

**TRANSLATÔMICA APLICADA AO
DESCOBRIMENTO DE ALTERAÇÕES
MOLECULARES EM GLIOMAS**

FERNANDA CRISTINA SULLA LUPINACCI

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lupinacci, Fernanda Cristina Sulla

Translatômica aplicada ao descobrimento de alterações moleculares em gliomas / Fernanda Cristina Sulla Lupinacci - São Paulo, 2018.

129p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Descritores: 1. Glioma/genética/Glioma/genetics. 2. Expressão Gênica/Gene Expression. 3. RNA Mensageiro/RNA, Messenger. 4. InativaçãoGênica/Gene Silencing. 5. Modificação Traducional de Proteínas/Protein Modification, Translational.

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que fizeram parte
da minha história, principalmente ao paciente
oncológico.

Espero que de alguma forma este trabalho possa
contribuir para o conhecimento, visando sempre
sua qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a minha caminhada até aqui.

A minha orientadora Dra. Glaucia Hajj, que me guiou desde o início, se portou como só o fazem os mestres, acreditando no meu trabalho, dando-me a liberdade necessária, dividindo comigo as expectativas, seus conhecimentos e sua ética. Obrigada pela sua generosidade e por todos os anos em que estivemos juntas pesquisando, refletindo e compartilhando.

À Dra. Vilma Martins, por abrir o espaço de seu laboratório, por me auxiliar em inúmeros momentos.

Ao Dr. Martin Roffé, que me ensinou muito do que sei hoje, compartilhando seus aprendizados e protocolos, me formando e me auxiliando a ter a maturidade necessária para enfrentar os desafios.

A todo o grupo de Biologia Tumoral e Biomarcadores. Aos pesquisadores Dra. Michelle e Dr. Tiago, por tudo que aprendi com vocês e por me acolherem quando aqui cheguei. Aos funcionários do CIPE, por proporcionarem o melhor ambiente de trabalho, e por todas as ajudas. Aos técnicos Felipe, Ederson e Danilo, por facilitarem muito a nossa vida. À Suely, pela ajuda com a formatação.

À Emne, Alexcia e Bianca, por todas as risadas que tornaram o caminho mais alegre. Fer Fortes e Grazi, por toda a amizade desde o início.

Aos ex-alunos por terem me recebido e me feito sentir acolhida, em especial à Giovanna, Bruna, Ana, Gabi e Luana, pela amizade e companheirismo. À Jessica, por todo o amor.

Aos alunos do CIPE, em especial à Denise, Adriano, Dimas, Arielly, Paula e Carol pela companhia diária. Ao 'Grupo da Gláucia', Bárbara, Fernanda, Mateus e Julia. Bá e Fe, por todas as risadas e toda a ajuda! Má, por ser amigo e amar o que faz, pela inspiração. Ju, pela companhia no Canadá e por todo o tempo que passamos no laboratório.

Ao Hermano, por tudo que me ensinou e todos os momentos que vivemos, por ser o meu oposto e me mostrar um outro lado. Dani, por todos os dias me aguentando e me ouvindo, por todas as discussões de experimentos.

Ao Liam (*in memoriam*) e à Carol (*in memoriam*), guerreiros que fizeram surgir em mim a vontade de estudar oncologia. À Vitoria (*in memoriam*), a menina mais dedicada que já conheci, será sempre a nossa cientista.

À Luna e a Mel, que desde a faculdade me apoiam, fizeram tantas aulas e trabalhos serem menos sofridos, e mesmo longe ainda fazem parte de mim. Luna, por todos os almoços e conversas, por ter os mesmos medos e aflições, assim sabemos que não estamos sozinhas. Mel, por toda sua doçura e amizade.

Às minhas avós (*in memoriam*), que estiveram comigo em tantos momentos, me ensinaram tanto, e hoje não estão mais aqui, mas deixaram um pedacinho delas. Por me ensinarem respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. À vó Adelaide pelas coxinhas tão maravilhosas e à sua força que nunca vi igual, que me inspira até hoje e à vó Edméia, por tantos doces gostosos e pelo amor à praia que levarei comigo sempre.

Aos meus pais, Dulce e Fernando e meu irmão Felipe, por todo o apoio durante a vida toda, por me mostrarem que nunca estarei sozinha. Graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Essa vitória não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação de vocês. Por serem meu exemplo de luta.

Ao Rapha, o melhor abraço que já recebi, por ser o melhor parceiro que poderia existir, por estar sempre ao meu lado e por ter me ensinado tanto. Por me fazer levar a vida mais leve. Por me ensinar a não me acostumar, não me esquivar, sempre enfrentar.

À família Svartman, Luiz, Saranda, Jedda e Victoria, por me fazer sentir acolhida e saber que tenho uma segunda casa.

Agradeço ao A.C.Camargo Cancer Center pela infraestrutura e por incentivar a pesquisa nacional.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante este projeto (bolsa Doutorado Direto no país Processo nº 2013/03315-2)

RESUMO

Lupinacci FCS. **Translatômica aplicada ao descobrimento de alterações moleculares em gliomas**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O glioblastoma (GBM) está entre os tipos tumorais mais agressivos e de menor resposta a terapias, o que requer, portanto, uma melhor compreensão sobre o comportamento deste tipo tumoral, auxiliando no desenvolvimento de novos tipos de tratamento para a doença. Atualmente, dados de expressão gênica em tumores baseiam-se na população de mRNA total. No entanto, essa abordagem fornece pouca informação sobre os mediadores moleculares das alterações tumorais, pois o nível de expressão de mRNAs não necessariamente reflete os níveis de proteínas expressos. Por outro lado, a população de mRNAs ativamente traduzidos reflete, de maneira mais fidedigna, a expressão proteica, sendo, dessa forma, mais próxima à real medida da expressão gênica. Dito isso, tem-se como objetivo estabelecer a técnica de identificação de RNAs diferencialmente traduzidos (translatômica) e utilizá-la em glioblastomas humanos, contribuindo, assim, para um avanço no conhecimento sobre essa doença. Indica-se com sucesso, como resultado desse estudo, a técnica de translatômica, com o desenvolvimento de um novo gradiente de sacarose que permitiu maior rendimento às preparações e à padronização da identificação de RNAs diferencialmente traduzidos, utilizando tanto microarrays quanto sequenciamento de nova geração. A translatômica foi primeiramente utilizada para comparar a heterogeneidade intratumoral. Comparando áreas histologicamente de maior e menor graus provenientes de um mesmo tumor, observa-se a tradução diferencial de vias de TGF- β e de ciclo celular. Em um segundo momento, a translatômica foi realizada em um número maior de amostras, sendo capaz de classificar três subgrupos moleculares, com um impacto notável na sobrevida: o grupo 1 foi caracterizado pelo aumento das vias associadas à mTORC2, às mitocôndrias à ciliogênese, com sobrevida média de 5 meses; o grupo 2 foi caracterizado por tradução dependente de mTORC1, baixa presença de mitocôndrias

e aumento da angiogênese, com uma sobrevida média de 6,3 meses; e o grupo 3 teve uma sobrevida mediana de 21,1 meses e é caracterizado pela alta presença de mitocôndrias, baixa cíliogênese e baixas vias mTORC1 e 2 associadas. Esses grupos não podem ser definidos pela expressão gênica baseada no RNA total, pois não correspondem a classificações moleculares anteriores. Logo, este estudo foi capaz de desenvolver, com sucesso, a técnica de translômica e aplicá-la ao descobrimento de vias moleculares biologicamente relevantes no processo de tumorigênese em glioblastomas.

SUMMARY

Lupinacci FCS. **[Translatomic applied to the discovery of molecular alterations in gliomas]**. São Paulo, 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Glioblastoma (GBM) is among the most aggressive tumor types and the least response to therapy, so better understanding the behavior of this tumor type could help to develop new types of treatment for this disease. Currently, gene expression data on tumors are based on the total mRNA population. However, this approach provides little information on the molecular mediators of tumor changes, since the level of mRNA expression does not necessarily reflect expressed protein levels. Therefore, the population of actively translated mRNAs reflects more accurately the protein expression, being closer to the real measurement of the gene expression. Establish the technique of the identification of differentially translated RNAs (translatomics) and apply it in human glioblastomas, contributing to an advance in the knowledge about this disease. We successfully established the translatomic technique, with the development of a new sucrose gradient that allowed higher yields to the preparations and standardization of the identification of differentially translated RNAs using both microarrays and next generation sequencing. Translatomics was first used to compare intratumoral heterogeneity. Comparing histologically areas of higher and lower degrees from the same tumor, we observed the differential translation of the TGF- β and cell cycle pathways. Afterwards, translatomics were performed in a larger number of samples, being able to classify GBMs into three molecular subgroups, with a remarkable impact on survival. Group 1 was characterized by increased pathways associated with mTORC2, mitochondria and cilia, with an average survival of 5 months. Group 2 was characterized by mTORC1-dependent translation, low mitochondria and increased angiogenesis, with a mean survival of 6.3 months. Group 3 had a median survival of 21.1 months and is characterized by the high presence of mitochondria, low cilia and low associated mTORC1 and 2 pathways. These groups can not be defined using gene expression based on total RNA and thus do not correspond to prior molecular classifications. This study was able to successfully develop the translatomic technique and to apply it to the discovery of biologically relevant molecular pathways in the process of tumorigenesis in glioblastomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Linha do tempo das etapas realizadas no projeto.....	iii
Figura 2	Classificação molecular de glioblastomas, proposta em 2010, subdividindo os glioblastomas em 4 subtipos moleculares, de acordo com as alterações encontradas.....	4
Figura 3	Nova classificação dos gliomas.....	6
Figura 4	Principais alterações moleculares em glioblastomas. Dentre as principais alterações encontradas em glioblastomas	10
Figura 5	Via de sinalização de mTOR.....	11
Figura 6	Esquema de Polissomo.....	13
Figura 7	Esquema de como é realizada a separação polissomal.....	18
Figura 8	Esquema de como a abundância de RNA mensageiro pode alterar a razão da sua tradução.....	20
Figura 9	Esquema ilustrativo do protocolo Smart-Seq2 e suas principais etapas.....	25
Figura 10	Perfil polissomal da célula LN-18.....	32
Figura 11	Resultado de anelamento das beads no sequenciamento.....	33
Figura 12	Teste de purificação de rRNA.....	34
Figura 13	Resultado de anelamento das beads no sequenciamento.....	35

Figura 14	Perfil polissomal dos tecidos congelados e não congelados.....	37
Figura 15	Taxa traducional dos tecidos..	38
Figura 16	Correlação entre as populações de RNA.	39
Figura 17	Perfis polissomais de um glioblastoma..	47
Figura 18	Taxa traducional dos tecidos..	48
Figura 19	Ensaio de western blot para as proteínas da via de mTOR.....	49
Figura 20	Ensaio de western blot para as proteínas da via de ERK 1/2.....	50
Figura 21	Corrida de Bioanalyzer das amostras submetidas ao ensaio de microarray.....	51
Figura 22	Análise de Componentes Principais.	53
Figura 23	Os RNAs polissomais purificados das amostras foram submetidos à análise de microarray.....	54
Figura 24	Os RNAs totais purificados das amostras foram submetidos à análise de microarray.....	55
Figura 25	O RNA purificado das amostras foi submetido à análise de microarray.....	56
Figura 26	Análise de funções alteradas, comparando tecidos de alto grau contra os de baixo grau.....	57
Figura 27	Via de sinalização encontrada alterada no glioblastoma analisado.	58
Figura 28	Perfil polissomal realizado em gradiente 15%-50%.....	61

Figura 29	Avaliação da variação na qPCR dos genes endógenos.....	62
Figura 30	Células tratadas com Soro Fetal Bovino (FCS) e Torina, um inibidor de mTOR.	63
Figura 31	Perfil polissomal da célula U87-MG.....	64
Figura 32	Expressão dos genes avaliada por qPCR.....	65
Figura 33	Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado.....	66
Figura 34	Lâminas coradas com HE para a análise do grau histológico e perfis polissomais dos glioblastomas.....	70
Figura 35	Lâminas coradas com HE para a análise do grau histológico e perfis polissomais dos glioblastomas.....	71
Figura 36	Taxa traducional dos tecidos.	72
Figura 37	Gráfico de pontos da expressão relativa dos genes diferencialmente transcritos e traduzidos.....	73
Figura 38	Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado.....	74
Figura 39	Gráfico de pontos da expressão relativa dos genes diferencialmente transcritos e traduzidos.	75
Figura 40	Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado.....	76
Figura 41	Interações e Processos biológicos enriquecidos no GBM 32.	77
Figura 42	Processos biológicos enriquecidos no GBM 33.	78

