



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

**Aline Faria Galvani**

**Estudo de RNAs não codificadores  
RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miRNA-34a em  
glioblastoma**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho  
Coorientadoras: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi  
Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

**Botucatu  
2025**

**Aline Faria Galvani**

**Estudo de RNAs não codificadores  
RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miRNA-34a em  
glioblastoma**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho  
Coorientadoras: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi  
Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

Botucatu  
2025

G182e

Galvani, Aline Faria

Estudo de RNAs não codificadores RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miRNA-34a em glioblastoma / Aline Faria Galvani. -- Botucatu, 2025  
108 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Pedro Tadao Hamamoto Filho

Coorientadora: Adriana Camargo Ferrasi

Coorientadora: Estela de Oliveira Lima

1. Biomarcadores moleculares. 2. Glioblastoma. 3. RNAs não codificadores. I. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE MEDICINA

Aline Faria Galvani

Estudo de RNAs não codificadores RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miRNA-34a em glioblastoma

Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho

### Impacto

Nesse estudo, foi possível segregar o grupo de glioblastoma em duas subpopulações com características distintas: uma composta por pacientes mais jovens e outra por pacientes mais idosos. Essa segregação foi determinada pela expressão diferencial de ncRNAs entre os grupos, com destaque para KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2. Esses resultados, aliados a evidências de estudos com linhagens celulares e outros tipos tumorais, sugerem que esses transcritos desempenham um papel relevante no GBM e podem estar associados ao prognóstico.

### Impact

In this study, it was possible to segregate the glioblastoma group into two subpopulations with distinct characteristics: one composed of younger patients and another of older patients. This segregation was determined by the differential expression of ncRNAs between the groups, with emphasis on KCNQ1OT1 and RP11-731F5.2. These results, combined with evidence from studies with cell lines and other tumor types, suggest that these transcripts play a relevant role in GBM and may be associated with prognosis.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALINE FARIA GALVANI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E MEDICINA TRANSLACIONAL, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 17 dias do mês de junho do ano de 2025, às 8h, no(a) Sala de Bioinformática - Bloco V - Unipex, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ALINE FARIA GALVANI, intitulada **Estudo de RNAs não codificadores RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miRNA-34a em glioblastoma**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO TADAO HAMAMOTO FILHO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Neurociências e Saúde Mental / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. MANOEL ANTONIO DE PAIVA NETO (Participação Virtual) do(a) Depto de Neurologia/Neurocirurgia. / EPM/São Paulo - Unifesp, Profa. Dra. MICHELLE BUENO DE MOURA PEREIRA ANTUNES (Participação Virtual) do(a) Universidade Federal de Juiz de Fora. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. PEDRO TADAO HAMAMOTO FILHO

## **Dedicatória**

Dedico esta tese àqueles que cultivaram a semente da minha curiosidade, que acreditaram em mim e que estiveram presentes ao longo desta jornada.

Esta obra é fruto de um empenho coletivo, uma colheita feita através de muitas mãos.

## **Agradecimentos**

A jornada do doutorado é repleta de desafios, aprendizados e, acima de tudo, pessoas que tornam o caminho possível e significativo.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por tamanhas bênçãos em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho, pela confiança depositada em meu trabalho, pela orientação e pelos ensinamentos compartilhados ao longo desta jornada, sempre pautados pelo rigor científico e pela excelência acadêmica.

Às minhas co-orientadoras, Profa Dra Adriana Camargo Ferrasi e Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima. A presença de vocês foi essencial não apenas pelo conhecimento técnico e científico compartilhado, mas também pela generosidade com que sempre dedicaram seu tempo e atenção ao meu desenvolvimento profissional, pelo apoio constante e dedicação em cada etapa deste trabalho.

Suas contribuições tornaram possível o desenvolvimento desta tese, ampliaram minha visão sobre a pesquisa e a prática acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, pela sólida formação acadêmica oferecida e pelo apoio institucional ao longo de todo o percurso deste doutorado.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, Dra. Patrícia Pintor dos Reis, e à secretária do programa, Márcia, meu sincero agradecimento pelo apoio dedicado e pelo auxílio em todas as demandas ao longo desta trajetória.

À CAPES, pelo apoio ao desenvolvimento meu científico.

Aos colegas do Laboratório LAMol, pelo apoio e companheirismo nesta trajetória.

À minha família, meu alicerce, agradeço por todo amor, paciência e compreensão ao longo desses anos.

Aos amigos que, mesmo à distância, estiveram presentes com palavras de incentivo e gestos de carinho.

É com sincero reconhecimento que registro aqui meus agradecimentos.

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Caracterização das moléculas de RNAs não codificadores conforme seu tamanho.....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo do sítio de reconhecimento da enzima de restrição PvuI para distinguir indivíduos mutados de indivíduos selvagens na porção c.395 do gene IDH1 - códon 132. ....	38
<b>Figura 3.</b> (A) Expressão relativa (log2RQ) e (B) Scatter plots dos ncRNAs na casuística de GBM comparados ao grupo controle (CG).....	43
<b>Figura 4.</b> Análise de clusters hierárquicos da casuística de glioblastoma de acordo com a expressão dos ncRNAs RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 e miR-34a. Cluster 1- Retângulo azul: n= 30 pacientes; Cluster 2- Retângulo vermelho: n= 13 pacientes.....	44
<b>Figura 5.</b> Mapa de calor ilustrando a diferença das expressões dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2e miR-34a nas clusterizações. Verde: menor expressão do ncRNA; Vermelho: maior expressão do ncRNA.....	45
<b>Figura 6.</b> Gráficos ilustrativo da comparação entre a idade média (A) entre os dois clusters e o tempo de sobrevida (B) entre eles. ....	45
<b>Figura 7.</b> Curva de sobrevivência Kaplan-Meier dos clusters 1 e 2. Os casos censurados representam os pacientes que não evoluíram ao desfecho (óbito).....	46
<b>Figura 8.</b> Análise de correlação de $\Delta Cq$ dos ncRNAs entre os clusters e grupo controle.....	46
<b>Figura 9.</b> (A) Scatter plots mostram os valores de log2(RQ) ncRNAs quando os casos do Cluster 1 são comparados ao Grupo Controle (CG). (B) Scatter plots mostram os valores de log2(RQ) ncRNAs quando os casos do Cluste 2 são comparados ao grupo controle. Teste-T: $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.....	47
<b>Figura 10.</b> DotPlots representativo das análises de correlações fortes. (A) Correlação entre RP11-731F5.2, KCNQ1OT1; (B) Correlação entre Idade e Sobrevida.....	49

<b>Lista de Tabelas</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Marcadores genéticos e epigenéticos em glioblastomas.....	17
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos lncRNAs em glioblastoma, suas principais funções e evidências.....	20
<b>Tabela 3.</b> Expressão do lncRNA KNCQ1TO1 em diferentes tipos de cânceres, suas associações clínicas e principais moléculas regulatórias.....	24
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos primers para reação em cadeia da polimerase para pesquisa da mutação pontual no gene IDH1 (p.R132H).....	38
<b>Tabela 5.</b> Sequência de primers para análise por RT-qPCR.....	39
<b>Tabela 6.</b> Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo.....	42
<b>Tabela 7.</b> Valores médios de $\Delta Cq$ para RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miR-34a segregados pelos clusters.....	44
<b>Tabela 8.</b> Análise de ANOVA de uma via de idade e os grupos de estudo.....	48
<b>Tabela 9.</b> Matriz de Correlação de Pearson entre ncRNAs e as variáveis idade e sobrevida.....	48

## Lista de Siglas e Abreviaturas

CG	Grupo controle
CH <sub>3</sub>	Grupamento metil
Chr 10	Cromossomo 10
Chr 7	Cromossomo 7
dCAPS	Do inglês - <i>Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Do inglês - <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
GBM	Glioblastoma
IDH1	Do inglês - <i>Gene isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1</i>
IDH2	Do inglês - <i>Gene isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2</i>
KCNQ1OT1	Do inglês - <i>KCNQ1 Opposite Strand/Antisense Transcript 1 of the KCNQ1 gene</i>
lncRNAs	RNAs longos não-codificantes
L-OHP	Oxaliplatin
MGMT	Do inglês - <i>Gene O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
miRNA	micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNAs	RNAs não codificadores
OMS	Organização mundial de saúde
PCAWT	Do inglês - <i>Pan-Cancer analysis of whole transcriptome</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Do inglês - <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RP11-731F5.2	COPDA1 – do inglês - <i>chronic obstructive pulmonary disease associated lncRNA 1</i>
siRNA	RNA pequeno de interferência
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TERT	Do inglês - <i>Gene telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	Temozolamida
UNIPEx	Unidade de pesquisa experimental
ΔCq	Variação do ciclo de quantificação

## Resumo

**Introdução:** Os RNAs não codificadores (ncRNAs) desempenham papéis fundamentais na regulação gênica e têm sido implicados na patogênese de vários tipos de tumores. O lncRNA KCNQ1OT1 já foi relacionado à gênese, progressão tumoral e quimiorresistência em gliomas e, outros estudos o evidenciam como um competidor endógeno de RNA (ceRNAs) que atua como esponja de vários microRNAs, como por exemplo o miR-34a. O lncRNA RP11-731F5.2 foi associado à progressão de outras neoplasias e apresenta interação química com KCNQ1OT1. O glioblastoma é um tumor infiltrativo, resistente às terapias disponíveis e letal. Apesar dos avanços em oncologia, o prognóstico dos pacientes com glioblastoma continua desfavorável. Portanto, estudos que busquem avaliar a importância de ncRNAs como biomarcadores moleculares associados a esta doença são relevantes. **Objetivo:** Investigar a expressão diferencial KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a em amostras de GBM em comparação com tecido glial saudável, visando elucidar o papel desses transcritos na doença. **Casuística e Metodologia:** Foram incluídos neste estudo 43 pacientes com glioblastoma e 13 doadores de tecido glial não tumoral, provenientes, respectivamente, do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. A expressão relativa dos ncRNAs foram determinadas por RT-qPCR, aplicando o método analítico  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . **Resultados e Conclusão:** Duas subpopulações distintas foram reveladas pela expressão dos ncRNAs: indivíduos mais jovens tiveram maior expressão dos ncRNAs quando comparados aos indivíduos mais idosos. Estes, por sua vez, apresentaram menor sobrevida em relação aos indivíduos mais jovens (389 dias vs 501 dias, respectivamente;  $p=0.267$ ) A identificação dessas subpopulações tumorais abre perspectivas para o aprofundamento de estudos futuros, que poderão explorar essas diferenças para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas e eficazes. Também, foi observada alta correlação da expressão entre RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1, o que reforça a sua relevância no contexto do GBM e sua potencial associação com o prognóstico dos pacientes. Conclui-se que os ncRNAs investigados são promissores biomarcadores moleculares no estudo do glioblastoma, podendo contribuir para uma melhor compreensão da biologia tumoral.

**Palavras-chave:** biomarcadores moleculares; glioblastoma; RNAs não codificadores

## Abstract

**Introduction:** Non-coding RNAs (ncRNAs) play key roles in gene regulation and have been implicated in the pathogenesis of various types of tumors. The lncRNA KCNQ1OT1 has already been linked to genesis, tumor progression and chemoresistance in gliomas, and other studies have shown it to be an endogenous RNA competitor (ceRNAs) that acts as a sponge for various microRNAs, such as miR-34a. The lncRNA RP11-731F5.2 has been associated with the progression of other neoplasms and has a chemical interaction with KCNQ1OT1. Glioblastoma is an infiltrative tumor, resistant to available therapies and lethal. Despite advances in oncology, the prognosis of patients with glioblastoma remains unfavorable. Therefore, studies that seek to evaluate the importance of ncRNAs as molecular biomarkers associated with this disease are relevant. **Objective:** To investigate the differential expression of KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 and miR-34a in GBM samples compared to healthy glial tissue, in order to elucidate the role of these transcripts in the disease. **Casuistry and Methodology:** This study included 43 patients with glioblastoma and 13 donors of healthy glial tissue, from the Neurosurgery Department of the Hospital das Clínicas of the Botucatu Medical School and the Necropsy Department of the Pathology Department of the Botucatu Medical School, respectively. The relative expression of the ncRNAs was determined by RT-qPCR, using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  analytical method. **Results and Conclusion:** Two distinct subpopulations were revealed by the expression of ncRNAs: younger individuals had higher ncRNA expression when compared to older individuals. The latter, in turn, had a lower survival rate compared to younger individuals (389 days vs 501 days, respectively;  $p= 0.267$ ). The identification of these tumor subpopulations opens up prospects for further studies, which could exploit these differences to develop more personalized and effective treatment strategies. Also, a high correlation of expression between RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 was observed, which reinforces their relevance in the context of GBM and their potential association with patient prognosis. It is concluded that the ncRNAs investigated are promising biomarkers in the study of glioblastoma, and may contribute to a better understanding of tumor biology and to the development of new therapeutic approaches.

**Keywords:** molecular biomarkers; glioblastoma; non-coding RNAs

## Sumário

1. Introdução.....	14
2. Justificativa.....	30
3. Objetivo.....	32
4. Métodos.....	34
4.1 Premissas Éticas.....	34
4.2 Cálculo do Número Amostral.....	34
4.3 Casuística.....	34
4.3.1 Critérios de inclusão.....	34
4.3.2 Critérios de exclusão.....	35
4.4 Casos Controle - Tecido Glial Saudável.....	35
4.4.1 Critérios de inclusão.....	35
4.4.2 Critérios de exclusão.....	35
4.5 Coleta de Fragmentos Tumorais.....	36
4.6 Coleta de Grupo Controle Tecido.....	36
4.7 Armazenamento das Amostras.....	36
4.8 Análise da Histologia Tumoral.....	36
4.9 Extração de ácidos nucleicos.....	37
4.9.1 Extração de DNA.....	37
4.9.2 Extração de RNA.....	37
4.10 Pesquisa da mutação c.395G>A (p.R132H) nas amostras de GBM coletadas.....	37
4.10.1 Reação dCAPS para pesquisa de mutação somática em IDH1 - c.395G>A, p.R132H.....	37
4.11 Análise da expressão diferencial dos ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miR-34a.....	39
4.11.1 Síntese de cDNA.....	39
4.11.2 Reação qPCR.....	39
4.11.3 Análise das expressões diferenciais dos ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miR-34a.....	40
4.12 Análises Estatísticas.....	40
5. Resultados.....	42
5.1. Dados demográficos.....	42
5.2 Análise da Expressão dos ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miR-34a.....	43
5.2.1 Análise de Expressão dos ncRNAs – Grupo Controle vs GBM.....	43
5.2.2 Análise por Cluster de Expressão dos ncRNAs.....	43
6. Discussão.....	51
7. Conclusões.....	56
8. Referências Bibliográficas.....	58
9. Arquivos Suplementares.....	76
10. Anexos.....	78

# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

Dentre os tumores do sistema nervoso central (SNC), o glioblastoma (grau 4) é considerado o tumor mais agressivo, de comportamento invasivo e letal, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).<sup>1</sup> Estes tumores são responsáveis pela maioria das mortes causadas por tumores primários de SNC, com maior resistência aos tratamentos atualmente disponíveis e, conseqüentemente, pior prognóstico.<sup>1-7</sup>

Estima-se que a sobrevida de pacientes com glioblastoma (GBM) seja em média de 15 meses após o diagnóstico. Quando avaliado o prazo de 5 anos, a sobrevida pode chegar a taxas inferiores a 4,7%, sendo reduzida para 2% em pacientes com idade superior a 65 anos.<sup>8-10</sup>

Embora este tumor seja mais comum em adultos, principalmente em homens caucasianos, também pode estar presente em pacientes na faixa etária pediátrica (de 0 a 19 anos), representando 3% de todos os tumores cerebrais desse grupo.<sup>1,12,13</sup>

A localização tumoral é determinante na sintomatologia dos pacientes e, por apresentarem alta taxa de infiltração, os GBMs podem estar presentes em mais de um lobo cerebral. O lobo frontal é a região de maior acometimento (25%), seguido do temporal (20%), parietal (13%) e occipital (3%). Os sintomas apresentados pelos pacientes são determinados por sua localização e podem apresentar-se como: dores de cabeça, déficits neurológicos focais, confusão mental, alterações de personalidade, perda de memória e crises epiléticas.<sup>14</sup>

O GBM é caracterizado como processo neoplásico astrocítico de alto grau com características histopatológicas que asseguram sua malignidade, tais como: tecido altamente heterogêneo, com atividade mitótica, proliferação vascular e necrose.<sup>15,16</sup> Além das características histopatológicas, características genômicas, epigenômicas e transcricionais também compõem a complexidade da heterogeneidade dos GBMs.<sup>14,17,18</sup>

As perspectivas quanto à patogênese molecular dos GBMs estão avançando constantemente. O intuito destes esforços é tornar o diagnóstico desta doença cada vez mais assertivo, complementando a classificação histológica tumoral e contribuindo para um tratamento baseado em medicina personalizada.<sup>1-7</sup>

A máxima ressecção cirúrgica tumoral, seguida de radioterapia em concomitância à administração do quimioterápico Temozolamida (TMZ) compõem o tratamento trimodal padrão de pacientes portadores de GBM. Entretanto, o tratamento

não é completamente eficaz para evitar recidivas, tornando o GBM um grande desafio para as terapias atualmente disponíveis.<sup>19,20</sup>

Ainda que a terapia molecular, imunoterapia e estratégias terapêuticas combinadas tenham avançado, o prognóstico do paciente portador de GBM permanece desfavorável.<sup>21-27</sup> Isso pode estar diretamente associado às características individuais de cada paciente (idade, sintomatologia apresentada e o estado funcional), à extensão da ressecção cirúrgica bem como à resistência às terapias atualmente disponíveis.<sup>25-28</sup>

Estudos citam a presença da barreira hematoencefálica, do microambiente tumoral imunossupressor, da heterogeneidade celular intra e intertumoral e de mecanismos moleculares de resistência ao TMZ, como alguns dos principais fatores fundamentais para a não efetividade absoluta das terapias em GBMs.<sup>25</sup>

O TMZ, comercialmente chamado de Temodal, é um fármaco capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.<sup>29-31</sup> Trata-se de um alquilante de DNA (ácido desoxirribonucleico),<sup>32</sup> que insere um grupamento alquil nas bases purinas do DNA. Após sua metabolização, ocorre a doação de um grupamento metil (CH<sub>3</sub>) na posição O6 da guanina.<sup>33,34</sup> Estas modificações induzem, posteriormente, a formação de quebras de DNA de fita simples e dupla, resultando em parada do ciclo celular e favorecendo a apoptose celular.<sup>26</sup> Esta medicação teve seu efeito antitumorigênico descoberto em meados de 1940 e rapidamente se tornou um dos primeiros medicamentos a serem usados como quimioterápicos, sendo amplamente utilizado como a base principal para o tratamento de GBM.

Entretanto, características como a capacidade mutacional das células que compõem o GBM, sua heterogeneidade celular e status de MGMT (do inglês- *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) contribuem para a resistência tumoral ao tratamento com TMZ, bem como em sua recidiva após tratamento inicial.<sup>35,36</sup>

Assim, a limitada eficácia do tratamento quimioterápico TMZ se tornou um importante fator associado ao prognóstico ruim do paciente com GBM, salientando a necessidade de identificar novas terapias.<sup>37-40</sup> Tendo em vista todos estes fatores limitantes e interferentes para a resposta ao tratamento e sobrevida do paciente, nota-se a importância da aplicabilidade da medicina personalizada.

Neste sentido, a busca por biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico dos pacientes portadores de GBM, bem como pesquisas por novas vias

terapêuticas têm prosseguido nos últimos anos, atraindo a atenção da comunidade científica.<sup>41,42</sup>

Nas últimas décadas, novos marcadores genéticos e epigenéticos foram inseridos na classificação molecular dos GBMs, os quais contribuem para maior acurácia, precisão do diagnóstico, expectativa de prognóstico e para melhor direcionamento dos tratamentos personalizados desses pacientes.<sup>21,43,46</sup>

Em 2021, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou a quinta edição da classificação dos tumores de sistema nervoso central.<sup>1</sup> Nesta edição, houve a atualização e introdução de novos marcadores moleculares, genéticos e epigenéticos, adicionando informações relevantes às análises histológicas e imuno-histoquímicas na classificação de tumores do SNC.<sup>1</sup>

Com isso, a estratificação tumoral de SNC tornou-se mais minuciosa, enfatizando os mecanismos pelos quais as alterações moleculares afetam as características dos tumores, inclusive do ponto de vista de resposta terapêutica,<sup>47</sup> demonstrando a importância e necessidade do diagnóstico integrado na medicina personalizada translacional. Esta nova classificação de 2021 estratificou em diversos subtipos tumorais e revisou a nomenclatura de outros tumores, levando-se em consideração análises genéticas e moleculares.<sup>47</sup>

Alguns dos principais marcadores moleculares foram inseridos com base na resposta ao tratamento adjuvante e pela importância no prognóstico dos GBMs. São eles: metilação do gene MGMT (do inglês- *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*); amplificação de EGFR (do inglês- *Epidermal Growth Factor Receptor*); mutação em IDH1 (do inglês- *isocitrate dehydrogenase (NADP(+))1*); IDH2 (do inglês- *isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2*); mutação na região promotora de TERT (do inglês- *telomerase reverse transcriptase*); ganho completo ou parcial do cromossomo 7 (Chr 7) e perda completa ou parcial do cromossomo 10 (Chr 10) (Tabela 1).<sup>48-49</sup>

**Tabela 1.** Marcadores genéticos e epigenéticos em glioblastomas.

<b>Marcadores Moleculares</b>	<b>Tipo</b>	<b>Alteração</b>	<b>Significância</b>	<b>Relevância</b>
<b>MGMT</b>	Epigenético	Metilação da região promotora do gene	Marcador preditivo e prognóstico	Metilação aumenta a resposta ao quimioterápico Temozolamida (TMZ)
<b>EGFR</b>	Genético	Amplificação gênica	Marcador prognóstico e alvo terapêutico	Aumento em sua expressão induz a proliferação celular
<b>IDH1</b>	Genético	Mutação na porção p.R132	Marcador prognóstico	Células com alterações nestes genes se tornam mais sensíveis ao estresse oxidativo causado pelo quimioterápico (TMZ)
<b>IDH2</b>	Genético	Mutação na porção R172	Marcador prognóstico	
<b>TERT</b>	Genético	Mutação na região promotora (C228T e C250T)	Marcador prognóstico	Imortalização de células tumorais
<b>Chr 7</b>	Citogenético	Ganho completo ou parcial do Chr 7	Marcador prognóstico	---
<b>Chr 10</b>	Citogenético	Perda completa ou parcial do Chr 10	Marcador prognóstico	---

Adaptado de MA; R.; TAPHOORN, M. J. B.; PLAHA, P., 2021. <sup>49</sup>

Além das análises de alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na gênese, rápida progressão, resistência aos tratamentos disponíveis e pior prognóstico dos pacientes, há o envolvimento de inúmeras moléculas, com as mais diversas funções em vias de sinalização que, direta ou indiretamente, regulam estes mecanismos da gliomagênese.<sup>50-52</sup>

Outras moléculas que estão associadas a funções de regulação da expressão gênica, por meio de mecanismos reguladores em níveis transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e epigenéticos têm atraído a atenção da comunidade científica no âmbito da pesquisa em câncer, podendo auxiliar no prognóstico.<sup>53</sup>

Apenas uma pequena porção do genoma humano (2%) é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) para ser traduzido em proteínas. Entretanto, existem outras

moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas. Estas moléculas são chamadas de RNAs não codificadores (ncRNAs) e, embora não codifiquem proteínas, desempenham funções significativas em diversos processos fisiológicos do organismo<sup>33,54,55</sup>

Com base no número de nucleotídeos presentes na molécula de ncRNA, eles podem ser caracterizados de diferentes formas (Figura 1).<sup>33,56,57</sup>

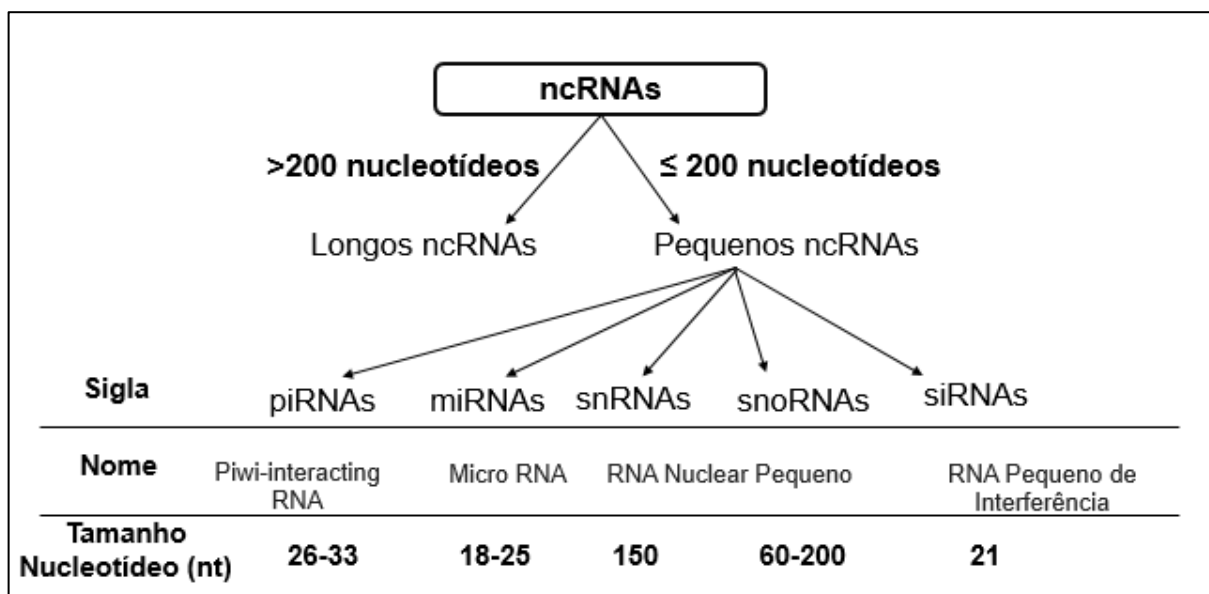


Figura 1. Caracterização das moléculas de RNAs não codificadores conforme seu tamanho.

