



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Leandro Dalolio Ramire

**Perfil de expressão diferencial de miR-34a em Glioblastoma
Multiforme**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu

2020

Leandro Dalolio Ramire

Perfil de expressão diferencial de miR-34a em
Glioblastoma Multiforme

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ramire, Leandro Dalolio.

Perfil de expressão diferencial de miR-34a em
glioblastoma multiforme / Leandro Dalolio Ramire. -
Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Adriana Camargo Ferrasi
Capes: 90194000

1. Sistema nervoso central - Tumores. 2. Metilação de
DNA. 3. Glioblastoma multiforme. 4. Marcadores
bioquímicos. 5. MicroRNAs.

Palavras-chave: Glioblastoma; Metilação; SNC; miR-34a.

Agradecimentos

Agradeço principalmente aos meus pais Vera e José Carlos, que sempre me apoiaram e me incentivaram em minhas escolhas, e a nunca desistir, não só durante todo o período do Mestrado, mas em toda a minha vida.

À Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi, que além de sua excelente orientação, nunca hesitou de ser uma pessoa amiga e acolhedora, a quem tive o prazer de reencontrar na pós-graduação.

À Assistente de Suporte Acadêmico, Fabiana Barcelos Furtado, pelo admirável apoio oferecido, como pessoa e no desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina, pelo acolhimento e pelas pessoas que apoiaram direta ou indiretamente o discorrer do presente trabalho.

A todas as pessoas envolvidas em minha vida pessoal e/ou profissional, que me proveram algum tipo de conforto e companheirismo durante esses dois anos de Mestrado.

E a Deus, que sem ele, nada disso seria possível, sempre iluminando meu caminho e me mostrando a razão de viver.

Das Pedras

“Ajuntei todas as pedras

que vieram sobre mim.

Levantei uma escada muito alta

e no alto subi.

Teci um tapete floreado

e no sonho me perdi.

Uma estrada,

um leito,

uma casa,

um companheiro.

Tudo de pedra.

Entre pedras cresceu a minha poesia.

Minha vida...

Quebrando pedras

e plantando flores.

Entre pedras que me esmagavam

levantei a pedra rude

dos meus versos...”

-Cora Carolina

Índice

Glioblastoma Multiforme [Artigo de Revisão].....	06
Introdução	06
Fisiopatologia	06
Sintomatologia e Diagnóstico	08
Tratamento	11
MicroRNAs	13
miRNA-34a.....	15
Referências	18
Perfil de Metilação e Expressão de miR-34a em Glioblastoma Multiforme [Artigo]	31
Resumo	31
Introdução	33
Casuística e Metodologia	34
Resultados	37
Discussão e Conclusão	38
Referências	40
Anexo 1 - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	45
Anexo 2 – Tabela 1: Dados gerais da casuística e resultados	49

Glioblastoma Multiforme

[REVISÃO]

Introdução

Câncer é um problema de saúde mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, a incidência da doença atingiu aproximadamente 18 milhões de casos, entre todas as idades e gêneros. Dentre estes, 203 mil correspondem aos tumores do sistema nervoso central (SNC), ocupando a 18ª posição do tipo de câncer com maior prevalência, para ambos os gêneros. Adicionalmente, para os tumores do SNC, estimou-se 297 mil novos casos e 241 mil mortes no mesmo ano. Porém, com notável piora dessas estimativas para o ano 2020, com 309 mil novos casos e 252 mil óbitos.

No Brasil, estimou-se para 2018 a prevalência de aproximadamente 8 mil (3,9/100.000) casos de tumores do SNC, 10º mais comum em ambos os sexos (12º e 9º para homens e mulheres, respectivamente), com uma incidência de 12.3 mil novos casos e 10.7 mil mortes estimadas. Para o ano de 2020 foi estimado, com um leve aumento, 12.9 mil e 11.3 mil para incidência e mortalidade respectivamente.^{1,2}

Embora sejam mais raros e representando apenas 1.7% dos tumores malignos relatados no mundo, os tumores do SNC colaboram significativamente com a mortalidade mundial por câncer, com um evidenciado aumento contínuo nas taxas de incidência e mortalidade nos últimos anos.^{3,4}

Dentre os tumores do SNC, o Glioblastoma Multiforme (GBM) representa o tipo mais frequente (50-60% dos tumores cerebrais primários)^{5,6} e com o pior prognóstico em adultos, devido sua natureza altamente invasiva. Mesmo após ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, os pacientes apresentam sobrevida média entre 10 e 15 meses,⁶⁻⁹ e apenas 4% sobrevivem 5 anos após o diagnóstico.⁶ Nesse contexto, o GBM é classificado segundo a OMS, como um astrocitoma (tipo mais comum) de grau IV.¹⁰

Fisiopatologia

Os gliomas são neoplasias originárias das células da glia encefálica, cuja principal função é dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Quatro tipos celulares formam a glia: os astrócitos, os oligodendrócitos, a

micróglia e epêndimócitos.¹¹ Assim, os gliomas apresentam características e marcadores moleculares de acordo com o tipo celular que os originou, sendo classificados em astrocitomas, oligodendroglioma, ependimomas e os oligoastrocitomas (gliomas mistos).^{10,12} Dentre os gliomas, 70% são astrocitomas, 10-15 % são oligodendrogliomas e 3-5 % são do tipo ependimomas.

Os tumores astrocíticos são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos. Classicamente, os astrocitomas são classificados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) de acordo com o grau de malignidade:

- Grau I: astrocitomas pilocíticos – com incidência estimada em menos de um caso/100.000 pessoas/ano, principalmente casos pediátricos. Histologicamente se apresentam como neoplasias de celularidade baixa a moderada, constituídas por astrócitos. A cirurgia é o tratamento de escolha para tais lesões, sendo curativa na maioria dos casos. Entretanto em alguns casos a quimioterapia tem sido utilizada, principalmente em crianças com tumores nas vias ópticas.

- Grau II: astrocitomas difusos fibrilares - são menos frequentes em crianças, afetando mais comumente jovens adultos. Ao exame histopatológico, estes tumores apresentam maior celularidade, são mais infiltrativos e tendem a sofrer transformação anaplásica de modo mais frequente.

- Grau III: astrocitomas anaplásicos - são neoplasias infiltrativas, com um alto potencial proliferativo, afetando principalmente adultos. Esses tumores estão associados à menor sobrevida quando comparados com os dois anteriores, chegando a uma média de 3 a 4 anos em 70% dos casos. A cirurgia continua sendo a melhor opção de tratamento e esta deve ser a mais ampla possível.

- Grau IV: glioblastomas multiforiais - mais comumente chamado de glioblastoma multiforme, é o tipo de tumor cerebral mais frequente em adultos e o tumor mais agressivo desta linhagem, correspondendo a aproximadamente 50% dos tumores malignos do SNC. São clinicamente agressivos e extremamente invasivos, com capacidade de invasão extra-axial. Essa neoplasia se apresenta frequentemente em adultos, após os 50 anos de idade, com uma sutil predominância entre pacientes masculinos, não sendo exclusivos desta faixa etária, afetando também pacientes mais jovens e crianças.^{6,10}

Os tumores do SNC, quando primários, ou seja, que não se originam de metástases, possuem origem multifatorial, onde a predisposição genética e a exposição à fatores ambientais estão intimamente relacionados à carcinogênese.¹³ A

exposição a infecções, alergias, traumas mecânicos, abuso de drogas e medicamentos, exposição a radiações ionizantes, tabagismo e etilismo são fatores ambientais considerados relevantemente relacionados ao surgimento desses tumores.^{14,15}

Estudos sugerem que o glioblastoma pode evoluir a partir dos astrocitomas de baixo grau (I e II) pré-existentes ou a partir da tumorigênese de células morfológicamente normais, sendo assim, denominados glioblastoma secundário ou primário, respectivamente.^{16,17} Geneticamente os dois subtipos tumorais tendem a se distinguir pela ocorrência de mutações no genes *IDH1* e *IDH2* (Isocitrato desidrogenase 1 e 2). Estudos mostram que essas mutações, principalmente em *IDH1*, são muito frequentes (~80%) no glioblastoma secundário, caracterizado por ser comum em pacientes mais jovens e apresentar melhor sobrevida, mas raras no glioblastoma primário (~5%). Diferentemente, nos glioblastomas primários pode-se verificar a predominância de mutações em *TERT* (região promotora da transcriptase reversa da telomerase) (~80%), deleção do gene *CDKN2A* (31~52%) e alterações no *EGFR* (36~60%) e nos glioblastomas secundários observam-se mutações em *IDH1* (88%), *TP53* (65%), *ATRX* (57~80%), além da *LOH 19q* (perda da heterozigosidade do cromossomo 19q) (54%).^{17,21-24}

As vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e progressão dos glioblastomas ainda não são totalmente conhecidas. Dentre as alterações genéticas mais frequentemente observadas estão a *LOH 10q23* (perda da heterozigosidade do cromossomo 10q23) (em aproximadamente 70% dos casos), metilação no gene de reparo do DNA *MGMT* (DNA O(6)metilguanina-metiltransferase) (30 - 60%), mutações no gene *EGFR* (Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico) (57%), mutações no *PTEN* (principal via de sinalização para proliferação celular) (44%) e mutações no gene que codifica a enzima *IDH1* (correlacionada a um aumento da metilação de histonas, alterando expressão gênica e promovendo transformação oncogênica) (12%).^{20,25-29}

Sintomatologia e Diagnóstico

O SNC, por ser uma região nobre do organismo e de alta complexidade, pode desencadear sinais e sintomas variados quando afetado por tumores, mesmo quando benignos. Os pacientes portadores de gliomas malignos, geralmente acometidos por sintomas neurológicos e cognitivos, apresentam uma queda

significativa em sua qualidade de vida, que muitas vezes avança com a progressão da doença. Os sintomas estão diretamente associados à região afetada, e apesar dos gliomas primários não respeitarem as divisões anatômicas, podendo envolver múltiplos lóbulos, os mais afetados em adultos, são o frontal e o temporal, gerando muitas vezes um aumento da pressão intracraniana³⁰

Um amplo estudo realizado por Laws *et al*,³¹ envolvendo 565 pacientes portadores de gliomas malignos, acompanhados por até 24 meses, observou que os sintomas mais comuns compreendem dores de cabeça (56%), perda de memória (36%), problemas neurocognitivos (34%), motores (34%), distúrbios de linguagem (33%), convulsões (31%), e alterações de personalidade (23%). Outra pesquisa realizada, citou dores de cabeça (57%), convulsões (40%), alterações na fala, visão ou audição (25%), no humor ou personalidade (25%), problemas na concentração ou memória (25%), e alterações no equilíbrio e no ato de andar (24%), relatados por portadores de astrocitomas de alto grau.³²

Os sintomas, além da relação com a progressão da doença, podem se tornar constantes ou se agravarem de acordo com outros fatores coexistentes, como infecções, acidentes vasculares cerebrais, uso de medicamentos, terapia de escolha, entre outras comorbidades presentes.³³

Comumente, são os sintomas supracitados que levam o paciente a buscar ajuda médica e, juntamente com a anamnese, exames físicos e específicos permitem o diagnóstico dos tumores do SNC. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA),³⁴ entre os exames utilizados a partir da suspeita clínica dessas neoplasias, os principais são os de imagem, como a Ressonância Magnética (RM) e a Tomografia Computadorizada (TC), essencialmente com o uso de contrastes, e de forma mais invasiva, a análise de biópsias. De forma complementar, o eletroencefalograma, eletroneuromiografia, campimetria, audiometria, e exames laboratoriais envolvendo marcadores específicos e dosagens hormonais podem auxiliar o diagnóstico.