Figura 43	Processos biológicos enriquecidos no GBM 34.	79
Figura 44	Ensaio de western blot.	80
Figura 45	Identificação da tradução diferencial de mRNAs pelo programa Anota.	87
Figura 46	Imagem ilustrativa da distribuição das diferentes soluções de sacarose no novo gradiente descontínuo padronizado.	90
Figura 47	Perfil polissomal da linhagem	91
Figura 48	Relação entre os picos polissomal e 80s dos tecidos analisados e sua histologia.	92
Figura 49	Correlação entre a sobrevivência dos pacientes e a taxa traducional.	93
Figura 50	Correlação entre a idade ao diagnóstico dos pacientes e a taxa traducional.	94
Figura 51	Resultado do bioanalyzer realizado para os RNAs extraídos.	95
Figura 52	Perfis representativos de preparações de bibliotecas finais.	96
Figura 53	Número de leituras obtidas.	97
Figura 54	Gráfico de PCA das amostras de glioblastomas.	100
Figura 55	Gráfico de PCA das amostras polissomais de glioblastomas.	101
Figura 56	Clusters gerados pela análise não supervisionada dos dados de RNA polissomal.	101
Figura 57	Gráfico de PCA das amostras totais de glioblastomas.	102

Figura 58	Clusters gerados pela análise não supervisionada dos dados de RNA total.....	102
Figura 59	Comparação entre os grupos gerados pela análise de RNA total e polissomal.....	103
Figura 60	Sobrevida relativa aos clusters gerados na análise do RNA polissomal.....	104
Figura 61	Sobrevida relativa aos clusters gerados na análise do RNA total.....	104
Figura 62	Idade ao diagnóstico dos pacientes de cada cluster gerado na análise dos RNAs polissomais.....	105
Figura 63	Processos mais ativos em cada um dos clusters, quando comparados aos outros.....	106
Figura 64	Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) de RNAs mensageiros diferencialmente traduzidos nos clusters.....	107
Figura 65	Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) dos genes de proteínas ribossomais.	108
Figura 66	Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) da expressão de RPTOR, LARP1 e RICTR..	108
Figura 67	Correlação da expressão das proteínas RICTR e RPTOR nos TMAs...	109
Figura 68	Resultados de sobrevida obtidos a partir do TMA.	109
Figura 69	Classificação das amostras nos grupos estabelecidos pelo TCGA.....	110
Figura 70	Perfil de processos biológicos diferencialmente expressos entre os glioblastomas e os gliomas de baixo grau..	113

Figura 71	Gráfico de PCA obtido com o RNA total de gliomas..	114
Figura 72	Clusters gerados pela análise não supervisionada do RNA total.....	114
Figura 73	Gráfico de PCA das amostras polissomais de gliomas.....	115
Figura 74	Clusters gerados pela análise não supervisionada.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado do sequenciamento.....	33
Tabela 2	Resultado do sequenciamento.....	35
Tabela 3	Concentração e quantidade total dos RNAs	51
Tabela 4	Validação da técnica de microarray, através de qPCR	60
Tabela 5	Validação da técnica de microarray, através de qPCR	60
Tabela 6	Quantificação dos RNAs extraídos.....	72
Tabela 7	Quantificação dos RNAs extraídos.....	95
Tabela 8	Identificação dos tecidos disponíveis para a utilização no presente projeto	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
3' UTR	<i>do inglês</i> , 3' <u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion
40S	Subunidade menor do ribossomo eucariótico
48S	Complexo de início de tradução composto pelo 43S PIC + eIF4F-mRNA
4E-BPs	<i>do inglês</i> , eIF <u>4E</u> <u>B</u> inding <u>P</u> roteins
5' UTR	<i>do inglês</i> , 5' <u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion
5' TOP	<i>do inglês</i> , 5' Terminal OligoPyrimidine tract
60S	Subunidade maior do ribossomo eucariótico
80S	Ribossomos eucariótico completo
AKT	<i>do inglês</i> , RAC- <u>α</u> <u>k</u> inase serine/ <u>t</u> hreonine-protein
AUG	Códon de início da tradução
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	<i>do inglês</i> , <u>c</u> omplementary DNA
CDS	<i>do inglês</i> , coding sequence
cm	centímetros
cm³	centímetros cúbicos
DMEM	<i>do inglês</i> , <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DNA	<i>do inglês</i> , <u>D</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	<u>D</u> esoxirribonucleotídeos <u>T</u> rifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>do inglês</i> , Ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR	<i>do inglês</i> , Epidermal growth factor receptor
eIFs	<i>do inglês</i> , <u>e</u> ukaryotic <u>I</u> nitiation <u>F</u> actors
ERK	<i>do inglês</i> , <u>E</u> xtracellular Signal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inase
G-CIMP	<i>do inglês</i> , glioma- <u>C</u> pG <u>i</u> sland <u>m</u> ethylator <u>p</u> henotype
GBM	Glioblastoma
HE	Coloração com <u>H</u> ematoxilina e <u>E</u> osina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
IPA	<i>do inglês</i> , Ingenuity Pathway Analysis
IRES	<i>do inglês</i> , <u>I</u> nternal <u>R</u> ibosome <u>E</u> ntry <u>S</u> ite
KCl	Cloreto de potássio

Ki-67	<i>do inglês</i> , Antigen identified by monoclonal antibody <u>Ki-67</u>
LNA	<i>do inglês</i> , <u>L</u> ocked <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
LOH	<i>do inglês</i> , <u>L</u> oss <u>O</u> f <u>H</u> eterozygosity
M	Molar
M-MLV	<i>do inglês</i> , Moloney murine leukemia
m⁷Cap	Capacete de 7-metil guanosina
MAPK	<i>do inglês</i> , <u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MGMT	enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>do inglês</i> , <u>M</u> ammalian <u>T</u> arget <u>o</u> f <u>R</u> apamycin
mTORC1	<i>do inglês</i> , mTOR <u>C</u> omplex 1
mTORC2	<i>do inglês</i> , mTOR <u>C</u> omplex 2
MYC	<i>do inglês</i> , MYC proto-oncogene
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
nm	nanômetros
oligo-dT	Nucleotídeos desoxi-timina
OMS	<u>O</u> rganização <u>m</u> undial da <u>s</u> aúde
ORF	<i>do inglês</i> , <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
p53	<i>do inglês</i> , <u>P</u> rotein 53
PABP	<i>do inglês</i> , <u>P</u> oly <u>A</u> <u>B</u> inding <u>P</u> roteins
pb	Pares de base
PBS	<i>do inglês</i> , <u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCA	<i>do inglês</i> , Principal Component Analysis
PCR	<i>do inglês</i> , <u>P</u> olymerization <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
pg	Picogramas
PGM	<i>do inglês</i> , Personal Genome Machine
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>do inglês</i> , <u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol-4,5-bisphosphate 3- <u>k</u> inase
Poli-A	Cauda poli A do mRNA
PTEN	<i>do inglês</i> , <u>P</u> hosphatase and <u>T</u> ensin homolog

qPCR	PCR quantitativa
rG	Riboguanosina
RGH	Registro Geral do Hospital (número de identificação de cada paciente no A.C.Camargo Cancer Center)
RIN	<i>do inglês</i> , <u>R</u> NA <u>I</u> ntegrity <u>N</u> umber
RNA	<i>do inglês</i> , <u>R</u> ibon <u>u</u> cleic <u>A</u> cid
rpm	<u>R</u> otações por <u>m</u> inuto
RT-PCR	<i>do inglês</i> , <u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> olimerization <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
S6K1	<i>do inglês</i> , Ribosomal protein <u>S</u> 6 kinase beta-1 (p70)
SDS	<u>S</u> odil sulfato de <u>S</u> ódio
SNC	<u>S</u> istema <u>n</u> ervoso <u>c</u> entral
SNP	<i>do inglês</i> , Single nucleotide polymorphism
TBS	<i>do inglês</i> , Tris-buffered saline
TBS T	TBS com adição de Tween
TCGA	<i>do inglês</i> , <u>T</u> he <u>C</u> ancer <u>G</u> enome <u>A</u> tlas
TMA	<i>do inglês</i> , <u>T</u> issue <u>M</u> icro <u>a</u> rray
TMZ	Temozolamida
Tn5	Transposase hiperativa
TP53	<i>do inglês</i> , <u>T</u> umor <u>P</u> rotein 53
TR	Transcrição reversa
Tris	Trisaminometano ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)
Trizol	Mistura fenólica ácida (pH 4,5) com isotiocianato de guanidina
tRNA	RNA transportador
TSO	<i>do inglês</i> , <u>T</u> emplate <u>S</u> witching <u>O</u> ligo
uORF	<i>do inglês</i> , Upstream Open Reading Frame
V	Volts
VEGF	<i>do inglês</i> , vascular endothelial growth factor
v/v	Relação volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tumores do Sistema Nervoso Central	1
1.2	Gliomas	1
1.3	Glioblastomas	3
1.4	Principais Alterações Moleculares Encontradas em Glioblastomas.....	7
1.4.1	Mutações no gene IDH1	7
1.4.2	Metilação do promotor MGMT	8
1.4.3	Mutação em CDKN2A e a via de pRB.....	8
1.4.4	Perda de heterozigose do cromossomo 10	9
1.4.5	Via de PI3K.AKT.mTOR	9
1.5	Tradução de mRNAs	12
1.6	Controle da Tradução.....	14
1.7	Translatômica.....	17
1.7.1	Adaptação de métodos de sequenciamento de célula única para a translatômica	23
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivos principais	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	CAPÍTULOS	28
3.1	Capítulo I - Padronizações	28
3.1.1	Material e métodos do Capítulo I.....	28
3.1.1.1	Cultura celular.....	29
3.1.1.2	Injeção de linhagens celulares em camundongos tipo nude para formação de tumor fresco e congelado	29
3.1.1.3	Isolamento de polissomos	29
3.1.1.4	Sequenciamento de RNAs pelo Ion PGM.....	30
3.1.2	Resultados e discussão do Capítulo I.....	31

3.1.2.1	Padronização da identificação de RNAs polissomais através de sequenciamento	31
3.1.2.2	Avaliação do efeito do congelamento sobre a população de RNAs polissomais	36
3.1.3	Conclusões parciais do Capítulo I	39
3.2	Capítulo II - Primeira Translatômica	40
3.2.1	Material e métodos do Capítulo II	40
3.2.1.1	Extrato para separação polissomal	41
3.2.1.2	Separação polissomal	41
3.2.1.3	Ensaio Whole Human Genome 4x44K	42
3.2.1.4	Síntese de cDNA e Real-Time PCR	43
3.2.1.5	Western Blot	44
3.2.1.6	Análise dos dados	44
3.2.1.7	Primers utilizados	45
3.2.2	Resultados e discussão do Capítulo II	45
3.2.2.1	Descrição do primeiro caso clínico e obtenção do RNA polissomal	46
3.2.2.2	Análise de translatômica do primeiro caso de glioblastoma utilizando microarray da plataforma Agilent 4x44K	52
3.2.3	Conclusões parciais do Capítulo II	66
3.3	Capítulo III - Segunda Translatômica	66
3.3.1	Material e métodos do capítulo III	67
3.3.1.1	Extrato para separação polissomal	67
3.3.1.2	Separação polissomal	67
3.3.1.3	Extração de RNA	67
3.3.1.4	Western Blot	67
3.3.1.5	Casuística	68
3.3.1.6	Ensaio Human Transcriptome Array 2.0 (HTA)	68
3.3.1.7	Análise dos dados	69
3.3.2	Resultados e Discussão do Capítulo III	69
3.3.2.1	Descrição dos três casos clínicos	69
3.3.2.2	Obtenção do RNA polissomal	70
3.3.2.3	Análise de translatômica	72

3.3.3	Conclusões parciais do capítulo III.....	81
3.4	Capítulo IV - Translatômica dos Tecidos do Biobanco.....	82
3.4.1	Material e métodos do capítulo IV.....	83
3.4.1.1	Extrato dos tecidos.....	83
3.4.1.2	Gradiente 5-34-55%.....	83
3.4.1.3	Extração de RNA.....	84
3.4.1.4	Construção de biblioteca de cDNA Single Cell.....	84
3.4.1.5	Análise dos dados.....	85
3.4.2	Casuística do capítulo IV.....	88
3.4.3	Resultados e discussão do capítulo IV.....	88
3.4.3.1	Padronização de novo gradiente de sacarose para isolamento de RNA polissomal.....	88
3.4.3.2	Realização do perfil polissomal em amostras de gliomas.....	92
3.4.3.3	Construção das bibliotecas e sequenciamento das amostras.....	94
3.4.3.4	Análise de dados e correlação com dados clínicos.....	97
3.4.3.4.1	Glioblastomas e gliomas de baixo grau.....	112
3.4.4	Conclusões parciais do capítulo IV.....	116
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

PREFÁCIO

Devido ao crescente número de estudos mostrando a importância do controle traducional de RNAs em tumores surge a necessidade de isolar os RNAs que efetivamente serão traduzidos. Assim, propõe-se neste trabalho estabelecer e disponibilizar uma técnica para o isolamento e a identificação de RNAs diferencialmente traduzidos (translatômica) provenientes de amostras tumorais humanas. Em seguida, escolheu-se aplicar a técnica em glioblastomas devido a sua alta complexidade e à falta de alternativas terapêuticas, além de o método apresentar frequentes alterações em vias de sinalização relacionadas ao controle traducional.