Adaptado de ERAKY e colaboradores (2022)<sup>33</sup>

Os RNAs longos não-codificantes (lncRNAs), moléculas com mais de 200 nucleotídeos, têm sido abordados em diversos estudos como biomarcadores promissores, seja para uso como potenciais alvos terapêuticos ou como marcadores de diagnóstico e prognóstico em muitos tipos tumorais, incluindo os gliomas.<sup>58,59</sup> São um tipo de RNA não codificador de proteínas que participam de modulação das funções biológicas através da regulação da expressão gênica. A complementariedade e ligações químicas realizadas entre os lncRNAs e outras moléculas-alvo (DNA, miRNA (micro-RNA), mRNA (RNA mensageiro)) e proteínas<sup>60-61-62</sup> podem interferir na regulação da expressão gênica nos diferentes níveis: modificação transcricional, pós-transcricional e epigenética.<sup>41-42</sup> Nesse contexto, os lncRNAs são conhecidos por sua capacidade de regular negativamente genes, através da interação com moléculas de miRNAs.<sup>63</sup>

Os miRNAs são moléculas de RNA pequenas (18 a 25 nucleotídeos), não codificadoras de proteínas. Estas moléculas podem aumentar ou diminuir a expressão

de genes-alvos, oncogenes ou supressores tumorais através da interação com moléculas de mRNA. Esta interação pode acontecer com centenas de transcritos envolvidos em diversos processos biológicos, tais como: desenvolvimento, diferenciação, apoptose e proliferação celular.<sup>64-66</sup>

Um estudo com mais de 2.600 tipos de cânceres, desenvolvido pelo Pan-Cancer Analysis of Whole Transcriptome (PCAWT), identificou inúmeros lncRNAs desregulados.<sup>67,68</sup> Os lncRNAs relacionados ao câncer apresentam expressão aberrante e estão associados a funções oncogênicas ou supressoras de tumores, regulando o início, a progressão ou metástases por modular as vias de sinalização do câncer em níveis epigenéticos.<sup>67-72</sup>

Em gliomas de alto grau, os lncRNAs parecem desempenhar papéis críticos na regulação da neurogênese e na progressão de tumores cerebrais.<sup>73</sup> Entretanto, os mecanismos regulatórios dos diversos comportamentos biológicos das células, como proliferação, invasão e migração, ainda permanecem pouco elucidados.<sup>42</sup>

Evidências demonstram que níveis discrepantes de lncRNAs poderiam estar associados com a formação e progressão tumoral, bem como com a iniciação e desenvolvimento de quimiorresistência tumoral.<sup>74</sup>

Em se tratando de GBM, Stackhouse e colaboradores (2020)<sup>75</sup>, resumiram 30 lncRNAs já descritos previamente na literatura, associando-os com a função dos lncRNAs e GBM, como apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Descrição dos lncRNAs em glioblastoma, suas principais funções e evidências.

<b>lncRNA</b>	<b>Função</b>	<b>Evidência</b>	<b>Ref</b>
CASC7	Supressão tumoral	GBM primário e linhagens celulares ( <i>in vitro</i> )	76
CASC9	Tumorigênese	Linhagens celulares de GBM <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	77
AGAP2-AS1	Proliferação e sobrevivência	GBM primário, linhagens celulares <i>in vitro</i> , correlação com sobrevida global em pacientes do estudo TCGA*	78
NEAT1	Proliferação e invasão	GBM primário, linhagens celulares <i>in vitro</i> , e xenoinxertos intracranial	79,80
LINC01426	Proliferação, invasão e sobrevivência	TCGA* associações clínicas, GBM primário, linhagens celulares <i>in vitro</i>	81
PART1	Supressão tumoral e inibição do crescimento	GBM primário, linhagens celulares <i>in vitro</i> e associações clínicas do TCGA*	82
LINC01446	Tumorigênese e progressão	Associações clínicas, cultura celular de GBM <i>in vitro</i> e em xenoinxertos	83
MNX1-AS1	Proliferação, migração e invasão	GBM e linhagens celulares <i>in vitro</i>	84
DCST1-AS1	Proliferação	Associações clínicas, GBM primários e cultura primária	85
AC016405.3	Supressão de proliferação e invasão	Associações clínicas, GBM primários e linhagens celulares <i>in vitro</i>	86
HOTAIRM1	Proliferação, invasão e sobrevivência	Associação clínica do TCGA*, GBM, linhagens celulares <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	87,88
HOXB13-AS1	Proliferação/ progressão do ciclo celular	GBM, linhagens celulares <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	89
LINC00467	Proliferação e invasão	Linhagens celulares de GBM (U87, LN229) <i>in vitro</i>	90
HIF1A-AS2	Manutenção de células tronco GBM	Linhagens celulares de GBM <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	91
H19	Proliferação, invasão e angiogênese	Linhagens celulares de GBM (HEB, U87, A172, U373) <i>in vitro</i>	92
LINC01494	Proliferação e invasão	Associações clínicas, GBM, linhagens celulares <i>in vitro</i>	93
ATB	Invasão	Linhagens celulares de GBM (LN-18, U251) <i>in vitro</i>	94
GAS5	Inibição da proliferação, invasão, sobrevivência	Linhagens celulares de GBM (HEB, U251, U87) <i>in vitro</i>	95
Lnc-TALC	Promove a resistência ao TMZ e recidiva tumoral	Linhagens celulares de GBM TMZ-selecionadas (LN229, U251, 551W, HG7) <i>in vitro</i>	96
MALAT1	Resistência ao TMZ e invasão	Associações clínicas, soro e tecido de GBM de pacientes, GBM, linhagens celulares de GBM (U87) <i>in vitro</i> e xenoinxerto intracranial	97-100
ADAMTs9-AS2	Resistência ao TMZ	Associações clínicas, linhagens celulares de GBM (T98G-R, U118-R) <i>in vitro</i>	101

<b>IncrRNA</b>	<b>Função</b>	<b>Evidência</b>	<b>Ref</b>
TP73-AS1	Resistência ao TMZ e metabolismo em células tronco de gliomas	Associações clínicas do TCGA*, linhagens celulares de células tronco de gliomas (G26, G7) <i>in vitro</i>	102
NCK1-AS1	Resistência ao TMZ	GBM primário, linhagens celulares de GBM (U251, A172) <i>in vitro</i>	103
HMMR-AS1	Tumorigênese, proliferação, invasão, resistência à radiação	Linhagens celulares de GBM (U87, U251, A172, U118) <i>in vitro</i>	104
TALNEC2	Tumorigênese e resistência à radiação	TCGA* associações clínicas do TCGA*, GBM primário, linhagens celulares de GBM (A172, U251, U87, T98G e LN308) <i>in vitro</i>	105
AHIF	Invasão, sobrevivência e resistência à radiação	Linhagens celulares de GBM (U87, U251, A172, T98G) <i>in vitro</i>	106
PCAT1	Características de células tronco, sobrevivência, reparo ao DNA	Linhagens celulares de GBM <i>in vitro</i>	107
HOTAIR	Proliferação, invasão, resistência à terapia, remodelação de cromatina	Associações clínicas, tecido e soro de pacientes com GBM, linhagens celulares <i>in vitro</i> e xenoinxerto intracranianos	108,109
RPSAP52	Características de células tronco e prognóstico ruim para o paciente	GBM primário, associações clínicas, linhagens celulares de GBM (U-373 MG) <i>in vitro</i>	110
MATN1-AS1	Supressor tumoral, supressor de proliferação e invasão	GBM primário e linhagens celulares <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	111

**Legenda:** \*TCGA–The Cancer Genome Atlas. Adaptado de: Stackhouse e colaboradores (2020) <sup>75</sup>

Como evidenciado na tabela 2, a variedade de funções desempenhadas pelos lncRNAs nas atividades biológicas celulares são notórias. Envolvimento em progressão, invasão celular, resistência a agentes alquilantes de DNA, sobrevivência celular e favorecimento às características de células tronco embrionárias são algumas das diversas funções destes lncRNAs nas células de GBM. Assim, estes lncRNAs podem se tornar representativos de uma nova classe de biomarcadores em GBM ou até mesmo se tornarem promissores alvos terapêuticos, devido aos impactos nos fenótipos celulares.<sup>33</sup>

KCNQ1OT1 (do inglês - *KCNQ1 Opposite Strand/Antisense Transcript 1 of the KCNQ1 gene*) (ENSG00000269821), *locus* 11p15.5<sup>112</sup> possui interação com outros transcritos, afeta a expressão de genes e interfere em diversas funções celulares: proliferação celular, migração, apoptose, viabilidade, autofagia e regulação da inflamação. Assim, tem sido associado a vários tipos tumorais humanos como: câncer colorretal, de bexiga, mama, cavidade oral, pele (melanoma), ossos, pulmão, cérebro, ovário, fígado, leucemia mielóide aguda, próstata e estômago.<sup>60-61</sup>

A revisão de literatura, realizada por Xia e colaboradores (2022), apresentou dados de expressões do lncRNA KCNQ1OT1 e suas funções regulatórias em diferentes tipos de cânceres como de cólon, mama e próstata. Nestas neoplasias, este lncRNA se apresentou up-regulado e, suas principais funções biológicas foram associadas à interação com micro-RNAs. As principais funções biológicas descritas foram o aumento da quimiorresistência tumoral, desenvolvimento de células tumorais, progressão tumoral e escape do sistema imunológico.<sup>113</sup>

Li e colaboradores (2019) desenvolveram um estudo com 45 pacientes portadores de câncer de cólon para detectar a expressão de KCNQ1OT1 nas amostras tumorais e em seus tecidos adjacentes. Com estas análises, foram observados que os níveis de expressão de KCNQ1OT1 estavam significativamente aumentados no tumor em comparação com os tecidos normais adjacentes. Ainda, os níveis de expressão de KCNQ1OT1 eram menores em tecidos de pacientes nos estágios I e II do que de pacientes nos estágios III e IV.<sup>114</sup>

Ainda neste estudo, foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano (HCT116 e SW480) com KCNQ1OT1 silenciado por tecnologia de siRNA. Ao serem submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de L-OHP (Oxaliplatin), medicamento padrão para tratamento de câncer colorretal avançado,

notou-se a diminuição da viabilidade das células de ambas as culturas celulares. Estes resultados demonstraram que o lncRNA KCNQ1OT1 desempenha um papel importante na quimiorresistência do câncer de cólon, regulando a morte celular.<sup>114</sup>

Diversos outros estudos indicaram os níveis de expressão do lncRNA KCNQ1OT1 associados à sua função biológica mediante a interação com transcritos e a outros tipos de câncer (Tabela 3).

**Tabela 3.** Expressão do lncRNA KNCQ1TO1 em diferentes tipos de cânceres, suas associações clínicas e principais moléculas regulatórias.

<b>Câncer</b>	<b>Nível de Expressão</b>	<b>Papel</b>	<b>Associações Clínicas</b>	<b>Importância Funcional</b>	<b>Moléculas regulatórias e Vias</b>
<b>Câncer Colorretal</b>	Mais expresso	Oncogênico	Tamanho tumoral, estágio TNM, metástase linfonodal, metástase distante, diferenciação histológica, terapia adjuvante, local do tumor primário, sobrevida global, sobrevivência livre de doença	Proliferação, ciclo celular, apoptose, migração, invasão, glicólise aeróbica, resistência ao metotrexato	miR-217/ZEB1 <sup>115</sup> ; miR-34a/Atg4B <sup>114</sup> ; miR-760/PPP1R1B <sup>116</sup> ; miR-329-3p/CTNND1 <sup>117</sup> ; miR-216b-5p/ZNF146 <sup>118</sup> ; HK2; PI3K/AKT <sup>119</sup> ; CD155 <sup>120</sup>
<b>Câncer de Ovário</b>	Mais expresso	Oncogênico	Sobrevida global	Proliferação, invasão	miR-142-5p/CAPN10 <sup>121</sup>
<b>Câncer Cervical</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Proliferação, metastase, e radioresistência	miR-491-5p/PKM2 <sup>122</sup>
<b>Glioma</b>	Mais expresso	Oncogênico	Grau histopatológico	Proliferação, apoptose, migração, invasão	miR-370/CCNE2 <sup>61</sup>
<b>Neuroblastoma</b>	---	Suppressor	---	Apoptose	miR-296-5p/Bax <sup>62</sup>
<b>Sarcoma</b>	---	---	Tipo histológico, metástases, profundidade do tumor, necrose	---	miR-29c-3p)/JARID2/CDK8/DNMT3A/TET1 <sup>123</sup>
<b>Carcinoma Oral de Células Escamosas</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Apoptose, migração, invasão	miR-185-5p/Rab14 <sup>124</sup>
<b>Carcinoma Espinocelular de Língua</b>	Mais expresso	Oncogênico	Estágio clínico, metástase de nodular, <i>status</i> sobrevivência, sensibilidade à cisplastina	Proliferação, migração, invasão, Resistência à cisplatina	miR-211-5p/Ezrin/Fak/Src <sup>125</sup> ; miR-124-3p/TRIM14 <sup>126</sup>
<b>Carcinoma de Células Escamosas do Seio Maxilar</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Viabilidade, migração, invasão	miR-204/EphA7 <sup>127</sup>
<b>Leucemia Mielóide Aguda</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Proliferação, apoptose, diferenciação induzida por PMA	miR-326/c-Myc <sup>128</sup>

<b>Câncer</b>	<b>Nível de Expressão</b>	<b>Papel</b>	<b>Associações Clínicas</b>	<b>Importância Funcional</b>	<b>Moléculas regulatórias e Vias</b>
<b>Osteosarcoma</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Proliferação, apoptose, migração, invasão, transição epitelial-mesenquimal, resistência ao fluorouracil	$\beta$ -catenin <sup>129</sup> ; KCNQ1/DNMT1 <sup>130</sup> ; miR-4458/CCND2 <sup>131</sup> ; miR-34c-5p/ALDOA <sup>132</sup> ; miR-192-5p/LARP1 <sup>133</sup>
<b>Cordoma</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Resistência a múltiplas drogas	miR-27b-3p/ATF2 <sup>134</sup>
<b>Câncer de Mama</b>	Mais expresso	Oncogênico	Tamanho do tumor, Contagem de tumores, Estágio do tumor	Proliferação, ciclo celular, apoptose, migração	miR-145/CCNE2 <sup>112</sup> ; miR-107 <sup>135</sup>
<b>Colangiocarcinoma</b>	Mais expresso	Oncogênico	Local do tumor, grau de diferenciação, estágio tumoral, estágio TMN, metástase linfonodal, recorrência pós-operatória	Proliferação, apoptose, invasão, , transição epitelial-mesenquimal	miR-140-5p/SOX4 <sup>136</sup>
<b>Carcinoma Hepatocelular</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	Proliferação, viabilidade, sobrevivência, apoptose, migração, invasão, metástase, resistência a oxaliplatina e sorafenibe	miR-7-5p/ABCC1 <sup>137</sup> ; miR-149/S1PR1/PI3K/AKT <sup>138</sup> ; miR-506/PD-L1 <sup>139</sup> ; miR-148a-3p/IGF1R <sup>140</sup>
<b>Câncer de Bexiga</b>	Mais expresso	Oncogênico	Prognóstico ruim	Proliferação, apoptose, migração, invasão	miR-145-5p/PCBP2 <sup>141</sup>
<b>Câncer de Pulmão</b>	Mais expresso	Oncogênico	Tamanho do tumor, estágio TNM, estágio da doença, metástase linfonodal, diferenciação histológica, histórico de tabagismo, sobrevivência global	Proliferação, ciclo celular, autofagia, apoptose, migração, invasão, glicólise aeróbica, resistência a múltiplas drogas, resistência à irradiação	miR-204-5p/ATG3 <sup>142</sup> ; MDR1 <sup>143</sup> ; miR-27b-3p/HSP90AA1 <sup>144</sup> ; miR-129-5p/JAG1 <sup>145</sup> ; miR-372-3p/ATG5/ATG12 <sup>146</sup> ; JAK2/STAT3 <sup>147</sup> ; TGF- $\beta$ 1 <sup>148</sup>
<b>Câncer de Pulmão</b>	Mais expresso	Supressor	Estágio clínico, tamanho do tumor, metástase linfonodal	Proliferação	--- 149

<b>Câncer</b>	<b>Nível de Expressão</b>	<b>Papel</b>	<b>Associações Clínicas</b>	<b>Importância Funcional</b>	<b>Moléculas regulatórias e Vias</b>
<b>Melanoma</b>	Mais expresso	Oncogênico	Prognóstico ruim	Proliferação, metástase	miR-153/MET <sup>150</sup>
<b>Câncer de Próstata</b>	Mais expresso	Oncogênico	---	proliferação, apoptose, migração, invasão, metástase	miR-15a/PD-L1 <sup>151</sup> ; miR-211-5p/CHI3L1 <sup>152</sup>
<b>Câncer Gástrico</b>	Mais expresso/ Menos expresso	Oncogênico / Supressor	Estágio TNM, invasão local, metástase linfonodal, metástase a distância, grau histológico	Proliferação, viabilidade, sobrevivência, apoptose, migração, invasão	miR-9/LMX1A <sup>153</sup> ; miR-145-5p/ARF6 <sup>154</sup> ; miR-43198/DRAM2 <sup>155</sup>

**Legenda:** TNM (Metastase tumoral em linfonodos – do inglês - *tumor lymph node metastasis*).

Adaptado de: Cagle e colaboradores (2021)<sup>71</sup>

Além de todas essas associações, este lncRNA desempenha importante papel na gênese, progressão e quimiorresistência em gliomas.<sup>60,118</sup> Cagle e colaboradores (2021), demonstraram que o lncRNA KCNQ1OT1 é mais expresso (*up*-regulado) em gliomas, desempenhando papel oncogênico e possui função em vias envolvidas na proliferação, apoptose, migração e invasão celular.<sup>60,118</sup>

Em relação à quimiorresistência, o aumento da expressão deste lncRNA tem sido associado à maior resistência ao tratamento de gliomas com TMZ, o que corrobora com o potencial do KCNQ1OT1 como biomarcador molecular de resistência ou como alvo terapêutico.<sup>156-159</sup>

Sendo a quimiorresistência um ponto crítico no tratamento do câncer, em especial do glioblastoma, é importante investigar as vias moleculares envolvidas.

Para melhor compreender o papel dos lncRNAs na tumorigênese, as abordagens utilizando algoritmos computacionais e bancos de dados de transcritos, como por exemplo, *LncRRlsearch*, têm se tornado uma ferramenta adjuvante a serem testadas experimentalmente e auxiliando na descoberta de novos alvos funcionais de lncRNAs. Com isso, através de análise de predição e interação *in silico*, o lncRNA KCNQ1OT1 apresentou forte interação química com outro lncRNA, denominado RP11-731F5.2.<sup>160-162</sup>

O lncRNAs RP11-731F5.2 (COPDA1 - do inglês *chronic obstructive pulmonary disease associated lncRNA 1*), (ENSG00000253364), *locus* 14q32.33<sup>163</sup> tem se destacado em estudos de tumorigênese e progressão tumoral. Este lncRNA está localizado no cromossomo 14<sup>163</sup> e foi associado à evolução do câncer gástrico,<sup>164</sup> doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)<sup>165</sup> e carcinoma hepatocelular.<sup>166</sup> Entretanto, a análise de sua expressão e a associação com a gênese, progressão e recidivas de GBM não foi realizada.

Além da forte interação química com RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 foi associado à capacidade de interagir e se ligar ao miR-34a com alta afinidade, pelo mecanismo de esponja, influenciando a expressão de genes alvos da atividade deste micro-RNA.<sup>114</sup> Essa interação resulta na alteração dos perfis de expressão das moléculas alvo do miR-34a e pode contribuir para a progressão do câncer.<sup>167,168</sup>

O perfil de expressão de miR-34a tem regulação negativa, com diminuição dos níveis frequentemente observada em vários tipos de câncer<sup>167-169</sup> como neuroblastoma, leucemia, carcinomas pancreáticos e hepatocelulares, glioblastoma,

mama, pulmão e cólon. Entretanto, outros estudos demonstraram seu aumento de expressão na tumorigênese no carcinoma de células renais, no carcinoma papilar da tireoide e nos cânceres uterinos.<sup>170-172</sup>

Em se tratando de glioblastoma, Yin e colaboradores (2013) mostraram redução de mais de 50% na expressão de miR-34a em 77% das amostras tumorais estudadas. Além disso, testes *in vitro* indicaram que a viabilidade das células de GBM reduz quando submetidas à superexpressão deste micro-RNA.<sup>169</sup>

Para confirmar a desregulação da expressão de miR-34a em glioblastoma, níveis deste ncRNA foram avaliados. Assim, observou-se que 9 (nove) das 10 (dez) amostras de GBM possuíam miR-34a menos expresso (downregulado) quando comparados às amostras de tecido normal. Ainda, neste estudo, foi encontrado que miR-34a pode inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em linhagens de GBM (U373MG e SHG44) através do controle de NOTCH1.<sup>173</sup>

Assim, a compreensão da interação entre o lncRNA KCNQ1OT1 e o miR-34a poderia fornecer implicações clínicas para o diagnóstico e o tratamento de GBM. Além disso, essas moléculas poderiam ser biomarcadoras moleculares para estimar prognóstico tumoral ou ainda serem utilizadas como alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas terapias-alvo dirigidas.

A análise da expressão do lncRNA KCNQ1OT1, associado a maior resistência celular de gliomas ao TMZ, somados à sua forte interação química com o RP11-731F5.2, ainda inédito em GBM, e, sua atividade de ceRNA de miR-34a, ressaltam a necessidade de ampliar os estudos que busquem elucidar a importância desses ncRNAs e associá-los com a gênese, ao prognóstico, à progressão tumoral e ao risco de recidiva em GBM, podendo contribuir para o avanço da medicina translacional.

# **JUSTIFICATIVA**

## **2. Justificativa**

O glioblastoma é um tumor infiltrativo, resistente às terapias disponíveis e letal em até 24 meses. Apesar dos avanços científicos significativos, o prognóstico para os pacientes com glioblastoma continua desfavorável. Portanto, estudos que busquem avaliar a importância de ncRNAs em glioblastomas e identifiquem moléculas com potencial para serem marcadores moleculares associados à gênese, prognóstico, progressão da doença e risco de recidiva são importantes na medicina translacional.

# OBJETIVO

### **3. Objetivos**

#### **Geral**

Investigar a expressão diferencial dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a em amostras de glioblastoma em comparação com tecido glial saudável, visando elucidar o papel desses transcritos na doença.

#### **Específicos**

- Quantificar os níveis de expressão relativa dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a em amostras de glioblastoma e em tecido glial não tumoral por RT-qPCR;
- Comparar a expressão dos ncRNAs entre os grupos de amostras de GBM e controles;
- Relacionar os níveis de expressão dos ncRNAs com características clínicas e patológicas dos pacientes, como grau tumoral, idade, prognóstico e tempo de sobrevida.

# MÉTODOS

## **4. Métodos**

### **4.1 Premissas Éticas**

O protocolo de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu sob número de aprovação CAAE: 68069423.7.0000.5411. Os pacientes ou responsáveis legais foram informados verbalmente e por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), sobre a pesquisa. Após o exposto entendimento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **4.2 Cálculo do Número Amostral**

O cálculo do número foi realizado considerando intervalo de confiança de 95% e margem de erro utilizada de 10%, obtendo-se assim o número mínimo amostral de 43 casos como o ideal para as análises.

### **4.3 Casuística**

Foram convidados a participar do estudo, 43 (quarenta e três) pacientes portadores de tumores do sistema nervoso central (SNC), compatíveis ou sugestivos de glioblastoma a serem operados de acordo com a rotina de atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

- I- Pacientes com idade igual ou superior a 18 anos;
- II- Possibilidade de coleta de 4mL de sangue total do paciente antes da cirurgia, sem prejuízo ao paciente ou a outros exames necessários;
- III- Possibilidade de coleta de fragmentos tumorais (3mm<sup>3</sup>) durante o procedimento cirúrgico, sem que houvesse qualquer prejuízo ao exame histopatológico;
- IV- Diagnóstico histológico de Glioblastoma;

V- Sobrevida maior que noventa dias;

VI- Expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente ou pelo seu responsável legal, previamente à cirurgia, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### **4.3.2 Critérios de exclusão**

I- Pacientes com neoplasias de origem diversa às previamente estabelecidas;

II- Pacientes com tumores primários do SNC recidivantes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade;

III- Pacientes com tumores pequenos, dos quais se obteve material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico.

#### **4.4 Casos Controle - Tecido Glial Saudável**

Como parâmetro de normalidade de tecidos não tumorais do SNC, cerca de 13 (treze) amostras de tecido glial saudável foram obtidas de cadáveres provenientes do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

##### **4.4.1 Critérios de inclusão**

I- Casos em que o óbito em nada remeta à presença de neoplasia intra ou extra-SNC;

II- Possibilidade da coleta tecidos não-tumorais ( $\pm 3\text{mm}^3$ ) sem que houvesse qualquer modificação do procedimento habitual ou prejuízo ao exame necroscópico e histopatológico.