A RM é a técnica padrão ouro de imagem escolhida por apresentar um contraste tecidual superior (exemplificado na Figura 1), fazendo com que se permita uma melhor visualização da complexidade e heterogeneidade da massa tumoral quando comparado à tomografia, normalmente escolhida quando a RM não pode ser realizada por motivos especiais, como o uso de marca-passos.³⁵

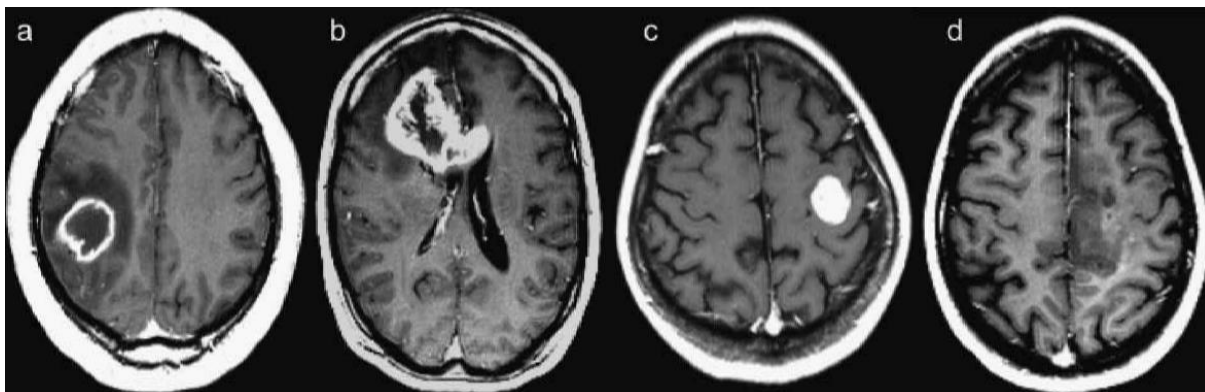


Figura 1. RM contrastada (T1), corte axial. Quatro pacientes com GBM que ilustram a heterogeneidade anatômica da lesão: (a) massa com borda extensa localizada no lóbulo parietal direito, apresentando necrose central envolvida por edema (branco); (b) massa irregular acentuada que atravessa o corpo caloso; (c) massa homogênea acentuada, bem delimitada no lóbulo frontal esquerdo sem edema associado; (d) massa infiltrativa e mal definida, sem necrose notável, na região medial do lóbulo frontal esquerdo. (Adaptado de Nelson e Cha, 2003).

Apesar do diagnóstico do GBM atualmente ser baseado em biópsia e exames de imagens,³⁶ ambos podem apresentar dificuldades em ilustrar a real atividade da progressão do tumor. Muitos estudos visam a busca e detecção de marcadores biológicos chaves para o GBM e outras neoplasias, tanto no sangue periférico como no Líquido Cefalorraquidiano (LCR), tendo em vista um melhor rastreamento da atividade tumoral, e sendo, quando comparado às biópsias, análises menos invasivas.³⁷

Para a eficiência das análises desses marcadores tumor-específicos, deve-se levar em consideração sua capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) a fim de serem detectados no sangue periférico. É sabido, que o GBM induz a um ambiente angiogênico (formador de novos vasos sanguíneos), com maior processo inflamatório ativo, e juntamente com a hipóxia, característica comum entre tumores sólidos assim como o GBM, podem aumentar a permeabilidade da BHE,^{38,39} já relacionada com uma maior progressão da doença, em gliomas.⁴⁰

Recentemente, Krol *et al.*⁴¹ em seu estudo verificou que 7 (53%) dos 13 de seus pacientes com GBM apresentaram, em pelo menos uma amostra de sangue periférico colhida em vários períodos durante terapia, positividade para a presença de aglomerados de células tumorais circulantes (CTCs). A partir desse estudo, evidenciou-se a capacidade desses aglomerados celulares em atravessar a BHE, alcançando a circulação periférica. Associada à metástase em diversos tipos de tumores sólidos, as CTCs são lançadas por tumores primários ou secundários ao

sistema circulatório.^{42,43} Outro estudo também encontrou a presença de CTCs em 39% das amostras de sangue periférico de pacientes com glioblastoma.⁴⁴

Além da CTCs, existe a capacidade da detecção de ácidos nucleicos circulantes derivados do tumor, como o DNA livre proveniente de necrose ou apoptose celular, podendo apresentar maior concentração em pacientes com tumores mais avançados,⁴⁵ e diferentes classes de RNAs circulantes, incluindo os não codificadores de proteína, tanto no LCR como na circulação sanguínea, com potencial de biomarcadores para o prognóstico, diagnóstico e monitoramento terapêutico nos pacientes com gliomas.^{46,47} É possível ainda, na detecção do DNA tumoral circulante, rastrear mutações específicas e/ou checar o perfil de metilação do DNA, como a metilação do gene de reparo *MGMT*, comum no GBM, e assim auxiliar tanto com um prognóstico mais preciso como na definição de uma abordagem terapêutica mais específica e efetiva.⁴⁸

Finalmente, pode-se citar a detecção das vesículas extracelulares (VE), liberadas em situações fisiológicas e/ou patológicas, que possuem a capacidade de carrear proteínas celulares, DNA, RNA codificador/não codificador, podendo ser detectados com o auxílio de marcadores superficiais celulares.^{49,50} Tais vesículas atravessam facilmente a BHE⁵¹ e desempenham um importante papel na estabilidade das biomoléculas,⁵² e na comunicação intercelular⁵³. Além das informações genéticas relevantes observadas nas VEs, estudos mostram um aumento dessas vesículas em pacientes com GBM quando comparado a pacientes saudáveis ou com outras doenças do SNC,^{54,55} além do potencial para diferenciar gliomas de alto e baixo grau.⁵⁶

Tratamento

As altas taxas de proliferação, migração e resistência terapêutica associadas a localização em sítios nobres e críticos do SNC tornam o tratamento do GBM ainda um desafio, baseando-se principalmente em combinações entre quimioterapia e/ou radioterapia após remoção cirúrgica do máximo possível da massa tumoral.⁵⁷

Quando possível, a excisão cirúrgica é realizada no contexto de remoção/redução da massa tumoral e na obtenção de material para diagnóstico histológico e caracterização molecular do tumor, melhorando a definição prognóstica e terapêutica.^{36,58}

O quimioterápico oral temozolomida (TMZ), agente alquilante/metilante do DNA, combinado com a radioterapia permanece como a modalidade terapêutica padrão para o GBM, podendo ser reavaliada após a caracterização molecular tumoral. Em pacientes idosos ou que apresentem a metilação da região promotora do *MGMT*, com redução na taxa de reparação do DNA, são mais responsivos ao quimioterápico, sendo sugerido nesses casos, apenas o uso do TMZ. Já os pacientes sem metilação do *MGMT*, a TMZ apresenta perda em sua efetividade e apenas o uso da radioterapia é indicado.^{59,60} Existe ainda em estudo, para os pacientes resistentes à TMZ, a possibilidade do uso de inibidores do *MGMT*, como *O-6 benzilguanina* ou o silenciamento do *MGMT* mediado por RNA de interferência, visando melhor resposta ao TMZ.⁶¹

Além do TMZ, outro quimioterápico alquilante e aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) é o BNCU (carmustina) que, formando ligações cruzadas entre cadeias nos DNAs, apesar de relatada a possibilidade de aumento na pressão intracraniana, demonstrou melhora significativa na sobrevida, em um estudo recente.⁶²

Lomustina, quimioterápico em fase III de estudo clínico, além de formar cadeias como o BNCU, promove a metilação do grupo amino e, pela sua alta solubilidade lipídica, facilita o traspassamento pela BHE.⁶³ Quando combinado com outros quimioterápicos tem-se mostrado altamente eficiente, como observado em um estudo que relatou uma sobrevida geral de 48.1 meses (Lomustina+TMZ) contra 31.4 meses quando apenas o TMZ foi utilizado.⁶⁴

Os anticorpos monoclonais Bevacizumab e o Nimotuzumab, que se ligam e inibem, respectivamente, VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico), têm sido utilizados na terapia adjuvante.⁶⁵ VEGF, liberado e estimulado pelas células tumorais em diversos cânceres, inicia o processo de formação de novos vasos (angiogênese) pela ativação e migração das células endoteliais, processo importante para o crescimento e disseminação do tumor.⁶⁶ Enquanto que o EGFR, quando seu estímulo é aumentado, observado em vários tipos de tumores sólidos, favorece o fenótipo maligno celular, com rápido crescimento tumoral devido a maior desregulação da proliferação celular.⁶⁷ Adicionalmente, o tratamento com o anti-PD-1 apresentou resultados significantes na melhora da sobrevida de pacientes com GBM.⁶⁸ Seu ligante, PD-L1, altamente expresso nesse tumor, ao se ligar com o PD-1 livre, reduz

a atividade dos linfócitos T citotóxicos, induzindo a tolerância e diminuindo a autoimunidade, importantes na resposta antitumoral.^{69,70}

Outros resultados promissores no tratamento de tumores do SNC, mas ainda em estudos, abrangem a terapia celular, inibidores de *checkpoints* imunológicos, imunoestimulantes, vacinas, terapia gênica e epigenética, e o uso de vírus oncolíticos.⁶⁵

Um dos maiores desafios para o tratamento dos GBM, além da sua localização de difícil acesso cirúrgico, é a sua heterogeneidade genética, tanto intra quanto inter-tumores. Tais diferenças promovem variação significativa nas respostas aos tratamentos e reações adversas, justificando a busca por mecanismos moleculares comuns a maioria dos GBM.