No primeiro momento em que o projeto foi proposto não era conhecido se seria possível obter RNA polissomal em qualidade e quantidade suficientes para a identificação através de sequenciamento ou microarrays. Deste modo, os desafios foram muitos, desde adaptar a técnica para a realização em menores volumes até utilizar estratégias de sequenciamento de célula única. Com tal situação, uma grande parte deste trabalho compreende as etapas de padronização da técnica, que foram essenciais para que hoje este e outros projetos sobre o tema pudessem ser executados.

Para fins didáticos, a tese está dividida em capítulos, sendo o material e os métodos correspondentes a cada capítulo. No primeiro capítulo, denominado *Validação da técnica*, testou-se a eficácia da extração de RNA, assim como a qualidade do RNA obtido, a fim de estabelecer se seriam compatíveis com as aplicações pretendidas. No segundo capítulo, devido às dificuldades iniciais com os protocolos de sequenciamento, ensaios de microarray com RNAs totais e polissomais foram realizados - com tecido obtido através de colaboração própria com o departamento de neurocirurgia -, pois esta abordagem eliminaria a necessidade de depleção de RNA ribossomal. Como o tecido era maior do que os obtidos no biobanco, foi possível obter áreas histologicamente de baixo e alto graus do mesmo paciente, o que permitiu avaliar aspectos da heterogeneidade tumoral. A heterogeneidade tumoral pode ser estudada em mais 3 amostras provenientes da

colaboração com o departamento de neurocirurgia, estando os resultados descritos na seção mencionada.

Ao final da experiência com o microarray, observou-se que ainda seriam necessárias melhorias, tanto no protocolo de perfil polissomal quanto no de sequenciamento, isso para que a identificação do RNA diferencialmente traduzido pudesse ser realizada com sucesso. Assim, no quarto capítulo, foi padronizado um novo gradiente de sacarose para que as frações de interesse pudessem ser concentradas em menor volume. Adicionalmente, optou-se também por utilizar um protocolo de sequenciamento que realiza a amplificação do RNA e que dispensa a depleção de RNA ribossomal, de modo que fosse possível utilizar inclusive fragmentos muito pequenos de tecido. Esta técnica foi aplicada às 69 amostras provenientes do biobanco da instituição e do Hospital de Amor, através da colaboração com o Dr. Rui Reis, sendo elas processadas e o perfil polissomal de todas realizado. As amostras foram também sequenciadas e analisadas no laboratório do nosso colaborador no Karolinska Institutet, em colaboração com o Dr. Martin Roffé.

Na Figura 1, pode-se observar o fluxo de trabalho realizado com os resultados obtidos em cada etapa, estando os satisfatórios marcados em verde e os problemas encontrados marcados em vermelho, para melhor ilustração.

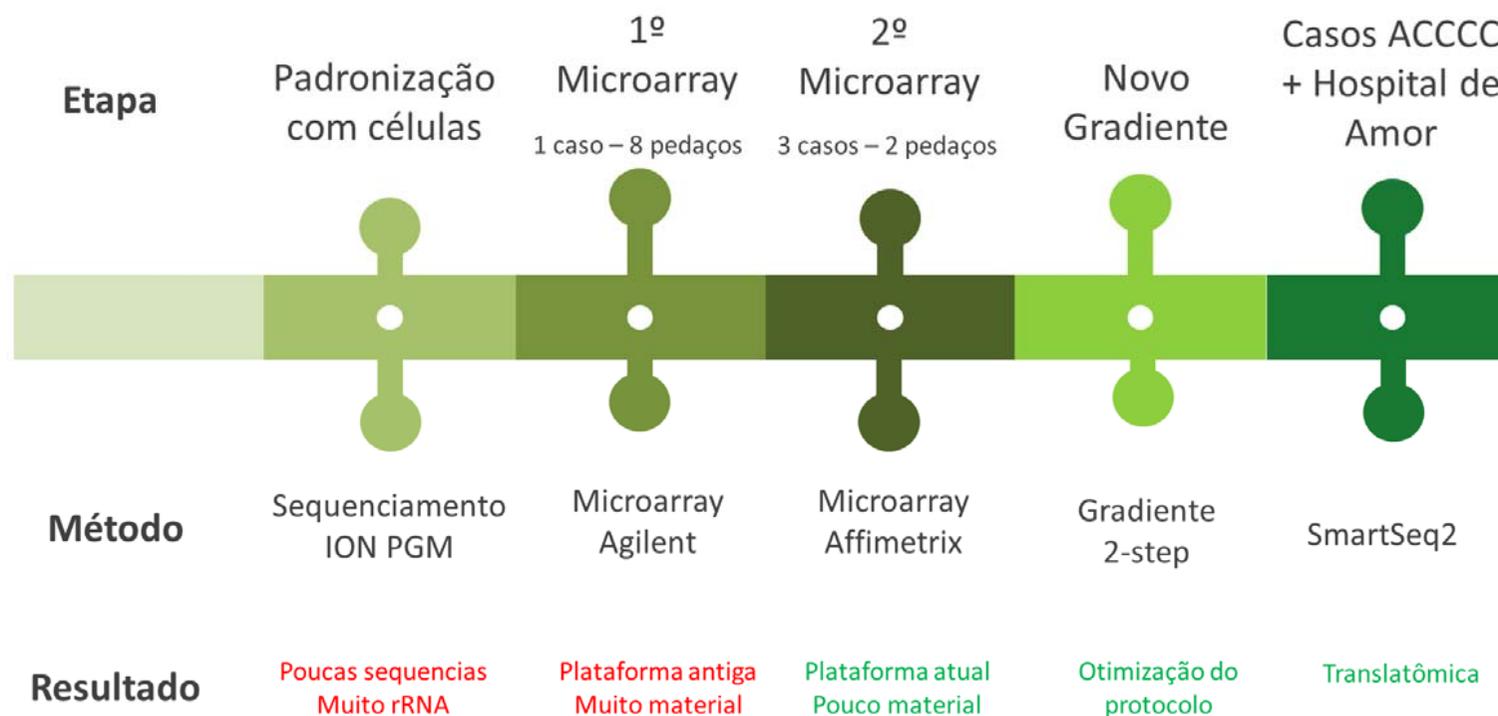


Figura 1 - Linha do tempo das etapas realizadas no projeto. A primeira etapa contou com a padronização de diversas etapas necessárias. A segunda e terceira etapas foram compostas pelos ensaios de microarray, e a última contou com o desenvolvimento do novo gradiente e a aplicação dele, com o sequenciamento e a análise dos tecidos obtidos no Biobanco. Os resultados em vermelho são os que não foram satisfatórios, então necessitaram de maior padronização ou de alteração da técnica. Os resultados em verde foram considerados satisfatórios.

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), apesar de possuírem uma incidência relativamente baixa, são de alta malignidade e impõem aos indivíduos acometidos um tempo de sobrevivência baixo. São considerados pela Organização Mundial da Saúde (OMS - do inglês, World Health Organization, WHO) o 14º tipo tumoral mais frequente em homens e o 15º mais frequente em mulheres. Segundo dados do Ministério da Saúde (2014), a estimativa de incidência de tumores do SNC no Brasil em 2016 foi de 5,5 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 a cada 100 mil mulheres, sendo classificados de acordo com as características histológicas e as principais mutações (LOUIS et al. 2016).

As causas para a sua manifestação ainda são desconhecidas, mas fatores como irradiação, traumas físicos na região da cabeça e traumas acústicos são possíveis fatores de risco. Trabalhadores do setor de radiologia, da indústria nuclear, de minas subterrâneas, entre outros, por estarem mais expostos às radiações ionizantes, estão em uma zona de risco.

1.2 GLIOMAS

O termo glioma refere-se ao grupo de tumores originados por células da glia, presentes no sistema nervoso central. As células gliais têm funções relacionadas à manutenção do meio iônico das células nervosas, à modulação da propagação do sinal nervoso, à modulação da ação sináptica ao controlar a absorção de neurotransmissores, à sustentação de alguns aspectos do desenvolvimento neuronal e ao auxílio da recuperação neuronal. São mais numerosas que neurônios, em uma razão de 10:1. Existem 3 tipos principais de células gliais: astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, e a principal função dos astrócitos é manter um ambiente químico apropriado para a sinalização neuronal. Já os oligodendrócitos são responsáveis por estabelecer um revestimento laminado rico em lipídios, chamado

mielina, ao redor de alguns axônios; as células da micróglia são semelhantes a macrófagos (PURVES et al. 2000).

Gliomas podem ser classificados, de acordo com a sua composição celular, em astrócitomas, oligodendrogliomas ou oligoastrocitomas. São os tipos mais comuns de tumores primários do sistema nervoso central, correspondendo de 40% a 60% destes (ZHU e PARADA 2002). Os gliomas são agressivos, altamente invasivos e frequentemente apresentam reincidência em um maior grau do que a lesão anterior. São tumores que possuem, tanto na parte genética quanto na histológica, uma composição muito heterogênea (PRADOS e LEVIN 2000).

Os oligodendrogliomas são compostos por células semelhantes aos oligodendrócitos (REIS FILHO et al. 1999) e apresentam um bom prognóstico quando comparados a outras neoplasias gliais, como os astrocitomas (BURGER et al. 1987). Podem ser classificados em grau II e III, de acordo com a OMS. São tumores bem diferenciados e normalmente apresentam uma mutação no gene *IDH1*, assim como os gliomas, porém, em geral, não demonstram mutações frequentes no gene TP53.

Os astrocitomas são compostos por células semelhantes aos astrócitos. A OMS criou um sistema de classificação para os astrocitomas baseado em quatro características histológicas que podem ser exibidas por estes tumores, a saber: aumento do número de células, mitoses, proliferação endotelial e necrose. Assim, o astrocitoma de grau I é considerado benigno, o de grau II exhibe apenas hiperplasia, caracterizando-se como uma massa difusa, no de grau III podem ser observadas mitoses e no de grau IV já exhibe características mais agressivas, como proliferação endotelial e/ou necrose (BUCKNER et al. 2007).

Os astrocitomas pilocíticos (grau I) são de crescimento lento, acometendo normalmente crianças, estando localizados no cerebelo. Correspondem a 5-6% dos gliomas e raramente há progressão para tumores de maior grau histológico. Os astrocitomas difusos (grau II) também apresentam baixa taxa de proliferação, com alta diferenciação celular. Podem progredir para gliomas de mais alto grau e representam 10-15% dos gliomas. Têm uma taxa de proliferação mais alta quando comparados ao tecido cerebral normal, mas mais baixa quando comparados aos graus III e IV, tipicamente apresentando menos de 5% de células marcadas com o

marcador de proliferação KI-67. Os astrocitomas anaplásicos (grau III) podem recidivar ou aparecerem como uma progressão de gliomas difusos. Apresentam alta taxa de proliferação celular, atipia celular e atividade mitótica, com o índice KI-67 entre 5 e 10%. Os astrocitomas de grau IV, também denominados glioblastomas (GBM), são o tipo mais comum e agressivo dos tumores gliais, sendo responsáveis por 50-60% dos tumores astrocitários. São compostos por uma mistura heterogênea e pouco diferenciada de astrócitos neoplásicos e contêm o maior número de mutações genéticas, sendo mais comum em homens, mostrando uma razão de 1,58:1 (THAKKAR et al. 2015).