##### **4.4.2 Critérios de exclusão**

I- Histórico de neoplasia primária do SNC;

II- Pacientes previamente tratados com radioterapia ou quimioterapia de qualquer modalidade.

#### **4.5 Coleta de Fragmentos Tumorais**

Foram coletadas amostras de tumores, durante o procedimento cirúrgico, as quais foram fragmentadas em aproximadamente 3mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram separados em criotubos contendo 500µL de conservante de ácidos nucleicos.

Após a coleta, todas as amostras foram registradas de maneira que os dados dos participantes da pesquisa fossem anonimizados e, em seguida, foram armazenadas (-80°C) até a sua utilização.

#### **4.6 Coleta de Grupo Controle Tecido**

Amostras de tecidos de SNC não tumorais obtidas de cadáveres provenientes do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, foram coletadas e acondicionadas em criotubos contendo aproximadamente 500µL de conservante de ácidos nucléicos.

Após a coleta, todas as amostras foram registradas de maneira que os dados dos participantes da pesquisa fossem anonimizados e, em seguida, foram armazenadas (-80°C) até a sua utilização.

#### **4.7 Armazenamento das Amostras**

Todas as amostras de tecidos (Grupo Controle e Tumorais) foram coletadas, processadas, identificadas através de códigos e, posteriormente armazenadas em freezer à -80°C, na Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPLEX – UNESP.

#### **4.8 Análise da Histologia Tumoral**

As informações de histologia tumoral, resultados dos marcadores imunohistoquímicos e tempo de sobrevivência foram acessadas via prontuário eletrônico e foram utilizadas para a seleção da casuística. Somente os casos que possuíam morfologia compatível ou sugestiva de glioblastoma seguiram para as análises moleculares.

Rotineiramente as análises histopatológicas dos fragmentos tumorais

coletados no atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, são realizadas pelo Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os laudos anatomopatológicos são elaborados em consenso entre dois patologistas do serviço.

## **4.9 Extração de ácidos nucleicos**

### **4.9.1 Extração de DNA**

Foi realizada a extração de DNA, através do Wizard Genomic DNA Purification System (Promega Incorporation), seguindo as especificações do fabricante.

### **4.9.2 Extração de RNA**

O RNA total do tecido foi isolado a partir de células gliais (Grupo Controle) e dos tecidos de glioblastoma usando RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as especificações dos fabricantes.

## **4.10 Pesquisa da mutação c.395G>A (p.R132H) nas amostras de GBM coletadas**

Para cumprir a nova classificação molecular proposta pela OMS (2021), somente os casos não mutados para IDH1 (p.R132H) foram incluídos neste estudo. Para isto, foram consultadas as análises imunohistoquímicas dos prontuários eletrônicos. Além disso, foi realizada a pesquisa da mutação somática no gene IDH1 (do inglês- isocitrate dehydrogenase (NADP(+))1) c.395G>A, p.R132H, por técnica de biologia molecular dCAPS.

### **4.10.1 Reação dCAPS para pesquisa de mutação somática em IDH1 - c.395G>A, p.R132H**

O DNA das amostras foi amplificado utilizando-se os iniciadores específicos de sequência (primers) para amplificação da região gênica de interesse, seguida de reação de digestão por enzima de restrição, conforme descrito por Meyer e colaboradores (2010).174

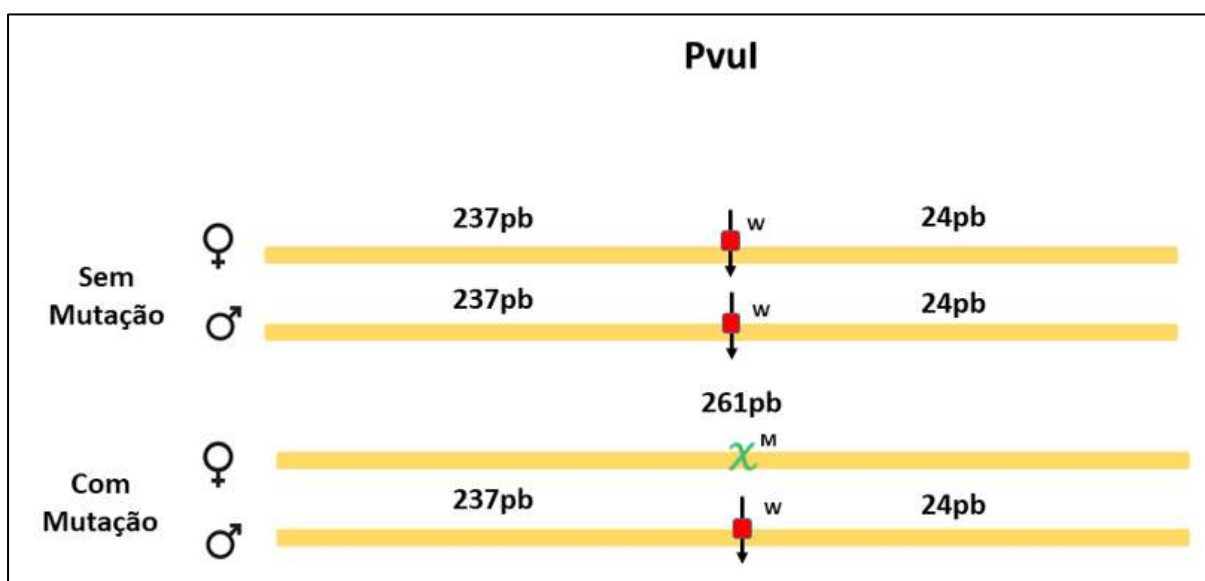
Os iniciadores específicos de sequência para esta PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) encontram-se descritos na tabela 4.

**Tabela 4.** Sequência dos primers para reação em cadeia da polimerase para pesquisa da mutação pontual no gene IDH1 (p.R132H).

Foward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<b>R132:</b> 5'TGGGTAAAACCTATCATCATCGAT 3'	5' TGTGTTGAGATGGACGCCTA 3'
<b>H132:</b> 5'GATGGGTAAAACCTATCATCATTGA 3'	

Após a amplificação pela PCR, a reação de digestão do fragmento de PCR foi realizada pela enzima PvuI (ThermoFisher Scientific, Inc.), seguindo as especificações do fabricante. A enzima PvuI reconhece e cliva a sequência palindrômica na região 5'...CGAT↓CG...3' e 3'...GC↑TAGC...5', que diferencia indivíduos mutados na posição c.395 dos selvagens (não-mutados) (Figura 2).

Assim, somente seguiram para as análises posteriores aqueles indivíduos que foram selvagens para a mutação pontual no gene IDH1 (c.395G>A, p. R132H).



**Figura 2.** Esquema representativo do sítio de reconhecimento da enzima de restrição *PvuI* para distinguir indivíduos mutados de indivíduos selvagens na porção c.395 do gene IDH1 – códon 132.

**Legenda:** Indivíduos Sem Mutação no códon 132 do gene IDH1, possuem o sítio de restrição para a enzima PvuI; perfil de amplificação: 237pb e 24pb. Indivíduos Com Mutação no códon 132 do gene IDH1, perdem um sítio de restrição para a enzima PvuI; perfil de amplificação: 261pb, 237pb e 24pb.

**Fonte:** Próprio autor, 2024.

## 4.11 Análise da expressão diferencial dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2e miR-34a

### 4.11.1 Síntese de cDNA

O cDNA foi produzido a partir do RNA extraído, utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher Scientific, Inc.), de acordo com especificações do fabricante. As condições de reação foram: RT Buffer 1x, dNTP Mix 4mM, Random Primer 1x, MultiScribe™ 25U, RNase Inhibitor 10U, para o volume final de 20µL.

### 4.11.2 Reação qPCR

O cDNA foi analisado como um modelo na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real usando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) e o StepOne Plus™ System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.), seguindo as especificações fabricante.

A reação de PCR em tempo real seguiu com as seguintes condições: 50°C por 2 min; 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s, anelamento e extensão a 62°C por 1 m. A análise da curva de fusão foi realizada para garantir a especificidade do ensaio.

A sequência de primer utilizadas para análise de qPCR dos ncRNAs, bem como dos seus genes referência, encontram-se descritas na tabela 5.

**Tabela 5.** Sequencia de primers para análise por RT-qPCR.

Alvo	Ensembl ID	Primers (5' - 3')	Amplicon. (pb)*	Ref
KCNQ1OT1	ENSG00000269821	F- TGCAGAAGACAGGACACTGG R- CTTTGGTGGGAAAGGACAGA	125	145
RP11-731F5.2	ENSG00000253364	F- TTCAGTCTTTGCAGCGTGGAG R- CCTGTTTTGGCGCGGTA	121	175
β-ACTINA	ENSG00000075624	F- AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC R- CACATGCCGGAGCCGTTGTCC	103	176
miR-34a	ENSG00000284357	F- CGTCACCTCTTAGGCTTGGAA R- CATTGGTGTCTGTTGTGCTCT	128	177
U6	ENSG00000278757	F- CTCGCTTCGGCAGCACATATACT R- ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC	93	178

Legenda: F: Foward; R: Reverse; \*pb: Pares de Base.

#### **4.11.3 Análise das expressões diferenciais dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2, e miR-34a**

O controle endógeno (gene referência) beta-actina foi utilizado na reação de detecção das expressões diferenciais entre os lncRNAs KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2 e, para a detecção da expressão diferencial do miR-34a, o controle endógeno utilizado foi o U6.

Todos os cálculos foram realizados usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .<sup>179</sup> As análises dos ncRNAs foram realizadas usando o Software StepOne™ v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc).

#### **4.12 Análises Estatísticas**

Foram realizadas análises estatísticas descritivas dos dados com frequência e porcentagens para as variáveis qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foram realizados testes de associação, Teste Qui quadrado ( $\chi^2$ ) ou Exato de Fisher, quando necessário. Para verificar a distribuição dos dados, foi realizado Teste de normalidade. O valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância.

Os valores de expressão foram usados para gerar uma análise de cluster hierárquica com cronograma de aglomeração e matriz de proximidade para verificar os padrões de expressão. Usamos o método de cluster de ligação entre grupos e o intervalo de medida usando a distância euclidiana ao quadrado. O dendrograma resultante foi usado para visualização dos possíveis clusters a serem criados na próxima etapa. Os valores de expressão foram incluídos como variáveis para interação (máximo de 10 interações e critério de convergência em 0) e classificação em clusters. As curvas de sobrevivência foram estimadas usando Kaplan-Meier com a técnica de log rank, utilizando intervalos de confiança de 95%.

As análises foram realizadas utilizando-se os *softwares* IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA) e GraphPad v. 9.5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

# RESULTADOS

## 5. Resultados

### 5.1. Dados demográficos

Foram incluídos neste estudo 13 amostras de tecido glial saudável obtidas de cadáveres provenientes do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, cuja *causa mortis* não foi associada a presença de processos tumorigênicos.

A casuística de casos foi composta por 43 pacientes portadores de tumores do sistema nervoso central (SNC), compatíveis com glioblastoma, através do diagnóstico anatomopatológico realizado pelo Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

A fim de garantir que todas as amostras de GBM incluídas neste estudo preenchiam os novos critérios de classificação (OMS, 2021), as amostras com diagnóstico anatomopatológico de glioblastoma foram testadas pela técnica de biologia molecular – dCAPS, no Laboratório de Neuro-Oncologia Molecular – Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX). As amostras com presença de mutação p.R132H em IDH1 foram excluídas deste estudo.

Os dados clínicos e epidemiológicos da casuística incluída neste estudo (43 pacientes), juntamente com os casos pertencentes ao grupo controle (13 pacientes), encontram-se descritos na tabela 6.

**Tabela 6.** Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo.

Variáveis	Controle	GBM	p-valor
	n=13	n=43	
<b>Idade</b> ( $\bar{x}$ ; dp*)	60,18 (16,1)	58 (13,7)	0.631
<b>Sexo</b>			
Masculino	7 (53,9%)	23 (53,5%)	0.999
Feminino	6 (46,1%)	20 (46,5%)	

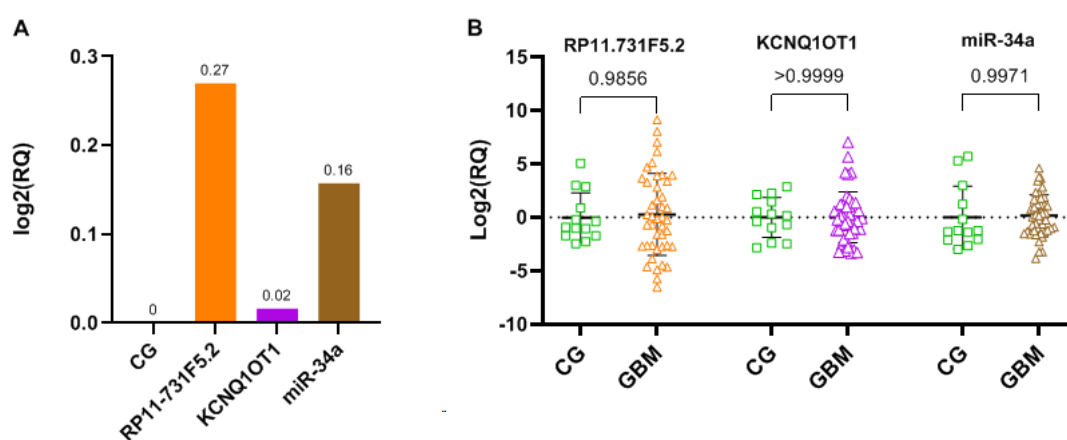
Legenda:  $\bar{x}$ : média; \*dp: desvio padrão.

## 5.2 Análise da Expressão dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a

### 5.2.1 Análise de Expressão dos ncRNAs – Grupo Controle vs GBM

A análise de expressão relativa dos ncRNAs foi realizada pela metodologia de RT-qPCR. Esta análise comparou os grupos: grupo controle (CG), utilizado como referência de normalidade, e o grupo de pacientes portadores de GBM.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 3.



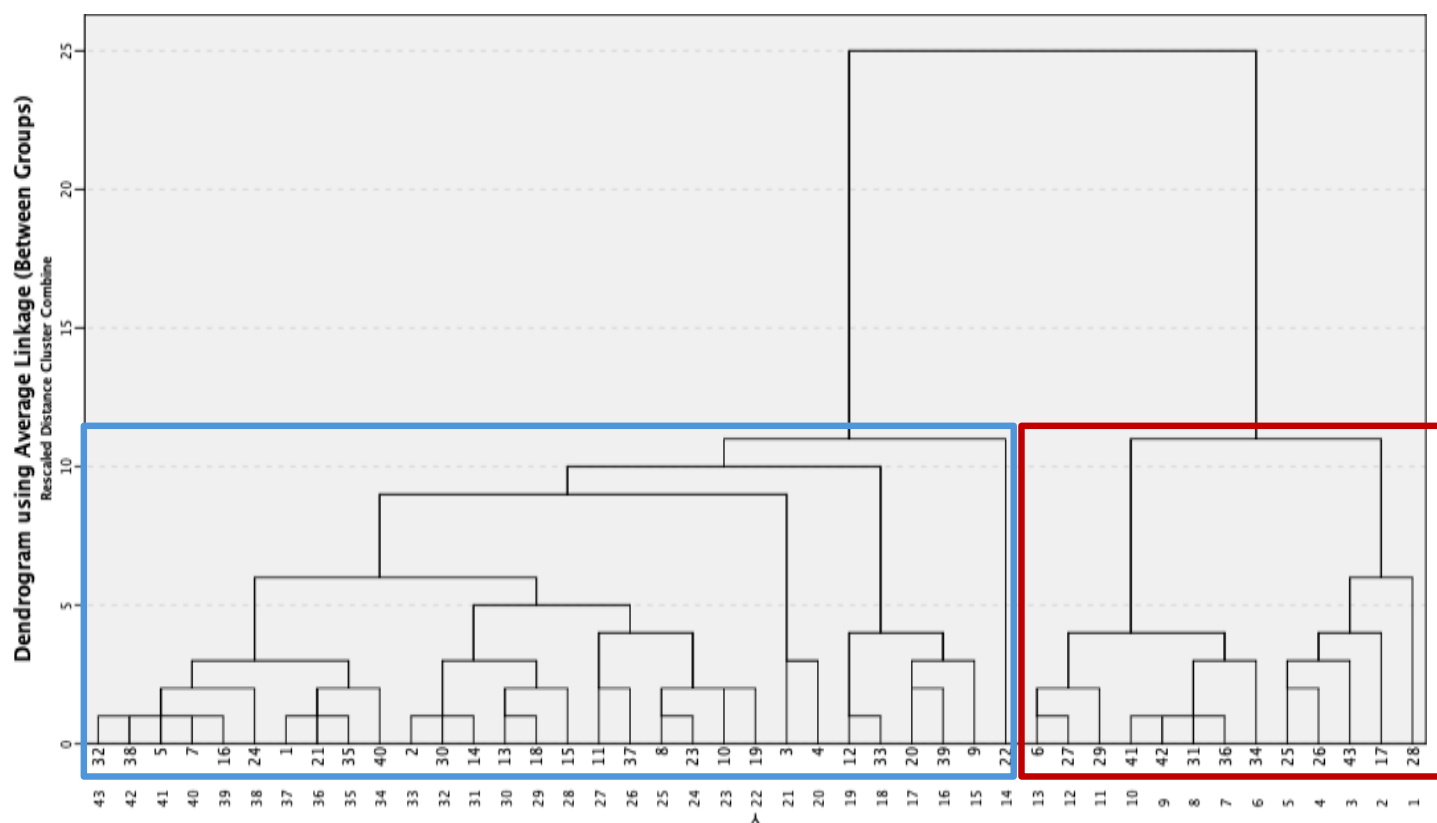
**Figura 3.** (A) Expressão relativa (log<sub>2</sub>RQ) e (B) *Scatter plots* dos ncRNAs na casuística de GBM comparados ao grupo controle (CG).

Nossos resultados demonstraram que, nessa casuística, não houve diferença de expressão dos ncRNAs em relação aos controles.

### 5.2.2 Análise por Cluster de Expressão dos ncRNAs

A fim de identificarmos possíveis heterogeneidades e padrões moleculares distintos na casuística, foi realizada a análise de agrupamento (cluster).

Na figura 4 está apresentado o dendograma da análise dos clusters hierárquicos, considerando os valores de  $\Delta Cq$  para os ncRNAs e utilizando a escala de aglomeração de acordo com o quadrado da distância Euclideana.



**Figura 4.** Análise de clusters hierárquicos da casuística de glioblastoma de acordo com a expressão dos ncRNAs RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 e miR-34a. Cluster 1- Retângulo azul: n= 30 pacientes; Cluster 2- Retângulo vermelho: n= 13 pacientes.

O dendograma acima permitiu classificar os casos incluídos no estudo (n= 43) em dois clusters. Representado pelo retângulo azul, o cluster 1 compreendeu 30 pacientes e representado pelo retângulo vermelho, o cluster 2, 13 indivíduos.

Na tabela 7 encontram-se os valores médios de  $\Delta Cq$  para KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a, segregados pelos clusters. Através desta análise, nota-se que houve diferença no padrão de expressão dos ncRNAs entre os dois clusters.

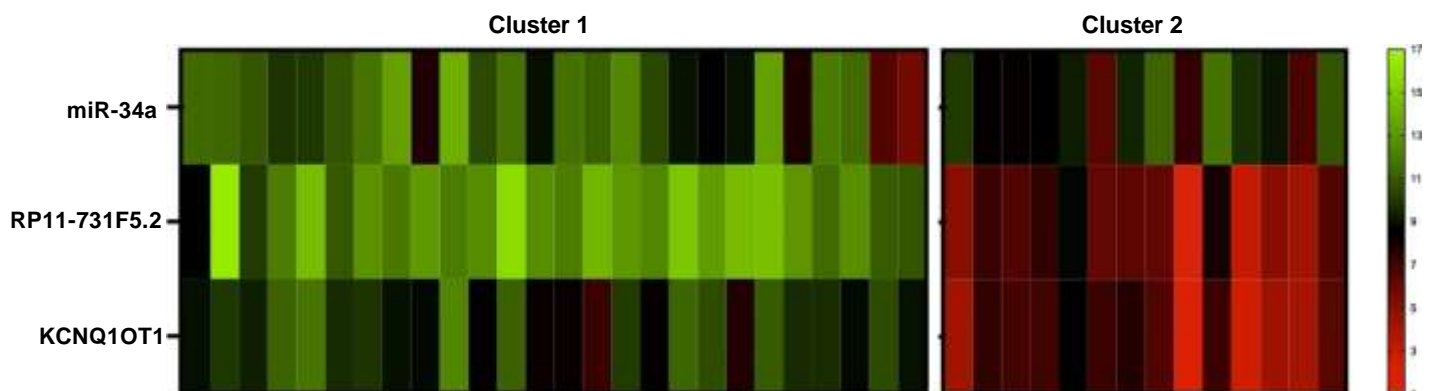
**Tabela 7.** Valores médios de  $\Delta Cq$  para RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 e miR-34a segregados pelos clusters.

	Cluster 1 (n = 30)	Cluster 2 (n = 13)	p-valor
<b>KCNQ1OT1</b> ( $\bar{x} \pm dp^*$ )	10,94 $\pm$ 1,28	7,04 $\pm$ 2,06	< 0.001
<b>RP11-731F5.2</b> ( $\bar{x} \pm dp^*$ )	12,94 $\pm$ 2,27	6,15 $\pm$ 1,99	< 0.001
<b>miR-34a</b> ( $\bar{x} \pm dp^*$ )	10,43 $\pm$ 1,96	9,04 $\pm$ 1,66	0.032

**Legenda:**  $\bar{x}$ : média; \*dp: desvio padrão

A relevância da diferença entre os dois clusters foi verificada pelos valores médios de  $\Delta Cq$  para KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a (teste-T de amostras independentes) (Tabela 7). Observou-se que no cluster 1 a média de  $\Delta Cq$  para KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a foram mais altas (KCNQ1OT1,  $p < 0.001$ ; RP11-731F5.2,  $p < 0.001$ ; e miR-34a,  $p = 0.032$ ).

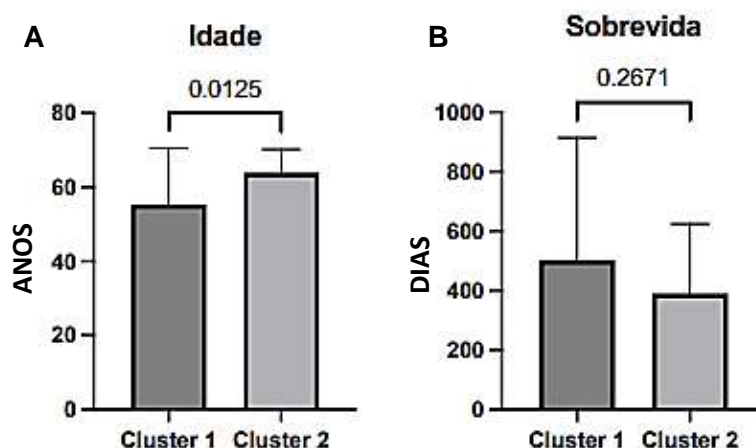
O mapa de calor (Figura 5) torna evidente a diferença no padrão de expressão dos ncRNAs entre os clusters identificados.



**Figura 5.** Mapa de calor ilustrando a diferença das expressões dos ncRNAs KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a nas clusterizações. Verde: menor expressão do ncRNA; Vermelho: maior expressão do ncRNA.

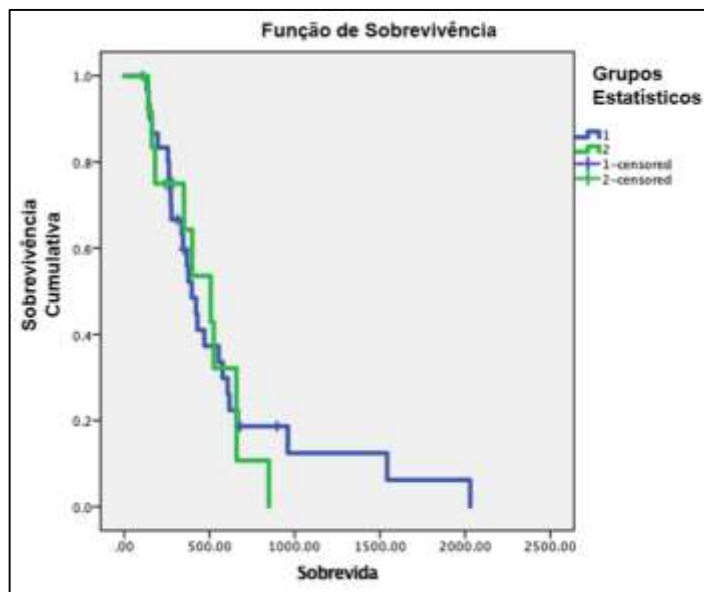
Para verificar as diferenças entre os dois clusters, variáveis como idade média (em anos) ao diagnóstico e o tempo de sobrevida (em dias) foram comparados. Para tal análise, foi realizado o teste-T de amostras independentes, assumindo variâncias não iguais com a correção de Welch (Tabela S1; Arquivos Suplementares).

Com os dados obtidos, nota-se que o cluster 1 apresentou idade média inferior ao cluster 2 ( $p = 0.013$ ). Ainda, a sobrevida no cluster 1 foi maior em relação ao cluster 2, contudo, essa relação não apresentou significância estatística (Figura 6).