MicroRNAs

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs de fita simples (18 a 25 nucleotídeos) não codificadoras de proteínas, que possuem função importante na regulação da expressão de dois terços dos genes humanos. Atuam principalmente na regulação pós transcricional e silenciamento de diversos RNAs mensageiros (mRNAs), interferindo em vários processos fisiológicos e patológicos, entre eles a origem e progressão neoplásica.^{71,72}

A formação dos miRNAs se inicia a partir da transcrição gênica, mediada pelas RNA Polimerase II ou III,^{73,74} em um transcrito primário denominado pri-miRNA (Figura 2). O pri-miRNA é então clivado por um complexo constituído por uma RNase III (Drosha) e uma proteína de ligação de RNA (DGCR8), formando o pre-miRNA, de 85 nucleotídeos. Após essa primeira etapa, o pre-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma, por meio do complexo Ran/GTP/Exportina 5, onde sofre nova clivagem por outra RNase III (Dicer), tornando-se um miRNA de fita dupla, que é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) no qual as duas fitas são separadas. Agora, a cadeia associada ao RISC promove o silenciamento gênico ao se ligar na região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNAs alvos, degradando-os ou intervindo na sua tradução.

Os miRNAs também podem atuar como ligantes aos receptores da via *Toll-like* (TLR).^{75,76} Localizados na membrana de diversos tipos de células e vesículas intracelulares, os TLRs são importantes no reconhecimento de agentes microbiológicos, liberação de mediadores inflamatórios e regulação da resposta

imune adaptativa. Um número crescente de estudos relata a interação dos miRNAs com os TLRs, com o potencial de iniciar a resposta imunológica, induzindo a expressão de genes imunoinflamatórios. Ao se ligarem aos TLRs ou proteínas envolvidas em suas vias de sinalização, os miRNAs regulam processos como inflamação, ativação das células T, infiltração celular e o desenvolvimento imunológico.^{77,78}

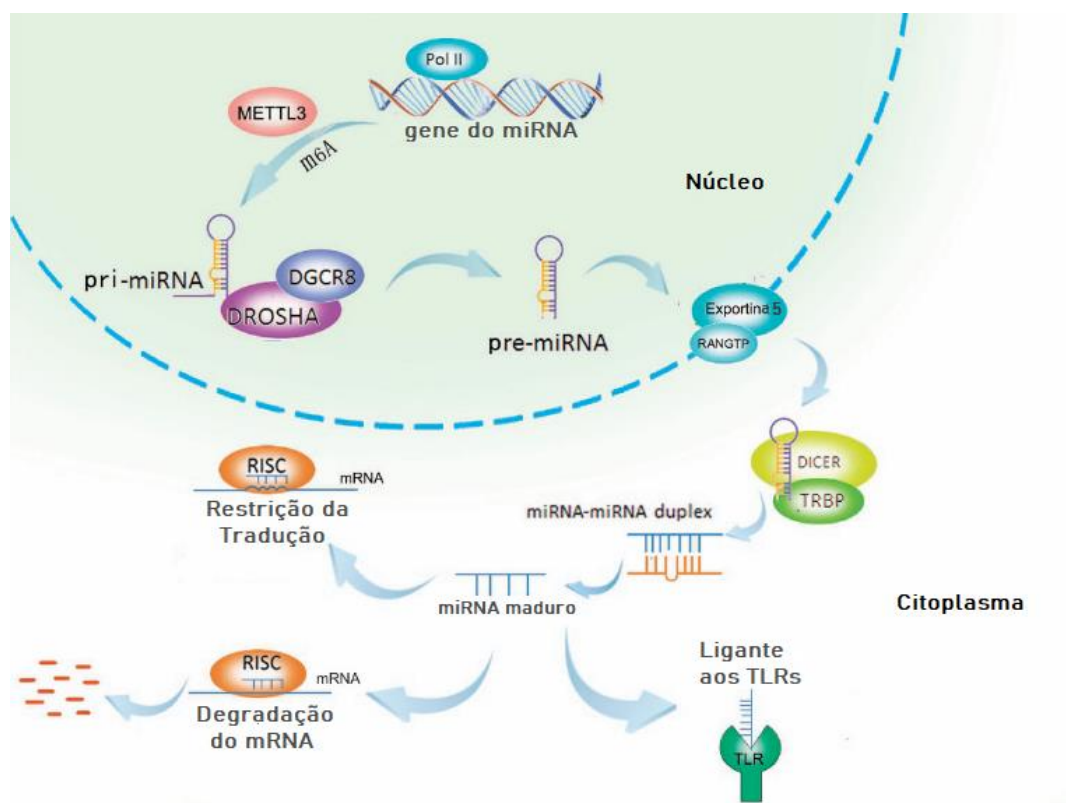


Figura 2. Biogênese dos microRNAs. (Adaptado de Peng e Croce, 2016)

A desregulação na expressão de alguns miRNAs pode alterar vias moleculares envolvidas com o câncer, alterando mecanismos importantes para seu desenvolvimento e manutenção de forma favorável (pró tumoral) ou desfavorável (antitumoral), como angiogênese, proliferação, invasão, migração, viabilidade, apoptose, ciclo celular e resistência terapêutica. Paulmurugan e colaboradores (2019) reuniram, em um recente estudo de revisão,⁷⁹ associações entre a desregulação da expressão de miRNAs com seus prováveis alvos e os mecanismos afetados em GBM (Tabela 1).

Tabela 1. Desregulação da expressão de miRNAs em Glioblastoma Multiforme.

miRNA	Expressão	Alvos	Mecanismos Celulares Afetados
<i>miR-9/miR-9*</i>	Aumentada	CAMTA1, SOX2	Proliferação, autorrenovação
<i>miR-10b</i>	Aumentada	HOXD10	Invasão
<i>miR-15b</i>	Aumentada	CCNEI	Proliferação, ciclo celular
<i>miR-17</i>	Aumentada	POLD2, CTGF	Angiogêneses, crescimento, viabilidade, apoptose, proliferação
<i>miR-18a</i>	Aumentada	Smad4, CTGF	Angiogêneses, crescimento, viabilidade, apoptose, proliferação
<i>miR-20a</i>	Aumentada	TGF β -RII, CTG	Angiogêneses, crescimento tumoral
<i>miR-21</i>	Aumentada	PTEN, RECK, PDCD4, SPRY2, TIMP3	Invasão, apoptose, quimiorresistência, proliferação, crescimento tumoral
<i>miR-25</i>	Aumentada	Mdm21, TSC1	Crescimento tumoral
<i>miR-26a/ miR-26b</i>	Aumentada	PTEN, IFNB	Apoptose, proliferação, crescimento tumoral
<i>miR-92</i>	Aumentada	CTGF	Viabilidade, proliferação
<i>miR-93</i>	Aumentada	Integrina- β 8	Angiogêneses, crescimento tumoral, proliferação
<i>miR-125b</i>	Aumentada	Bmf	Invasão, apoptose, proliferação, migração, volume tumoral
<i>miR-221/ miR-222</i>	Aumentada	PUMA, P57, P27, Akt, PTP μ	Proliferação, invasão, apoptose, migração, ciclo celular
<i>miR-381</i>	Aumentada	LRRC4	Proliferação, volume tumoral
<i>miR-7</i>	Diminuída	EGFR, IRS1, IRS2	Proliferação, invasão, migração, viabilidade, radiosensibilidade
<i>miR-29b</i>	Diminuída	PDPN	Apoptose, invasão, proliferação
<i>miR-34a</i>	Diminuída	CDK6 ¹⁰²	Senescência e ciclo celular
<i>miR-101</i>	Diminuída	EZH2	Apoptose, invasão, migração, viabilidade
<i>miR-128</i>	Diminuída	EGFR, Bmi-1	Proliferação, autorrenovação, volume tumoral, angiogênese
<i>miR-137</i>	Diminuída	CDK6, Msi1, EZH2	Proliferação, ciclo celular, invasão, migração
<i>miR-138</i>	Diminuída	Msi1	Proliferação
<i>miR-146b-5p</i>	Diminuída	EGFR	Invasão, migração, proliferação
<i>miR-181a/181b/181d</i>	Diminuída	Bcl-2, K-Ras	Apoptose, radiosensibilidade, invasão, proliferação, volume tumoral
<i>miR-218</i>	Diminuída	IKK- β	Invasão
<i>miR-326</i>	Diminuída	Notch-1, Notch-2, PKM2	Apoptose, invasão, viabilidade, proliferação, crescimento tumoral

*Fita complementar

(Adaptado de Paulmurugan, Malhotra e Massoud, 2019)

miRNA-34a

Codificado pelo gene *MIR34A* localizado na região 1p36⁸⁰ e alvo direto da proteína P53, atua como um fator transcrricional.⁸¹

O miRNA-34a atua na regulação de genes importantes em diferentes processos e mecanismos celulares, muitos deles envolvendo o controle do ciclo celular, regulação da apoptose e senescência, além de inibir a migração e invasão celular.⁸¹⁻⁸³ (Tabela 2)

A desregulação miR-34a foi associada a vários tipos de tumores, como o de próstata,⁸⁴ pâncreas,⁸⁵ ovário,⁸⁶ neuroblastoma,⁸⁷ gástrico,⁸⁸ hepatocelular⁸⁹ e tumores do sistema nervoso central, tal como glioma⁹⁰⁻⁹² e meduloblastoma.^{93,94} Em GBM, foi observada a redução da expressão^{91,94-99} do miR-34a tanto em tecidos tumorais como em linhagens celulares. Apoiando esses achados, Vaitkiene *et al.*¹⁰⁰ recentemente concluíram que pacientes acometidos por GBM com menor expressão do miR-34a, possuíam um volume tumoral significativamente maior, quando comparados aos com maior expressão. Contrariando esses achados, Jesionek-Kupnicka¹⁰¹ detectaram maior expressão do miR-34a nos tecidos de glioblastomas, entretanto, menor expressão nos pacientes que apresentavam mutações no gene *TP53*.