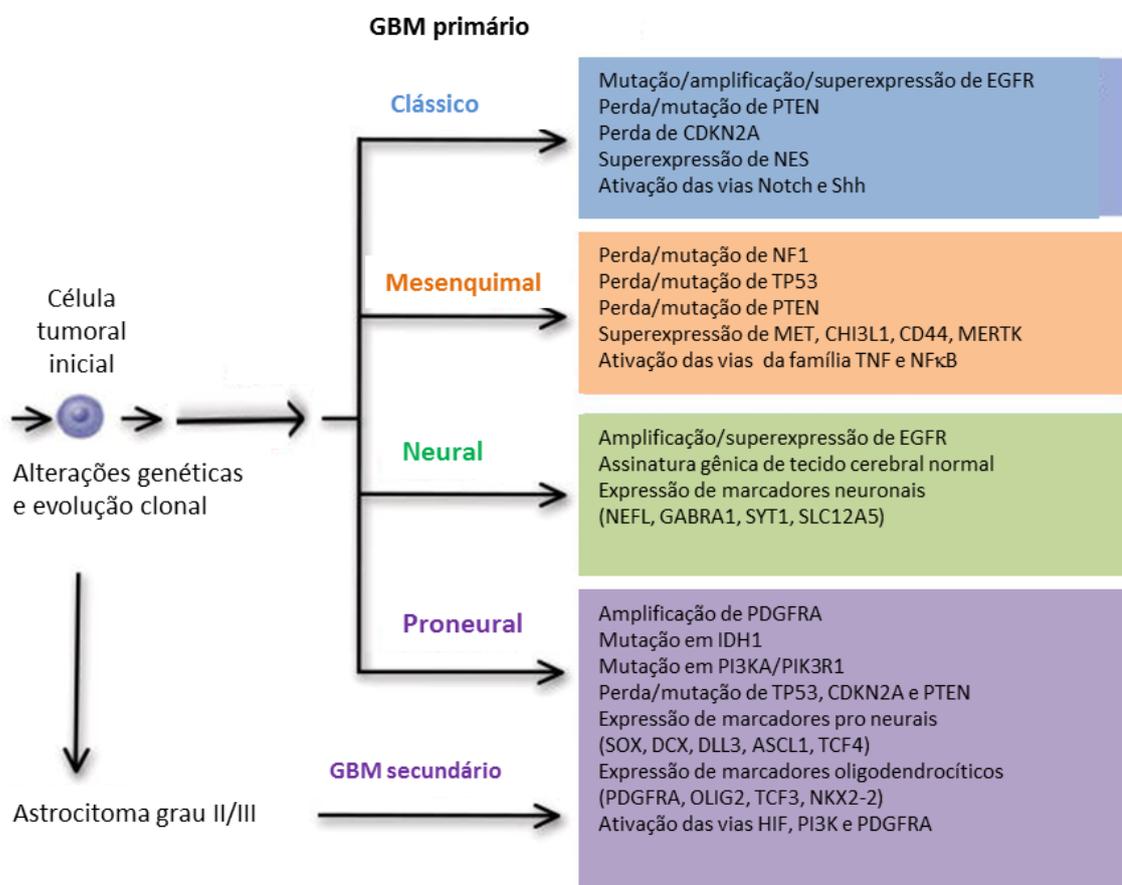
1.3 GLIOBLASTOMAS

Os glioblastomas podem ser classificados em primários e secundários, sendo histologicamente semelhantes. O GBM primário é o mais comum, respondendo por 80% dos casos, predominantemente em adultos mais velhos. Já o GBM secundário é diagnosticado como uma recidiva de tumores de menor grau histológico (astrocitomas grau II e III) e é mais comum em adultos mais jovens (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Glioblastomas secundários apresentam, mais frequentemente, componentes oligodendrogliais, enquanto que os glioblastomas primários apresentam maior índice de necrose isquêmica e necrose em pseudopaliçada (HOMMA et al. 2006).

O tratamento padrão para glioblastomas inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a temozolamida a escolha principal, pois aumenta a sobrevida em dois anos, de 10% para 26% (SCOTT et al. 2011; STUPP et al. 2006), em comparação aos pacientes submetidos à cirurgia e à radioterapia apenas. A sobrevida média dos pacientes submetidos à cirurgia, à radioterapia e à quimioterapia com a Temozolamida é de 14,2 meses (JOHNSON e O'NEILL 2012), enquanto que pacientes submetidos apenas à cirurgia e à radioterapia apresentam uma sobrevida média de 12,1 meses (STUPP et al. 2009). Recidivas ocorrem em quase todos os casos e a sobrevida após a recorrência é de 25 semanas (SATHORNSUMETEE et al. 2007). Deste modo, para este tipo tumoral é particularmente importante o delineamento de vias moleculares envolvidas no processo tumorigênico, pois

possibilitam o desenvolvimento de terapias específicas que possam beneficiar os pacientes.

Recentemente surgiram iniciativas para a identificação em larga escala de alterações gênicas relacionadas ao câncer, como o consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Um dos primeiros tecidos estudados foi o glioblastoma, com os primeiros resultados divulgados em 2009 (Cancer Genome Atlas Research Network 2008). A partir destes estudos, em 2010 foi proposta uma classificação dos glioblastomas em quatro tipos moleculares (Figura 2): clássico, proneural, neural e mesenquimal (VAN MEIR et al. 2010; VERHAAK et al. 2010).



Fonte: Adaptado de VAN MEIR et al. (2010)

Figura 2 - Classificação molecular de glioblastomas, proposta em 2010, subdividindo os glioblastomas em 4 subtipos moleculares, de acordo com as alterações encontradas. Os glioblastomas primários podem ser divididos, de acordo com o perfil de alterações moleculares, em clássicos, mesenquimais, neurais ou proneurais, sendo que os glioblastomas secundários são todos considerados tumores proneurais.

O tipo clássico apresenta altas taxas proliferativas e, em comparação aos outros subtipos, responde relativamente bem às terapias. Apresenta elevada expressão de marcadores de células tronco, como *NOTCH* E *SHH*, e precursores tumorais.

O glioblastoma do tipo mesenquimal também apresenta boa resposta às terapias quando comparado aos outros subtipos. Mostra perfil de expressão semelhante às células mesenquimais, com a inativação de *NF1*, e expressão de *MET*, *CHI3L1*, *CD44* e *MERTK*, e células comprometidas com a angiogênese.

O glioblastoma do tipo proneural expressa genes que participam do desenvolvimento neural, como *SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* e *TCF4*. Há também uma subdivisão do tipo proneural em dois subtipos, “glioma-CpG island methylator phenotype” (G-CIMP), que apresenta mutações em *IDH1*, o que leva ao remodelamento epigenético (TURCAN et al. 2012), e subtipo não G-CIMP, sem as alterações anteriores, e com a presença de amplificação no gene *PDGFR* (NOUSHMEHR et al. 2010). Essa mutação em *IDH1* em GBMs está relacionada com a progressão de outros subtipos menos agressivos, e estes seriam, portanto, GBMs secundários. Os pacientes com estas características são comumente mais jovens e apresentam uma maior sobrevida.

Há também os glioblastomas do tipo neural, que apresentam marcadores de tecido cerebral não tumoral e marcadores neurais (*NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* e *SLC12A5*), assim como células mais diferenciadas.

Após essa classificação, estudos subsequentes (CECCARELLI et al. 2016) elaboraram outra classificação molecular que considera os gliomas de todos os graus histológicos e não apenas os glioblastomas (Figura 4). A alteração mais relevante encontrada foi a presença de uma mutação no gene de *IDH1*, que já havia sido descrita em 2008 (PARSONS et al. 2008). Assim, a classificação é primeiramente feita considerando o gene *IDH1*, se está mutado, ou tipo-selvagem, sendo que a sobrevida dos pacientes com *IDH1* mutado é maior. Os gliomas com a mutação em *IDH* podem ser subdivididos em 3 grupos, sendo estes: G-CIMP baixo (com baixa taxa de metilação), G-CIMP alto (com alta taxa de metilação) e Co-deleção do cromossomo 1p-19q; neste grupo encontram-se, e majoritariamente, os gliomas de baixo grau. Os gliomas com o *IDH* tipo selvagem podem ser divididos em 4

subgrupos: clássico, mesenquimal, LGm6-GBM e proneural, sendo estes classificados de acordo com as principais alterações encontradas (Figura 3). Pode-se observar, na figura abaixo, as mutações encontradas em cada um dos grupos.

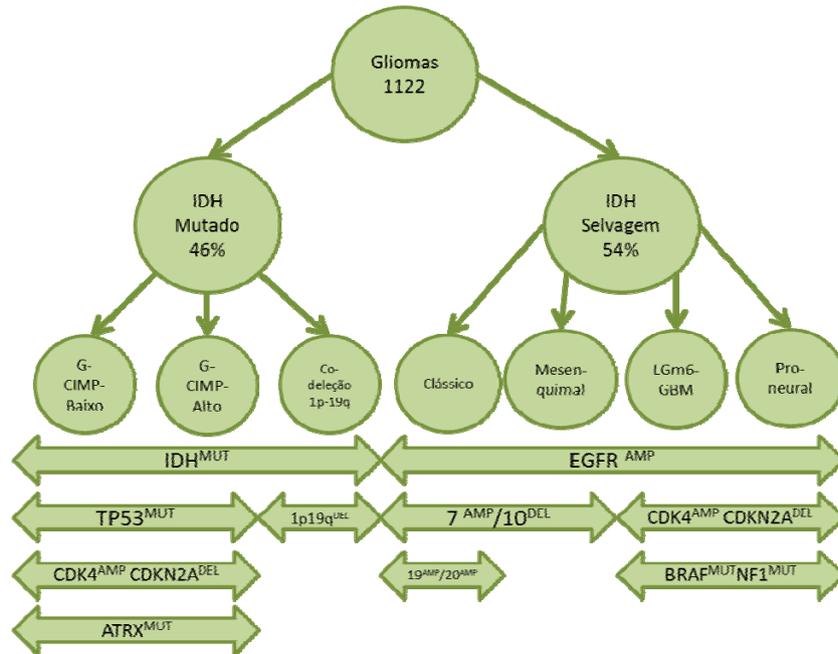


Figura 3 - Nova classificação dos gliomas. Os gliomas podem ser divididos em 2 grupos principais, de acordo com a presença ou a ausência de mutação no gene IDH. Para os gliomas com IDH mutado, são 3 grupos: G-CIMP baixo, G-CIMP alto e Co-deleção 1p-19q, e para os gliomas com IDH tipo selvagem são 4 grupos: clássico, mesenquimal, LGm6-GBM e proneural.

No entanto, estas classificações moleculares tiveram baixo impacto na avaliação clínica dos pacientes e não geraram novas modalidades terapêuticas. De fato, desde 2005 até 2016 foram realizados 791 estudos clínicos com pacientes portadores de glioblastomas, incluindo drogas inibitórias de vias de sinalização. Até hoje, contudo, o tratamento padrão ainda é a Temozolamida em associação à radioterapia após a cirurgia. Sendo assim, ainda é necessária uma ampliação do conhecimento biológico sobre estes tipos tumorais, o que poderia delinear tratamentos alvo mais eficazes.

1.4 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS EM GLIOBLASTOMAS

Independentemente da classificação utilizada, pode-se observar nos gliomas algumas alterações gênicas mais prevalentes.

1.4.1 Mutações no gene *IDH1*

Em humanos, existem 3 isoenzimas de IDH: *IDH1*, *IDH2* e *IDH3* (DALZIEL 1980), sendo estas enzimas que atuam sobre o substrato isocitrato, convertendo-o em alfa-cetoglutarato (α -KG) via descarboxilação oxidativa. As reações catalisadas por *IDH1* e *IDH2* são reversíveis e usam NADP^+ como um aceptor de elétrons, levando à produção de NADPH (GEISBRECHT et al. 1999). A enzima *IDH1* atua no citoplasma da célula e dos peroxissomos enquanto que as enzimas *IDH2* e *IDH3* são encontradas na matriz mitocondrial.

Mutações no gene *IDH1* são muito comuns em gliomas e em GBMs secundários. A grande maioria das mutações no gene *IDH1* em gliomas afetam o resíduo 132, causando uma mutação de arginina para histidina (R132H) (BALSS et al. 2008). Esse resíduo encontra-se no sítio ativo da enzima e é crítico para a ligação desta com o isocitrato (XU et al. 2004), levando, assim, à perda da atividade da enzima, reduzindo os níveis de alfa-cetoglutarato e NADPH, importantes cofatores na manutenção dos níveis normais de glutatona para combater espécies reativas de oxigênio (ROS).

Estudos *in vitro* mostram que a proteína *IDH1* mutada adquire a habilidade de converter alfa-cetoglutarato em R(-)-2-hidroxi-glutarato (2-HG) (DANG et al. 2009), levando ao surgimento da hipótese de que *IDH1* mutante seria um oncogene e o 2-HG um oncometabólito (GARBER 2010). Ao antagonizar o alfa-cetoglutarato, o 2-HG inibe a atividade de diversas dioxigenases dependentes de alfa-cetoglutarato, incluindo histonas dimetilases (XU et al. 2011). Perfis de GBMs realizados em estudos de grande escala, como o TCGA, mostram uma associação entre a mutação de *IDH1* e um aumento na metilação de promotores (G-CIMP), levando ao silenciamento de genes. A perda da função da enzima leva à ativação da via de sinalização induzida por hipóxia, passo crítico na adaptação dos tumores ao

crescimento anaeróbio e na formação de novos vasos através do processo de tumorigênese (ZHAO et al. 2009). As células com menor atividade dessa enzima acabam mais expostas a radicais livres, sendo mais sensíveis a danos oxidativos.