**Figura 6.** Gráficos ilustrativo da comparação entre a idade média (A) entre os dois clusters e o tempo de sobrevida (B) entre eles.

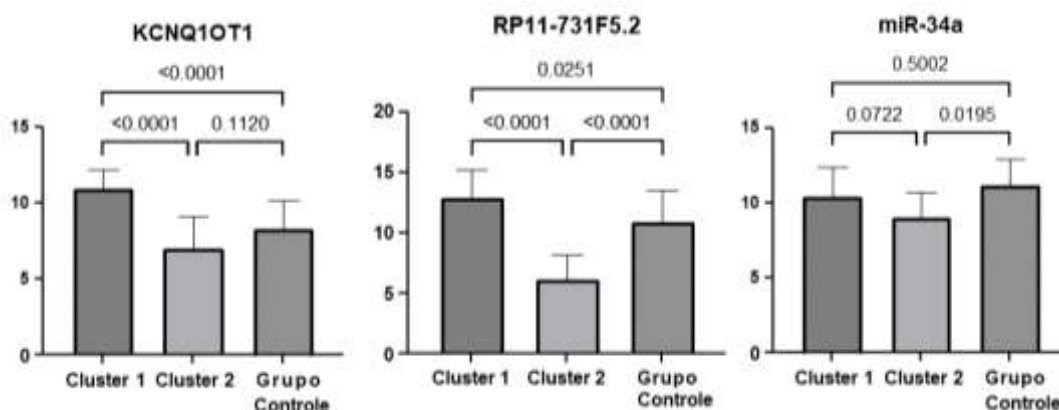
Curvas de sobrevivência dos pacientes agrupados de acordo com os clusters 1 e 2 são apresentadas na figura 7.



**Figura 7.** Curva de sobrevivência Kaplan-Meier dos clusters 1 e 2. Os casos censurados representam os pacientes que não evoluíram ao desfecho (óbito).

Considerando a hipótese de que a casuística seja composta por duas entidades tumorais distintas, procedemos com análises dos ncRNAs nos clusters 1 e 2, comparando-os com o grupo controle (Tabela S2; Arquivos Suplementares).

O teste de ANOVA de uma via foi realizado para comparar os valores médios de  $\Delta Cq$  de cada ncRNA entre os clusters e o grupo controle. Análise *post-hoc* foi feita com o teste de Tukey (Figura 8).



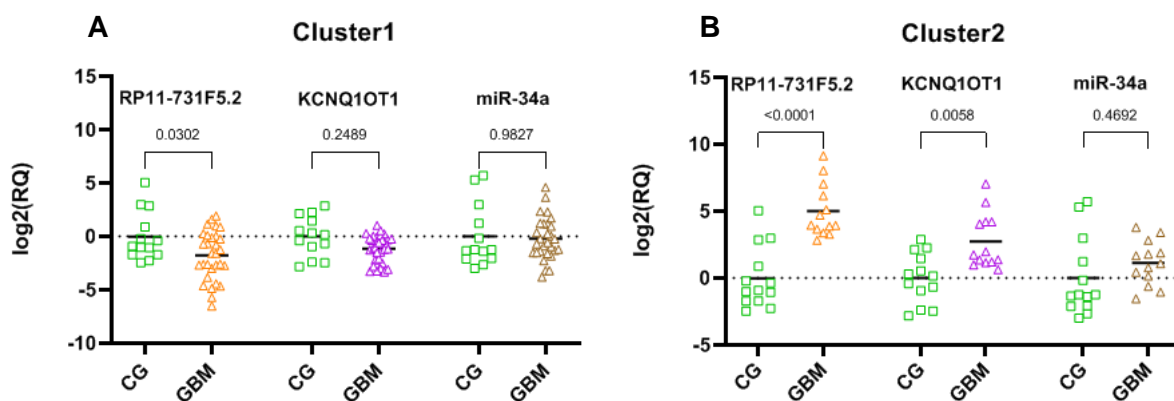
**Figura 8.** Análise das médias de  $\Delta Cq$  dos ncRNAs entre os clusters e grupo controle.

Análises *post-hoc* demonstraram que houve diferença significativa em KCNQ1OT1, entre os clusters 1 e 2 ( $p < 0.001$ ) e cluster 1 e grupo controle ( $p < 0.001$ ). Não houve diferença entre o cluster 2 e o grupo controle.

O mesmo foi observado em RP11-731F5.2, onde os três apresentaram diferença estatisticamente significativa (cluster 1 e 2 e grupo controle ( $p < 0,001$ )).

Adicionalmente, apenas foi observada diferença estatisticamente significativa de miR-34a, quando o cluster 2 foi comparado ao grupo controle ( $p = 0.02$ ).

A relevância do agrupamento da casuística na expressão dos ncRNAs foi verificada por uma nova análise de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) aplicada em cada cluster (Figura 9).



**Figura 9.** (A) Scatter plots mostram os valores de  $\log_2(RQ)$  ncRNAs quando os casos do Cluster 1 são comparados ao Grupo Controle (CG). (B) Scatter plots mostram os valores de  $\log_2(RQ)$  ncRNAs quando os casos do Cluste 2 são comparados ao grupo controle. Teste-T:  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

A figura 9A demonstra as expressões dos ncRNAs no cluster 1, onde RP11-731F5.2 estava menos expresso em GBM em relação ao Grupo Controle ( $p = 0.0302$ ). Os ncRNAs KCNQ1OT1 e miR-34a neste mesmo cluster, não apresentaram diferença significativa quanto às suas expressões entre os grupos avaliados neste mesmo cluster ( $p = 0.2489$  e  $p = 0.9827$ , respectivamente).

No cluster 2 (Figura 9B) destacaram-se as expressões de RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 ( $p < 0.0001$  e  $p = 0.0058$ , respectivamente). Igualmente ao obtido no cluster 1, miR-34a, não apresentou variação significativa entre os grupos ( $p = 0.4692$ ).

O teste de ANOVA de uma via foi realizado para comparar os valores médios de idade entre os clusters e o grupo controle (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise de ANOVA de uma via de idade e os grupos do estudo.

	<b>Cluster 1 (n = 30)</b>	<b>Cluster 2 (n = 13)</b>	<b>Grupo Controle (n = 13)</b>
<b>Idade (<math>\bar{x} \pm dp^*</math>)</b>	55,3 ± 15,34	63,92 ± 6,29	60,18 ± 16,1

**Legenda:**  $\bar{x}$ : média;  $dp$ : desvio padrão

Análise *post-hoc* foi feita com o teste de Tukey, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados ( $p= 0.167$ ).

Para verificar a existência de correlação entre os ncRNAs e, também, em função da idade e sobrevida, foi realizada a correlação de Pearson (Tabela 9).

**Tabela 9.** Matriz de Correlação de Pearson entre ncRNAs e as variáveis idade e sobrevida.

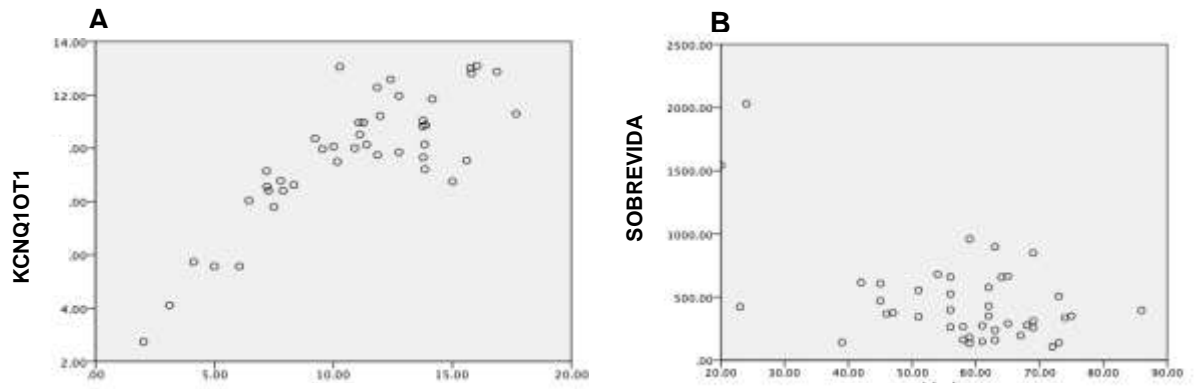
	<b>RP11-731F5</b>	<b>KCNQ1OT1</b>	<b>miR-34a</b>	<b>Idade</b>	<b>Sobrevida</b>
<b>KCNQ1OT1</b>	<b>0.818**</b>	-	<b>0.333*</b>	-0.234	0.043
<b>RP11-731F5</b>	-	<b>0.818*</b>	<b>0.316*</b>	-0.120	0.069
<b>miR-34a</b>	<b>0.316*</b>	<b>0.333*</b>	-	-0.139	-0.042
<b>Idade</b>	-0.120	-0.234	-0.139	-	<b>-0.514**</b>
<b>Sobrevida</b>	0.069	0.043	-0.042	<b>-0.514**</b>	-

Valores de Coeficiente r de Pearson. \*\*. Correlação é significativa no nível 0.01; \*. Correlação é significativa no nível 0.05. Força da correlação: insignificante ( $r \leq 0,3$ ), baixa ( $0,3 < r \leq 0,5$ ), moderada ( $0,5 < r \leq 0,7$ ), alta ( $0,7 < r \leq 0,9$ ) e muito alta ( $0,9 - 1,0$ ).<sup>180</sup>

Com base no apresentado na tabela 9, observa-se alta correlação entre KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2 e ( $r= 0.818$ ,  $p < 0.01$ ), como ilustrado no gráfico DotPlot, figura 10A.

Houve baixa correlação entre miR-34a e os lncRNAs e KCNQ1OT1 ( $r= 0.333$ ,  $p= 0.029$ ) e RP11-731F5.2 ( $r= 0.316$ ,  $p = 0.039$ )

Não houve correlação entre os ncRNAs com a sobrevida dos pacientes, apenas associação moderada e inversa entre idade e sobrevida ( $r= -0.514$ ,  $p < 0.001$ ), figura 10B.



**Figura 10.** DotPlots representativo das análises de correlações fortes. **(A)** Correlação entre RP11-731F5.2, KCNQ1OT1; **(B)** Correlação entre Idade e Sobrevida.

# DISCUSSÃO

## 6. Discussão

Este estudo avaliou a expressão de ncRNAs inéditos em GBM e com importância em outros tipos tumorais –KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR-34a, a fim de verificar sua importância na doença. O GBM é um tumor altamente heterogêneo com combinações complexas de alterações moleculares que resultam, principalmente, em diferentes respostas às terapias.<sup>181</sup> Dessa forma, a heterogeneidade inter e intratumoral de GBM apresenta desafios para terapias de precisão e estratificação de pacientes, incentivando estudos que esclareçam tais diferenças. Assim, para compreender e avaliar a existência de heterogeneidade na casuística estudada, foi realizada a análise de agrupamento por cluster. Observou-se que a casuística foi composta por duas subpopulações tumorais distintas (cluster 1 e cluster 2; Figura 4), cuja característica norteadora da distinção entre os grupos foi a expressão diferencial conjunta dos ncRNAs (Figura 5).

Levando em conta os resultados alcançados, a partir daqui cada cluster foi tratado como uma subpopulação tumoral única. Com a clusterização, foi possível observar significância na expressão desses transcritos quando o tumor é comparado aos controles (Figura 9). Enquanto no cluster 1 RP11-731F5.2 foi menos expresso em relação ao controle ( $p = 0.0302$ ), no cluster 2, o inverso foi observado ( $p < 0.0001$ ). Também, no cluster 2, KCNQ1OT1 apresentou-se mais expresso no grupo GBM ( $p = 0.0058$ ). Níveis de expressão de miR-34a não apresentaram significância estatística nos clusters analisados.

É importante destacar que cada cluster, além de diferir quanto ao seu perfil molecular, também apresentou distinção em relação às variáveis idade e tempo de sobrevida. O cluster 1 foi composto por indivíduos mais jovens com maior sobrevida em relação ao cluster 2 (Figura 7).

Quando avaliados globalmente, pode-se inferir a relação entre a idade avançada, menor sobrevida e maior expressão dos ncRNAs (Figuras 5 e 6). Contudo, o ncRNA miR-34a não apresentou o mesmo perfil no cluster 2.

Tais resultados devem ser interpretados com cautela. É conhecido que a sobrevida em GBM está associada com diversos fatores intrínsecos ao paciente, como características no período pré-operatório (idade, presença de comorbidades, entre outros) e, também, o período pós-operatório imediato (<24h) e tardio (>24h),

levando-se em consideração a complexidade inerente a esse tipo de abordagem cirúrgica.<sup>182</sup> Contudo, é sugestivo o papel da faixa etária desses pacientes sobre a expressão de RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 ( $p= 0.0125$ ; Figura 6). Até onde se conhece, esse estudo é inédito no relato dessa associação.

O envelhecimento biológico contribui para a tumorigênese e invasão tumoral, enquanto a senescência celular é um potente mecanismo supressor de tumores por impedir a proliferação de células danificadas.<sup>183</sup> Genes relacionados às vias de senescência e envelhecimento (por exemplo, p16INK4a e p53) já são reconhecidos como relevantes na tumorigênese e prognóstico.<sup>184</sup> Seguindo essa mesma linha de pensamento, é esperado que os lncRNAs, que regulam genes e miRNAs, também desempenhem papéis significativos na senescência celular e tumorigênese.<sup>185</sup>

Embora a associação entre KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2 deva ser melhor esclarecida, um bom exemplo da relação entre a expressão de ncRNAs e a senescência celular é o silenciamento do gene p16INK4a pelos lncRNAs ANRIL e MIR31HG que provocam a inibição da supressão e da senescência tumoral, permitindo que células mal replicadas contornem a parada da senescência e se dividam continuamente.<sup>186,187</sup> Além disso, sabe-se que estes lncRNAs estão envolvidos com funções oncogênicas ou supressoras de tumores, regulando o início, progressão ou metástases. Isso se dá devido a modulação de vias de sinalização do câncer em níveis epigenéticos que parecem desempenhar papéis críticos na regulação da neurogênese e na progressão de tumores cerebrais<sup>73</sup>, além de influenciar na quimiorresistência tumoral.<sup>74</sup>

KCNQ1OT1 desempenha um papel vital no desenvolvimento de diversos tipos tumorais: câncer colorretal, bexiga, mama, cavidade oral, pele (melanoma), ossos, pulmão, cérebro, ovário, fígado, leucemia mielóide aguda, próstata e estômago.<sup>60-61</sup> Processos como proliferação celular, migração, apoptose, viabilidade, autofagia e regulação da inflamação, podem sofrer interferências pela atividade deste lncRNA.

Além de interferências nos processos celulares primordiais, o KCNQ1OT1 possui a capacidade de se ligar ao miR-34a com alta afinidade, pelo mecanismo de esponja, influenciando a expressão de genes alvos da atividade deste micro-RNA.<sup>114</sup> Essa interação resulta na alteração dos perfis de expressão das moléculas alvo do miR-34a e pode contribuir para a progressão do câncer.<sup>168</sup>

Níveis diminuídos de miR-34a foram associados com diversos tipos de

câncer<sup>168,169</sup> como: neuroblastoma, leucemia, carcinomas pancreáticos e hepatocelulares, glioblastoma, mama, pulmão e cólon. Entretanto, outros estudos demonstraram seu aumento de expressão no carcinoma de células renais, no carcinoma papilar da tireoide e nos cânceres uterinos.<sup>170-172</sup> Em se tratando de glioblastoma, Yin e colaboradores (2013) mostraram redução de mais de 50% na expressão de miR-34a em 77% das amostras tumorais estudadas. Além disso, testes *in vitro* indicaram que a viabilidade das células de GBM reduz quando submetidas à superexpressão deste micro-RNA.<sup>169</sup> Contudo, nossas análises não detectaram diferença de expressão significativa desse transcrito em nossa casuística.

O mecanismo de regulação dos ncRNAs é complexa e permanece pouco elucidada em GBM. Neste estudo, investigou-se a correlação da expressão entre os ncRNAs. A expressão de RP11-731F5.2 estava fortemente correlacionada à expressão de KCNQ1OT1 ( $r = 0.818$ ,  $p < 0.01$  – Tabela 9). Por outro lado, foi observada uma correlação fraca entre a expressão de miR-34a e RP11-731F5.2 ( $r = 0.316$ ,  $p = 0.039$ ) e KCNQ1OT1 ( $r = 0.333$ ,  $p = 0.029$ ).

Além da forte correlação entre KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2, também observamos forte interação química, quando foi realizada análise de predição *in silico*.<sup>117,118</sup>

Ainda que RP11-731F5.2 tenha sido destacado em estudos envolvendo tumorigênese, progressão tumoral, à evolução do câncer gástrico,<sup>164</sup> doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)<sup>165</sup> e carcinoma hepatocelular,<sup>166</sup> sua expressão e associação com a gênese, progressão e recidivas de GBM é inédita.

Ademais, KCNQ1OT1 regula negativamente alvos de micro-RNAs por ser um competidor endógeno de RNA (do inglês - competing endogenous RNAs (ceRNAs))<sup>188</sup> podendo, por exemplo, atuar como esponja de miR-34a, o que pode explicar a correlação, mesmo que fraca, entre esses dois transcritos na casuística estudada. Destacamos que esse é o primeiro estudo que aponta correlação entre a expressão de KCNQ1OT1 e RP11-731F5.2.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, notou-se a importância da expressão dos lncRNAs como biomarcadores moleculares de segregação do grupo de glioblastoma em duas subpopulações com características distintas: mais jovens e mais idosos. Tais resultados, somados a evidências em estudos com linhagens celulares e outros tipos tumorais sugerem a relevância desses transcritos no GBM e

potencial associação ao prognóstico.

Para consolidar os achados deste estudo, pesquisas futuras devem priorizar a validação desses biomarcadores moleculares em uma amostra maior e mais diversificada, incluindo ampliação de tipos tumorais cerebrais e múltiplos centros de coleta. Isso pode aumentar a robustez e a aplicabilidade clínica dos biomarcadores candidatos em pacientes com GBM.

# CONCLUSÕES

## 7. Conclusões

- Identificados dois perfis distintos com base na expressão dos ncRNAs;
- RP11-731F5.2 apresentou expressão reduzida nos glioblastomas do cluster 1;
- RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 estavam mais expressos nos glioblastomas no cluster 2;
- MiR-34a não mostrou expressão diferencial significativa entre GBM e o grupo controle, independentemente do cluster;
- Houve forte correlação positiva entre as expressões de RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 nos tumores analisados;
- A idade diferiu entre os clusters.

# **Referências Bibliográficas**

## 8. Referências Bibliográficas

1. LOUIS, D.N.; PERRY, A.; WESSELING, P. **The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.** Neuro-Oncology, 2021. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
2. YANG, K.; WU, Z.; ZHANG, H. et al. **Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches.** Molecular Cancer, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01513-z>.
3. GUSYATINER, O.; HEGI, M. E. **Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options.** Seminars in Cancer Biology, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.010>.
4. WELLER, M.; WICK, W.; ALDAPE, K. et al. **Glioma.** Nature Review Disease Primers, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>.
5. LE RHUNA, B. E.; PREUSSERC, M.; ROTH, P. et al. **Molecular targeted therapy of glioblastoma.** Cancer Treatment Reviews 80, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.10189>.
6. HUANG, B.; LI, X.; LI, Y. et al. **Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme.** Frontiers in Immunology, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603911>.
7. DAVIS, M.E. **Epidemiology and Overview of Gliomas.** Seminars in Oncology Nurse, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>.
8. SAENZ-ANTOÑANZAS, A.; AUZMENDI-IRIARTE, J.; CARRASCO-GARCIA, E. et al. **Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges.** Cancers (Basel), 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11070950>.
9. OSTROM, Q T *et al.* **CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2015-2019.** Neuro-Oncology, 2022. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>.
10. WU, W.; PRICE, M.; NEFF, C. *et al.* **Glioblastoma multiforme (GBMM): an overview of current therapies and mechanisms of resistance.** Pharmacological Research, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>.
11. HANIF, F.; MUZAFFAR, K.; PERVEEN, K. *et al.* **Glioblastoma Multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>.

12. ROCK, K.; MCARDLE, O.; FORDE, P. *et al.* **A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme—the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival?** *The British Journal of Radiology*, 2012. [https://doi: 10.1259/bjr/83796755](https://doi.org/10.1259/bjr/83796755).
13. DAVIS, M. **Glioblastoma: overview of disease and treatment.** *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 2016. [https:// doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8](https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8).
14. NETTO, J. B.; SILVA, T. F.; DO NASCIMENTO, G. V. F. **Glioblastoma: patogênese e tratamento.** Revisão da literatura. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, 2019.
15. CLAES, A.; IDEMA, A.J.; WESSELING, P. **Diffuse glioma growth: a guerilla war.** *Acta Neuropathology*, 2007. [https://doi: 10.1007/s00401-007-0293-7](https://doi.org/10.1007/s00401-007-0293-7).
16. LAH, T.T.; NOVAK, M.; BREZNIK, B. **Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases.** *Seminars in Cancer Biology*, 2020. [https:// doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.010](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.010).
17. ALDAPE, K.; ZADEH, G.; MANSOURI, S. *et al.* **Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers.** *Acta Neuropathology*, 2015. [https://doi: 10.1007/s00401-015-1432-1](https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1).
18. FERREIRA, J.; RAMOS, A.A.; ALMEIDA, T. *et al.* **Drug resistance in glioblastoma and cytotoxicity of seaweed compounds, alone and in combination with anticancer drugs: A mini review.** *Phytomedicine*. 2018. [https://doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.062](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.062).
19. VECERA, M.; SANA, J.; LIPINA, R. *et al.* **Long Non-Coding RNAs in Gliomas: From Molecular Pathology to Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19092754>.
20. TAMIMI, A. F.; JUWEID, M. **Epidemiology and Outcome of Glioblastoma.** *Glioblastoma*, [S.L.], p. 143-153, 2017. [https://doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8](https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8)
21. REIFENBERGER, G.; WIRSCHING, H.G.; KNOBBE-THOMSEN, C.B.; WELLER, M. **Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy.** *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 2017. [https://doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204).
22. CHAO, B.; JIANG, F.; BAI, H. *et al.* **Predicting the prognosis of glioma by pyroptosis-related signature.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17061>.

23. OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; LIAO, P. et al. **CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014.** Neuro-Oncology, 2017. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>.
24. XI, J.; SUN, Q.; MA, L.; KANG, J. **Long non-coding RNAs in glioma progression.** Cancer Letters, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.041>.
25. OU, A.; YUNG, W.K.A.; MAJD, N. **Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma.** International Journal of Molecular Sciences, 2020..<https://doi.org/10.3390/ijms22010351>.
26. STUPP, R.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J. et al. **Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.** N. Engl. J. Med. 2005. <https://doi.org/10.1056/nejmoa043330>.
27. OSTROM, Q.T.; PATIL, N.; CIOFFI, G. et al. **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017.** Neuro Oncology, 2020. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>.
28. PREUSSER, M.; DE RIBAUPIERRE, S.; WÖHRER, A. et al. **Current concepts and management of glioblastoma.** Annals of Neurology, 2011. <https://doi.org/10.1002/ana.22425>.
29. ARORA, A.; SOMASUNDARAM, K. **Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?** Cancer Biology and Therapy, 2019. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599662>.
30. MOHAMMAD, S.N.; HOPFINGER, A.J. **Chemical reactivity of a methyldiazonium ion with nucleophilic centers of DNA bases.** Journal of Theoretical Biology, 1980. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(80\)90367-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(80)90367-7).
31. SINGH, N.; MINER, A.; HENNIS, L.; MITTAL, S. **Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review.** Cancer Drug Resistance, 2021. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.79>.
32. FRIEDMAN, H.S.; KERBY, T.; CALVERT, H. **Temozolomide and treatment of malignant glioma.** Clinical Cancer Research, 2000. PMID: 10914698.
33. ERAKY, A.M.; ABDULLAH, K.; STEVEN, L. et al. **Serum long non-coding RNAs as potential noninvasive biomarkers for glioblastoma diagnosis, prognosis, and chemoresistance.** Journal of Integrative Neuroscience, 2022. <https://doi.org/10.31083/j.jin2104111>.
34. NEWLANDS, E.S.; STEVENS, M.F.; WEDGE, S.R. et al. **Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials.** Cancer Treatment Reviews, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(97\)90019-0](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(97)90019-0).

35. WICK, W.; PLATTEN, M. **Understanding and targeting alkylator resistance in glioblastoma.** *Cancer Discovery*, 2014. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0918>.
36. XIE, Q.; MITTAL, S.; BERENS, M.E. **Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion.** *Neuro Oncology*, 2014. <https://doi: 10.1093/neuonc/nou147>.
37. ZHAO, R.; SA, X.; OUYANG, N. **A Pan-Cancer Analysis of Transcriptome and Survival Reveals Prognostic Differentially Expressed LncRNAs and Predicts Novel Drugs for Glioblastoma Multiforme Therapy.** *Frontiers Genetics*, 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.723725>
38. CLARKE, J.; PENAS, C.; PASTORI, C. et al. **Epigenetic pathways and glioblastoma treatment.** *Epigenetics*, 2013. <https://doi: 10.4161/epi.25440>.
39. SZOPA, W.; BURLEY, T. A.; KRAMER-MAREK, G.; KASPERA, W. **Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: current status and future perspectives.** *Biomedicine Research*, 2017. <https://doi: 10.1155/2017/8013575>.
40. TAN, S. K.; PASTORI, C.; PENAS, C. et al. **Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme.** *Molecular Cancer*, 2018. <https://doi: 10.1186/s12943-018-0822-0>.
41. BONASIO R, SHIEKHATTAR R. **Regulation of Transcription by Long Noncoding Rnas.** *Annual Review of Genetics* (2014) 48:433–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092323>
42. QIN, J.; JIANG, C.; CAI, J. et al. **Roles of Long Noncoding RNAs in Conferring Glioma Progression and Treatment.** *Frontiers in Oncology*, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.688027>
43. SHIYU LIU, S.; SHI, W.; ZHAO. et al. **Progress and prospect in tumor treating fields treatment of glioblastoma.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111810>.
44. CHEN, X.; FAN, X.; ZHAO, C. et al. **Molecular subtyping of glioblastoma based on immune-related genes for prognosis.** *Scientific Reports*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72488-4>
45. ALDAPE, K.; ZADEH, G.; MANSOURI, S. et al. **Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers.** *Acta Neuropathology*, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>.
46. SZOPA, W.; BURLEY, T.A.; KRAMER-MAREK, G.; KASPERA, W. **Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives.** *Biomedical Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8013575>.