A relação do miR-34a com o *TP53* e seu potencial efeito antitumoral já foi relatada anteriormente evidenciando miRNA atuando como uma fenocópia de P53.^{95,99,102}

Um desses estudos observou que linhagens celulares com *TP53* mutado expressavam menos miR-34a do que aquelas com *TP53* em sua forma selvagem.⁹⁵

Muitos mRNAs alvos de miR-34a são envolvidos em processos fundamentais no desenvolvimento e progressão tumoral. Ao se ligar na região 3'-UTR desses mRNAs, miR-34a induz a sua degradação (em uma ligação perfeita) ou interfere na sua tradução (ligação parcial).¹⁰³ A maioria desses mRNAs alvos são responsáveis pela tradução de proteínas antiapoptóticas (SIRT1 e Bcl2) ou envolvidas no processo de invasão celular (c-MET) e fatores essenciais para a transição G1/S do ciclo celular (c-MYC, CDK4, CDK6 e E2F).⁸¹ Agindo sobre essa variedade de mRNAs, miR-34a provoca um silenciamento de diversos genes chave (Tabela 2), agindo contrariamente a etapas importantes na carcinogênese em diversos tipos de tumores.

Tabela 2. Alvos do miR-34a e efeitos associados em tumores.

Gene Alvo	Efeito do silenciamento gênico induzido pelo miR-34a	Referência
AR	Apoptose e inibição da autorrenovação celular	104
Bcl-2	Apoptose, inibição da proliferação, invasão e viabilidade	105,106
CCL22	Inibição do crescimento e sobrevivência tumoral	107
CD24	Inibição da tumorigênese e metástase	108
c-Kit	Inibição da quimiorresistência e invasão	109
c-Met	Apoptose, inibição da invasão e migração	110,111
c-Myc	Inibição da invasão e migração	112
E2F1/E2F3	Controle ciclo celular	113
Eag1	Inibição da proliferação	114
HDAC1	Regulação da P53 e inibição do crescimento tumoral	115
IMPDH	Inibição do crescimento e sobrevivência tumoral	116
LMTK3	Inibição da proliferação celular	117
LyGDI	Apoptose por radiosensibilidade	118
MDM4	Regulação da P53	119
MTA2	Regulação da P53	115
Musashi1	Apoptose, diferenciação e controle do ciclo celular, além da inibição da proliferação	120
Notch	Radiossensibilidade, inibição da tumorigênese e progressão tumoral	104,121,122
PDGFR α	Apoptose, inibição da tumorigênese, migração e invasão	123,124
PDGFR β	Apoptose, inibição da migração e invasão	123
PNUTS	Inibição do alongamento dos telômeros	125
Receptor Axl	Inibição da proliferação, migração e invasão	126,127
SIRT1	Apoptose, inibição da proliferação, migração e senescência	106,128
Src	Inibição da invasão e metástase	108
Survivina	Apoptose, inibição da proliferação e invasão	129,130
ULBP2	Inibição do reconhecimento do tumor pelas células <i>Natural Killers</i>	131
Yin Yang-1	Regulação da P53	115

Dentre as possíveis causas para o silenciamento de miR-34a há a metilação das ilhas CpG situadas na região promotora da transcrição.¹³² Caracterizada pela adição de um grupo metil, pela DNA Metiltransferase, ao carbono 5 de citosinas que antecedem guaninas (CpG), localizadas em regiões denominadas ilhas CpG.¹³³ As ilhas CpG estão localizadas principalmente nas regiões promotoras de genes

housekeeping e aqueles que se expressam em tecidos específicos.¹³⁴ Silenciar um gene *via* metilação é um evento normal do desenvolvimento e da diferenciação celular, entretanto, a metilação aberrante pode silenciar genes importantes no controle do ciclo celular como supressores tumorais ou os de reparo de danos no DNA.¹³⁵ Além da metilação, alterações na sequência de nucleotídeos do *MIR34A*, como a deleção cromossômica (1p36) e mutações no gene *TP53*, podem impactar drasticamente a expressão do miR-34a.⁹⁵

Em razão da relevância do miR-34a nos processos celulares, seu potencial uso como molécula terapêutica vem sendo avaliado. Um estudo confirmou que a reexpressão do miR-34a em linhagens de células tumorais aumentou a taxa de apoptose, promoveu melhor controle do ciclo celular e diminuição do crescimento celular.¹³⁶ Thor *et al.*, ao analisar animais geneticamente modificados com deleção do *MIR34A*, verificaram que tumores implantados, meduloblastoma humano, após a reexpressão do *MIR34A*, exibiram maior taxa de apoptose, e ao mesmo tempo, menor viabilidade e proliferação celular. Como consequência, reduziu a expressão de seus genes alvos, *SIRT1* e *MYCN*, importantes na iniciação e progressão tumoral.⁹³ Em outro estudo, com linhagens de câncer colorretal, após a transferência do equivalente sintético do miR-34a, notou-se queda na migração, invasão e proliferação celular e também o aumento na expressão de *EGR1* e redução da expressão do gene da vimentina, associada a maior migração e invasão tumoral.¹³⁷

Nesse contexto, miR-34a representa, além de um potencial agente supressor tumoral, um possível alvo terapêutico e marcador biológico no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento nos processos da carcinogênese de diferentes tipos de tumores e estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares em que ele atua.

Referências

1. World Health Organization. *Cancer Today - International Agency for Research on Cancer*. (2018). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
2. World Health Organization. *Cancer Tomorrow - International Agency for Research on Cancer*. (2018). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.
3. BRASIL. Sistema de informações sobre mortalidade. *Sistema de informações sobre mortalidade* (2017). Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.

4. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
5. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer Statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 277–300 (2010).
6. Tumor Types - National Brain Tumor Society. Disponível em: <https://braintumor.org/brain-tumor-information/understanding-brain-tumors/tumor-types/#glioblastoma-multiforme>.
7. Elmaci, İ. & Altinoz, M. A. A Metabolic Inhibitory Cocktail for Grave Cancers: Metformin, Pioglitazone and Lithium Combination in Treatment of Pancreatic Cancer and Glioblastoma Multiforme. *Biochemical Genetics* **54**, 573–618 (2016).
8. Yin, Y., Qiu, S. & Peng, Y. Functional roles of enhancer of zeste homolog 2 in gliomas. *Gene* **576**, 189–194 (2016).
9. Thakkar, J. P. *et al.* Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **23**, 1985–1996 (2014).
10. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
11. Jäkel, S. & Dimou, L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**, (2017).
12. Sahm, F. *et al.* Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol.* **128**, 551–559 (2014).
13. Gu, J., Liu, Y., Kyritsis, A. P. & Bondy, M. L. Molecular Epidemiology of Primary Brain Tumors. *Neurother.* **6**, 427 (2009).
14. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro. Oncol.* **4**, 278–299 (2002).

15. Claus, E. B. *et al.* Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery* **57**, 1088–1094 (2005).
16. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683–2710 (2007).
17. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445–1453 (2007).
18. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P. & Ohgaki, H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174**, 1149–1153 (2009).
19. Yan, H. *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765–773 (2009).
20. Parsons, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **321**, 1807–1812 (2008).
21. Bögl, O., Su Huang, H.-J., Kleihues, P. & Cavenee, W. K. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* **15**, 308–327 (1995).
22. Balss, J. *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* **116**, 597–602 (2008).
23. Killela, P. J. *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6021–6026 (2013).
24. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* **19**, 764–772 (2013).
25. Brennan, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
26. Weller, M. *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 39–51 (2010).
27. Bigner, S. H. *et al.* Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.* **48**, 405–11 (1988).

28. Wang, S. I. *et al.* Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **57**, 4183–6 (1997).
29. Lu, C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474–478 (2012).
30. Armstrong, T. S. *et al.* Determining priority signs and symptoms for use as clinical outcomes assessments in trials including patients with malignant gliomas: Panel 1 Report. *Neuro. Oncol.* **18**, ii1–ii12 (2016).
31. Laws, E. R. *et al.* Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: Data from the glioma outcomes project. *J. Neurosurg.* **99**, 467–473 (2003).
32. Helfer, J. L., Wen, P. Y., Blakeley, J., Gilbert, M. R. & Armstrong, T. S. Report of the Jumpstarting Brain Tumor Drug Development Coalition and FDA clinical trials clinical outcome assessment endpoints workshop (October 15, 2014, Bethesda MD). in *Neuro-Oncology* **18**, ii26–ii36 (Oxford University Press, 2016).
33. Molassiotis, A. *et al.* Symptom experience in patients with primary brain tumours: A longitudinal exploratory study. *Eur. J. Oncol. Nurs.* **14**, 410–416 (2010).
34. Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central/profissional-de-saude>.
35. Nelson, S. J. & Cha, S. Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J.* **9**, 134–145 (2003).
36. Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J. C. & Pentheroudakis, G. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25**, 93–101 (2014).
37. Wang, J. & Bettegowda, C. Applications of DNA-Based Liquid Biopsy for Central Nervous System Neoplasms. *Journal of Molecular Diagnostics* **19**, 24–34 (2017).
38. Zhao, C., Wang, H., Xiong, C. & Liu, Y. Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **502**, 324–331 (2018).

39. Chen, Z. & Hambardzumyan, D. Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
40. Dubois, L. G. *et al.* Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, (2014).
41. Krol, I. *et al.* Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma. *Br. J. Cancer* **119**, 487–491 (2018).
42. Pantel, K. & Speicher, M. R. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* **35**, 1216–1224 (2016).
43. Kulasinghe, A., Perry, C., Jovanovic, L., Nelson, C. & Punyadeera, C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *International Journal of Cancer* **136**, 2515–2523 (2015).
44. Sullivan, J. P. *et al.* Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov.* **4**, 1299–1309 (2014).
45. Bettgowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
46. Best, M. G. *et al.* Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathologica* **129**, 849–865 (2015).
47. Rynkeviciene, R. *et al.* Non-Coding RNAs in Glioma. *Cancers (Basel)*. **11**, 17 (2018).
48. Fiegl, H. *et al.* Circulating tumor-specific DNA: A marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.* **65**, 1141–1145 (2005).
49. Kahlert, C. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis. *J. Mol. Med.* **91**, 431–437 (2014).
50. Hallal, S. *et al.* The emerging clinical potential of circulating extracellular vesicles for non-invasive glioma diagnosis and disease monitoring. *Brain Tumor Pathology* **36**, 29–39 (2019).