1.4.2 Metilação do promotor MGMT

Um dos principais tratamentos disponíveis atualmente para pacientes com GBM é a temozolamida (TMZ), que tem efeito citotóxico ao causar metilação no DNA. Ao ser administrada, a temozolamida é hidrolisada espontaneamente nas condições fisiológicas em seu metabolito ativo, o monometil triazeno imidazol carboxamida (MITC). Este composto metila o DNA nas posições N7 e O6 da guanina e N3 da adenina (MUTTER e STUPP, 2006), e esta metilação pode ser reparada pela enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). A metilação do promotor do gene MGMT em glioblastomas leva a uma deficiência na expressão desta proteína e é um biomarcador de prognóstico já estabelecido (HEGI et al. 2008). Pacientes com a metilação do promotor de MGMT apresentam melhor resposta ao tratamento com TMZ.

1.4.3 Mutação em CDKN2A e a via de pRB

Durante a fase G1 do ciclo celular o complexo formado pela ciclina D, CDK4 e CDK6 inibem a pRB (proteína retinoblastoma) através de fosforilação, liberando, assim, o fator E2F, permitindo a progressão do ciclo para a fase S. A pRB quando ativada permanece ligada ao E2F, não permitindo a progressão do ciclo (MAO et al. 2012). Em gliomas de alto grau, mutações inativadoras de pRB foram identificadas em mais de 20% dos casos (HENSON et al. 1994), e a perda de expressão também já foi identificada em GBMs (TORTOSA et al. 2000). Essas mutações favorecem a progressão do ciclo celular, já que a proteína pRB é um supressor do ciclo.

Em glioblastomas também é comum a mutação do gene *CDKN2A*, um inibidor da quinase dependente de ciclina 2A. Este gene, em humanos, está localizado no cromossomo 9, banda p21, e codifica duas proteínas, incluindo o membro da família INK4 p16 (ou p16INK4a) e p14arf (RUAS e PETERS, 1998). Ambos atuam como supressores tumorais, regulando o ciclo celular. A p16 inibe as

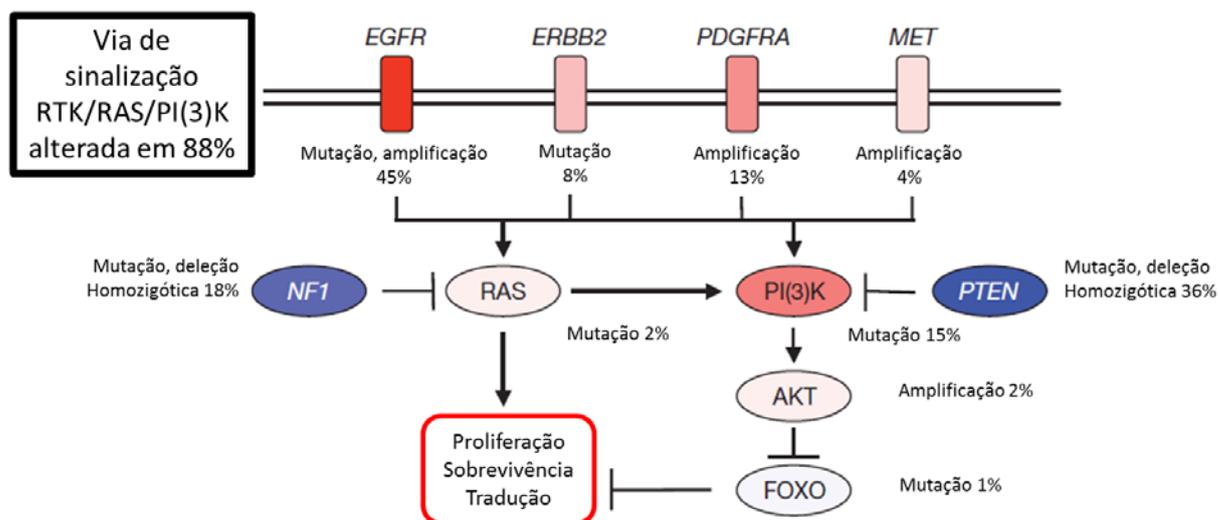
quinases 4 e 6 dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) e, desse modo, ativa a família de proteína retinoblastoma (Rb); a p14ARF ativa o supressor tumoral p53.

1.4.4 Perda de heterozigose do cromossomo 10

Uma das alterações mais comuns em GBMs, presente nos tumores de todos os subtipos moleculares, é a perda de heterozigose (LOH) do cromossomo 10, ocorrendo em 60-80% dos casos (DAHIA 2000; KNOBBE et al. 2002), mas não se relacionam com o prognóstico dos pacientes (OHGAKI et al. 2004). O gene PTEN, um supressor tumoral, está localizado nesta região. Embora em GBM não tenham sido observadas altas taxas de mutações no gene de AKT, uma ativação anormal de AKT é observada na maioria dos GBMs, relacionada principalmente à perda de função de PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10) (HAAS-KOGAN et al. 1998; HOLLAND et al. 2000). PTEN é uma fosfatase de lipídeos, responsável pela desfosforilação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, o que regula a via de mTOR.

1.4.5 Via de PI3K.AKT.mTOR

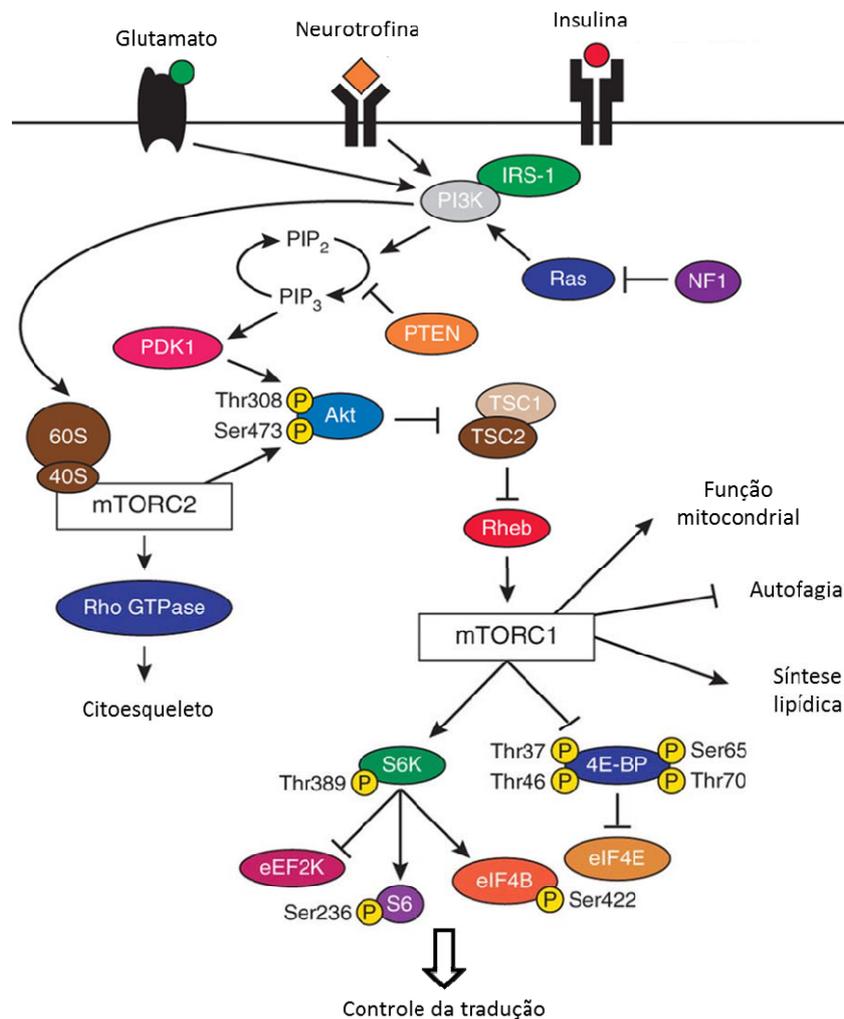
Em GBMs é muito comum observar a diminuição dos mecanismos de parada de progressão do ciclo celular. Em muitos casos, pode-se encontrar a superexpressão, ou mutações que levem ao ganho de função de receptores tirosina quinase ou na ativação constitutiva de vias de transdução de sinal. No estudo do TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network 2008) foram encontradas alterações na via Ras/mitogen activated protein kinase (MAPK) e na via fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) (Figura 4) em 88% dos casos. A amplificação do *EGFR* encontra-se presente em 45% dos casos.



Fonte: Adaptado de VAN MEIR et al. (2010)

Figura 4 - Principais alterações moleculares em glioblastomas. Dentre as principais alterações encontradas em glioblastomas, 88% dos tumores apresentam mutações/amplificações de receptores de membrana que participam das vias de AKT e MAPK, envolvidas com a síntese proteica. Essas vias estão envolvidas com a progressão do ciclo celular, com a sinalização de sobrevivência e com a tradução de mRNAs. Genes com amplificação/mutação estão representados em vermelho, enquanto genes com deleção/mutação estão em azul.

Na via de transdução de sinal de PI3K (Figura 5), esta enzima fosforila fosfatidil-inositol, para gerar inositol-trisfosfato (PIP3), o qual se liga à proteína AKT, possibilita sua translocação para a membrana plasmática. AKT é, então, fosforilada por quinases PI3K dependentes (PDKs), no resíduo Thr308, resultando em sua ativação (HAY 2005) (Figura 5). Após sua ativação, AKT fosforila a proteína TSC2 no sítio Thr1462, a qual, junto com a proteína TSC1, formam o tuberous sclerosis complex (TSC) (SABATINI 2006). A proteína TSC2 inibe a atividade da GTPase RHEB através da hidrólise de GTP. Assim, a fosforilação de TSC2 por AKT inibe sua atividade, evitando a inibição de RHEB que, por sua vez, influencia fortemente a atividade de mTOR, sendo necessária a inativação de TSC2 para a ativação de mTOR (FINGAR e BLENIS 2004).



Fonte: Adaptada de COSTA-MATTIOLI e MONTEGGIA (2013).

Figura 5 - Via de sinalização de mTOR. A via de PI3K/AKT tem início com a ativação de RTKs presentes na membrana plasmática que, quando ativados por hormônios ou fatores de crescimento, fosforilam e ativam a proteína cinase PI3K, sendo esta responsável pela fosforilação de PIP2 em PIP3, o que resulta na ativação de AKT. O AKT regula a tradução por fosforilar e inativar a função do complexo TSC, um heterodímero de TSC1 e TSC2 que regula negativamente a proteína RHEB. A atividade de RHEB é essencial para a ativação da via, pois essa proteína associa-se a mTORC1 promovendo sua ativação e sua consequente sinalização para os alvos S6K1 e 4EBP1, essenciais para o início da tradução

A mTOR é uma proteína quinase altamente conservada que compõe ao menos dois complexos multi-proteicos - mTORC1 e mTORC2, sendo o primeiro um complexo de proteína quinase sensível à rapamicina, composto por mTOR e duas proteínas acessórias, RPTOR e mLST8. Em resposta a fatores de crescimento e

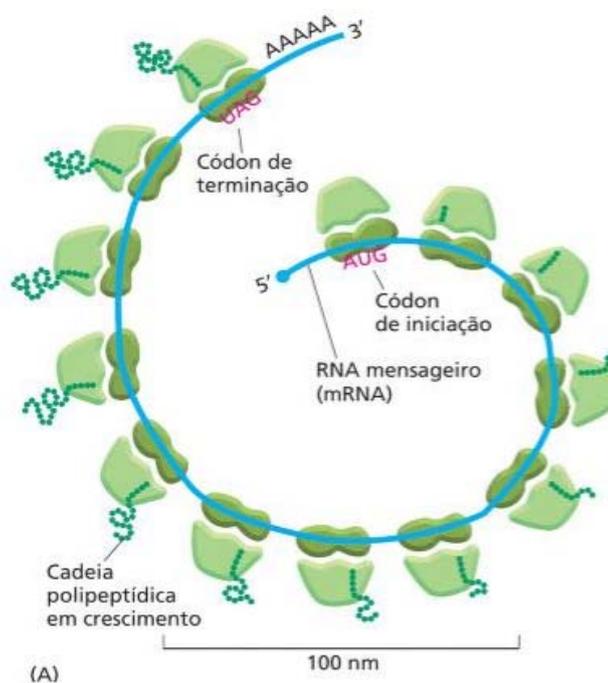
nutrientes, mTORC1 regula o crescimento celular, controlando a síntese proteica, a biogênese de ribossomos e a autofagia. mTORC2 é um complexo de proteína quinase insensível à rapamicina, definido pela interação com a proteína acessória RICTR (SABATINI 2006) sua função ainda não foi totalmente elucidada, mas já foi mostrado que está envolvido com a reorganização do citoesqueleto de actina e migração celular.

