. Acesso em: set. 2019.

PARKER, B. C. et al. The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 2, p. 855–65, 9 fev. 2013. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/67144>. Acesso em: set. 2019.

PUC, J. et al. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 193–204, fev. 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610805000309>. Acesso em: set. 2019.

PULIDO, R. PTEN: A yin-yang master regulator protein in health and disease. **Methods**, v. 77, p. 3–10, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.009>. Acesso em: set. 2019.

RAFII, A. et al. Where cancer genomics should go next: A clinician's perspective. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, p. 69–75, 2014.

RAY, S. K. **Glioblastoma**. New York, NY: Springer New York, 2010.

SAADATPOUR, L. et al. Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. **Cancer Gene Therapy**, v. 23, n. 12, p. 415–418, 11 dez. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cgt201648>. Acesso em: set. 2019.

SANTIAGO-DIEPPA, D. R. et al. Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy' in glioblastoma patients. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 7, p. 819–825, 19 set. 2014. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2014.943193>. Acesso em: set. 2019.

SATHYAN, P. et al. Mir-21-Sox2 Axis Delineates Glioblastoma Subtypes with Prognostic Impact. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 45, p. 15097–15112, 11 nov. 2015. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1265-15.2015>. Acesso em: set. 2019.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 9, p. 494–503, set. 2006. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncpneuro0289>. Acesso em: set. 2019.

SHANKAR, G. M. et al. Liquid biopsy for brain tumors. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 10, p. 943–947, 3 out. 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1374854>. Acesso em: set. 2019.

SHEN, L. et al. MicroRNA-199a-3p suppresses glioma cell proliferation by regulating the AKT/mTOR signaling pathway. **Tumor Biology**, v. 36, n. 9, p. 6929–6938, 9 set. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3409-z>. Acesso em: set. 2019.

SHENOY, A.; DANIAL, M.; BLELLOCH, R. H. Let-7 and miR-125 cooperate to prime progenitors for astrogliogenesis. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 9, p. 1180–1194, 5 maio 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emboj.201489504>.

Acesso em: set. 2019.

SRINIVASAN, S.; PATRIC, I. R. P.; SOMASUNDARAM, K. A Ten-microRNA expression signature predicts survival in Glioblastoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17438, 31 mar. 2011. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0017438>. Acesso em: set. 2019.

TANG, H. et al. Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth. **Brain Research**, v. 1390, p. 21–32, maio 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899311005543>. Acesso em: set. 2019.

TUMILSON, C. A. et al. Circulating MicroRNA Biomarkers for Glioma and Predicting Response to Therapy. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 545–558, 3 out. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-014-8679-8>. Acesso em: set. 2019.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 19 jan. 2010.

VISVANATHAN, J. et al. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. **Genes & Development**, v. 21, n. 7, p. 744–749, 2007a. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1519107>. Acesso em: set. 2019.

VISVANATHAN, J. et al. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. **Genes and Development**, v. 21, n. 7, p. 744–749, 1 abr. 2007b. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1519107>. Acesso em: set. 2019.

WANG, G. et al. The role of Myc and let-7a in glioblastoma, glucose metabolism and response to therapy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 580, p. 84–92, ago. 2015a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986115300096>. Acesso em: set. 2019.

WANG, S. et al. Expression and clinical significance of microRNA-326 in human glioma miR-326 expression in glioma. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 373, 6 mar. 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-012-0373-y>. Acesso em: set. 2019.

WANG, Z. et al. Targeting miR-381-NEFL axis sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by regulating stemness factors and multidrug resistance factors. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3147–3164, 20 fev. 2015b. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3061>. Acesso em: set. 2019.

WANGARYATTAWANICH, P. et al. Multicenter imaging outcomes study of The Cancer Genome Atlas glioblastoma patient cohort: imaging predictors of overall and progression-free survival. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 11, p. 1525–1537, nov. 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/nov117>. Acesso em: set. 2019.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, mar. 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncb0309-228>. Acesso em: set. 2019.

WU, N. et al. MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2853–2863, 29 nov. 2013. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/bjc2013672>. Acesso em: set. 2019.

ZHANG, C. Z. et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 229, 2010. Disponível em: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-9-229>. Acesso em: set. 2019.

ZHOU, X. et al. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. **Laboratory Investigation**, v. 90, n. 2, p. 144–155, 4 fev. 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/labinvest2009126>. Acesso em: set. 2019.

ZUO, Z. et al. Circulating microRNAs let-7a and miR-16 predict progression-free survival and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 413–415, 14 jul. 2011. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/118/2/413/28485/Circulating-microRNAs-let7a-and-miR16-predict>. Acesso em: set. 2019.