51. García-Romero, N. *et al.* DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget* **8**, 1416–1428 (2017).
52. Müller Bark, J., Kulasinghe, A., Chua, B., Day, B. W. & Punyadeera, C. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br. J. Cancer* (2019).
53. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 1208–1215 (2016).
54. Osti, D. *et al.* Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.* **25**, 266–276 (2019).
55. André-Grégoire, G., Bidère, N. & Gavard, J. Temozolomide affects Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells. *Biochimie* **155**, 11–15 (2018).
56. Chandran, V. I. *et al.* Ultrasensitive immunoprofiling of plasma extracellular vesicles identifies syndecan-1 as a potential tool for minimally invasive diagnosis of glioma. *Clin. Cancer Res.* **25**, 3115–3127 (2019).
57. Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsins, N. & Neamati, N. Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. *Pharmacol. Rev.* **70**, 412–445 (2018).
58. Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* **95**, 190–198 (2001).
59. Wick, W. *et al.* Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 707–715 (2012).
60. Malmström, A. *et al.* Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: The Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 916–926 (2012).
61. Warren, K. E. *et al.* A phase II study of O 6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-grade gliomas and brainstem gliomas: A Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J. Neurooncol.* **106**, 643–649 (2012).

62. Xing, W. K., Shao, C., Qi, Z. Y., Yang, C. & Wang, Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: A meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3341–3348 (2015).
63. Baer, J. C. *et al.* Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br. J. Cancer* **67**, 1299–1302 (1993).
64. Herrlinger, U. *et al.* Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **393**, 678–688 (2019).
65. Zhang, H. *et al.* Glioblastoma treatment modalities besides surgery. *J. Cancer* **10**, 4793–4806 (2019).
66. Ellis, L. M. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **18**, 1007–1021 (2004).
67. Laskin, J. J. & Sandler, A. B. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Lung Cancer Therapy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **25**, 17–27 (2004).
68. Cloughesy, T. F. *et al.* Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat. Med.* **25**, 477–486 (2019).
69. Berghoff, A. S. *et al.* Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **17**, 1064–1075 (2015).
70. Zeng, J. *et al.* Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **86**, 343–349 (2013).
71. Strmsek, Z. & Kunej, T. MicroRNA silencing by DNA methylation in human cancer: A literature analysis. *Non-coding RNA* **1**, 44–52 (2015).
72. Shea, A. *et al.* MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Medicine* **5**, 1917–1946 (2016).
73. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).

74. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
75. MacFarlane, L.-A. & R. Murphy, P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* **11**, 537–561 (2010).
76. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **1**, (2016).
77. Bayraktar, R., Bertilaccio, M. T. S. & Calin, G. A. The interaction between two worlds: MicroRNAs and Toll-like receptors. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
78. O'Neill, L. A., Sheedy, F. J. & McCoy, C. E. MicroRNAs: The fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **11**, 163–175 (2011).
79. Paulmurugan, R., Malhotra, M. & Massoud, T. F. The protean world of non-coding RNAs in glioblastoma. *J. Mol. Med.* **97**, 909–925 (2019).
80. Wei, J. S. *et al.* The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* **27**, 5204–5213 (2008).
81. Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **17**, 193–199 (2010).
82. Tarasov, V. *et al.* Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G 1-arrest. *Cell Cycle* **6**, 1586–1593 (2007).
83. Zhao, T., Li, J. & Chen, A. F. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **299**, (2010).
84. Liu, C. *et al.* The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat. Med.* **17**, 211–5 (2011).
85. Nalls, D., Tang, S.-N., Rodova, M., Srivastava, R. K. & Shankar, S. Targeting Epigenetic Regulation of miR-34a for Treatment of Pancreatic Cancer by Inhibition of Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS One* **6**, e24099 (2011).

86. Corney, D. C. *et al.* Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1119–1128 (2010).
87. Welch, C., Chen, Y. & Stallings, R. L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**, 5017–5022 (2007).
88. Deng, X. *et al.* MicroRNA-34a regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting silent information regulator 1. *Exp. Ther. Med.* **15**, 3705–3714 (2018).
89. Dang, Y., Luo, D., Rong, M. & Chen, G. Underexpression of miR-34a in Hepatocellular Carcinoma and Its Contribution towards Enhancement of Proliferating Inhibitory Effects of Agents Targeting c-MET. *PLoS One* **8**, (2013).
90. Guessous, F. *et al.* microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* **9**, 1031–6 (2010).
91. Rathod, S. S., Rani, S. B., Khan, M., Muzumdar, D. & Shiras, A. Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio* **4**, 485–95 (2014).
92. Li, S. Z. *et al.* MicroRNA-34a induces apoptosis in the human glioma cell line, A172, through enhanced ROS production and NOX2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 6–12 (2014).
93. Thor, T. *et al.* MiR-34a deficiency accelerates medulloblastoma formation in vivo. *Int. J. Cancer* **136**, 2293–2303 (2015).
94. Fan, Y. N., Meley, D., Pizer, B. & Sée, V. Mir-34a mimics are potential therapeutic agents for p53-mutated and chemo-resistant brain tumour cells. *PLoS One* **9**, (2014).
95. Li, Y. *et al.* MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.* **69**, 7569–76 (2009).
96. Luan, S., Sun, L. & Huang, F. MicroRNA-34a: A Novel Tumor Suppressor in p53-mutant Glioma Cell Line U251. *Arch. Med. Res.* **41**, 67–74 (2010).

97. Ofek, P. *et al.* Restoring the oncosuppressor activity of microRNA-34a in glioblastoma using a polyglycerol-based polyplex. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 2201–2214 (2016).
98. Wang, B. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted exosomes overexpressing microRNA-34a ameliorate glioblastoma development via down-regulating MYCN. *Cell. Oncol.* **42**, 783–799 (2019).
99. Gao, H., Zhao, H. & Xiang, W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J. Neurooncol.* **113**, 221–228 (2013).
100. Vaitkiene, P. *et al.* Association of miR-34a expression with quality of life of glioblastoma patients: A prospective study. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
101. Jesionek-Kupnicka, D. *et al.* MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with MGMT and TP53 expression in primary glioblastoma patients. *Arch. Med. Sci.* **15**, 504–512 (2019).
102. Lodygin, D. *et al.* Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* **7**, 2591–2600 (2008).
103. Misso, G. *et al.* Mir-34: A new weapon against cancer? *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **3**, e194 (2014).
104. Kashat, M. *et al.* Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. *Am. J. Transl. Res.* **4**, 432–42 (2012).
105. Yang, F. *et al.* MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **13**, 77–86 (2014).
106. Li, L. *et al.* MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin. Exp. Med.* **13**, 109–117 (2013).
107. Yang, P. *et al.* TGF- β -miR-34a-CCL22 Signaling-Induced Treg Cell Recruitment Promotes Venous Metastases of HBV-Positive Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **22**, 291–303 (2012).

108. Muppala, S. *et al.* CD24 Induces Expression of the Oncomir miR-21 via Src, and CD24 and Src Are Both Post-Transcriptionally Downregulated by the Tumor Suppressor miR-34a. *PLoS One* **8**, (2013).
109. Siemens, H., Jackstadt, R., Kaller, M. & Hermeking, H. Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget* **4**, 1399–1415 (2013).
110. Li, N. *et al.* miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* **275**, 44–53 (2009).
111. Menges, C. W. *et al.* Tumor suppressor alterations cooperate to drive aggressive mesotheliomas with enriched cancer stem cells via a p53-miR-34a-c-met axis. *Cancer Res.* **74**, 1261–1271 (2014).
112. Yamamura, S. *et al.* MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* **7**, (2012).
113. Tomosugi, M. *et al.* Retinoblastoma gene-independent G1 phase arrest by flavone, phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, and histone deacetylase inhibitor. *Cancer Sci.* **103**, 2139–2143 (2012).
114. Wu, X. *et al.* MicroRNA-34a inhibits human osteosarcoma proliferation by downregulating ether à go-go 1 expression. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 676–682 (2013).
115. Kaller, M. *et al.* Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, (2011).
116. Kim, H. R. *et al.* A p53-inducible microRNA-34a downregulates Ras signaling by targeting IMPDH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 682–688 (2012).
117. Zhao, G. *et al.* MicroRNA-34a suppresses cell proliferation by targeting Imtk3 in human breast cancer mcf-7 cell line. *DNA Cell Biol.* **32**, 699–707 (2013).
118. Duan, W. *et al.* Ectopic expression of miR-34a enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells, partly by suppressing the LyGDI signaling pathway. *J. Radiat. Res.* **54**, 611–619 (2013).

119. Mandke, P. *et al.* MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One* **7**, (2012).
120. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol.* **8**, (2011).
121. Kang, J. H. *et al.* Rhamnetin and cirsiolol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* **288**, 27343–27357 (2013).
122. Ji, X. *et al.* Delta-tocotrienol suppresses Notch-1 pathway by upregulating miR-34a in nonsmall cell lung cancer cells. *Int. J. Cancer* **131**, 2668–2677 (2012).
123. Garofalo, M. *et al.* MiR-34a/c-Dependent PDGFR- α/β Downregulation Inhibits Tumorigenesis and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Lung Cancer. *PLoS One* **8**, (2013).
124. Silber, J. *et al.* MiR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PLoS One* **7**, (2012).
125. Jin, K. *et al.* miR-34 is associated with poor prognosis of patients with gallbladder cancer through regulating telomere length in tumor stem cells. *Tumor Biol.* **35**, 1503–1510 (2014).
126. Mudduluru, G. *et al.* Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene* **30**, 2888–2899 (2011).
127. MacKiewicz, M. *et al.* Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 663–679 (2011).
128. Yamakuchi, M. & Lowenstein, C. J. MiR-34, SIRT1 and p53: The feedback loop. *Cell Cycle* **8**, 712–715 (2009).
129. Shen, Z. *et al.* MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med. Oncol.* **29**, 2473–2480 (2012).

130. Cao, W. *et al.* miR-34a regulates cisplatin-induce gastric cancer cell death by modulating PI3K/AKT/survivin pathway. *Tumor Biol.* **35**, 1287–1295 (2014).
131. Heinemann, A. *et al.* Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res.* **72**, 460–471 (2012).
132. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683–692 (2007).
133. Jeltsch, A. & Jurkowska, R. Z. New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences* **39**, 310–318 (2014).
134. Attwood, J. T., Yung, R. L. & Richardson, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 241–257 (2002).
135. Esteller, M. ABERRANT DNA METHYLATION AS A CANCER-INDUCING MECHANISM. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 629–656 (2005).
136. Dimopoulos, K., Gimsing, P. & Grønbæk, K. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. *European Journal of Haematology* **91**, 95–105 (2013).
137. Zhu, W. *et al.* MicroRNA-34a suppresses the invasion and migration of colorectal cancer cells by enhancing EGR1 and inhibiting vimentin. *Exp. Ther. Med.* **18**, 2459–2466 (2019).