1.5 TRADUÇÃO DE mRNAS

Todos os RNAs mensageiros eucariotos possuem na sua extremidade 5' um quepe composto por uma guanina com um grupamento metil associado (7-metilguanossina). O processo de adição deste composto, o capeamento, é a primeira modificação feita no RNA transcrito (RAMANATHAN et al. 2016), ocorrendo após a RNA polimerase II ter produzido um fragmento de aproximadamente 25 nucleotídeos de RNA durante a transcrição. Já na extremidade 3' do RNA mensageiro ocorre a poliadenilação, uma sequência repetitiva de adeninas sobre a extremidade 3' (cauda Poli-A). Estas modificações aumentam a estabilidade do RNA e auxiliam na exportação deste para o citoplasma e na sua identificação (RAMANATHAN et al. 2016). São utilizadas também como indicadores de que a molécula de mRNA está íntegra. O quepe atua também como recrutador e ancorador de fatores de início de tradução.

A tradução de mRNAs em proteínas em eucariotos pode ser dividida em 4 etapas, sendo elas a iniciação, a alongação, a terminação e a reciclagem dos ribossomos. O início da tradução é o passo com maior regulação, envolvendo diversos fatores de tradução (eIF). Estes fatores regulam a montagem do ribossomo no mRNA maduro e seu escaneamento até a fase aberta de leitura (ORF). A tradução dependente de quepe inicia-se com a ligação dos eIF às estruturas do RNA (m7Cap e a cauda Poli-A). O fator de início de tradução eIF4F (formado pelos fatores eIF4E, eIF4G e eIF4A) liga-se ao quepe, e a proteína de ligação PABP liga-se à cauda poli-A. O RNAm é então circularizado através da interação entre PABP e eIF4F, o que facilita a tradução por reciclar os ribossomos que terminam a tradução, garantindo que apenas os RNAm intactos sejam traduzidos, protegendo-os da degradação.

Uma vez circular, é realizada a montagem do ribossomo 80S a partir das subunidades 40S e 60S. Primeiramente, é formado um complexo de pré-iniciação 43S, a partir da interação do 40S com o complexo ternário (formado pelo RNAt iniciador carregado com uma metionina, eIF2 e GTP). Então o complexo 43S é recrutado à extremidade 5' pelo fator eIF4F, formando o complexo 48S, que escaneia o RNAm até o códon inicial do quadro de leitura (ORF), um AUG. Após esta etapa, o GTP do complexo ternário é hidrolisado por eIF5, E isso possibilita que a subunidade 60S com eIF6 ligue-se ao RNAm, formando o ribossomo competente 80S. Quando este entra na fase de elongação, outra rodada de iniciação começa e, assim, a mesma molécula de RNAm pode ser traduzida por diversos ribossomos ao mesmo tempo, formando o chamado polissomo, ou poliribossomo (Figura 6). Quanto maior a quantidade de ribossomos simultaneamente na mesma molécula maior será a taxa de tradução desta molécula, pois uma maior quantidade de proteínas será sintetizada em um menor espaço de tempo.



Fonte: ALBERTS et al. (2002)

Figura 6 - Esquema de Polissomo. Desenho esquemático ilustrando uma série de ribossomos traduzindo simultaneamente uma mesma molécula de RNAm.

1.6 CONTROLE DA TRADUÇÃO

Historicamente, a ideia de que uma molécula de mRNA será sempre traduzida para uma molécula de proteína prevaleceu durante muito tempo. Esta visão comum é influenciada pelo fato de que a transcrição e a tradução são diretamente acopladas em bactérias, o que não é o caso em eucariotos (ALBERTS et al. 2002). O interesse em mecanismos que determinam a relação entre os níveis de mRNAs e proteínas aumentou após alguns estudos de larga escala, que mostram claramente discrepâncias entre os níveis de transcritos e proteínas em eucariotos (ANDERSON e SEILHAMER, 1997; GYGI et al. 1999; RAJASEKHAR et al. 2003; MATHEWS et al. 2007). De fato, apenas 40% da variabilidade da expressão gênica ocorre em resposta a variações nos níveis de mRNA total e, em média, as moléculas de proteína são 2800 vezes mais abundantes que as moléculas de RNA (SCHWANHAUSSER et al. 2011). Modelos baseados na determinação do número absoluto de RNAs e proteínas estabelecem que a velocidade de transcrição varia de 0.1 a 100 transcritos/gene/hora, sendo a média de 2 transcritos/gene/hora. Por outro lado, a velocidade de tradução varia de 0.1 a 10^5 proteínas/hora/transcrito, sendo a média de 140 proteínas/hora/transcrito. Assim, pode-se observar que o processo de tradução contribui enormemente para o processo de expressão gênica (SCHWANHAUSSER et al. 2011).

De fato, como o processo de tradução consome grandes quantidades de energia, a tradução não-regulada de todos os mRNAs não beneficiaria a célula ou o organismo. Adicionalmente, a existência de mecanismos redundantes de regulação da expressão gênica permitiria uma estabilidade maior nos níveis de expressão. Além disso, em situações de estresse em que a célula necessita responder rapidamente, induzir diretamente a tradução de mRNAs já transcritos permite enfrentar, de uma maneira mais ágil, as mudanças no ambiente (POLUNOVSKY e BITTERMAN 2006).

Entre os mecanismos de regulação da expressão proteica, a tradução do mRNA é o passo de maior consumo energético, o que indica a necessidade de um controle rigoroso desta etapa. A regulação da tradução é conseguida principalmente em dois momentos: na fase de iniciação da tradução, na qual o ribossomo é recrutado

ao RNAm pelo complexo eIF4F (HINNEBUSCH 2014), e na modulação de quantos ribossomos associam-se a cada transcrito, ou seja, o número de unidades de ribossomos traduzindo cada transcrito em proteína num determinado momento. O recrutamento do ribossomo exerce, dessa forma, papel fundamental na regulação da eficiência de tradução, sendo um fator limitante das taxas de síntese proteica (MATHEWS et al. 2007).

Foi observado que a ativação tanto de PI3K quanto do oncogene Ras leva a uma importante mudança no perfil de mRNAs ligados a ribossomos (ativamente engajados na tradução), afetando, todavia, muito pouco o perfil de mRNAs totais da célula, demonstrando a importância da tradução para o controle do ciclo celular. Os mRNAs especificamente direcionados para a tradução, após a ativação de PI3K e Ras, compreendem famílias envolvidas na progressão do ciclo celular, motilidade celular, entre outras situações envolvidas com o processo tumorigênico (RAJASEKHAR et al. 2003).

Entre os principais alvos de mTORC1 estão as proteínas p70S6K e *eIF4E binding protein* (4E-BP). A proteína 4E-BP sequestra o fator de início de tradução *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E), diminuindo a tradução dependente do quepe de 7- metilguanossina (m7G-cap) presente na região 5' não traduzida (5'-UTR) dos mRNAs. Quando hiperfosforilado por mTORC1, nos resíduos Thr37, Thr 46, Ser 65 e Thr 70, a 4E-BP libera o fator eIF4E, aumentando as taxas de tradução (RICHTER e SONENBERG 2005).

Interessantemente, muitas proteínas de controle do ciclo celular, como a ciclina D1 (ROSENWALD et al. 1993) e a c-Myc (ZIMMER et al. 2000), além de fatores de crescimento, como *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (KEVIN et al. 1996), possuem a tradução do RNA mensageiro regulada pela abundância de eIF4E. Já a quinase p70S6K fosforila a proteína S6, um importante componente da subunidade ribossomal 40S (HAY, SONNENBERG, 2004). Assim, o complexo mTORC1 regula, de muitas maneiras, o início da tradução proteica e conseqüentemente a proliferação celular.

Diversos RNAs mensageiros de vertebrados que codificam proteínas ribossômicas têm uma sequência de 4 a 15 oligopirimidinas na sua extremidade 5', sendo chamados de genes 5' TOP (AMALDI e PIERANDREI-AMALDI 1997). Os

genes 5' TOP ainda estão sendo identificados, sendo principalmente regulados por mTOR. Entre eles estão fatores de início de tradução, como eIF 2, 2 β , 2B, 3, 4, 4A, 4B e 4H (YAMASHITA et al. 2008). Esta sequência serve como um elemento regulador cis que inibe a ligação de proteínas reguladoras da tradução ou o próprio mecanismo de tradução. Como resultado, a tradução desses genes é inibida como resposta à parada de crescimento celular.

Quando sob estresse, os RNAs mensageiros dos genes 5' TOP, que estão normalmente associados aos polissomos, mudam seu estado para o "subpolissomo", sendo este um estado de tradução inativa, enquanto a maioria dos mRNAs não-5' TOP permanece no polissomo, sendo traduzidos (MASVIDAL et al. 2017).

Existe também a tradução independente de quepe, mediada por uORFs (do inglês, Upstream Open Reading Frame) ou estruturas no RNAm chamadas de IRES (do inglês, *Internal ribosome entry site* ou sítio de entrada interna do ribossomo) (LEPPEK et al. 2017). Esta tradução requer um menor número de fatores de tradução e corresponde a 5% dos eventos de início de tradução em eucariotos.

As uORFs são janelas de leituras localizadas na região 5' não traduzida do mRNA, sendo um dos fatores do controle da tradução, podendo inibir a tradução da janela de leitura subsequente, ou até mesmo promover o início da tradução no CDS (YOUNG e WEK 2016). São sensíveis à fosforilação por eIF2 α em resposta ao estresse ambiental, como falta de aminoácidos, estresse de retículo endoplasmático, infecção viral ou estresse oxidativo. Temos como exemplo a fosforilação de eIF2 induzindo a tradução preferencial do CHOP por um mecanismo envolvendo uma única ORF (uORF) localizada na região 5' do mRNA de CHOP (PALAM et al. 2011). Na ausência de stress e baixa fosforilação de eIF2, a tradução da uORF serve como uma barreira que impede a tradução da região de codificação de CHOP. A fosforilação de eIF2 durante o estresse facilita o desvio da tradução da uORF, permitindo que os ribossomos traduzam CHOP.

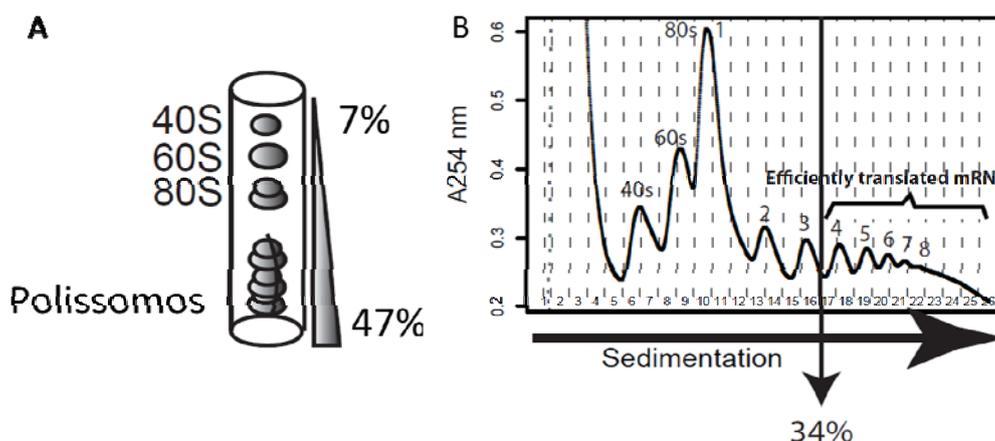
As IRES apresentam estruturas secundárias que promovem uma interação mais eficiente com o ribossomo 40S, possibilitando a iniciação da tradução sem o auxílio dos fatores de tradução. São encontradas em RNAs virais e eucariotos, mas apenas algumas destas IRES já tem a sua função demonstrada em eucariotos. A complexidade destas estruturas secundárias irá determinar os fatores necessários para

a montagem adequada do ribossomo competente 80S. Portanto, a tradução independente de quepe é uma via de tradução importante em condições de inibição ou redução da tradução dependente de quepe.

1.7 TRANSLATÔMICA

Como visto até o presente momento, as taxas de tradução são proporcionais ao número de ribossomos ligados a um RNAm. É possível, deste modo, estratificar a população de mRNAs com base no número de ribossomos ligados através de uma abordagem bioquímica de separação de poli(ribo)ssomos (MIKULITS et al. 2000).

O RNA ligado aos ribossomos pode ser separado pela sua diferença de densidade, sendo que quanto mais ribossomos presentes, mais pesada fica a molécula. Durante a preparação dos polissomos, amostras de interesse são colocadas sobre um gradiente de densidade e ultracentrifugadas, o que faz com que os mRNAs que estejam ligados a vários ribossomos sedimentem mais rápido. A amostra é recolhida de maneira a isolar diferentes frações, contendo um número diferente de ribossomos ligados (Figura 7). Após a separação polissomal, técnicas de sequenciamento de última geração, ou microarrays, podem ser utilizadas para a identificação de cada mRNA (LARSSON et al. 2013). Por conseguinte, o isolamento e a detecção de mRNAs polissomais utilizam a sensibilidade das técnicas de genômica para, a partir de pouca quantidade de amostra, obter um perfil de sequências que reflita a expressão de proteínas, constituindo o que é atualmente chamado translátômica.