47. KUROKAWA, R.; KUROKAWA, M.; BABA, A. **Major Changes in 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors.** RadioGraphics, 2022. [https://doi: 10.1148/rg.210236](https://doi.org/10.1148/rg.210236).
48. ALTIRIK, C.K.; YILMAZ, S.G.; OZDOGAN, S. et al. **Determination of IDH1, IDH2, MGMT, TERT and ATRX Gene Mutations in Glial Tumors.** In Vivo, 2022. <https://doi.org/10.21873/invivo.12881>.
49. MA, R.; TAPHOORN, M.J.B.; PLAHA, P. **Advances in the management of glioblastoma.** Journal of Neurology and Neurosurgery and Psychiatry, 2021. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-325334>.
50. PAPAIE, M.; BUCCARELLI, M.; MOLLINARI, C. et al. **Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma Cancer Stem Cells Progression.** International Journal of Molecular Sciences, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21082660>
51. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
52. JAROCH, K.; MODRAKOWSKA, P.; BOJKO, B. **Glioblastoma Metabolomics-In Vitro Studies.** Metabolites, 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11050315>.
53. WANG, Z.; YANG, B.; ZHANG, M. et al. **lncRNA Epigenetic Landscape Analysis Identifies EPIC1 as an Oncogenic lncRNA that Interacts with MYC and Promotes Cell-Cycle Progression in Cancer.** Cancer Cell, 2018. [https://doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.006).
54. VENKATESH, T.; SURESH, P.S.; TSUTSUMI, R. **Non-coding RNAs: Functions and applications in endocrine-related cancer.** Molecular and Cellular Endocrinology. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.026>.
55. MA, L.; BAJIC, V.B.; ZHANG, Z. **On the classification of long noncoding RNAs.** RNA Biology. 2014; 10: 925–933. [https://doi.org/ 10.4161/rna.24604](https://doi.org/10.4161/rna.24604)
56. YADAV, B.; PAL, S.; RUBSTOV, Y. et al. **LncRNAs associated with glioblastoma: from transcriptional noise to novel regulators with a promising role in therapeutics.** Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.03.018>.
57. HUNG, T.; CHANG, H.Y. **Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms.** RNA Biology, 2010; 7: 582–585.
58. PARLATO, C.; BARBARISI, M.; MORACI, M. et al. **Surgery, radiotherapy and temozolomide in treating high-grade gliomas.** Frontiers in Bioscience, 2006. <https://doi.org/10.2741/1881>.

59. SASMITA, A.O.; WONG, Y.P.; LING, A.P.K. **Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme.** *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 2018. <https://doi.org/10.1111>.
60. CAGLE, P.; QI, Q.; NITURE, S.; KUMAR, D. **KCNQ1OT1: An Oncogenic Long Noncoding RNA.** *Biomolecules*, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11111602>.
61. GONG, W.; ZHENG, J.; LIU, X. et al. **Knockdown of Long Non-Coding RNA KCNQ1OT1 Restrained Glioma Cells' Malignancy by Activating miR-370/CCNE2 Axis.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00084>.
62. LI, M.M.; LIU, X.H.; ZHAO, Y.C. et al. **Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes apoptosis in neuroblastoma cells by regulating miR-296-5p/Bax axis.** *The FEBS Journal*. 2020, 287, 561–577. <https://doi.org/10.1111/febs.15047>
63. ZHAO, J.; PU, J.; HAO, B. et al. **LncRNA RP11-86H7. 1 promotes airway infammation induced by TRAPM2. 5 by acting as a ceRNA of miRNA-9-5p to regulate NFKB1 in HBECS.** *Scientific Reports*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68327-1>
64. FABBRI, M.; CALIN, G.A. **Epigenetics and miRNAs in Human Cancer.** *Advances in Genetics*, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60004-6>.
65. V. AMBROS; LEE, R.C. **Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning.** *Methods in Molecular Biology*, 2004. <https://doi.org/10.1385/1-59259-775-0:131>
66. BARTEL, D.P. **MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell*, 2004. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
67. PARK, E.G.; PYO, S.J.; CUI, Y. et al. **Tumor immune microenvironment IncRNAs.** *Briefings in Bioinformatics*, 2022. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab504>.
68. LI, Y.; JIANG, T.; ZHOU, W. et al. **Pan-cancer characterization of immune-related lncRNAs identifies potential oncogenic biomarkers.** *Nature Communications*, 2020. <https://doi:10.1038/s41467-020-14802-2>.
69. ALI, M.M.; AKHADE, V.S.; KOSALAI, S.T. et al. **PAN-cancer analysis of S-phase enriched lncRNAs identifies oncogenic drivers and biomarkers.** *Nature Communications*, 2018. <https://doi:10.1038/s41467-018-03265-1>.
70. CABANSKI, C.R.; WHITE, N.M.; DANG, H.X. et al. **Pan-cancer transcriptome analysis reveals long noncoding RNAs with conserved function.** *RNA Biology*, 2015. <https://doi:10.1080/15476286.2015.1038012>.

71. CHIU, H.S.; SOMVANSHI, S.; PATEL, E. et al. **Pan-Cancer Analysis of lncRNA Regulation Supports Their Targeting of Cancer Genes in Each Tumor Context.** Cell Reports, 2018. [https://doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.064](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.064).
72. CARLEVARO-FITA, J.; LANZÓS, A.; FEUERBACH, L. et al. **Cancer lncRNA Census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis.** Communications Biology, 2020. [https://doi: 10.1038/s42003-019-0741-7](https://doi.org/10.1038/s42003-019-0741-7).
73. REON, B.J.; ANAYA, J.; ZHANG, Y. et al. **Expression of lncRNAs in Low-Grade Gliomas and Glioblastoma Multiforme: An In Silico Analysis.** PLoS Medicine, 2016. <https://doi.org/10.1371/>.
74. QIN, A.C.; QIAN, Y.; MA, Y.Y. et al. **Long Non-coding RNA RP11-395G23.3 Acts as a Competing Endogenous RNA of miR-124-3p to Regulate ROR1 in Anaplastic Thyroid Carcinoma.** Frontiers in Genetic, 2021. [https://doi: 10.3389/fgene.2021.673242](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.673242).
75. STACKHOUSE, C.T.; GILLESPIE, G.Y.; WILLEY, C.D. **Exploring the Roles of lncRNAs in GBM Pathophysiology and Their Therapeutic Potential.** Cells, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9112369>.
76. GONG, X.; LIAO, X.; HUANG M. **lncRNA CASC7 inhibits the progression of glioma via regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.** Pathology, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.018>.
77. LIU, H.; LI, C.; YANG, J. et al. **Long noncoding RNA CASC9/miR-519d/STAT3 positive feedback loop facilitate the glioma tumourigenesis.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13932>.
78. ZHENG, Y.; LU, S.; XU, Y.; ZHENG, J. **Long non-coding RNA AGAP2-AS1 promotes the proliferation of glioma cells by sponging miR-15a/b-5p to upregulate the expression of HDGF and activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.** International Journal of Biological Macromolecules, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01>.
79. CHEN, Q.; CAI, J.; WANG, Q. et al. **Long Noncoding RNANEAT1, Regulated by the EGFR Pathway, Contributes to Glioblastoma Progression Through the WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway by Scaffolding EZH2.** Clinical Cancer Research, 2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0605>.
80. ZHOU, K.; ZHANG, C.; YAO, H. et al. **Knockdown of long non-coding RNA NEAT1 inhibits glioma cell migration and invasion via modulation of SOX2 targeted by miR-132.** Molecular Cancer, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0849-2>.
81. WANG, S.-J.; WANG, H.; ZHAO, C.-D., LI R. **Long noncoding RNA LINC01426 promotes glioma progression through PI3K/AKT signaling pathway and serves as a prognostic biomarker.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201810\\_16047](https://doi.org/10.26355/eurrev_201810_16047)

82. JIN, Z.; PIAO, L.; SUN, G. et al. **Long Non-Coding RNA PART1 Exerts Tumor Suppressive Functions in Glioma via Sponging miR-190a-3p and Inactivation of PTEN/AKT Pathway.** *OncoTargets and Therapy*, 2020. <https://doi.org/10.2147/OTT.S232848>.
83. ZHANG, L.; WANG, Q.; WANG, F. et al. **LncRNA LINC01446 promotes glioblastoma progression by modulating miR-489-3p/TPT1 axis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.067>.
84. GAO, Y.; XU, Y.; WANG, J. et al. **lncRNA MNX1-AS1 Promotes Glioblastoma Progression Through Inhibition of miR-4443.** *Oncology Research*, 2019. <https://doi.org/10.3727/096504018X15228909735079>.
85. HU, S.; YAO, Y.; HU, X.; ZHU, Y. **LncRNA DCST1-AS1 downregulates miR-29b through methylation in glioblastoma (GBM) to promote cancer cell proliferation.** *Clinical and Translational Oncology*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02363-1>.
86. REN, S.; XU, Y. **AC016405.3, a novel long noncoding RNA, acts as a tumor suppressor through modulation of TET2 by microRNA-19a-5p sponging in glioblastoma.** *Cancer Science*, 2019. <https://doi.org/10.1111/cas.14002>.
87. SHI, T.; GUO, D.; XU, H. et al. **HOTAIRM1, an enhancer lncRNA, promotes glioma proliferation by regulating long-range chromatin interactions within HOXA cluster genes.** *Molecular Biology Reports*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05371-0>.
88. LI, Q.; DONG, C.; CUI, J. et al. **Over-expressed lncRNA HOTAIRM1 promotes tumor growth and invasion through up-regulating HOXA1 and sequestering G9a/EZH2/Dnmts away from the HOXA1 gene in glioblastoma multiforme.** *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0941-x>.
89. XIONG, Y.; KUANG, W.; LU, S. et al. **Long noncoding RNA HOXB 13- AS 1 regulates HOXB 13 gene methylation by interacting with EZH 2 in glioma.** *Cancer Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1002/cam4.1718>.
90. ZHANG, Y.; JIANG, X.; WU, Z. et al. **Long Noncoding RNA LINC00467 Promotes Glioma Progression through Inhibiting P53 Expression via Binding to DNMT1.** *Journal of Cancer*, 2020. <https://doi.org/10.7150/jca.41942>.
91. MINEO, M.; RICKLEFS, F.; ROOJ, A.K. et al. **The Long Non-coding RNA HIF1A-AS2 Facilitates the Maintenance of Mesenchymal Glioblastoma Stem-like Cells in Hypoxic Niches.** *Cell Reports*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.018>.
92. LIU, Z.Z.; TIAN, Y.F.; WU, H. et al. **LncRNA H19 promotes glioma angiogenesis through miR-138/HIF-1 $\alpha$ /VEGF axis.** *Neoplasia*, 2020. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2019\\_190121N61](https://doi.org/10.4149/neo_2019_190121N61).

93. LI, C.; HU, G.; WEI, B. et al. **lncRNA LINC01494 Promotes Proliferation, Migration And Invasion In Glioma Through miR-122-5p/CCNG1 Axis**. *OncoTargets and Therapy*, 2019. <https://doi.org/10.2147/OTT.S213345>.
94. TANG, F.; WANG, H.; CHEN, E. et al. **LncRNA-ATB promotes TGF- $\beta$ -induced glioma cells invasion through NF- $\kappa$ B and P38/MAPK pathway**. *Journal of Cellular Physiology*, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28898>.
95. LI, G.; CAI, Y.; WANG, C. et al. **LncRNA GAS5 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of brain glioma cells through targeting GSTM3 expression. The effect of LncRNA GAS5 on glioma cells**. *Journal of Neuro- Oncology*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03185-0>.
96. WU, P.; CAI, J.; CHEN, Q. et al. **Lnc-TALC promotes O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression via regulating the c-Met pathway by competitively binding with miR-20b-3p**. *Nature Communications*, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10025-2>.
97. VOCE, D.J.; BERNAL, G.M.; WU, L. et al. **Temozolomide Treatment Induces lncRNA MALAT1 in an NF- $\kappa$ B and p53 Codependent Manner in Glioblastoma**. *Cancer Research*, 2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2170>.
98. CHEN, W.; XU, X.-K.; LI, J.-L. et al. **MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression**. *Oncotargets*, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15199>.
99. KIM, S.-S.; HARFORD, J.B.; MOGHE, M. et al. **Targeted nanocomplex carrying siRNA against MALAT1 sensitizes glioblastoma to temozolomide**. *Nucleic Acids Research*, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1221>.
100. WANG, R.; SUN, Y.; LI, L. et al. **Preclinical Study using Malat1 Small Interfering RNA or Androgen Receptor Splicing Variant 7 Degradation Enhancer ASC-J9(®) to Suppress Enzalutamide-resistant Prostate Cancer Progression**. *European Urology*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.04.005>.
101. YAN, Y.; XU, Z.; CHEN, X. et al. **Novel Function of lncRNA ADAMTS9-AS2 in Promoting Temozolomide Resistance in Glioblastoma via Upregulating the FUS/MDM2 Ubiquitination Axis**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00217>.
102. MAZOR, G.; LEVIN, L.; PICARD, D. et al. **The lncRNA TP73-AS1 is linked to aggressiveness in glioblastoma and promotes temozolomide resistance in glioblastoma cancer stem cells**. *Cell Death and Disease*, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1477-5>.

103. CHEN, M.; CHENG, Y.; YUAN, Z. et al. **NCK1-AS1 Increases Drug Resistance of Glioma Cells to Temozolomide by Modulating miR-137/TRIM24.** *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutical*, 2020. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3054>.
104. LI, J.; JI, X.; WANG, H. **Targeting Long Noncoding RNA HMMR-AS1 Suppresses and Radiosensitizes Glioblastoma.** *Neoplasia*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.02.010>.
105. BRODIE, S.; LEE, H.K.; JIANG, W. et al. **The novel long non-coding RNA TALNEC2, regulates tumor cell growth and the stemness and radiation response of glioma stem cells.** *Oncotarget*, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15991>.
106. DAI, X.; LIAO, K.; ZHUANG, Z. et al. **AHIF promotes glioblastoma progression and radioresistance via exosomes.** *International Journal of Oncology*, 2018. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4621>.
107. ZHANG, P.; LIU, Y.; FU, C. et al. **Knockdown of long non-coding RNA PCAT1 in glioma stem cells promotes radiation sensitivity.** *Medical Molecular Morphology*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00795-018-0209-8>.
108. TAN, S.K.; PASTORI, C.; PENAS, C. et al. **Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme.** *Molecular Cancer*, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0822-0>.
109. LI, Y.; REN, Y.; WANG, Y. et al. **A Compound AC1Q3QWB Selectively Disrupts HOTAIR-Mediated Recruitment of PRC2 and Enhances Cancer Therapy of DZNep.** *Theranostics*, 2019. <https://doi.org/10.7150/thno.35188>.
110. WANG, S.; GUO, X.; LV, W. et al. **LncRNA RPSAP52 Upregulates TGF- $\beta$ 1 to Increase Cancer Cell Stemness and Predict Postoperative Survival in Glioblastoma.** *Cancer Management and Research*, 2020. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S227496>.
111. HAN, N.; YANG, L.; ZHANG, X. et al. **LncRNA MATN1-AS1 prevents glioblastoma cell from proliferation and invasion via RELA regulation and MAPK signaling pathway.** *Annals of Translational Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.36>.
112. FENG, W.; WANG, C.; LIANG, C. et al. **The dysregulated expression of KCNQ1OT1 and its interaction with downstream factors miR-145/CCNE2 in breast cancer cells.** *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1159/000492978>.
113. XIA, F.; WANG, Y.; XUE, M. et al. **LncRNA KCNQ1OT1: Molecular mechanisms and pathogenic roles in human diseases.** *Genes Disease*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.07.003>.
114. LI, Y.; LI, C.; LI, D. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 enhances the chemoresistance**

**of oxaliplatin in colon cancer by targeting the miR-34a/ATG4B pathway.** *OncoTargets and Therapy*, 2019. [https:// DOI: 10.2147/OTT.S188054](https://doi.org/10.2147/OTT.S188054).

115. BIAN, Y.; GAO, G.; ZHANG, Q.. et al. **KCNQ1OT1/miR-217/ZEB1 feedback loop facilitates cell migration and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer.** *Cancer Biology and Therapy*, 2019. [https://doi: 10.1080/15384047.2019.1579959](https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1579959).
116. XIAN, D.; ZHAO, Y. **LncRNA KCNQ1OT1 enhanced the methotrexate resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-760/PPP1R1B via the cAMP signalling pathway.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019. [https://doi.org/ 10.1111/jcmm.14071](https://doi.org/10.1111/jcmm.14071).
117. LIU, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y. et al. **Long non-coding RNA KCNQ1OT1 up-regulates CTNND1 by sponging miR-329-3p to induce the proliferation, migration, invasion, and inhibit apoptosis of colorectal cancer cells.** *Cancer Cell International*, 2020. [https://doi.org/ 10.1186/s12935-020-01425-2](https://doi.org/10.1186/s12935-020-01425-2).
118. ZHU, S.; CHEN, C.-Y.; HAO, Y. **LncRNA KCNQ1OT1 acts as miR-216b-5p sponge to promote colorectal cancer progression via up-regulating ZNF146.** *Journal of Molecular Histology*, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10735-020-09942-0>.
119. DUAN, Q.; CAI, L.; ZHENG, K. et al. **lncRNA KCNQ1OT1 knockdown inhibits colorectal cancer cell proliferation, migration and invasiveness via the PI3K/AKT pathway.** *Oncology Letters*, 2020. [https://doi.org/ 10.3892/ol.2020.11619](https://doi.org/10.3892/ol.2020.11619).
120. LIN, Z.-B.; LONG, P.; ZHAO, Z. et al. **Long Noncoding RNA KCNQ1OT1 is a Prognostic Biomarker and mediates CD8(+) T cell exhaustion by regulating CD155 Expression in Colorectal Cancer.** *International Journal of Biology Sciences*, 2021. [https://doi.org/ 10.7150/ijbs.59001](https://doi.org/10.7150/ijbs.59001).
121. LIU, H.; CHEN, R.; KANG, F. et al. **KCNQ1OT1 promotes ovarian cancer progression via modulating MIR-142-5p/CAPN10 axis.** *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2020. [https://doi.org/ 10.1002/mgg3.1077](https://doi.org/10.1002/mgg3.1077).
122. LEI, H.W.; GAO, Y.; SHI, J.B. et al. **KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 promotes aggressive biological behaviors of cervical cancer cells via regulating microRNA-491-5p and pyruvate kinase M1/2.** *Journal of Biological Regulators and Homeostatics Agents*, 2020. [https://doi.org/ 10.23812/20-19-A](https://doi.org/10.23812/20-19-A).
123. ZHU, Z.; JIN, Z.; ZHANG, H. et al. **Integrative Clustering Reveals a Novel Subtype of Soft Tissue Sarcoma With Poor Prognosis.** *Frontiers in Genetics*, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00069>.
124. BAO, Q.; LIAO, X.; LI, R.; Ding, N. **KCNQ1OT1 promotes migration and inhibits apoptosis by modulating miR-185-5p/Rab14 axis in oral squamous cell carcinoma.** *Developments, Growth and Differentiation*, 2019.

<https://doi.org/10.1111/dgd.12638>.

125. ZHANG, S.; MA, H.; ZHANG, D. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 regulates proliferation and cisplatin resistance in tongue cancer via miR-211-5p mediated Ezrin/Fak/Src signaling.** *Cell Death and Disease*, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0793-5>.
126. QIAO, C.Y.; QIAO, T.Y.; JIN, H. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 contributes to the cisplatin resistance of tongue cancer through the KCNQ1OT1/miR-124-3p/TRIM14 axis.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202001\\_19912](https://doi.org/10.26355/eurrev_202001_19912).
127. SUN, Y.; XU, C.; WU, Q. et al. **Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes proliferation, migration, and invasion in maxillary sinus squamous cell carcinoma by regulating miR-204/EphA7 axis.** *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1002/jcb.29548>.
128. CHENG, P.; LU, P.; GUAN, J. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 controls cell proliferation, differentiation and apoptosis by sponging miR-326 to regulate c-Myc expression in acute myeloid leukemia.** *Neoplasma* 2020, 67, 238–248. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2018\\_181215N972](https://doi.org/10.4149/neo_2018_181215N972).
129. ZHANG, C.; DU, S.; CAO, L. **Long non-coding RNA KCNQ1OT1 promotes osteosarcoma progression by increasing  $\beta$ -catenin activity.** *RSC Advances*, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8ra07209d>.
130. QI, X.; YU, X.-J.; WANG, X.-M. et al. **Knockdown of KCNQ1OT1 Suppresses Cell Invasion and Sensitizes Osteosarcoma Cells to CDDP by Upregulating DNMT1-Mediated Kcnq1 Expression.** *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.06.010>.
131. WANG, M.; WANG, Z.; ZHU, X. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 acting as a ceRNA for miR-4458 enhances osteosarcoma progression by regulating CCND2 expression.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00386-9>.
132. SHEN, Y.; XU, J.; PAN, X. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 sponges miR-34c-5p to promote osteosarcoma growth via ALDOA enhanced aerobic glycolysis.** *Cell Death and Disease*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2485-1>.
133. ZHANG, Y.; CAI, W.; ZOU, Y.; Zhang, H. **Knockdown of KCNQ1OT1 Inhibits Proliferation, Invasion, and Drug Resistance by Regulating miR-129-5p-Mediated LARP1 in Osteosarcoma.** *BioMed Research International*, 2020, 2020, 7698767. <https://doi.org/10.1155/2020/7698767>.
134. LI, L.; LV, G.; WANG, B.; Ma, H. **Long Non-Coding RNA KCNQ1OT1 Promotes Multidrug Resistance in Chordoma by Functioning as a Molecular Sponge of miR-27b-3p and Subsequently Increasing ATF2 Expression.** *Cancer Management and Research*, 2020. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S250611>.

135. WU, Y.; BI, Q.J.; HAN, R.; ZHANG, Y. **Long noncoding RNA KCNQ1OT1 is correlated with human breast cancer cell development through inverse regulation of hsa-miR-107.** *Biochemistry and Cell Biology*, 2020. <https://doi/10.1139/bcb-2019-0271>.
136. SUN, H.; LI, Y.; KONG, H.; DAI, S.; QIAN, H. **Dysregulation of KCNQ1OT1 promotes cholangiocarcinoma progression via miR-140-5p/SOX4 axis.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.09.019>.
137. Hu, H.; Yang, L.; Li, L.; Zeng, C. **Long non-coding RNA KCNQ1OT1 modulates oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma through miR-7-5p/ ABCC1 axis.** *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.168>.
138. CHENG, J.L.; LI, D.J.; LV, M.Y. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 regulates the invasion and migration of hepatocellular carcinoma by acting on S1PR1 through miR-149.** *Cancer Gene Therapy*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0203-x>.
139. ZHANG, J.; ZHAO, X.; MA, X. et al. **KCNQ1OT1 contributes to sorafenib resistance and programmed death-ligand-1-mediated immune escape via sponging miR-506 in hepatocellular carcinoma cells.** *International Journal of Molecular Medicine*, 2020. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4710>.
140. XU, G.; ZHU, Y.; LIU, H. et al. **Long Non-Coding RNA KCNQ1OT1 Promotes Progression of Hepatocellular Carcinoma by miR-148a-3p/IGF1R Axis.** *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2020. <https://doi.org/10.1177/1533033820980117>.
141. WANG, J.; ZHANG, H.; SITU, J. et al. **KCNQ1OT1 aggravates cell proliferation and migration in bladder cancer through modulating miR-145-5p/PCBP2 axis.** *Cancer Cell International*, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1039-z>.
142. KANG, Y.; JIA, Y.; WANG, Q. et al. **Long Noncoding RNA KCNQ1OT1 Promotes the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer via Regulating miR-204-5p/ATG3 Axis.** *OncoTargets and Therapy*, 2019. <https://doi.org/10.2147/OTT.S226044>.
143. REN, K.; XU, R.; HUANG, J. et al. **Knockdown of long non-coding RNA KCNQ1OT1 depressed chemoresistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3356-z>.
144. DONG, Z.; YANG, P.; QIU, X. et al. **KCNQ1OT1 facilitates progression of non-small-cell lung carcinoma via modulating miRNA-27b-3p/HSP90AA1**

- axis.** Journal of Cellular Physiology, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.27788>.
145. WANG, Y.; ZHANG, L.; YANG, J.; Sun, R. **LncRNA KCNQ1OT1 promotes cell proliferation, migration and invasion via regulating miR-129-5p/JAG1 axis in non-small cell lung cancer.** Cancer Cell International, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01225-8>.
146. HE, H.; SONG, X.; YANG, Z. et al. **Upregulation of KCNQ1OT1 promotes resistance to stereotactic body radiotherapy in lung adenocarcinoma by inducing ATG5/ATG12-mediated autophagy via miR-372-3p.** Cell Death and Disease, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03083-8>.
147. ZHU, Y.; SHEN, Y.; CHEN, R. et al. **KCNQ1OT1 lncRNA affects the proliferation, apoptosis, and chemoresistance of small cell lung cancer cells via the JAK2/STAT3 axis.** Annals of Translational Medicine, 2021. <https://doi.org/10.21037/atm-21-1761>.
148. LI, D.; TONG, Q.; LIAN, Y. et al. **Inhibition of lncRNA KCNQ1OT1 Improves Apoptosis and Chemotherapy Drug Response in Small Cell Lung Cancer by TGF- $\beta$ 1 Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition.** Cancer Research and Treatment, 2021. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.1208>.
149. SUN, X.; XIN, Y.; WANG, M. et al. **Overexpression of long non-coding RNA KCNQ1OT1 is related to good prognosis via inhibiting cell proliferation in non-small cell lung cancer.** Thoracic Cancer, 2018. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12599>.
150. GUO, B.; ZHANG, Q.; WANG, H. et al. **KCNQ1OT1 promotes melanoma growth and metastasis.** Aging (Albany NY), 2018. <https://doi.org/10.18632/aging.101418>.
151. CHEN, Q.H.; LI, B.; LIU, D.G. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 sponges miR-15a to promote immune evasion and malignant progression of prostate cancer via up-regulating PDL1.** Cancer Cell International. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01481-8>.
152. HAO, H.; CHEN, H.; XIE, L. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 Promotes Proliferation, Invasion and Metastasis of Prostate Cancer by Regulating miR-211-5p/CHI3L1 Pathway.** OncoTargets Therapy, 2021. <https://doi.org/10.2147/OTT.S288785>.
153. FENG, L.; LI, H.; LI, F. et al. **LncRNA KCNQ1OT1 regulates microRNA-9-LMX1A expression and inhibits gastric cancer cell progression.** Aging (Albany NY), 2020. <https://doi.org/10.18632/aging.102651>.
154. ZHONG, X.; WEN, X.; CHEN, L. et al. **Long non-coding RNA KCNQ1OT1 promotes the progression of gastric cancer via the miR-145-5p/ARF6 axis.** Journal of Gene Medicine, 2021. <https://doi.org/10.1002/jgm.3330>.