Perfil de Metilação e Expressão de miR-34a em Glioblastoma Multiforme

[ARTIGO]

LEANDRO DALOLIO RAMIRE¹, SILVIA HELENA BAREM RABENHORST², MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS PARDINI^{1,3}, REJANE MARIA TOMMASINI GROTO⁴, MARCO ANTONIO ZANINI⁵, ADRIANA CAMARGO FERRAS^{1,3}

¹Molecular Biology Laboratory, Transfusion Blood Center, HC-FMB, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu-SP, Brazil.

²Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil

³Department of Internal Medicine, Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu-SP, Brazil.

⁴Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu-SP, Brazil

⁵Department of Neurology, Psychology and Psychiatry, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu-SP, Brazil.

Resumo

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), embora considerados raros, contribuem de forma significativa para a morbidade e mortalidade mundial. Dentre os tumores do SNC, o glioblastoma multiforme (GBM) apresenta o pior prognóstico, com altas taxas de proliferação, invasão e difícil excisão cirúrgica completa. Atualmente, os microRNAs (miRNAs) têm sido considerados importantes na gênese e progressão do câncer, uma vez que participam da regulação de diversos processos biológicos como o controle da proliferação, diferenciação celular e apoptose. O miR-34a é ativado por *TP53* e atua no controle pós transcricional da expressão de genes envolvidos na proliferação celular. A sub-expressão do miR-34a já foi associada à progressão do câncer em vários tipos celulares. Esse microRNA pode ser silenciado tanto por mutações no *TP53* ou deleção da região cromossômica 1p36 quanto por metilação na sua região promotora. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivos definir o perfil de metilação da região promotora e a expressão relativa do miR-34a em amostras de glioblastoma multiforme, quando comparados com o tecido glial normal. A maioria dos casos (82.5%) exibiu subexpressão de miR-34a, contudo, poucos casos apresentaram metilação na região promotora da transcrição.

Concluimos que a metilação, em nosso estudo, parece não ser o principal mecanismo envolvido no silenciamento do miR-34a, mas sua significativa sub-expressão sugere que esse microRNA representa ser um importante supressor tumoral, como potencial biomarcador no diagnóstico e prognóstico, além do potencial uso adjuvante como molécula terapêutica em GBM.

Palavras-chave: glioblastoma, miR-34a, metilação, SNC

Introdução

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) correspondem ao 18º tipo de câncer mais frequente, independente do sexo¹, representando 1,7% de todos os tumores malignos relatados no mundo.² Apesar de serem considerados raros, os tumores do SNC, contribuem de forma significativa para a mortalidade no mundo e tem-se observado um aumento de sua incidência e mortalidade nos últimos anos.^{3,4}

Dentre os tumores do SNC, os gliomas são neoplasias originárias das células da glia encefálica, cuja principal função é dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. São classificados segundo o tipo celular que os originou como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e oligoastrocitomas (gliomas mistos). Dentre os gliomas, 70% são astrocitomas, 10-15% são oligodendrogliomas e 3-5% são do tipo ependimomas.

Os astrocitomas são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos. Classicamente, os astrocitomas são classificados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) de acordo com o grau de malignidade em astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas difusos fibrilares (grau II), astrocitomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas multiformes (grau IV).

O glioblastoma multiforme (GBM) ocorre mais frequentemente em adultos e corresponde a aproximadamente 50% dos tumores malignos do SNC. São clinicamente agressivos e muito invasivos, com capacidade de invasão extra-axial e prognóstico ruim, com uma média de 15 meses de sobrevida após o diagnóstico.^{5,6}

Estudos sugerem que o GBM pode evoluir a partir dos astrocitomas de baixo grau (I e II) pré-existentes ou a partir da tumorigênese de células morfolologicamente normais, sendo assim, denominados glioblastoma secundário ou primário, respectivamente.^{7,8}

As vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e progressão dos glioblastomas ainda não são totalmente conhecidas. Contudo, dentre as alterações genéticas mais frequentemente observadas estão a *LOH 10q23* (perda da heterozigosidade do cromossomo 10q23) (em aproximadamente 70% dos casos), metilação no gene de reparo do DNA *MGMT* (DNA O(6) metilguanina-metiltransferase) (30 - 60%), mutações em *EGFR* (Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico) (57%), mutações no *PTEN* (principal via de sinalização para proliferação celular) (44%) e mutações no gene que codifica a enzima IDH1 (correlacionada ao

aumento da metilação de histonas, alterando expressão gênica e promovendo transformação oncogênica) (12%).⁹⁻¹⁴

Estudos sugerem que os glioblastomas primários e os secundários diferem quanto as vias moleculares alteradas. Nos glioblastomas primários pode-se verificar a predominância de mutações em *TERT* (região promotora da transcriptase reversa da telomerase) (~80%), deleção do gene *CDKN2A* (31~52%) e alterações no EGFR (36~60%); nos glioblastomas secundários observam-se mutações em *IDH1* (88%) e *TP53* (65%), *ATRX* (57~80%), além da *LOH 19q* (perda da heterozigosidade do cromossomo 19q) (54%).^{8,15-18}

Atualmente, vem sendo relatada a importância dos microRNAs (miRNAs) na regulação de diversos processos biológicos como o controle da proliferação, diferenciação celular e apoptose.¹⁹⁻²³ Os miRNAs são moléculas de fita simples, não codificadoras de proteínas, envolvidas no controle da expressão de 30% a 50% dos genes humanos.^{24,25} Frequentemente, esse controle ocorre pela ligação dessas moléculas na região 3' não traduzida dos RNA mensageiros (RNAm).^{26,27}

A relevância dos miRNAs nos processos fisiológicos celulares tem despertado o interesse sobre a importância da desregulação na sua expressão em eventos patológicos celulares, dentre eles o câncer. Alvo do gene *TP53* (*Tumor Protein P53*), o microRNA-34a (miR-34a) tem se destacado por seu potencial efeito antitumoral, por meio da regulação de processos fundamentais no desenvolvimento e progressão de tumores, como ciclo celular, apoptose, diferenciação, proliferação, invasão e metástase.²⁸⁻³³

A desregulação da expressão do miR-34a foi relatada em diversos tumores, incluindo o glioblastoma, tendo como possíveis causas mutações no *TP53* e/ou deleção do cromossomo 1p36 e silenciamento por metilação na região promotora da transcrição no gene *MIR34A*.^{34,35}

Nesse contexto, esse estudo teve como objetivos definir o perfil de metilação da região promotora e a expressão relativa do miR-34a em amostras de glioblastoma multiforme, comparados com o tecido glial normal.

Casuística e Metodologia

Casuística

Amostras de tecido tumoral de 40 pacientes acometidos por glioblastoma multiforme e assistidos pelo Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP foram incluídos nesse estudo. Como parâmetro de normalidade de tecidos não tumorais do Sistema Nervoso Central (SNC) 11 amostras de tecidos gliais foram obtidas por ocasião de necropsia de indivíduos cujo óbito não fora causado por câncer ou outras doenças, provenientes do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Metodologia

PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

RNA total foi isolado das amostras tumorais e não tumorais pelo RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, Texas), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi gerado a partir de 1 ug de RNA total usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) e *primers reverse* específicos de cada gene (alvo e endógeno) (tabela 1). A RT-qPCR foi realizada no ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), utilizando a GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em duplicata, cada uma composta por 2 uL de cDNA, 6,25 uL de tampão de amplificação GoTaq qPCR Master Mix 2X, 0.3 uM de cada *primer* e água livre de nucleases para um volume final de 12,5uL.

Os *primers* usados na RT-qPCR para o pri-miR-34a³⁶ e RNA U6 (endógeno) estão descritos na tabela 1. cDNAs provenientes de amostras de tecido glial não-tumoral foram utilizados como controle (calibrador) na quantificação relativa (RQ), calculada pelo método comparativo de C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) segundo Livak e Schmittgen³⁷.

Tabela 1 – Sequência de *primers* e condições de reação para RT-qPCR e MSP-PCR

Alvo	Primer (5' - 3') forward	Primer (5' - 3') reverse	Tamanho (pb)	Temperatura anelamento
pri-miR-34a	CGTCACCTCTTAGGCTTGGA	CATTGGTGTCTGTTGTGCTCT	128	60°C
RNA U6	TCGCTTCGGCAGCACATATAC	GCGTGTCATCCTTGCGCAG	123	60°C
miR-34a-MET	GGTTTTGGGTAGGCGCGTTTC	TCCTCATCCCCTTCACCGCCG	122	60°C
miR-34a-UMET	IIGGTTTTGGGTAGGTGTGTTTT	AATCCTCATCCCCTTCACCACCA	126	63°C

I = inosina

MSP-PCR (PCR Específica para Metilação)

O DNA foi isolado dos tecidos tumorais e não tumorais pelo DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Após a extração, 1 μ g de DNA foi tratado com bissulfito de sódio pelo EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA modificado foi amplificado com *primers* específicos (tabela 1) para as condições de promotor de miR-34a metilado e não-metilado.³⁶ MSP-PCR foi realizada em dois tubos individuais com 25 μ L de reação contendo 1X Platinum Taq Buffer, 1,5 mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L de cada dNTP, 0,4 μ mol/L de cada primer, 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 2 μ L do DNA tratado. DNA metilado *in vitro* por Sss-I methylase (New England Biolabs) foi usado como controle positivo e água foi usada como controle negativo. Os produtos de PCR metilado e não-metilado (122 e 126 pares de bases, respectivamente) foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6%, corado por nitrato de prata.

Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva dos dados com frequência e porcentagens para as variáveis qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foram avaliados a média, mediana, desvio padrão e valores de mínimo e de máximo. Para verificar expressão relativa de *MIR34A* foi realizado um teste de proporção. E para verificar a associação entre a expressão e as variáveis explanatórias de interesse foi realizado um Teste Qui quadrado (χ^2) ou Exato de Fisher, quando necessário. Já para comparar a expressão com idade foi realizado o Teste *t*Student após realizar o Teste de normalidade para verificar a distribuição dos dados, e os mesmos apresentaram uma distribuição simétrica. Para testar a concordância entre as variáveis expressão e MSP-PCR foi calculado o coeficiente *Kappa*. Considerou-se valor de $p < 0.05$ como nível de significância. O programa utilizado para realizar as análises foi o programa SAS, versão 9.4.

Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP mediante parecer 3.241.332 (CAAE 06516918.5.0000.5411) e foi conduzido de acordo com o protocolo da Declaração de

Helsinki de 1964 (revisado em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000). Todos os participantes deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Resultados

Dentre os 40 pacientes incluídos nesse estudo, 24 (60%) eram do gênero masculino e 16 (40%) do gênero feminino. A mediana das idades foi 58 anos (desvio padrão ± 14.34).

Expressão relativa de miR-34a

A expressão do transcrito primário do miR-34a (pri-miR34a) nos tecidos tumorais foi comparada a dos tecidos gliais normais³⁷. Em 33 casos (82.5%) de glioblastoma houve redução da expressão do miR-34a quando comparados ao grupo controle ($p < 0.0001$, teste qui-quadrado (χ^2)) (Figura 1). As amostras foram distribuídas por gênero e idade e a mesma proporção foi mantida (χ^2 e teste t de Student), indicando uma distribuição simétrica dos resultados, não influenciados pelo gênero e/ou pela idade do grupo amostral.

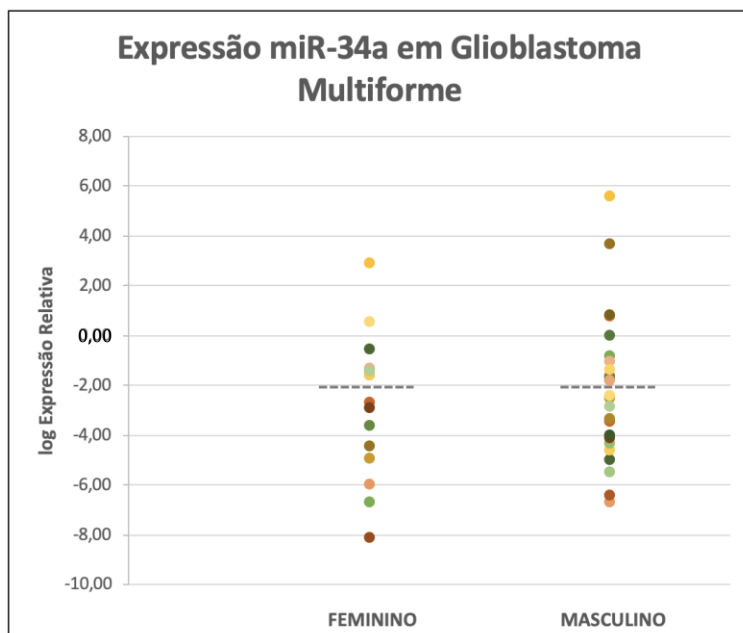


Figura 1. Gráfico de dispersão dos valores de expressão relativa ($\log^2$) do miR-34a em 40 casos de glioblastoma multiforme ($p < 0.0001$), distribuídos por gênero ($p = 0.4968$). As medianas são indicadas pelas linhas tracejadas.

MSP-PCR

O perfil de metilação da região promotora do gene *MIR34A* foi avaliada por MSP-PCR. Nove amostras tumorais (22.5%) apresentaram-se metiladas, dentre elas quatro casos do gênero masculino e cinco femininos. Uma das amostras do grupo controle (1/11; 9.1%) estava metilada. Quando os grupos foram comparados, não foi observada significância estatística (22.5% vs 9.1%, $p=0.321$, χ^2). A mediana das idades dos casos metilados e não metilados foram 62 e 58 anos, respectivamente. Não houve diferença na média das idades entre os dois grupos (56,8 vs 57,9 anos). A figura 2 ilustra um gel de eletroforese para a visualização do resultado de MSP-PCR.

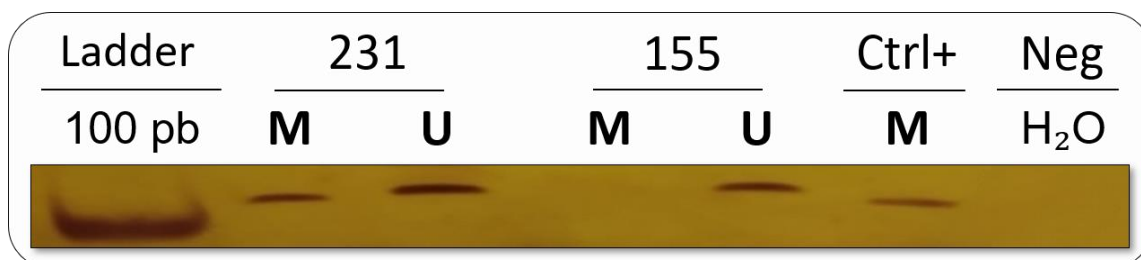


Figura 2. Imagem ilustrativa dos resultados da MSP-PCR em gel de poliacrilamida 6% revelados com nitrato de prata. M: produto amplificado com *primers* para a região metilada (122 pares de bases); U: produto amplificado com *primers* para a região não metilada (126 pares de bases). Caso 231 (metilado) e Caso 155 (não metilado); Ctrl+ (controle positivo metilado *in vitro* por Sss-I methylase (New England Biolabs)); Neg: reação sem DNA.

Para testar a concordância entre a expressão (qPCR) e metilação (MSP-PCR) de miR-34a foi calculado o coeficiente *Kappa* e não foi encontrada associação estatística significativa entre essas duas variáveis ($p=0.1342$).

Discussão e Conclusão

O miR-34a apresenta um potencial efeito antitumoral e, como alvo transcricional direto do gene *TP53*,³⁸⁻⁴⁰ participa do controle do ciclo celular e apoptose, indispensáveis para o crescimento normal da célula. A sub-expressão do miR-34a já foi associada ao desenvolvimento e/ou progressão de vários tipos de tumores.^{28,41-48} Observamos uma marcante redução da expressão do miR-34a em 82.5% (33/40; $p<0.0001$) dos glioblastomas multiformes (GBM) analisados em nosso estudo. Esses dados corroboram outros já publicados por Yunqing Li et al,³⁵ que mostraram expressão de miR-34a regulada negativamente em GBM e em gliomas P53 mutantes, quando comparados ao tecido normal. Um estudo envolvendo a transferência de um miR-34a mimico (artificial) à linhagem de glioma U251 (miR-34a

sub-expresso) induziu a restauração da sua expressão, resultando na inibição do crescimento, parada do ciclo celular na fase G0-G1 e apoptose. Além disso, a restauração do miR-34a reduziu significativamente as capacidades de migração e invasão *in vitro*.⁴⁹

Yuen Ngan Fan et al⁵⁰ demonstraram relevância do miR-34a na sensibilidade de GBM e meduloblastoma à quimioterapia, mesmo quando esses tumores possuíam mutações em *TP53*, que conferem quimioresistência. Tais resultados mostram que a necessidade de uma via de sinalização funcional da P53 pode ser contornada pela ativação direta do miR-34a nas células tumorais cerebrais. Os principais desafios da terapia nos GBM estão relacionados a sua localização e ao alto grau de heterogeneidade inter-tumoral, resultado de diferentes combinações de alterações genéticas.⁶ Contudo, a maioria (82.5%) da casuística analisada no presente estudo apresentou miR-34a sub-expresso, e tais resultados associados a estudos anteriores⁵⁰ sugerem o potencial uso do miR-34a como molécula terapêutica adjuvante em GBM.

A hipermetilação na região promotora de genes supressores tumorais e o consequente silenciamento transcricional é bem conhecido⁵¹ e a sua importância para a carcinogênese e progressão tumoral é equitativa às mutações.³⁶ De maneira inédita, nosso estudo analisou o perfil de metilação da região promotora da transcrição do *MIR34A* em amostras de glioblastomas. Apenas 22.5% (9/40) dos casos estudados estavam metilados e a análise de concordância (*Kappa*) entre os perfis de expressão (qPCR) e metilação não apresentou associações relevantes entre as duas variáveis ($p=0.1342$). Na literatura, alguns tipos tumorais apresentaram alta frequência de hipermetilação em *MIR34A* como o câncer de próstata (79.1%), melanoma (62.5%), câncer de bexiga (33.3%) e de pulmão (29.1%) e outros apresentaram menor frequência como o câncer de mama (25%), rins (21.4%), pâncreas (15.7%) e cólon (13.0%), como em nosso estudo.³⁶ Além da metilação, outros mecanismos podem estar envolvidos no silenciamento de miR-34a como a deleção cromossômica 1p36 (onde o gene está localizado), e também mutações em *TP53*. A transcrição de miR-34a é ativada por p53 e este, por sua vez regula a expressão de múltiplos genes envolvidos nas origens e progressão do câncer, como *SIRT1*, *BCL2*, *MYC*, *CDK4/6*, *NOTCH1*, *MET*, entre outros.^{52,53} As análises de mutações e expressão de *TP53* não

foram realizadas em nosso estudo mas devem ser levadas em consideração em estudos futuros que investigam essa importante questão.

Uma das amostras de tecido glial normal apresentou-se metilada (1/11; 9.1%). A metilação parece ocorrer precocemente durante a progressão do tumor e, assim, apresenta potencial de aplicações no diagnóstico e avaliação de risco no futuro.⁵⁴

Os resultados do presente estudo mostraram que o miR-34a está sub-expresso na maioria dos casos de GBM e que a metilação parece não ser o principal mecanismo envolvido no silenciamento desse miRNA.

Referências

1. World Health Organization. *Cancer Today - International Agency for Research on Cancer*. (2018). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
2. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
3. Sant, M. *et al.* Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int. J. Cancer* **131**, 173–185 (2012).
4. BRASIL. Sistema de informações sobre mortalidade. *Sistema de informações sobre mortalidade* (2017). Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
5. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
6. Wen, P. & Kesari, S. Malignant Gliomas in Adults — NEJM. *NEJM* **359**, 492–507 (2008).
7. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683–2710 (2007).
8. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445–1453 (2007).

9. Parsons, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* (80-.). **321**, 1807–1812 (2008).
10. Brennan, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
11. Weller, M. *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 39–51 (2010).
12. Bigner, S. H. *et al.* Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.* **48**, 405–11 (1988).
13. Wang, S. I. *et al.* Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **57**, 4183–6 (1997).
14. Lu, C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474–478 (2012).
15. Böglér, O., Su Huang, H.-J., Kleihues, P. & Cavenee, W. K. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* **15**, 308–327 (1995).
16. Balss, J. *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* **116**, 597–602 (2008).
17. Killela, P. J. *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6021–6026 (2013).
18. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* **19**, 764–772 (2013).
19. Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **113**, 25–36 (2003).
20. Esau, C. *et al.* MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 52361–52365 (2004).