Fonte: LIANG et al. (2018)

Figura 7 - Esquema de como é realizada a separação polissomal. A: em um gradiente de sacarose é adicionado o extrato e após a ultracentrifugação ocorre a separação dos polissomos. B: representação do perfil polissomal gerado. As moléculas 40s, 60s e 80s, por serem de menor peso, ficam nas frações com menor densidade de sacarose, e as moléculas com mais ribossomos ligados ficarão nas regiões com maior densidade de sacarose.

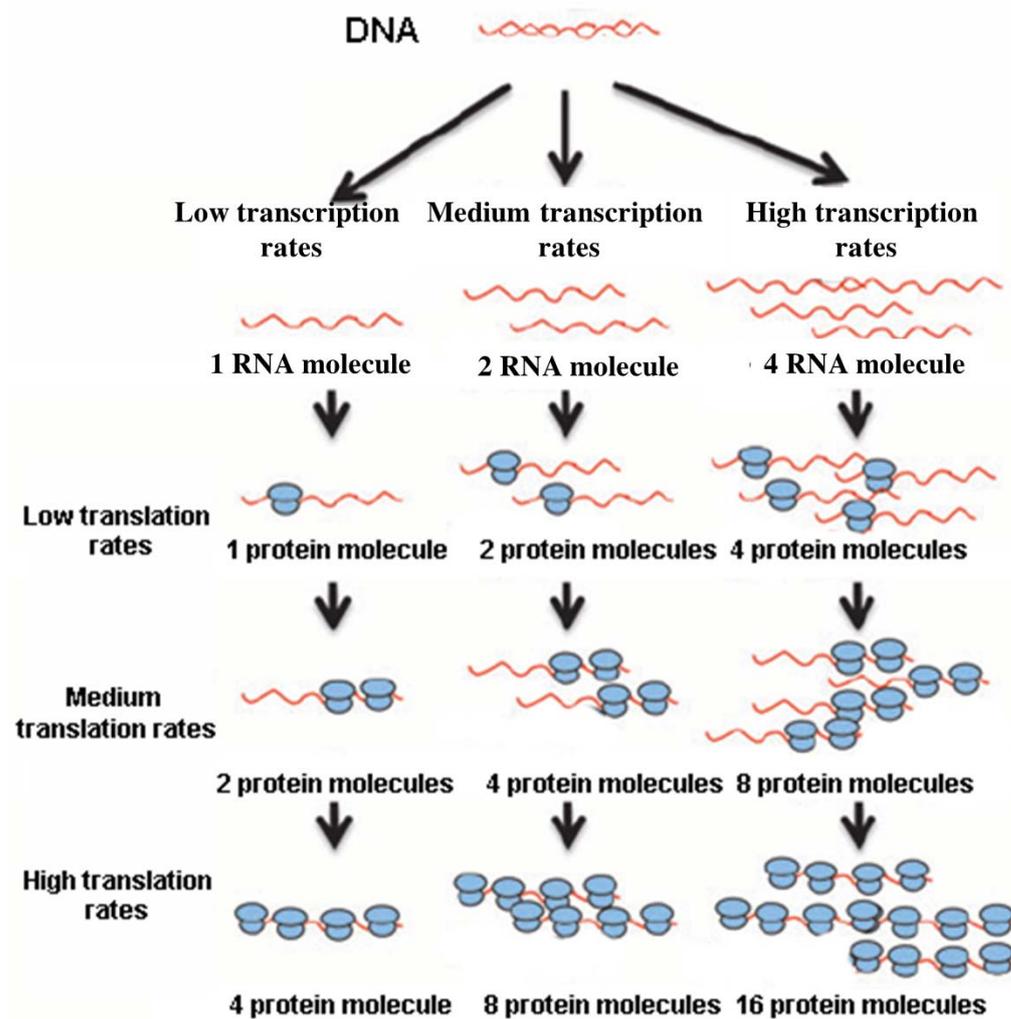
O perfil de expressão gênica medido através da quantidade de mRNAs em tumores tem sido o foco de estudos “high throughput” durante a última década, a chamada transcriptômica (DONG e WANG 2012; GARAY e GRAY 2012). Do ponto de vista biológico, no entanto, a transcriptômica pode ser considerada uma “faca de dois gumes”, pois, apesar das vantagens, existem problemas intrínsecos à sua utilização. O principal contraponto advém do interesse biológico principal de encontrar nos produtos da tradução do mRNA as proteínas, pois na maioria dos casos estas constituem as moléculas ativas que desempenham funções dentro da célula, embora o nível de expressão de mRNAs não necessariamente reflita o perfil de expressão das proteínas (LARSSON e NADON 2008). De acordo com os autores, vários anos de estudos de genômica de larga escala e de eficiência de tradução indicam que uma gama de informações é perdida se apenas a transcrição é considerada, e analisar genes diferencialmente traduzidos tem, portanto, o potencial de gerar um perfil de expressão gênica muito mais compatível com o perfil de expressão proteica.

Alternativamente aos estudos de genômica, vários grupos têm utilizado abordagens de proteômica para identificar perfis de expressão de marcadores de

progressão tumoral (CORTESI et al. 2011; GIUSTI et al. 2012). Desafios técnicos e analíticos, no entanto, têm impedido até agora o proteoma de larga escala. Estudos de proteômica necessitam de grandes quantidades de material e têm sido limitados a proteínas altamente expressas; proteínas associadas a membranas, secretadas ou de baixa abundância são amplamente sub-representadas ou completamente perdidas nestes tipos de estudo (NAGANO et al. 2008).

Não obstante a estes desafios, pode-se argumentar que ao medir apenas o proteoma estaria-se ainda longe de uma compreensão detalhada da regulação da expressão gênica. Simples medidas, através de técnicas proteômicas, não fornecem informação sobre os mecanismos através dos quais o nível de uma proteína difere entre duas amostras, já que muitos mecanismos podem contribuir para este fato: transcrição, splicing, transporte e estabilidade do RNA, assim como a eficiência da tradução e a estabilidade da proteína (ALBERTS et al. 2002). Assim, os dados obtidos a partir de análises proteômicas revelam menos informação sobre os mecanismos da regulação diferencial da expressão gênica. Adicionalmente, as análises proteômicas podem perder proteínas integrais de membrana, secretadas, residentes no lúmen de organelas intracelulares ou de baixa representatividade (DIEHN et al. 2006-2000; STIZIEL et al., 2004).

Durante a análise dos dados da translômica, a estimativa da tradução, obtida a partir da fração de RNA polissomal, precisa ser corrigida pelos níveis de transcrição basal, isto porque a abundância de transcritos medida em cada fração será influenciada pelas diferenças na abundância de mRNA total (Figura 8). Usando uma amostra de RNA não separada bioquimicamente, a qual representa a população total de RNAs, uma estimativa desta população pode ser obtida e utilizada para corrigir àquela obtida a partir do RNA polissomal. Esta medida pode ser usada para comparar diferentes amostras (Figura 9) (LARSSON et al. 2010, 2011).



Fonte: LARSSON et al. (2010)

Figura 8 - Esquema de como a abundância de RNA mensageiro pode alterar a razão da sua tradução. Uma única molécula de RNA mensageiro pode ser traduzida simultaneamente por diversos ribossomos, independentemente de sua taxa de transcrição. Por isso, faz-se necessária a comparação entre o RNA transcrito e o traduzido para se obter a sua taxa de tradução.

Na área da pesquisa sobre o câncer, a translômica tem sido utilizada para determinar o perfil de mRNAs traduzidos em vários modelos. A exemplo disso, tem-se um estudo que avalia a transição epitélio-mesênquima utilizando modelos celulares: foi indicado que uma quantidade substancial de todas as alterações de expressão gênica presentes era observada unicamente ao nível traducional. O mesmo estudo mostra ainda que os dados de mRNAs associados a polissomos estavam

melhor correlacionados com os níveis de proteína, em comparação com a análise padrão do transcriptoma (JECHLINGER et al. 2003). Em linhagens celulares de mama também foi observado que relativamente poucos genes possuem regulação transcricional (141 genes), enquanto muitos genes possuem controle traducional (1518 genes) (LARSSON et al. 2007).

No câncer colorretal também foi demonstrado que se adquire muito mais mudanças impactando o controle traducional que o transcricional. Os autores também observaram que, enquanto alguns processos celulares pareciam ser regulados em ambos os níveis, outros, como a apoptose, foram modulados apenas ao nível da tradução (PROVENZANI et al. 2006). Oncogenes, como Ras e MCT-1, podem exercer um papel importante na população de mRNAs traduzidos. Foi mostrado que o MCT-1 altera o padrão de mRNAs, como BCL2L2, TFDP1, MRE11A, ciclina D1 e E2F1, associados a polissomos, enquanto suas quantidades totais permaneceram as mesmas (REINERT et al. 2006). Já a ativação de PI3K, ou do oncogene Ras, leva a uma importante mudança no perfil de mRNAs associados com polissomos, mas afeta muito pouco o perfil de mRNAs totais da célula.

Os mRNAs especificamente direcionados para a tradução, após a ativação de PI3K e Ras, compreendem, além dos envolvidos na progressão do ciclo celular, aqueles associados com motilidade, interação célula-célula e regulação transcricional (RAJASEKHAR et al. 2003; SPENCE et al. 2006). Estas mudanças teriam sido completamente perdidas em uma análise convencional do transcriptoma, detectando mRNAs celulares totais. Outros estudos observaram os efeitos do fator de início de tradução eIF4E, dada a sua importância no processo tumorigênico (RUGGERO et al. 2004). Quando comparado o conjunto mRNAs polissomais entre linhagens celulares normais, ou expressando estavelmente eIF4E, foram encontrados cerca de 250 genes diferencialmente traduzidos (LARSSON et al. 2006). Adicionalmente, a expressão de eIF4E em linhagens celulares por apenas 6 horas altera poucos genes ao nível da transcrição (27 genes), enquanto muitas diferenças podem ser observadas no nível de tradução (294 transcritos) (MAMANE et al. 2007).

Interessantemente, outra área em que foram realizados estudos sobre regulação traducional é a de resposta ao estresse. Em células tratadas com radiação ionizante, 10 vezes mais genes foram afetados ao nível da tradução do que ao nível

da transcrição, sugerindo que a regulação do recrutamento ribossomal seria o efeito principal da radiação ionizante (LÜ et al. 2006). Como a radioterapia associada à cirurgia e ao tratamento com temozolamida é um dos recursos mais utilizados para GBM (STUPP et al. 2009), o estudo de RNAs associados a polissomos, particularmente neste tipo tumoral, é de extrema importância. Outra situação de estresse especialmente importante em GBM é a hipóxia (OLIVER et al. 2009), pois uma das características principais desse tumor é a proliferação de células endoteliais que obstruem os vasos e promovem necrose. Em células submetidas a hipóxia, grande parte da tradução é inibida; no entanto, um subconjunto de mRNAs importantes para a resposta celular à hipóxia tem sua tradução induzida, sem alteração nos níveis de mRNA total (BLAIS et al. 2004). Também foi observado que a quinase Perk (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*, residente do retículo endoplasmático, cuja ativação em resposta a estresse leva à diminuição da tradução) atua na adaptação celular à hipóxia e regula a tradução de vários mRNAs envolvidos no processo de angiogênese (BLAIS et al. 2006). Deste modo, é significativo observar se genes envolvidos com proteção celular ao estresse ou angiogênese podem ter sua tradução regulada nos GBMs.

Todavia, até agora foram realizados poucos estudos de larga escala com RNA polissomal em comparação ao grande número de estudos de larga escala realizados com RNA total, o que em parte reflete a complexidade e os desafios técnicos que estão associados a tal análise. Além disso, a grande maioria dos estudos trabalha com linhagens celulares e são raros os que utilizam tecidos animais (CHEN et al. 2002; FU et al. 2012; OTULAKOWSKI et al. 2009) ou humanos (TRÉTON et al. 2011). Particularmente no Brasil, este tipo de tecnologia não está disponível.

Sendo assim, o uso da técnica da translátômica no estudo de GBMs é uma estratégia inovadora, com o potencial de identificar genes diferencialmente traduzidos, ajudando a entender a biologia tumoral e o comportamento destes tumores e do processo tumorigênico. O perfil de expressão proteico tem também o potencial de mostrar grupos moleculares que reflitam o curso clínico do paciente, ou que mostre um novo alvo terapêutico.