155. WANG, J.; WU, F.; LI, Y. et al. **KCNQ10T1 accelerates gastric cancer progression via miR-4319/DRAM2 axis.** International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2020. <https://doi.org/10.1177/2058738420954598>.
156. WANG, W.; HAN, S.; GAO, W. et al. **Long Noncoding RNA KCNQ10T1 Confers Gliomas Resistance to Temozolomide and Enhances Cell Growth by Retrieving PIM1 From miR-761.** Cellular and Molecular Neurobiology, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00958-4>.
157. JIANG, C.; SHEN, F.; DU, J. et al. **Upregulation of CASC2 sensitized glioma to temozolomide cytotoxicity through autophagy inhibition by sponging miR-193a-5p and regulating mTOR expression.** Biomedicine and Pharmacotherapy, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10>.
158. LIAO, Y.; SHEN, L.; ZHAO, H. et al. **LncRNA CASC2 interacts with miR-181a to modulate glioma growth and resistance to TMZ through PTEN pathway.** Journal of Cellular Biochemistry, 2017. <https://doi.org/10.1002/jcb.25910>.
159. XU, N.; LIU, B.; LIAN, C. et al. **Long noncoding RNA AC003092.1 promotes temozolomide chemosensitivity through miR-195/TFPI-2 signaling modulation in glioblastoma.** Cell Death and Disease, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1183-8>.
160. TERAJ, G.; IWAKIRI, J.; KAMEDA, T. et al. **Comprehensive prediction of lncRNA-RNA interactions in human transcriptome.** BMC Genomics, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2307-5>.
161. Interaction RNA. Disponível em: <http://rtools.cbrc.jp/cgi-bin/RNARNA/index.pl>. Acesso em 20/01/2023.
162. Disponível em: [http://rtools.cbrc.jp/LncRRISearch/detail.cgi?t3=ENST00000460164&t4=ENST00000460164&q4=ENST00000597346&species=human&t1=ENSG00000253364&q1=ENST00000597346&hist=T&q2=ENST00000597346&t2=ENSG00000253364&energy\\_threshold=16&q3=ENST00000597346](http://rtools.cbrc.jp/LncRRISearch/detail.cgi?t3=ENST00000460164&t4=ENST00000460164&q4=ENST00000597346&species=human&t1=ENSG00000253364&q1=ENST00000597346&hist=T&q2=ENST00000597346&t2=ENSG00000253364&energy_threshold=16&q3=ENST00000597346). Acesso em 20/01/2023.
163. **COPDA1 chronic obstructive pulmonary disease associated lncRNA 1.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=copda1>. Acesso em 06/02/2023.
164. ESPOSTI, D.D.; HERNANDEZ-VARGAS, H.; VOEGELE, C. et al. **Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing.** Oncotarget, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7364>.
165. ZHENG, M.; HONG, W.; GAO, M. et al. **Long Noncoding RNA COPDA1 Promotes Airway Smooth Muscle Cell Proliferation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology,

2019. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0269OC>.

166. FERRASI, A. C.; FERNANDEZ, G.J.; GROTTTO, R.M.T. *et al.* **New LncRNAs in Chronic Hepatitis C progression: from fibrosis to hepatocellular carcinoma.** Scientific Reports, 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-66881-2>.
167. WANG, X.; REN, Z.; XU, Y, *et al.* **KCNQ1OT1 sponges miR-34a to promote malignant progression of malignant melanoma via upregulation of the STAT3/PD-L1 axis.** Environmental Toxicology 2023. <https://doi.org/10.1002/tox.23687>.
168. LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E.A. *et al.* **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** Nature, 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03702>.
169. YIN, D.; OGAWA, S.; KAWAMATA, N. *et al.* **miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme.** Oncogene, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111115>.
170. MA, Z.-L., HOU, P.-P., LI, Y.-L. *et al.* **MicroRNA-34a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of non-small cell lung cancer H1299 cell line by targeting TGF $\beta$ R2.** Tumor Biology, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2861-5>.
171. LIU, H.; BRANNON, A.R.; REDDY, A.R. *et al.* **Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: With application to clear cell Renal Cell Carcinoma.** BMC System Biology, 2010. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-51>.
172. MARSH, E.E.; LIN, Z.; YIN, P. *et al.* **Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium.** Fertility and Sterility, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.074>.
173. LI, W. B.; MA, M. W.; DONG, L. J. *et al.* **MicroRNA-34a targets notch1 and inhibits cell proliferation in glioblastoma multiforme.** Cancer Biology & Therapy, 2011. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.6.16300>.
174. MEYER, J.; PUSCH, S.; BALSS, J. *et al.* **PCR- and Restriction EndonucleaseBased Detection of IDH1 Mutations.** Brain Pathology, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00327.x>
175. JING, R.; LIU, S.; JIANG, Y. *et al.* **Determination of serum RP11-731F5.2 as a noninvasive biomarker for gastric cancer diagnosis and prognosis.** Pathology Research and Practice, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153261>.
176. ALGABER, A.; AL-HAIDARI, A.; MADHI, R. **MicroRNA-340-5p inhibits colon cancer cell migration via targeting of RhoA.** Science Report, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73792-9>. Erratum in: Science Report, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53419-z>.
177. LODYGIN, D.; TARASOV, V.; EPANCHINTSEV, A. *et al.* **Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer.** Cell Cycle, 2008

[https://doi: 10.4161/cc.7.16.6533](https://doi.org/10.4161/cc.7.16.6533).

178. BURENINA, O.Y.; LAZAREVICH, N.L.; KUSTOVA, I.F. et al. **Panel of potential lncRNA biomarkers can distinguish various types of liver malignant and benign tumors.** *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03378-5>.
179. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-Delta Delta C(t)] method.** *Methods*, 2001. [https://doi: 10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
180. MUKAKA, M.M. **Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research.** *Malawi Medical Journal*, 2012. PMID: 23638278; PMCID: PMC3576830.
181. LAN, Z.; LI, X.; ZHANG, X. **Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25053040>.
182. SIQUEIRA, E.M.P.; DICCINI, S. **Complicações pós-operatórias em neurocirurgia eletiva e não eletiva.** *Acta Paulista de Enfermagem*, 2017. <https://doi.org/10.1590/1982-0194201700015>.
183. SCHMITT, C.A.; WANG, B.; DEMARIA, M. **Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities.** *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022a. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>.
184. XU, Q.; CHEN, Y. **An aging-related gene signature-based model for risk stratification and prognosis prediction in lung adenocarcinoma.** *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685379>.
185. HE, J.; TU, C.; LIU, Y. **Role of lncRNAs in aging and age-related diseases.** *Aging Medicine*, 2018. [https://doi: 10.1002/agm2.12030](https://doi.org/10.1002/agm2.12030).
186. BALARAMAN, A.K.; AFZAL, M.; MOGLAD, E. et al. **The interplay of p16INK4a and non-coding RNAs: bridging cellular senescence, aging, and cancer.** *Biogerontology*, 2025. [https://doi: 10.1007/s10522-025-10194-2](https://doi.org/10.1007/s10522-025-10194-2).
187. BEAUSÉJOUR, C.M.; KRTOLICA, A.; GALIMI, F. et al. **Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.** *EMBO Journal*, 2003. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>.
188. TAHERI, M.; SHIRVANI-FARSANI, Z.; HARSIJ, A. et al. **A review on the role of KCNQ10T1 lncRNA in human disorders.** *Pathology Research and Practice*, 2024 <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155188>.

# **Arquivos Suplementares**

## 9. Arquivos Suplementares

**Tabela S1.** Médias de idade (em anos) e sobrevida (em dias) da casuística analisada.

	<b>Cluster 1 (n = 30)</b>	<b>Cluster 2 (n = 13)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Idade</b> (anos, $\bar{x} \pm dp^*$ )	55,3 $\pm$ 15,3	63,9 $\pm$ 6,3	0,013
<b>Sobrevida</b> (dias, $\bar{x} \pm dp^*$ )	501,6 $\pm$ 412,0	389,6 $\pm$ 234,5	0,267

**Legenda:**  $\bar{x}$ : média; \*dp: desvio padrão

**Tabela S2.** Análise de correlação dos ncRNAs nos clusters e grupo controle.

	<b>Cluster 1 (n = 30) (<math>\bar{x} \pm dp^*</math>)</b>	<b>Cluster 2 (n = 13) (<math>\bar{x} \pm dp^*</math>)</b>	<b>Grupo Controle (n=13) (<math>\bar{x} \pm dp^*</math>)</b>
<b>KCNQ1OT1</b>	10,94 $\pm$ 1,28	7,04 $\pm$ 2,06	8,34 $\pm$ 1,84
<b>RP11-731F5.2</b>	12,94 $\pm$ 2,27	6,15 $\pm$ 1,99	10,88 $\pm$ 2,66
<b>miR-34a</b>	10,43 $\pm$ 1,96	9,04 $\pm$ 1,66	11,18 $\pm$ 1,76

**Legenda:**  $\bar{x}$ : média; \*dp: desvio padrão

# Anexos

## 10. Anexos

### ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

#### RESOLUÇÃO 466/2012

#### (Participante maior de 18anos)

CONVIDO o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado **“Análise de biomarcadores moleculares em gliomas de alto grau”**, que será desenvolvido por mim, **Aline Faria Galvani**, (Biomédica), pós-graduanda da Faculdade de Medicina de Botucatu–UNESP e por outros Pesquisadores (listados no final desse documento).

**Estamos estudando as alterações de algumas moléculas presentes no plasma sanguíneo dos pacientes com tumores cerebrais para tentar diagnosticar mais cedo e mais facilmente esses tumores, antes que ele fique avançado.**

Para que possamos ter um resultado, nesse momento preciso coletar 4ml do seu sangue e, depois iremos realizar nesse sangue os seguintes exames (analisar e detectar quais as moléculas estão presentes). O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente, igual às coletas que fazemos para outros exames de sangue no laboratório.

Também iremos precisar de duas pequenas amostras do tumor que será retirado no dia da sua cirurgia. O tamanho de cada amostra será de aproximadamente 3mm<sup>3</sup> (meio grão de feijão). Nessas amostras vamos buscar por marcadores que diferenciem as células de tumor das células normais (por exemplo proteínas, DNA, RNA). Informamos que o seu tratamento e cirurgia não irão ser alterados em nada para que a amostra seja coletada. Nenhum risco adicional será incluído aos que já existem em decorrência ao seu tratamento e que serão explicados pelo seu médico.

Informo que o material biológico colhido do Senhor(a) não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para

reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que o Senhor(a) assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como (data de nascimento, documentação, endereço, histórico da doença, hábitos de vida, existência ou não de casos da doença na família, exame físico e complementares, laudos histopatológicos e tratamentos realizados) referentes a consultas feitas anteriormente pelo(a) Senhor(a).

Vale lembrar que o(a) Senhor(a) não terá qualquer benefício direto imediato desta pesquisa, em princípio, mas poderá estar contribuindo para que se entenda melhor os tumores cerebrais e que, a médio prazo, o diagnóstico se torne mais rápido, preciso e barato, podendo estar disponível para o maior número de pessoas. Ainda assim, qualquer informação ou descoberta vindas desse estudo e que venha a ser comprovada como benefício, será imediatamente repassada a você e a seu médico.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Será garantido o direito à assistência integral e gratuita a você em caso de quaisquer danos decorrentes da participação nessa pesquisa e pelo tempo que for necessário. Você tem direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12:00 e das 13:30 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

**Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardos através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas.**

Botucatu, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Pesquisador**

---

**Participante da Pesquisa**

Nome do

Participante: \_\_\_\_\_

Documento: \_\_\_\_\_ No .

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de

Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **PESQUISADORES**

**Ms. Aline Faria Galvani**

Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimarães Montenegro, s/n., Distrito de Rubião Júnior,

Botucatu. Telefone: (14) 99604 2086 e (014) 3880-1394.

E-mail: alinefgalvani@gmail.com

**Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho**

Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimarães Montenegro, s/n., Distrito de Rubião Júnior,

Botucatu. Depto. Neurol/Psicol/Psiquiatria. Telefone: (014) 3880-1823. E-mail: pedro.hamamoto@unesp.br

**Dra. Estela de Oliveira Lima**

Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimarães Montenegro, s/n., Distrito de Rubião Júnior,

Botucatu. Departamento de Clínica Médica. Telefone: (014) 3880-1394 E-mail: estela.lima@unesp.br

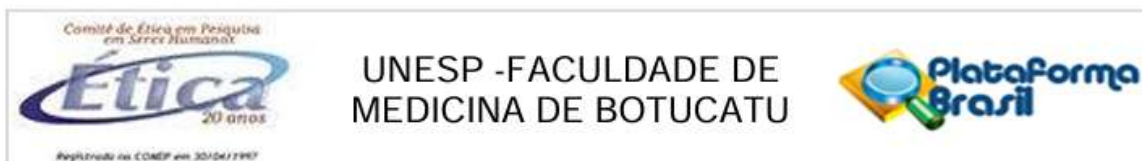
**Dra. Adriana Camargo Ferrasi**

Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimarães Montenegro, s/n., Distrito de Rubião Júnior,

Botucatu. Departamento de Clínica Médica. Telefone: (14) 99621 3386 e (014) 3880-1394.

E-mail: adriana.ferrasi@unesp.br

## ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise de biomarcadores moleculares em gliomas de alto grau.

**Pesquisador:** Aline Faria Galvani

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 68069423.7.0000.5411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.030.431

#### Apresentação do Projeto:

##### INTRODUÇÃO BREVE

O tumor do Sistema Nervoso Central (SNC), considerado como o mais maligno (grau 4) e o glioblastoma multiforme (GBM). Estes são responsáveis pela maioria das mortes causadas por tumores primários de SNC, com maior taxa de recidiva, maior resistência aos tratamentos atualmente disponíveis e conseqüentemente, pior prognóstico. A máxima ressecção cirúrgica tumoral, seguida de radioterapia em concomitância a administração do quimioterápico Temozolamida (TMZ) compõem o conjunto de processos que englobam o tratamento padrão de pacientes portadores de GBM primários. Entretanto, tais esforços ainda não são completamente eficientes para evitar recidivas e aumentar a sobrevivência dos pacientes consideravelmente. Por este motivo, a busca de biomarcadores associados ao prognóstico e a detecção precoce de GBM tem prosseguido de forma constante nos últimos anos. Evidências demonstram que níveis discrepantes de lncRNAs poderiam estar associados à formação, progressão tumoral, bem como iniciação e desenvolvimento de quimiorresistência tumoral. O lncRNA RP11-731F5.2, foi associado à evolução de câncer gástrico, doença pulmonar obstrutiva crônica e carcinoma hepatocelular e apresenta forte interação química com o lncRNA KCNQ10T1, caracterizado por desempenhar importante função associada à gênese, progressão tumoral e quimiorresistência em gliomas. Além disso genes envolvidos com as vias de regulação do ciclo celular, e quando desregulados, afetam

**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: 6.030.431

processo de divisão celular e contribuem com processos de tumorigenese e/ou progressão tumoral. O gene p53 tem sido descrito com importante função no controle do ciclo celular, atuando sobre mecanismos envolvidos no crescimento celular, proliferação, migração de células, invasão a tecidos adjacentes, controle da angiogênese e evasão da apoptose por células tumorais.

#### HIPÓTESE

O entendimento de processos patológicos e biológicos complexos é obtido através da interpretação e associação dos resultados de análises dos diferentes níveis "ômicos". Assim, com a análise de expressões diferenciais de lncRNAs (RP11-731F5.2 e KCNQ10T1), correlacionadas com o perfil de mutação em p53, esperamos ser capazes de inferir sobre o prognóstico do paciente frente a patologia, e, inferir sobre a possibilidade de utilizarmos estes biomarcadores moleculares como adjuvantes a conduta de seguimento do paciente.

#### METODOLOGIA

Serão convidados a participar do estudo, 50 (cinquenta) pacientes portadores de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), compatíveis ou sugestivos de glioblastoma a serem operados de acordo com a rotina de atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os pacientes e/ou responsável legal serão informados verbalmente e por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), sobre a pesquisa. Após o exposto entendimento desta pesquisa, estes pacientes, ou seu responsável legal, deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, caso concordem em participar da pesquisa. Serão coletadas amostras de tumores, durante o procedimento cirúrgico, as quais serão fragmentadas em aproximadamente 3mm<sup>3</sup>. Os fragmentos serão separados em criotubos contendo 500L de conservante de ácidos nucleicos.

As amostras de tecido e plasma (Pacientes) serão coletadas, processadas, identificadas através de códigos e, posteriormente armazenadas em freezer a -80°C, na Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX – UNESP.

Rotineiramente as análises histológicas dos fragmentos tumorais coletados no atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP são realizadas pelo Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Assim, não haverá nenhuma alteração no fluxo contínuo das análises já realizadas ou custos adicionais ao serviço. Tais informações (histologia tumoral) serão acessadas via prontuário eletrônico e serão utilizadas para a seleção da casuística. Somente os casos que possuírem morfologia compatível ou sugestiva de Glioblastoma seguirão para as análises moleculares. O RNA total do tecido será isolado a partir dos tecidos de glioblastoma (GBM) usando RNeasy Mini Kit (Qiagen), com base nas

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Telefone:** (14)3880-1609

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 6.030.431

instruções dos fabricantes.

O isolamento do lncRNA das amostras de plasma de indivíduos acometidos por glioblastoma será realizado pelo Kit Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Mini Kit (Norgen – Biotek Corporation), conforme as especificações do fabricante. O cDNA será produzido utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher Scientific, Inc.), de acordo com especificações do fabricante. As condições de reação serão: RT Buffer 1x, dNTP Mix 4mM, Random Primer 1x, MultiScribe™ 25U, RNase Inhibitor 10U, para o volume final de 10L. O cDNA será analisado como um modelo na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real usando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) e o StepOne Plus™ System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.), seguindo as especificações fabricante. Para detectar as expressões diferenciais dos lnc-RNA, a Beta-Actina será utilizada como controle endógeno de reação, usando o método 2–Ct. As análises de lncRNA RP11- 731F5.2 serão realizadas usando o Software StepOne™ v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.). A metodologia de ARMS-PCR será implementada para genotipar dois polimorfismos na região do domínio de ligação de TP53 (c.G743A - p.R248Q e c.G818A - p.R273H). Os dois polimorfismos serão genotipados separadamente, por um conjunto de quatro primers (dois primers específicos de alelos e dois primers comuns).

#### CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Casística: Pacientes com idade igual ou superior a 18 anos; II- Presença ou suspeita de glioblastoma com indicação neurocirúrgica formal, incluindo casos de recidivas; III- Possibilidade de coleta de 4mL de sangue total do paciente antes da cirurgia, sem prejuízo ao paciente ou a outros exames necessários; IV- Possibilidade de coleta de fragmentos tumorais (3mm<sup>3</sup>) durante o procedimento cirúrgico, sem que haja qualquer prejuízo ao exame histopatológico ou outros que porventura se fizerem necessários; V- Diagnóstico histológico da neoplasia sugestivo de Glioblastoma; VI- Expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente ou pelo seu responsável legal, previamente a cirurgia, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Casística: Pacientes que reconhecidamente apresentarem neoplasias de origem diversa as previamente estabelecidas; II- Pacientes com tumores primários do SNC recidivantes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade; III- Pacientes com tumores pequenos, dos quais se obtenha material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico e/ou outros exames necessários; IV- Impossibilidade de coleta de 4mL de sangue total do

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

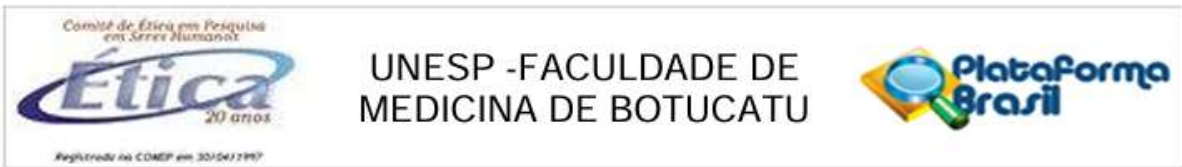
**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.030.431

paciente antes da cirurgia; V- Diagnostico histologico da neoplasia incompatíveis com Glioblastoma; VI- Pacientes ou responsável legal que não tenham conseguido compreender suficientemente as diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

TAMANHO AMOSTRAL: 50

HAVERÁ RETENÇÃO DE AMOSTRA, APRESENTADO O REGULAMENTO DE BIORREPOSITÓRIO: SIM

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar e comparar a expressão diferencial dos LncRNAs RP11-731F5.2 e KCNQ1OT1 em amostras tumorais e de plasma de pacientes acometidos por Glioblastoma e comparar a expressão destes LncRNAs de acordo com o perfil de sobrevivência desses pacientes.

Correlacionar os dados encontrados com o perfil de mutação R248Q e R273H em TP53, buscando por biomarcadores moleculares

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:**

Os riscos são mínimos. Informamos que a conduta do médico, o tratamento oferecido para o paciente não será alterado por conta da pesquisa proposta. Assim, nenhum risco adicional será incluído aos que já existem em decorrência do tratamento e abordagem cirúrgica e, apenas poderá ocorrer, após a coleta de sangue e a picadinha da agulha, uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente, igual as coletas que fazemos para outros exames de sangue no laboratório.

**BENEFÍCIOS:**

O paciente que concordar em participar da pesquisa não terá qualquer benefício direto imediato, em princípio, mas poderá contribuir para que se entenda melhor os tumores cerebrais e que, a médio prazo, o diagnóstico se torne mais rápido, preciso e barato, podendo estar disponível para o maior número de pessoas. Ainda assim, qualquer informação ou descoberta vindas desse estudo e que venha a ser comprovada como benefício, será imediatamente repassada ao paciente e ao médico responsável.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de projeto de pesquisa com coleta prospectiva, de amostras de tecido cerebral

**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: 6.030.431

provenientes de cirurgia e de cadáveres de portadores ou com suspeita de gliomas de alto grau e de sangue de suspeitos e submissão a análise laboratorial de biomarcadores para tentar correlacionar com o prognóstico e tratamento. Local do estudo: Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPLEX – UNESP. O custo será de R\$ 15.000,00 com financiamento próprio, provenientes de sobras de outras pesquisas

Período de coleta de dados do estudo prospectivo: 08/03/2023 a 13/02/2025

Cronograma de execução na PB: 08/03/2023 a 13/02/2026

A pesquisadora incluiu carta resposta com as pendências solicitadas e analisadas abaixo:

Ref.: Esclarecimentos as pendências sobre o Projeto de Pesquisa sob CAAE 68069423.7.0000.5411

Prezados Senhores,

Agradecemos a avaliação do Projeto de Pesquisa "Análise de biomarcadores moleculares em gliomas de alto grau". Segue abaixo nossos esclarecimentos sobre as pendências apontadas:

1. A pesquisadora informa que haverá armazenamento do sangue e material biológico na Unidade Uniplex. No entanto, não apresentou os documentos regulatórios de Biorrepositório. Solicita-se a inclusão.

Resposta: O documento referente ao biorrepositório agora foi inserido no sistema de acordo com a solicitação.

**PARECER:** A pesquisadora atendeu a pendência e incluiu o documento do repositório, descrito conforme a resolução Resolução no 441/2011, do Conselho Nacional de Saúde. A redação está clara.