21. Sun, C.-C. *et al.* Hsa-miR-329 exerts tumor suppressor function through down-regulation of MET in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 21510–26 (2016).
22. Sun, C. *et al.* Down-regulation of c-Met and Bcl2 by microRNA-206, activates apoptosis, and inhibits tumor cell proliferation, migration and colony formation. *Oncotarget* **6**, 25533–74 (2015).
23. Sun, C. *et al.* Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget* **6**, 39756–92 (2015).
24. Rajewsky, N. MicroRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* **38**, S8–S13 (2006).
25. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
26. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 376–385 (2005).
27. Grosswendt, S. *et al.* Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions. *Mol. Cell* **54**, 1042–1054 (2014).
28. Welch, C., Chen, Y. & Stallings, R. L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**, 5017–5022 (2007).
29. Cole, K. A. *et al.* A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol. Cancer Res.* **6**, 735–42 (2008).
30. Raver-Shapira, N. *et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **26**, 731–43 (2007).
31. Bommer, G. T. *et al.* p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr. Biol.* **17**, 1298–307 (2007).
32. Muppala, S. *et al.* CD24 Induces Expression of the Oncomir miR-21 via Src, and CD24 and Src Are Both Post-Transcriptionally Downregulated by the Tumor Suppressor miR-34a. *PLoS One* **8**, (2013).

33. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol.* **8**, (2011).
34. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683–692 (2007).
35. Li, Y. *et al.* MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.* **69**, 7569–76 (2009).
36. Lodygin, D. *et al.* Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* **7**, 2591–2600 (2008).
37. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
38. Hermeking, H. p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer Cell* **12**, 414–418 (2007).
39. He, X., He, L. & Hannon, G. J. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res.* **67**, 11099–101 (2007).
40. Jesionek-Kupnicka, D. *et al.* MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with MGMT and TP53 expression in primary glioblastoma patients. *Arch. Med. Sci.* **15**, 504–512 (2019).
41. Liu, C. *et al.* The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat. Med.* **17**, 211–5 (2011).
42. Nalls, D., Tang, S.-N., Rodova, M., Srivastava, R. K. & Shankar, S. Targeting Epigenetic Regulation of miR-34a for Treatment of Pancreatic Cancer by Inhibition of Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS One* **6**, e24099 (2011).
43. Corney, D. C. *et al.* Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1119–1128 (2010).
44. Deng, X. *et al.* MicroRNA-34a regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting silent information regulator 1. *Exp. Ther. Med.* **15**, 3705–3714 (2018).

45. Dang, Y., Luo, D., Rong, M. & Chen, G. Underexpression of miR-34a in Hepatocellular Carcinoma and Its Contribution towards Enhancement of Proliferating Inhibitory Effects of Agents Targeting c-MET. *PLoS One* **8**, (2013).
46. Guessous, F. *et al.* microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* **9**, 1031–6 (2010).
47. Rathod, S. S., Rani, S. B., Khan, M., Muzumdar, D. & Shiras, A. Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio* **4**, 485–95 (2014).
48. Thor, T. *et al.* MiR-34a deficiency accelerates medulloblastoma formation in vivo. *Int. J. Cancer* **136**, 2293–2303 (2015).
49. Luan, S., Sun, L. & Huang, F. MicroRNA-34a: A Novel Tumor Suppressor in p53-mutant Glioma Cell Line U251. *Arch. Med. Res.* **41**, 67–74 (2010).
50. Fan, Y. N., Meley, D., Pizer, B. & Sée, V. Mir-34a mimics are potential therapeutic agents for p53-mutated and chemo-resistant brain tumour cells. *PLoS One* **9**, (2014).
51. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23–38 (2013).
52. Misso, G. *et al.* Mir-34: A new weapon against cancer? *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **3**, e194 (2014).
53. Rokavec, M., Li, H., Jiang, L. & Hermeking, H. The p53/miR-34 axis in development and disease. *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 214–30 (2014).
54. Laird, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer* **3**, 253–266 (2003).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de Expressão Diferencial de miR-34a em Glioblastoma Multiforme

Pesquisador: LEANDRO DALOLIO RAMIRE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 06516918.5.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.241.332

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa a ser desenvolvido pelo pesquisador Leandro Dalolio Ramire, sob orientação da Profa. Adriana Camargo Ferrasi.

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), embora considerados raros, contribuem de forma significativa para a morbidade e mortalidade mundial. Representam 1,8% dos tumores malignos e registros atuais apontam elevações significativas na incidência mundial. Dentre os tumores do SNC, o glioblastoma multiforme apresenta o prognóstico mais sombrio, com altas taxas de proliferação, necrose microvascular e excisão cirúrgica completa raramente atingida. Estudos sugerem que o glioblastoma pode evoluir a partir dos astrocitomas de baixo grau (I e II) pré-existentes ou a partir da tumorigênese de células morfológicamente normais. Atualmente os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA não traduzidos, têm sido alvo de estudos, pois a desregulação na expressão de vários miRNAs já foram relacionadas à ocorrência ou progressão de alguns cânceres, inclusive do SNC. Tais achados sustentam a hipótese de que alguns desses miRNAs poderiam ser úteis tanto como biomarcadores diagnósticos quanto pelo seu potencial uso terapêutico. Nesta pesquisa serão utilizados materiais biológicos de 30 participantes, sendo 10 de astrocitoma, 10 de glioblastoma e 10 normais, estocados no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu remanescentes das coletas realizadas para o projeto "Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em Astrocitomas", sob número de aprovação CEP

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.241.332

097423/2014.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a expressão relativa do miR-34a em amostras de tumores astrocíticos de baixo grau e glioblastoma multiforme (grau IV) quando comparados aos respectivos tecidos normais, verificando seu potencial como biomarcador diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A participação nesse estudo não acarretará em nenhuma mudança no que diz respeito a cirurgia ou a qualquer outro tipo de tratamento (radioterapia, quimioterapia, entre outras). Nenhum efeito colateral será causado pelo presente estudo. Assim, não haverá aumento dos riscos já inerentes aos procedimentos que são realizados rotineiramente nos pacientes em igual situação.

Benefícios:

Não haverá qualquer benefício imediato ao paciente com esta pesquisa. Contudo, os resultados do estudo poderão ajudar para que sejam melhores entendidos os tumores que afetam o cérebro. Adicionalmente, qualquer informação obtida com esta pesquisa que venha a ser comprovada como benefício, será imediatamente repassada ao médico que acompanha os voluntários da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Haverá um custo de R\$ 6.800,00, com financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos obrigatórios foram apresentados adequadamente.

Houve pedido de dispensa do TCLE, pois o material a ser utilizado está estocado em biorrepositório.

Os autores apresenta o regulamento do biorrepositório.

O cronograma está compatível com aprovação deste Comitê.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa da

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.241.332

FMB/UNESP, realizada em 1º de ABRIL de 2019, o projeto analisado encontra-se APROVADO para ser iniciado, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, ao final da execução do projeto de pesquisa, é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades", na forma de "NOTIFICAÇÃO", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1252893.pdf	29/01/2019 12:37:42		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	29/01/2019 12:36:36	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencia_HEMOCENTRO.Pdf	29/01/2019 12:27:16	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencia_HCFMB.Pdf	29/01/2019 12:26:55	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional_FMB.pdf	29/01/2019 12:26:21	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	18/12/2018 19:19:44	LEANDRO DALOLIO RAMIRE	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	18/12/2018 19:18:36	LEANDRO DALOLIO RAMIRE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/11/2018 15:50:12	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.241.332

BOTUCATU, 03 de Abril de 2019

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

6 **Endereço:** Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

ANEXO 2

Tabela 1 - Dados gerais da casuística e resultados.

CÓDIGO	IDADE	GÊNERO	CLASSIFICAÇÃO	GRAU	METILAÇÃO <i>MIR34A</i>	qPCR Relativa* <i>miR-34a</i>
1	70	M	GBM	IV	N-MET	0,012230
3	59	M	GBM	IV	N-MET	0,747846
16	58	M	GBM	IV	N-MET	5,564495
30	32	F	GBM	IV	N-MET	-1,611824
35	58	M	GBM	IV	N-MET	-0,845571
41	45	M	GBM	IV	N-MET	-1,686597
49	56	M	GBM	IV	N-MET	3,684861
54	20	F	GBM	IV	MET	2,905888
55	75	M	GBM	IV	MET	-4,997296
58	23	F	GBM	IV	N-MET	-6,693257
77	64	M	GBM	IV	N-MET	-6,691748
78	46	M	GBM	IV	MET	-4,646627
82	45	M	GBM	IV	N-MET	-4,321364
101	73	F	GBM	IV	N-MET	-8,117737
128	56	M	GBM	IV	N-MET	-3,449838
139	82	M	GBM	IV	MET	-2,537556
143	58	F	GBM	IV	N-MET	-4,485028
147	67	F	GBM	IV	N-MET	-0,554289
150	73	M	GBM	IV	N-MET	-1,691292
155	79	F	GBM	IV	N-MET	-6,006114
161	86	F	GBM	IV	N-MET	-1,619296
163	63	M	GBM	IV	N-MET	-1,048149
169	58	M	GBM	IV	N-MET	-2,417999
173	61	F	GBM	IV	N-MET	-1,402189
178	47	M	GBM	IV	N-MET	-2,867875
179	50	F	GBM	IV	MET	-2,703863
189	51	F	GBM	IV	N-MET	-4,929149
197	54	F	GBM	IV	N-MET	-3,609736
207	34	F	GBM	IV	MET	-1,331204
212	51	M	GBM	IV	N-MET	-4,127323
220	65	M	GBM	IV	N-MET	0,786320
224	55	M	GBM	IV	N-MET	-4,010011
226	73	F	GBM	IV	MET	0,550168
228	52	F	GBM	IV	N-MET	-1,414018
229	58	M	GBM	IV	N-MET	-1,833725
236	57	M	GBM	IV	N-MET	-1,407185
239	69	M	GBM	IV	MET	-5,504863
240	62	F	GBM	IV	MET	-2,901580
246	58	M	GBM	IV	N-MET	-6,448761
247	63	M	GBM	IV	N-MET	-3,373095

GBM = Glioblastoma; N-MET = não metilado; MET = metilado

*valores expressos em Log2; Expressão relativa calculada pelo método comparativo de $C_T (2^{-\Delta\Delta C_T})$ segundo Livak e Schmittgen, 2001.