No entanto, ao final do arquivo, o orientador assina o documento indicando que o projeto não é destinado à titulação acadêmica, onde se lê: Este projeto não se destina à titulação acadêmica. Essa informação difere daquelas apresentadas no 1º. Parágrafo do TCLE, onde se lê: CONVIDO o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise de biomarcadores moleculares em gliomas de alto grau", que será desenvolvido por mim, Aline Faria Galvani, (Biomedica), pós-graduanda da Faculdade de Medicina de Botucatu–UNESP e por outros Pesquisadores (listados no final desse documento). Outro fato é o arquivo incluído como brochura do investigador tem o título de tese, além da informação na resposta 2 da Carta resposta, onde se lê: A Pós-Graduação em que esse projeto de doutorado está vinculado realiza anualmente "bancas de acompanhamento..."

Tal situação não tem impacto no bem estar do sujeito da pesquisa. No entanto, recomenda-se

**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: 6.030.431

(identificada em amarelo).

PENDENCIA ATENDIDA. A informação foi incluída na brochura do investigador, parte de metodologia, onde se lê: As análises moleculares para avaliação dos biomarcadores serão realizadas pela pesquisadora Aline Faria Galvani, que possui conhecimento técnico, científico e competência profissional suficientes para desempenhar essa função.

6. O pesquisador informa que os riscos são mínimos, (item RISCOS, pag 4/7 informações básicas PB) onde se lê: Os riscos são mínimos. Informamos que a conduta do médico, o tratamento oferecido para o paciente não será alterado por conta da pesquisa proposta. Assim, nenhum risco adicional será incluído aos que já existem em decorrência do tratamento e abordagem cirúrgica. No entanto no TCLE informa sobre a coleta de sangue e possível dor e hematoma. Solicita-se incluir essa informação em riscos.

Resposta: Agradecemos a nota. Essa informação foi adicionada na Plataforma Brasil e no projeto (identificada em amarelo).

PENDENCIA ATENDIDA. A pesquisadora incluiu o texto no item riscos da PB (página 4/8), onde se lê: apenas poderá ocorrer, após a coleta de sangue e a picadinha da agulha, uma manchinha roxa que desaparecera bem rapidamente, igual as coletas que fazemos para outros exames de sangue no laboratório.

7. Revisar texto do 3º parágrafo do TCLE complementando quais exames serão coletados, antes do parágrafo, onde se lê: Para que possamos ter um resultado, nesse momento, preciso coletar 4 ml de sangue e depois irei realizar nesse sangue os seguintes exames (analisar e detectar quais moléculas estão presentes)

Resposta: Revisamos o texto do TCLE como recomendado e incluímos as informações sobre os exames que serão realizados, tomando o cuidado para que essas informações estejam o mais claras e simplificadas para o entendimento dos participantes da pesquisa.

PENDENCIA ATENDIDA. O texto do TCLE foi modificado. Onde se lê: Para que possamos ter um resultado, nesse momento preciso coletar 4ml do seu sangue e, depois iremos realizar nesse sangue alguns exames para analisar a quantidade de partículas (moléculas) que estão presentes e que podem estar relacionadas com o tumor

Esperamos ter atendido as pendências do relator. Todas as alterações no projeto foram identificadas com marcação amarela.

Nos colocamos a disposição para maiores informações que se fizerem necessárias. Cordialmente,

\_\_\_\_\_ Aline Faria Galvani

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

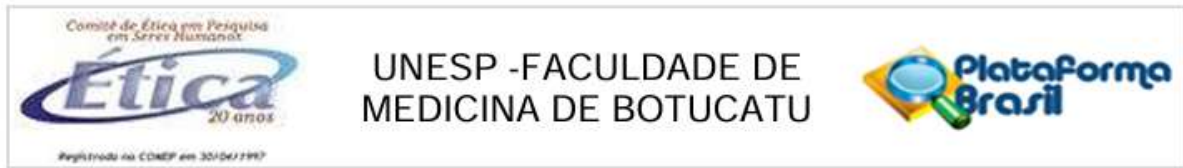
**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.030.431

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TOs temos obrigatórios foram apresentados:

- Folha de rosto, assinada pela Diretora da FMB, em 22/02/2023
- Anuência institucional da FMB, assinada pela Diretora da FMB, emitida pelo EAP em 22/02/2023
- Anuência do HCFMB, assinada pelo superintendente em 08/02/2023
- Projeto de pesquisa/brochura
- Termo de Biorrepositório
- Anuência da Unipex
- TCLE para participantes maiores de 18 anos
- Outros documentos:
- Anuência do gestor de área do Serviço de Neurocirurgia – HCFMB, assinada pelo chefe, em 07/02/2023
- Anuência do gestor de área do Departamento de Patologia, assinada pelo chefe em 07/02/2023
- Informações básicas da PB

**Recomendações:**

não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do PROJETO de Pesquisa apresentado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, o PROJETO de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

O projeto de pesquisa deverá ter início somente após aprovação deste CEP.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

**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: 6.030.431

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2086156.pdf	20/04/2023 16:24:37		Aceito
Outros	RespostasaoComite.pdf	20/04/2023 16:24:07	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	DeclaracaoUnipex.pdf	20/04/2023 16:21:03	Aline Faria Galvani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TESE_CEP_revisado.pdf	20/04/2023 16:15:10	Aline Faria Galvani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_revisado.pdf	20/04/2023 16:14:09	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	Biorrepositorio.pdf	18/04/2023 15:50:19	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	CienciaeAnuencia_Neurocirurgia.pdf	23/02/2023 10:44:14	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	CienciaeAnuencia_Patologia.pdf	23/02/2023 10:43:47	Aline Faria Galvani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_AlineFariaGalvani.pdf	23/02/2023 10:41:52	Aline Faria Galvani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimento.pdf	23/02/2023 10:40:02	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	TermoDeAnuenciaInstitucional_SIPE.pdf	23/02/2023 10:37:34	Aline Faria Galvani	Aceito
Outros	AnuenciaHCFMB_Sipe_372023.pdf	23/02/2023 10:36:43	Aline Faria Galvani	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada_SIPE.pdf	23/02/2023 10:35:13	Aline Faria Galvani	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

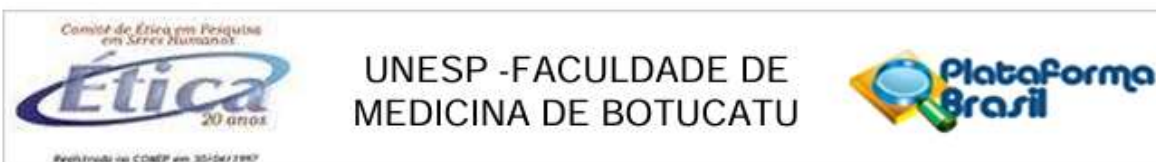
**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.030.431

UNESP - FACULDADE DE  
MEDICINA DE BOTUCATU

BOTUCATU, 28 de Abril de 2023

---

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

## The Landscape of RP11-731F5.2, KCNQ1OT1, and miR-34a Expression in Glioblastoma: Correlation and Clinical Associations

Aline Faria Galvani<sup>1</sup>, Estela de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Marco Antonio Zanini<sup>2</sup>, Driele Bretones dos Santos<sup>1</sup>, Silvia Helena Barem Rabenhorst<sup>3</sup>, Adriana Camargo Ferrasi<sup>1†</sup>, Pedro Tadao Hamamoto Filho<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>São Paulo State University - Botucatu Medical School, Department of Internal Medicine, Botucatu, Brazil.

<sup>2</sup>São Paulo State University - Botucatu Medical School, Department of Neurology-Psychology and Psychiatry- Botucatu, Brazil.

<sup>3</sup>Pathology and Forensic Medicine Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

†These authors contributed equally to this work and share senior authorship.

\*adriana.ferrasi@unesp.br

**Abstract:** Non-coding RNAs (ncRNAs) play fundamental roles in gene regulation and tumor pathogenesis. LncRNA KCNQ1OT1 has already been linked to genesis, tumor progression and chemoresistance in gliomas and act as a competitive endogenous RNA (ceRNAs) for various microRNAs, such as miR-34a. LncRNA RP11-731F5.2 has already been associated with the progression of other tumors and has a chemical interaction with KCNQ1OT1. Glioblastoma (GBM) is a lethal primary tumor of the central nervous system, characterized by a high recurrence rate and resistance to treatments. This study investigated their differential expression in 43 GBM samples versus 13 non-tumoral glial tissue using RT-qPCR to evaluate their potential as biomarker. Hierarchical clustering based on ncRNA profiles revealed two distinct patient subpopulations. Cluster 1 consisted of younger patients with lower ncRNA expression and exhibited a better survival (501 days) compared to Cluster 2, which included older patients with higher RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 expression and shorter median survival (389 days). A strong positive correlation was observed between RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 expression ( $r=0.818$ ). These findings underscore GBM heterogeneity identifiable through ncRNA expression profiles. RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 correlate strongly and stratify patients into subgroups with distinct clinical features, highlighting their potential as candidate biomarkers for GBM patient stratification.

**Keywords:** molecular biomarkers; glioblastoma; non-coding RNAs

## 1 Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive, invasive and lethal tumor of the central nervous system.<sup>1-7</sup> Trimodal treatment consists of surgical tumor resection followed by radiotherapy concomitant with the administration of the chemotherapy drug Temozolamide (TMZ), but its prognosis remains unfavorable, making GBM a major challenge.<sup>8-14</sup> For this reason, the search for diagnostic and prognostic biomarkers in GBM, as well as the search for potential therapeutic avenues, have attracted the attention of the scientific community.<sup>15,16</sup> Non-coding RNAs (ncRNAs) have been addressed in several studies as promising biomarkers in various cancers, including gliomas.<sup>17-19</sup> Although these molecules do not encode proteins, their complementarity and chemical bonds with other target molecules (DNA, miRNA (microRNA), mRNA (messenger RNA)) and proteins<sup>20-22</sup> regulate gene expression at the transcriptional, post-transcriptional and epigenetic levels.<sup>15-16</sup> The lncRNA (long non-coding RNA) RP11-731F5.2 (COPDA1)<sup>23</sup> (ENSG00000253364) has been highlighted as a diagnostic and prognostic biomarker in gastric tumors<sup>24</sup>, hepatocellular carcinoma<sup>25,26</sup> melanoma<sup>27</sup> and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).<sup>28</sup> However, its relevance in GBM remains to be clarified. The lncRNA KCNQ1OT1 (ENSG00000269821)<sup>29</sup> interacts with other transcripts modulating the expression of key genes in various tumor types.<sup>30</sup> In addition, KCNQ1OT1 can act as an endogenous high-affinity RNA (ceRNA) competitor interfering with the control of target genes modulated by microRNAs, such as miR-34a.<sup>31</sup> Evidence has highlighted that this interaction with miR-34a may contribute to tumor progression.<sup>32</sup> In this context, the present study sought to elucidate the relevance of the ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR34a as molecular biomarkers in glioblastoma.

## 2 Methods

### 2.1 Ethical Premises

This study was approved by the São Paulo State University Research Ethics Committee (CAAE 68069423.7.0000.5411, approved on April 23,2023) and was conducted in accordance with the relevant guidelines/regulations for research involving human participants and all the principles set out in the Declaration of Helsinki. All participants of the study signed individual informed consent forms.

## 2.2 Casuistry

Tumors samples was collected from 43 volunteer participants, operated by the Neurosurgery from Botucatu Medical School Hospital – UNESP, with anatomopathological diagnosis confirmed by the Pathology Laboratory of the Hospital das Clínicas de Botucatu. Inclusion Criteria: Patients aged 18 or over; II. Possibility of collecting 4mL of whole blood before surgery, without harming the patient or other routine tests; III. Possibility of collecting tumor fragments (3mm<sup>3</sup>) during the surgical procedure, without prejudice to histopathological examination; IV. Histological diagnosis of glioblastoma; V. Tumor samples without mutation in IDH1 (p.R132H); VI. Survival of more than 90 days. As a parameter for the normality of non-tumorous CNS tissues, 13 (thirteen) samples of healthy glial tissue were obtained from cadavers from the Necropsy Department of the Pathology Department of the Botucatu Medical School - UNESP. The inclusion criteria were: I. Cases in which death did not refer to intra- or extra-SNC neoplasia; II. Possibility of collecting non-tumor tissues ( $\pm$  3mm<sup>3</sup>). All the tissues collected were placed in cryotubes containing 500 $\mu$ L of nucleic acid preservative, identified anonymously and stored at -80°C until use.

## 2.3 RT-qPCR

Total tissue RNA was isolated from glial cells (Control Group) and GBM tissues using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's specifications. The cDNA was produced using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's specifications. The reaction conditions were RT Buffer 1x, dNTP Mix 4mM, Random Primer 1x, MultiScribe™ 25U, RNase Inhibitor 10U, for a final volume of 20 $\mu$ L. The conditions for real-time polymerase chain reaction (qPCR) followed: 1x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA); 0,3 $\mu$ M from each primer (Table S1-Supplementary Materials) and water enough for 20 $\mu$ L of reaction. The reaction was performed is StepOne Plus™ System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), following the manufacturer's specifications. The qPCR reaction was carried out under the following conditions: 50°C for 2 min; 95°C for 2 min e 40 cycles of 95°C for 15 s, aneeling and extension at 62°C for 1 m. RP11-731F5.2 and KCNQ10T1 and, for miR-34a, U6. The lncRNA expression level was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method.<sup>33</sup>  $\beta$ -actin was selected as an internal reference to evaluate the differential expression. Of RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 and U6, for miR-34a. The specificity of assays was confirmed by dissociation melting curve and polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were analyzed in triplicate, with no-template controls included.

## **2.4 Statistical Analysis**

Descriptive statistical analyses were carried out on the data with frequencies and percentages for the qualitative variables. For the quantitative variables, association tests were carried out: Chi square test ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact test, when necessary. To check the distribution of the data, a normality test was carried out. A value of  $p < 0.05$  was taken as the significance level. The expression values were used to generate a hierarchical cluster analysis with agglomeration schedule and proximity matrix to verify the expression patterns. We used the cluster method of linkage between groups and the interval measure using the squared Euclidean distance. The resulting dendrogram was used to visualize the possible clusters to be created in the next step. Expression values were included as variables for interaction (maximum of 10 interactions and convergence criterion at 0) and classification into clusters. Survival curves were estimated using Kaplan-Meier with the log rank technique, using 95% confidence intervals. Analyses were carried out using IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and GraphPad v. 9.5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and GraphPad v. 9.5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **3 Results**

Our study evaluated the expression of KCNQ1OT1, RP11-731F5.2 e miR34- miR34a in glioblastoma samples and non-tumor glial tissue to find potential biomarkers as well as better elucidating the molecular characteristics of the disease.

To comply with the new WHO classification<sup>1</sup>, only cases with wild-type IDH1 were included in the study. Thus, 43 tumor samples from patients with

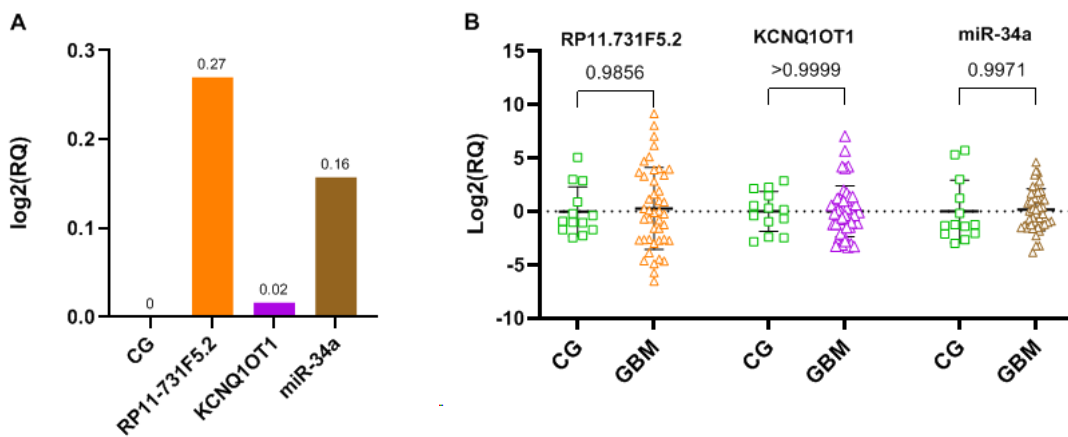
glioblastoma and 13 non-tumor glial samples (control group) was included in this study. Patient demographics are shown in Table 1.

**Table 1.** Demographic data of the patients included in the study.

Variables	Control	GBM	p-value
	n=13	n=43	
<b>Age</b> ( $\bar{x}$ ; sd*)	54 (7.0)	58 (13.7)	0.999
<b>Sex</b>			
Male	7 (53.9%)	23 (53.5%)	0.999
Female	6 (46.1%)	20 (46.5%)	

Caption:  $\bar{x}$ - Average; \*sd – Standard Deviation.

Initially, when comparing the relative expression of the transcripts studied, it was observed that there was no difference between the tumor samples (GBM) and the control group (CG), (Figure 1).

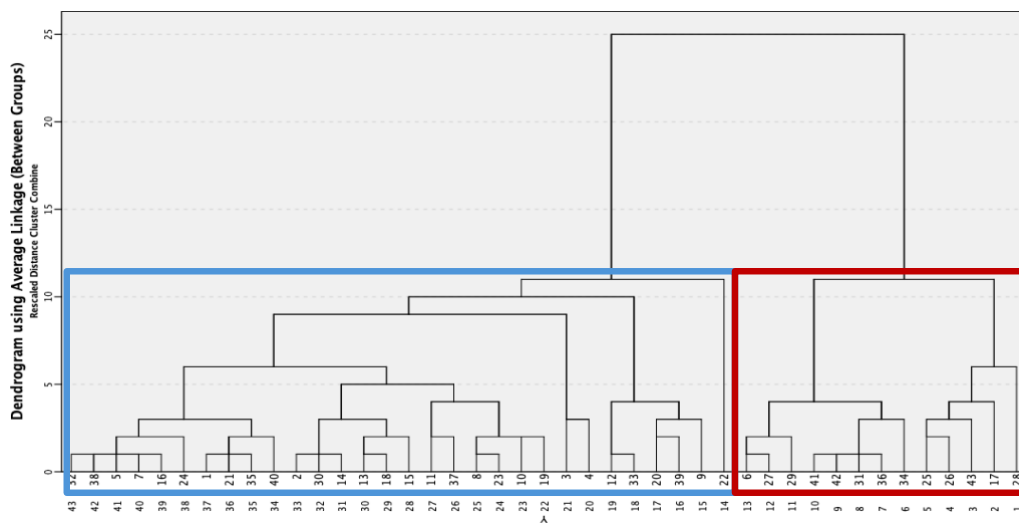


**Figure 1.** (A) Relative Expression (log2RQ) and (B) Scatter plots of ncRNAs in GBM cases compared to the control group (CG)

In order to identify possible heterogeneities and distinct molecular patterns in the sample, cluster analysis was carried out. Figure 2 shows the hierarchical cluster dendrogram, using the agglomeration scale according to the square of the Euclidean distance.

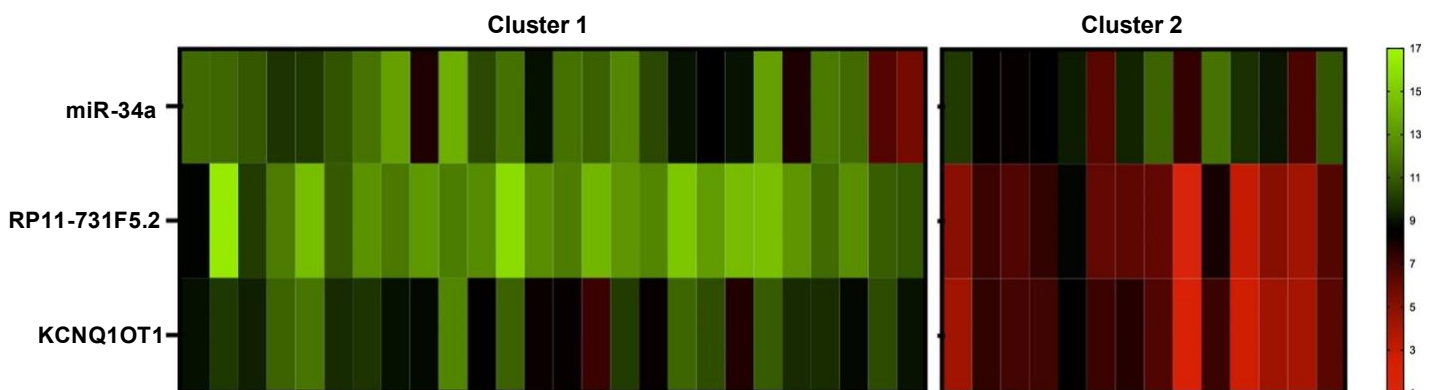
The samples were grouped into two clusters according to the expression profile of the ncRNAs. Represented by the blue rectangle, cluster 1 obtained 30 patients and represented by the red rectangle, cluster 2, 13 individuals (Figure 2).

The relevance of the difference between the two clusters was verified by the mean  $\Delta Cq$  values for RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a (independent samples t-test) (Table S2). It was observed that in cluster 1 the mean  $\Delta Cq$  for RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a were higher (RP11-731F5.2,  $p < 0.001$ ; KCNQ1OT1,  $p < 0.001$ ; and miR-34a,  $p = 0.032$ ).



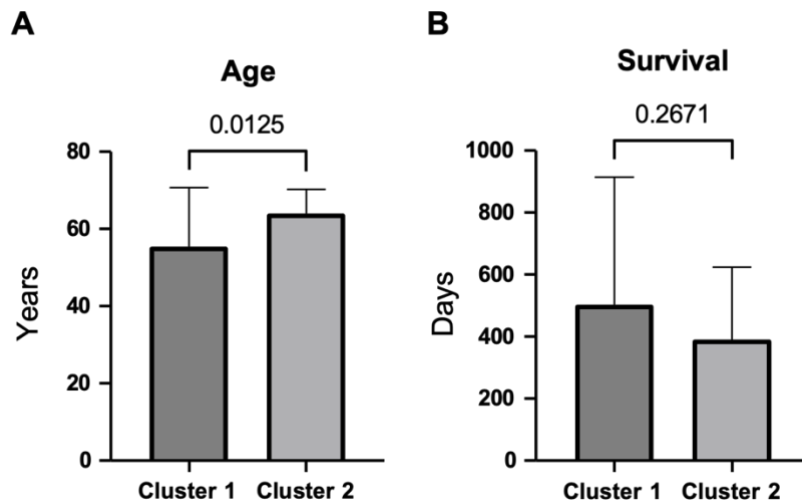
**Figure 2.** Hierarchical cluster analysis of glioblastoma cases according to the expression of the ncRNAs RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 and miR-34a. Cluster 1- Blue rectangle: n= 30 patients; Cluster 2- Red rectangle: n= 13 patients.

The heat map (Figure 3) shows the difference in the expression pattern of the ncRNAs between the clusters identified.

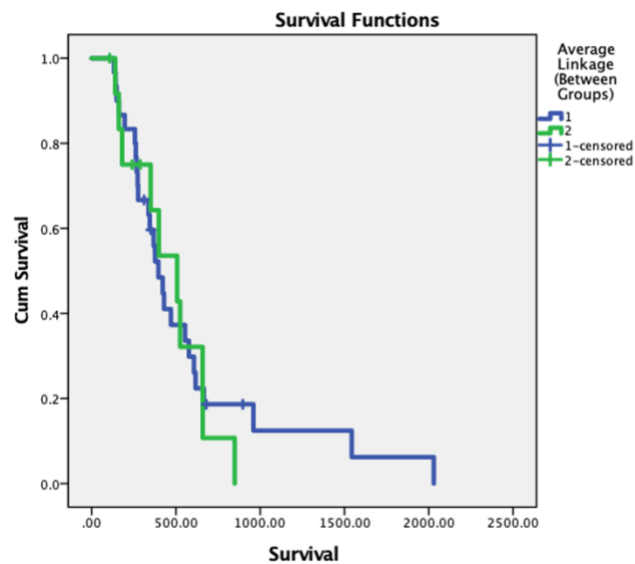


**Figure 3.** Heat map illustrating the difference in expression of the ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a in the clusters. Green: lower ncRNA expression; Red: higher ncRNA expression.

To check for differences between the two clusters, variables such as mean age (in years) at diagnosis and survival time (in days) were compared (Table S3; Supplementary Materials). Figure 4 illustrates this comparison, showing that cluster 1 had a lower mean age than cluster 2 ( $p= 0.013$ ). In addition, survival in cluster 1 was higher than in cluster 2, although this was not statistically significant. Survival curves for patients in clusters 1 and 2 are shown in figure 5.

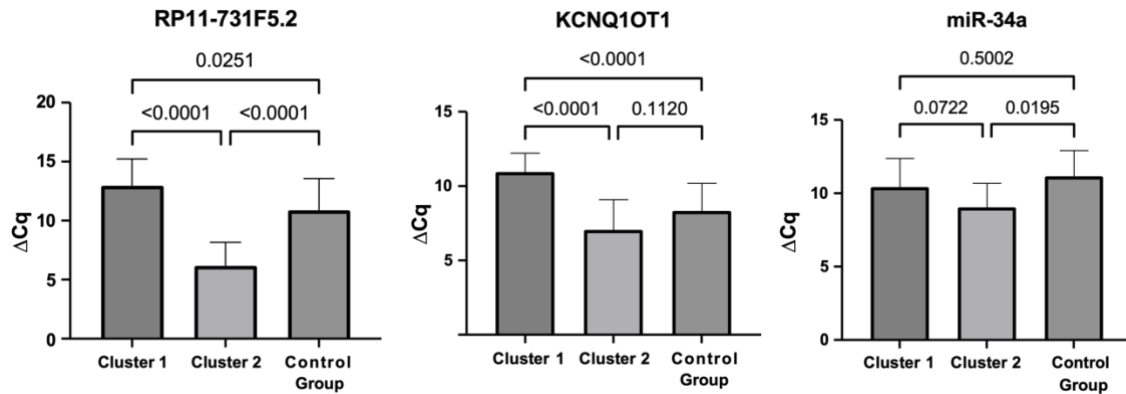


**Figure 4.** Graphs illustrating the comparison between the average age (**A**) between the two clusters and the survival time (**B**) between them.



**Figure 5.** Kaplan-Meier survival curve for clusters 1 and 2. Censored cases represent patients who did not progress to the outcome (death).

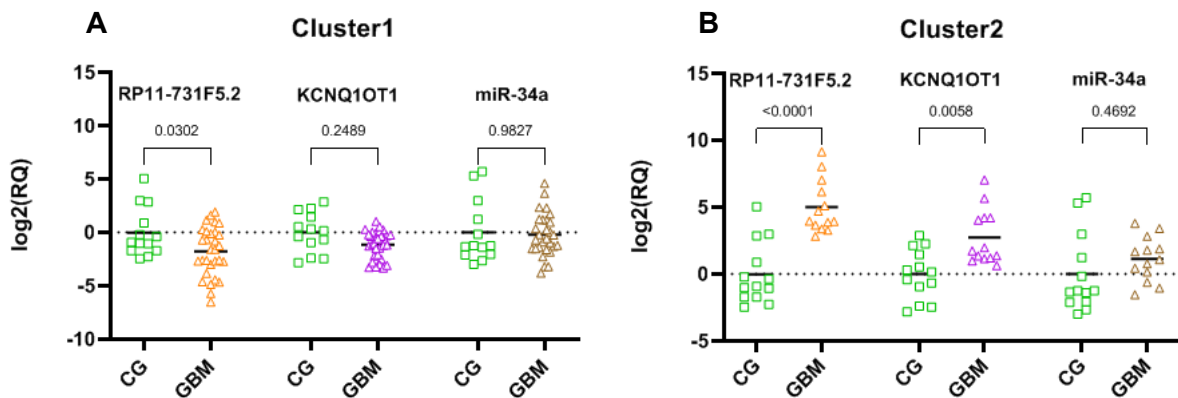
Considering the hypothesis that the sample consisted of two distinct tumor entities, we proceeded with analysis of the ncRNAs in clusters 1 and 2, comparing them with the control group (Figure 6; Table S4, Supplementary Materials).



**Figure 6.** Comparison analysis of the  $\Delta Cq$  means of the ncRNAs between the clusters and the control group. One-way ANOVA test. Post-hoc analysis with Tukey's test.

Post-hoc analyses showed that there was a significant difference between the three groups for lncRNA RP11-731F5.2 (cluster 1 and 2 and control group ( $p < 0.001$ )). The same was observed for KCNQ10T1, with differences between clusters 1 and 2 ( $p < 0.001$ ) and cluster 1 and the control group ( $p < 0.001$ ). Additionally, a difference in miR-34a was only observed when cluster 2 was compared to the control group ( $p = 0.02$ ) (figure 6).

The relevance of the grouping of the series in terms of ncRNA expression was verified by a new relative expression analysis ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) applied to each cluster (Figure 7).



**Figure 7. (A)** Scatter plots show the  $\log_2(RQ)$  ncRNAs values when cluster 1 cases are compared to the Control Group (CG). **(B)** Scatter plots show the  $\log_2(RQ)$  ncRNAs values when cluster 2 cases are compared to the control group. T-test:  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Figure 7A shows the expressions of the ncRNAs in cluster 1, where RP11-731F5.2 was less expressed in GBM when compared to CG ( $p= 0.0302$ ). The ncRNAs KCNQ1OT1 and miR-34a showed no significant difference in their expression between the groups evaluated in this same cluster ( $p= 0.2489$  and  $p= 0.9827$ , respectively). In cluster 2 (Figure 7B), the expressions of RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 stood out ( $p< 0.0001$  and  $p= 0.0058$ , respectively). As in cluster 1, miR-34a showed no significant variation between the groups ( $p= 0.4692$ )

The one-way ANOVA test was carried out to compare the mean age values between the clusters and the control group (Table 2). Post-hoc analysis was carried out using the Tukey test, where no statistically significant differences were observed between the groups analyzed ( $p= 0.167$ ).

**Table 2.** One-way ANOVA analysis of age and study groups

	<b>Cluster 1 (n = 30)</b>	<b>Cluster 2 (n = 13)</b>	<b>Control Group (n=13)</b>
<b>Age (<math>\bar{x} \pm sd</math>)</b>	55,3 $\pm$ 15,34	63,92 $\pm$ 6,29	60,18 $\pm$ 16,1

Caption:  $\bar{x}$  – Average; \*sd – Standard Deviation.

Pearson's correlation test was performed to assess the potential correlation between the expression of ncRNAs, as well as age and survival (Table 3).

**Table 3.** Pearson's correlation matrix between ncRNAs and the variables age and survival.

	<b>RP11-731F5</b>	<b>KCNQ1OT1</b>	<b>miR-34a</b>	<b>Idade</b>	<b>Sobrevida</b>
<b>RP11-731F5</b>	-	<b>0.818*</b>	<b>0.316*</b>	-0.120	0.069
<b>KCNQ1OT1</b>	<b>0.818**</b>	-	<b>0.333*</b>	-0.234	0.043
<b>miR-34a</b>	<b>0.316*</b>	<b>0.333*</b>	-	-0.139	-0.042
<b>Idade</b>	-0.120	-0.234	-0.139	-	<b>-0.514**</b>
<b>Sobrevida</b>	0.069	0.043	-0.042	<b>-0.514**</b>	-

Valores de Coeficiente r de Pearson. \*\*. Correlação é significativa no nível 0.01; \*. Correlação é significativa no nível 0.05. Força da correlação: insignificante ( $r \leq 0,3$ ), baixa ( $0,3 < r \leq 0,5$ ), moderada ( $0,5 < r \leq 0,7$ ), alta ( $0,7 < r \leq 0,9$ ) e muito alta ( $0,9 - 1,0$ ).<sup>34</sup>

High correlation between the expression of RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 ( $r= 0.818$ ,  $p< 0.01$ ) was observed in the series. Low correlation between miR-34a and the lncRNAs RP11-731F5.2 ( $r= 0.316$ ,  $p = 0.039$ ) and KCNQ1OT1 ( $r= 0.333$ ,

$p=0.029$ ) was also observed. Age and survival ( $r=-0.514$ ,  $p<0.001$ ) showed no correlation with ncRNAs.

#### 4 Discussion

Glioblastoma (GBM) remains a challenge in oncology due to its aggressive nature, high recurrence rates, and limited therapeutic options.<sup>4,8</sup> The search for reliable biomarkers to improve diagnosis, prognosis, and treatment strategies is therefore paramount.<sup>15,16</sup> Non-coding RNAs (ncRNAs), including long non-coding RNAs (lncRNAs) and microRNAs (miRNAs), have emerged as critical regulators of gene expression and cellular processes, playing significant roles in tumorigenesis, including in gliomas.<sup>17-19</sup> The combination of a complexity of molecular alterations results in a varied response to therapy and has an impact on patient prognosis.<sup>35</sup>

This study aimed to investigate the expression profiles of ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a in IDH-wildtype GBM samples compared to non-tumor glial tissue, seeking to elucidate their potential roles as molecular biomarkers.

Globally, our analysis did not reveal significant differences in the overall expression of RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 or miR-34a between the GBM cohort and the control group (Figure 1). This finding underscores the well-known heterogeneity of GBM.<sup>4,35</sup> The inter- and intratumoural heterogeneity represents a significant challenge for precision therapies and patient stratification, making it essential to carry out studies that seek to clarify these differences. Furthermore, heterogeneity can mask potentially significant molecular signatures when analyzing the tumor group as a whole. Consequently, we employed hierarchical cluster analysis based on the expression patterns of the three ncRNAs, which successfully segregated the GBM patients into two distinct clusters (cluster 1,  $n=30$ ; cluster 2,  $n=13$ ) (Figure 2).

These clusters exhibited significant clinicopathological and molecular differences. Patients in cluster 1 were significantly younger at diagnosis compared to those in cluster 2 ( $p=0.013$ ) and showed a trend towards longer survival, although this did not reach statistical significance (501 vs 389 days,  $p=0.267$ ) (Table S3 – Supplementary Materials, Figure 4, Figure 5).

It is known that survival in GBM is associated with various intrinsic patient factors, such as characteristics in the preoperative period (age, presence of comorbidities, among others) and also the immediate (<24h) and late (>24h) postoperative period, considering the complexity of this type of surgical approach.<sup>36</sup> However, the role of the age group of these patients on the expression of ncRNAs could be suggestive. Molecularly, cluster 1 was characterized by significantly lower mean  $\Delta Cq$  values (indicating higher relative abundance before normalization) for all three ncRNAs compared to cluster 2 (Table S2 – Supplementary Materials). When comparing each cluster to the control group after normalization (Figure 7), cluster 1 showed significantly lower expression of RP11-731F5.2 ( $p=0.0302$ ), while cluster 2 exhibited significantly higher expression of both RP11-731F5.2 ( $p<0.0001$ ) and KCNQ1OT1 ( $p=0.0058$ ) compared to controls. This differential expression pattern between the clusters suggests distinct underlying biological mechanisms or subtypes within GBM, potentially linked to age and prognosis.

RP11-731F5.2 (also known as COPDA1) is less characterized in GBM compared to KCNQ1OT1. While studies have implicated it in other cancers like hepatocellular carcinoma,<sup>25,26</sup> gastric cancer<sup>24</sup> and melanoma,<sup>27</sup> its role in glioma remains unexplored. Our study provides novel insight by demonstrating its differential expression between GBM clusters and its strong positive correlation with KCNQ1OT1 expression ( $r=0.818$ ,  $p<0.01$ ) across the entire cohort (Table 3, Figure 8A). This high correlation suggests potential co-regulation or involvement in shared biological pathways. The significantly lower expression in cluster 1 and higher expression in cluster 2 relative to controls reflects the KCNQ1OT1 pattern, further strengthening the possibility of a functional link between these two lncRNAs in GBM pathogenesis, ensuring further investigation.

The lncRNA KCNQ1OT1 is increasingly recognized as an oncogenic player in various cancers, including glioma.<sup>20</sup> Studies have shown its upregulation in glioma tissues and its role in promoting proliferation, invasion, and resistance to therapies like temozolomide.<sup>20,21,37</sup> Our finding of significantly higher KCNQ1OT1 expression in cluster 2, which comprised older patients with a worse survival trend, aligns with the established oncogenic role of KCNQ1OT1. In contrast, the lack of significant KCNQ1OT1 upregulation in cluster 1 (younger patients)

compared to controls suggests that KCNQ1OT1-driven mechanisms might be less prominent in this subgroup or perhaps counteracted by other factors.

In addition to interfering with primordial cellular processes, KCNQ1OT1 can bind to miR-34a with high affinity, through the sponge mechanism, influencing the expression of genes targeted by the activity of this microRNA.<sup>31</sup> This interaction results in altered expression profiles of miR-34a target molecules and may contribute to cancer progression.<sup>32</sup> The role of miR-34a in GBM is complex. Decreased levels of miR-34a have been associated with several types of cancer<sup>32,38</sup> such as neuroblastoma, leukemia, pancreatic and hepatocellular carcinomas, glioblastoma, breast, lung and colon. However, other studies have shown an increase in its expression in renal cell carcinoma, papillary thyroid carcinoma and uterine cancers.<sup>39-41</sup> In the case of glioblastoma, Yin et al. (2013) showed a reduction of more than 50% in the expression of miR-34a in 77% of the tumor samples studied.<sup>38</sup>

Our study did not find significant overall downregulation of miR-34a compared to controls, nor within cluster 1. A slight, though significant, difference was noted between cluster 2 and the control group in the post-hoc analysis of  $\Delta Cq$  values ( $p=0.02$ , Table S4 – Supplementary Materials), but not in the relative expression analysis (Figure 7B,  $p=0.4692$ ). Furthermore, we observed a weak positive correlation between miR-34a and both lncRNAs (Table 3), which contrasts with some literature suggesting KCNQ1OT1 can act as a sponge for miR-34a, implying an inverse relationship.<sup>31,32</sup> These discrepancies may be due to the specific characteristics of the cohort (e.g., exclusively IDH-wildtype), the relatively small sample size, methodological differences, or the complex interplay of multiple regulatory factors influencing miR-34a expression and function in distinct GBM subtypes represented by the clusters.

The limitations of the present study include its small sample size (particularly for the control group and cluster 2) and the fact that it was a single-center study. Furthermore, the study lacks functional validation; the observed correlations and differential expressions require mechanistic investigation in cellular and animal models.

Despite these limitations, our findings highlight the importance of considering tumor heterogeneity when studying molecular biomarkers in GBM. The identification of two distinct clusters based on the expression profiles of

RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a, associated with differences in patient age and potentially survival, suggests these ncRNAs could serve as markers for specific GBM subtypes. The strong correlation between RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 is a novel finding in GBM that merits further exploration.

Future research should aim to validate these findings in larger, independent cohorts, incorporating comprehensive molecular subtyping. Functional studies are crucial to elucidate the specific roles of RP11-731F5.2 and its interplay with KCNQ1OT1 and miR-34a in GBM cell proliferation, invasion, and therapeutic resistance. Understanding the mechanisms driving the distinct ncRNA profiles in the identified clusters could have the way for more personalized prognostic assessments and targeted therapeutic strategies for GBM patients.

## 5 Conclusion

In conclusion, this study investigated the expression of ncRNAs RP11-731F5.2, KCNQ1OT1 and miR-34a in glioblastoma. Cluster analysis revealed two distinct patient subgroups characterized by different ncRNA profiles, age distributions, and survival trends. Notably, RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1 expression levels were significantly different between these clusters and controls, and their expression showed a strong positive correlation. These findings underscore the heterogeneity of GBM and suggest that this panel of ncRNAs, particularly the combination of RP11-731F5.2 and KCNQ1OT1, holds potential as biomarkers for stratifying GBM patients. Further research is warranted to validate these results and explore the functional significance of these ncRNAs in glioblastoma pathogenesis and their potential therapeutic implications.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** This work was supported by Coordination of Superior Level Staff Improvement - Brazil (CAPES), grant 88887.670079/2022-00.

**Authors contribution:** Conceptualization: AFG, PTHF, ACF; Acquisition of data: AFG, EOL, MAZ, DBS, SHBR; Data curation: AFG, ACF, PTHF; Project administration: PTHF, ACF; Manuscript draft: AFG and ACF; Review and editing: AFG, EOL, MAZ, DBS, SHBR, ACF, PTHF; Approval of final version: all.

**Data availability:** The datasets generated during the current study are available from the corresponding author upon request.

## 6 References

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013.
2. Yang, K., Wu, Z., Zhang, H. *et al.* Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. *Mol Cancer* 21, 39 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01513-z>.
3. Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018 Aug;51:50-58. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.010. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29170066.
4. Weller, M., Wick, W., Aldape, K. *et al.* Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15017 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>.
5. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, Reifenberger G, Weller M. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 2019 Nov;80:101896. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101896. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31541850.
6. Huang B, Li X, Li Y, Zhang J, Zong Z, Zhang H. Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. *Front Immunol.* 2021 Mar 9;11:603911. doi: 10.3389/fimmu.2020.603911. PMID: 33767690; PMCID: PMC7986847.
7. Davis M E. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Seminars in Oncology.*2018. Nursing, Volume 34, Issue 5, ISSN 0749-2081, <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>.
8. Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Jul;14(7):434-452. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28031556.
9. Hao B, Jiang F, Bai H, Meng P, Wang L, Wang F. Predicting the prognosis of glioma by pyroptosis-related signature. *J Cell Mol Med.* 2022; 26: 133–143. doi:10.1111/jcmm.17061.
10. Quinn T Ostrom, Haley Gittleman, Peter Liao, Toni Vecchione-Koval, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, Jill S Barnholtz-Sloan, CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014, *Neuro-Oncology*, Volume 19, Issue suppl\_5, October 2017, Pages v1–v88, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>.
11. Xi J, Sun Q, Ma L, Kang J. Long non-coding RNAs in glioma progression. *Cancer*

Lett. 2018 Apr 10;419:203-209. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.041. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29355660.

12. Ou A, Yung WKA, Majd N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 31;22(1):351. doi: 10.3390/ijms22010351. PMID: 33396284; PMCID: PMC7794986.

13. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

14. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro Oncol.* 2022 Oct 5;24(Suppl 5):v1-v95. doi: 10.1093/neuonc/noac202. PMID: 36196752; PMCID: PMC9533228.

15. Bonasio R, Shiekhhattar R. Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu Rev Genet.* 2014;48:433-55. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092323. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25251851; PMCID: PMC4285387.

16. Qin J, Jiang C, Cai J, Meng X. Roles of Long Noncoding RNAs in Conferring Glioma Progression and Treatment. *Front Oncol.* 2021 Jun 11;11:688027. doi: 10.3389/fonc.2021.688027. PMID: 34178684; PMCID: PMC8226164.

17. Ciro Parlato, Manlio Barbarisi, Marco Moraci, Aldo Moraci. Surgery, radiotherapy and temozolomide in treating high-grade gliomas. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2006, 11(2), 1280–1283. <https://doi.org/10.2741/1881>.

18. Sasmita AO, Wong YP, Ling APK. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018 Feb;14(1):40-51. doi: 10.1111/ajco.12756. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28840962.

19. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem.* 2021 Oct 27;65(4):625-639. doi: 10.1042/EBC20200032. PMID: 33860799; PMCID: PMC8564738.

20. Cagle P, Qi Q, Niture S, Kumar D. KCNQ1OT1: An Oncogenic Long Noncoding RNA. *Biomolecules.* 2021 Oct 29;11(11):1602. doi: 10.3390/biom11111602. PMID: 34827600; PMCID: PMC8615887.

21. Gong W, Zheng J, Liu X, Liu Y, Guo J, Gao Y, Tao W, Chen J, Li Z, Ma J, Xue Y. Knockdown of Long Non-Coding RNA KCNQ1OT1 Restrained Glioma Cells' Malignancy by Activating miR-370/CCNE2 Axis. *Front Cell Neurosci.* 2017 Mar 22;11:84. doi:

- 10.3389/fncel.2017.00084. Retraction in: *Front Cell Neurosci.* 2023 Mar 24;17:1181681. doi: 10.3389/fncel.2023.1181681. PMID: 28381990; PMCID: PMC5360732.
22. Li MM, Liu XH, Zhao YC, Ma XY, Zhou YC, Zhao YX, Liu XY. Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes apoptosis in neuroblastoma cells by regulating miR-296-5p/Bax axis. *FEBS J.* 2020 Feb;287(3):561-577. doi: 10.1111/febs.15047. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31433907.
23. National Center for Biotechnology Information. COPDA1 chronic obstructive pulmonary disease associated lncRNA 1. Updated on 11-Jan-2025, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=copda1>. Access in: 06-Feb-2024
24. Esposti DD, Hernandez-Vargas H, Voegelé C, Fernandez-Jimenez N, Forey N, Bancel B, Le Calvez-Kelm F, McKay J, Merle P, Herceg Z. Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing. *Oncotarget.* 2016 May 31;7(22):31862-77. doi: 10.18632/oncotarget.7364. PMID: 26887054; PMCID: PMC5077982.
25. Ferrasi, A.C., Fernandez, G.J., Grotto, R.M.T. *et al.* New lncRNAs in Chronic Hepatitis C progression: from fibrosis to hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 10, 9886 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66881-2>.
26. dos Santos, D.B.; Fernandez, G.J.; Silva, L.T.; Silva, G.F.; Lima, E.O.; Galvani, A.F.; Pereira, G.L.; Ferrasi, A.C. lncRNAs as Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Risk and Liver Damage in Advanced Chronic Hepatitis C. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2025, 47, 348. <https://doi.org/10.3390/cimb47050348>.
27. Xu J, Jin M, Mu Z, Li Z, Qi R, Han X, Jiang H. Inhibiting melanoma tumor growth: the role of oxidative stress-associated *LINC02132* and *COPDA1* long non-coding RNAs. *Front Immunol.* 2025 Feb 28;16:1558292. doi: 10.3389/fimmu.2025.1558292. PMID: 40092985; PMCID: PMC11906686.
28. Zheng M, Hong W, Gao M, Yi E, Zhang J, Hao B, Liang C, Li X, Li C, Ye X, Liao B, He F, Zhou Y, Li B, Ran P. Long Noncoding RNA COPDA1 Promotes Airway Smooth Muscle Cell Proliferation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019 Nov;61(5):584-596. doi: 10.1165/rcmb.2018-0269OC. PMID: 31050548.
29. Feng W, Wang C, Liang C, Yang H, Chen D, Yu X, Zhao W, Geng D, Li S, Chen Z, Sun M. The Dysregulated Expression of KCNQ1OT1 and Its Interaction with Downstream Factors miR-145/CCNE2 in Breast Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(2):432-446. doi: 10.1159/000492978. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30157476.
30. Xia F, Wang Y, Xue M, Zhu L, Jia D, Shi Y, Gao Y, Li L, Li Y, Chen S, Xu G, Yuan D, Yuan C. lncRNA KCNQ1OT1: Molecular mechanisms and pathogenic roles in human diseases. *Genes Dis.* 2021 Aug 16;9(6):1556-1565. doi: 10.1016/j.gendis.2021.07.003.

PMID: 36157505; PMCID: PMC9485204.

31. Li Y, Li C, Li D, Yang L, Jin J, Zhang B. lncRNA KCNQ1OT1 enhances the chemoresistance of oxaliplatin in colon cancer by targeting the miR-34a/ATG4B pathway. *Onco Targets Ther.* 2019 Apr 9;12:2649-2660. doi: 10.2147/OTT.S188054. PMID: 31040703; PMCID: PMC6462170.

32. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8. doi: 10.1038/nature03702. PMID: 15944708.

33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

34. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012 Sep;24(3):69-71. PMID: 23638278; PMCID: PMC3576830.

35. Lan Z, Li X, Zhang X. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 6;25(5):3040. doi: 10.3390/ijms25053040. PMID: 38474286; PMCID: PMC10931698.

36. Siqueira EMP, Diccini S. Complicações pós-operatórias em neurocirurgia eletiva e não eletiva. *Acta paul enferm [Internet].* 2017Jan;30(1):101–8. Available from: <https://doi.org/10.1590/1982-0194201700015>.

37. Wang W, Han S, Gao W, Feng Y, Li K, Wu D. Long Noncoding RNA KCNQ1OT1 Confers Gliomas Resistance to Temozolomide and Enhances Cell Growth by Retrieving PIM1 From miR-761. *Cell Mol Neurobiol.* 2022 Apr;42(3):695-708. doi: 10.1007/s10571-020-00958-4. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32897512; PMCID: PMC11441228.

38. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, Doan NB, Said JW, Black KL, Phillip Koeffler H. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2013 Feb 28;32(9):1155-63. doi: 10.1038/onc.2012.132. Epub 2012 May 14. PMID: 22580610; PMCID: PMC4085050.

39. Ma ZL, Hou PP, Li YL, Wang DT, Yuan TW, Wei JL, Zhao BT, Lou JT, Zhao XT, Jin Y, Jin YX. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of non-small cell lung cancer H1299 cell line by targeting TGFβR2. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2481-90. doi: 10.1007/s13277-014-2861-5. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25501507.

40. Liu, H., Brannon, A.R., Reddy, A.R. *et al.* Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma. *BMC Syst Biol* 4, 51 (2010). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-51>.
41. Marsh EE, Lin Z, Yin P, Milad M, Chakravarti D, Bulun SE. Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium. *Fertil Steril*. 2008 Jun;89(6):1771-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.074. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17765232; PMCID: PMC2773156.
42. Jing R, Liu S, Jiang Y, Zong W, Ju S, Cui M. Determination of serum RP11-731F5.2 as a noninvasive biomarker for gastric cancer diagnosis and prognosis. *Pathol Res Pract*. 2020 Dec;216(12):153261. doi: 10.1016/j.prp.2020.153261. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33176259.
43. Wang Y, Zhang L, Yang J, Sun R. LncRNA KCNQ1OT1 promotes cell proliferation, migration and invasion via regulating miR-129-5p/JAG1 axis in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int*. 2020 May 1;20:144. doi: 10.1186/s12935-020-01225-8. PMID: 32377169; PMCID: PMC7195752.
44. Algaber, A., Al-Haidari, A., Madhi, R. *et al.* MicroRNA-340-5p inhibits colon cancer cell migration via targeting of RhoA. *Sci Rep* 10, 16934 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73792-9>.
45. Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., ... Hermeking, H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7(16), 2591-2600. <https://doi.org/10.4161/cc.7.16.6533>.
46. Burenina OY, Lazarevich NL, Kustova IF, Shavochkina DA, Moroz EA, Kudashkin NE, Patyutko YI, Metelin AV, Kim EF, Skvortsov DA, Zatsepin TS, Rubtsova MP, Dontsova OA. Panel of potential lncRNA biomarkers can distinguish various types of liver malignant and benign tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021 Jan;147(1):49-59. doi: 10.1007/s00432-020-03378-5. Epub 2020 Sep 12. PMID: 32918630.