1.7.1 Adaptação de métodos de sequenciamento de célula única para a translômica

O protocolo estabelecido por PICELLI et al. em 2014, possibilita o sequenciamento de RNAm obtido de uma única célula, minimizando o viés causado pela amplificação do cDNA e permitindo o sequenciamento de poucos picogramas de RNA purificado. Este é o principal motivo que justifica a escolha por este protocolo, pois como a purificação do RNA polissomal é feita a partir de tecidos muito pequenos, o rendimento é de, no máximo, poucas nanogramas. Sendo assim, o protocolo de Smart-Seq2 é o melhor para, aliado à purificação polissomal, realizar as análises de translômica (Figura 10). Esta técnica foi aperfeiçoada a partir de protocolos utilizados para RNA-seq nos últimos anos. Diversos reagentes foram introduzidos para melhorar a eficiência e diminuir a quantidade de RNA inicial necessário, como o reagente TSO (*Template Switching Oligo*) e a forma mutada da enzima Tn5, que permitem a construção de bibliotecas representativas com apenas 10 picogramas de RNA.

A versão simples de um *Template Switching Oligo* é uma sequência de DNA que transporta 3 riboguanosinas (rGrGrG) em sua extremidade 3'. A complementaridade entre estas bases rG consecutivas e a extensão 3' dC da molécula de cDNA permite a troca de *templates*. Este protocolo usa um TSO carregando duas riboguanosinas na terceira e na segunda posições, e uma guanina modificada para produzir um ácido nucléico bloqueado (LNA), como a última base na extremidade 3'. Portanto, o LNA utilizado possui um oligo para a troca de *template*.

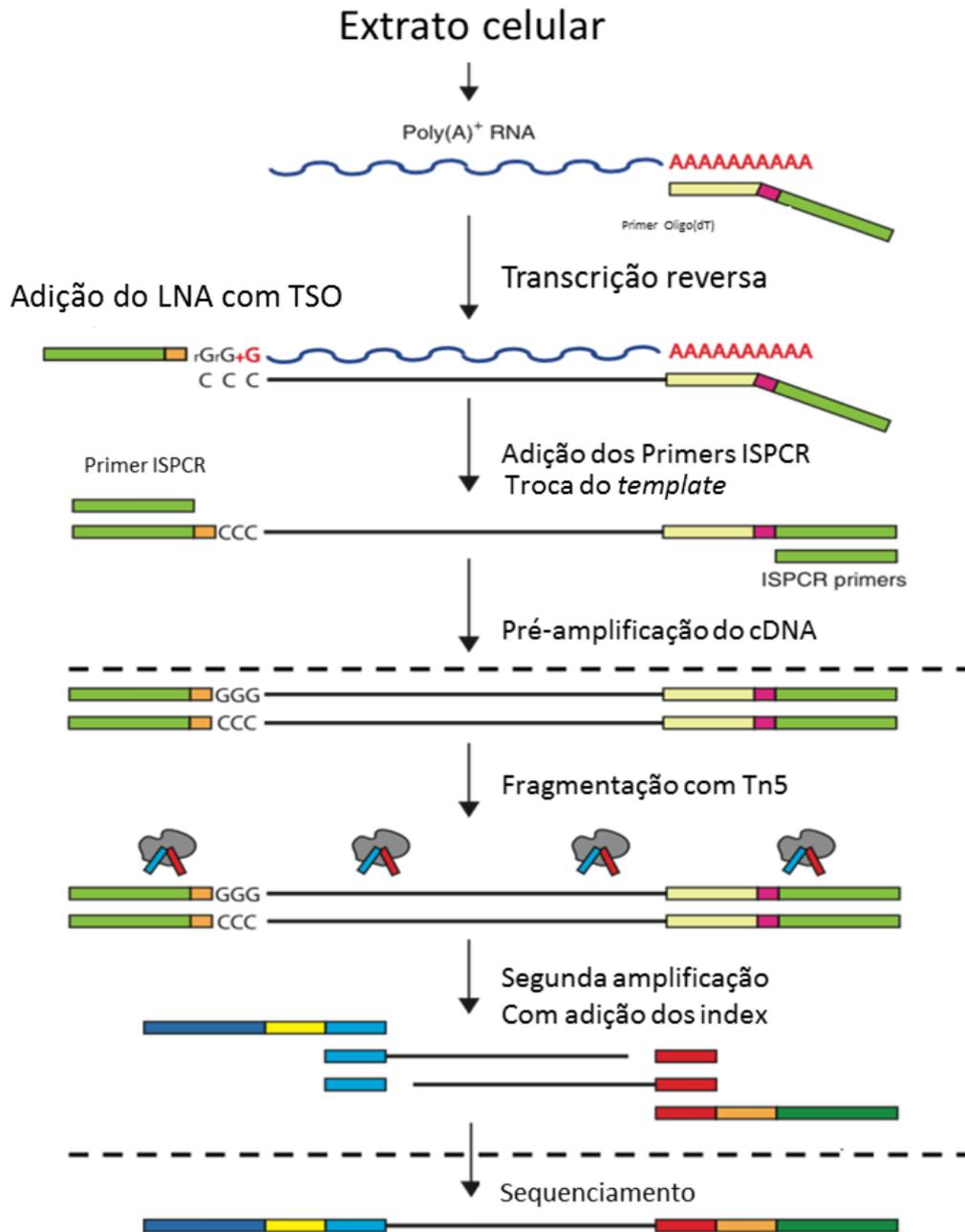
O protocolo pode ser dividido em duas etapas principais, sendo a primeira parte relativa à conversão do RNA em cDNA (RT), utilizando, para tal, o oligo-dT, que converte especificamente os RNAs mensageiros, sendo uma forma eficaz de reduzir a contaminação por RNAs ribossomais ou outros RNAs. A reação de transcrição reversa utiliza a transcriptase reversa *Moloney murine leukemia* (M-MLV), que adiciona três citosinas (C) na região 3' da nova fita do cDNA. Com isso, pode ser utilizado o ácido nucleico bloqueado (LNA), que contém duas guaninas, na terceira e na segunda últimas posições, e uma guanina modificada na última posição. Essas duas guaninas foram adicionadas neste oligo devido a maior estabilidade na ligação entre DNA-RNA. Estas três últimas guaninas ligam-se às três últimas

citossinas de cada fita de cDNA. Após a hibridização do LNA ao cDNA, a enzima transcriptase reversa pode sintetizar a fita complementar. Também está presente nesta reação o reagente betaina e as altas concentrações de $MgCl_2$, que aumentam o rendimento de cDNA.

Após a RT, uma PCR convencional é realizada. A ponta 5' do oligo-dT e o LNA contêm a mesma sequência e, assim, esta PCR pode ser realizada apenas com um primer. Esta primeira PCR amplifica o cDNA obtido. Após esta primeira etapa, uma corrida eletroforética revela uma maior concentração de fragmentos entre 1000 e 2000 pares de base, a média de tamanho de um RNA eucarioto.

Após a síntese do cDNA e sua amplificação é realizada a fragmentação do material, uma vez que o sistema Illumina HiSeq (utilizado nesse projeto) não realiza o sequenciamento com eficiência e qualidade de fragmentos maiores de 800 pb. Então, é realizada uma reação para a fragmentação do material, desenvolvida de modo que possa ser efetuada uma segunda etapa de amplificação do material, sem gerar viés experimental. Uma enzima do tipo transposase, chamada de Tn5, faz esta fragmentação, sendo esta enzima mutada para ser super-ativa, clivando o DNA em locais aleatórios com uma média de 300pb. Por ser uma transposase, além de clivar o DNA, a Tn5 também é capaz de incorporar nos fragmentos, concomitantemente na reação, os transposons.

Quando finalizada a reação de fragmentação, uma segunda PCR é realizada, amplificando todo o material obtido. Vale a pena ressaltar que fragmentos pequenos apresentam as mesmas chances de serem amplificados numa reação, e isso ocorre porque a eficiência de polimerases utilizadas *in vitro* decai com fragmentos muito longos. Assim, após fragmentar todo o cDNA em fragmentos de 300 pb, permite-se que esta segunda PCR aconteça por quantos ciclos amplificatórios sejam necessários, a fim de obter material suficiente e compatível com o sequenciador. Além disso, os primers usados nesta PCR hibridizam nos elementos adicionados pela Tn5 em cada fragmento e, também, possuem em suas estruturas sequências únicas chamadas de index, as quais permitem o rastreamento dos fragmentos e a associação com uma amostra inicial específica.



Fonte: PICELLI et al. (2014)

Figura 9 - Esquema ilustrativo do protocolo Smart-Seq2 e suas principais etapas. A primeira etapa desta metodologia compreende a reação de transcrição reversa, que converte todo o mRNA de partida em cDNA. Na segunda etapa, o cDNA obtido é fragmentado por uma transposase chamada de Tn5, seguido de uma PCR com o material fragmentado que amplifica o cDNA, inserindo os índices e as sequências adaptadoras para o aparelho de sequenciamento.

Esta metodologia apresenta diversas vantagens, embora algumas limitações ainda existam. Por um lado, ela requer menos que 100 pg de RNA como material de partida, permitindo a recuperação de cDNAs completos (fornecendo informações acerca de todos os exons de cada transcrito, variantes de splicing e SNPs) e aceitando a utilização de uma única plataforma do sequenciador para diversas amostras em uma única corrida do aparelho. Por outro lado, este método seleciona apenas os RNAs poli-adenilados. Para a translômica, esta última característica é desejável, pois elimina a necessidade de depleção do RNA ribossomal, que forma grande parte dos RNAs isolados nos perfis polissomais. Sendo assim, este método é a estratégia ideal para a construção de bibliotecas de RNA polissomal.

2 OBJETIVOS

A seguir, os objetivos que norteiam a presente pesquisa.

2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS

- Padronizar, implementar e disponibilizar, para a instituição, a técnica da translatômica.
- Utilizar a técnica de translatômica para identificar mRNAs preferencialmente traduzidos em gliomas, aumentando o conhecimento disponível sobre processos celulares alterados durante a tumorigênese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a purificação dos RNAs polissomais a partir de tumores humanos armazenados no biobanco do A. C. Camargo Cancer Center é compatível com o isolamento de polissomos, em quantidade e qualidade suficientes às necessidades das aplicações.
- Ajuizar se a congelação dos tecidos altera a população de RNAs. Como os tumores estão congelados, faz-se necessária a avaliação do efeito desta na população dos RNAs polissomais.
- Padronizar e aprimorar a separação polissomal e a posterior extração do RNA polissomal dos tecidos de gliomas obtidos.
- Comparar tecidos de alto e de baixo grau histológicos, avaliando a heterogeneidade tumoral.
- Analisar os tecidos de gliomas obtidos nos biobancos através da técnica da translatômica.

3 CAPÍTULOS

A seguir, serão descritos os materiais e os métodos elegidos e utilizados na pesquisa, de acordo com as subdivisões sugeridas por cada capítulo.

3.1 CAPÍTULO I - PADRONIZAÇÕES

Este capítulo apresenta os dados das primeiras padronizações realizadas. Acredita-se que estes dados são relevantes porque fundamentam todas as modificações que foram introduzidas aos protocolos ao longo do tempo, retratando uma trajetória de construção de conhecimento buscada por esta tese.

O primeiro experimento realizado utilizou linhagens celulares e sequenciamento no equipamento *Ion Personal Genome Machine (PGM) System* e teve o objetivo de atestar a viabilidade do método e alterar a metodologia, se necessário. No entanto, o número baixo de reads não permitiu a análise para a identificação dos mRNAs diferencialmente traduzidos e ressaltou a necessidade de alterar os kits de depleção de RNA ribossomal e/ou a metodologia de construção das bibliotecas. Desta forma, embora os resultados deste primeiro sequenciamento não tenham sido analisados para a identificação dos mRNAs diferencialmente traduzidos, acredita-se que seja fundamental sua apresentação. Em um segundo momento realizou-se ensaios para demonstrar a viabilidade da utilização do tecido congelado, já que não era sabido o quanto o congelamento poderia afetar as estruturas polissomais, inviabilizando, assim, todos os projetos com tecido congelado proveniente do biobanco.

3.1.1 Material e métodos do Capítulo I

Abaixo, os materiais e os métodos referentes ao capítulo primeiro.

3.1.1.1 Cultura celular

As células LN-229 e LN-18 (ATCC CRL-2611 e ATCC CRL-2610) foram mantidas em meio DMEM High Glucose (Thermo) acrescido de 10% soro fetal bovino (Thermo), em estufa úmida, a 37 °C e 5% de CO₂.

3.1.1.2 Injeção de linhagens celulares em camundongos tipo nude para formação de tumor fresco e congelado

Foram injetadas as células LN 229 em animais nude, sendo 5 milhões de célula por animal. Após 4 semanas, quando os tumores já estavam com 1cm³, os animais foram eutanasiados e os tumores foram retirados e divididos em dois: metade foi submetida à lise imediatamente e metade congelada em freezer -80°C. Após 15 dias do congelamento, essas outras metades dos tumores foram submetidos à lise. Tal experimento contou com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais 057/13.

3.1.1.3 Isolamento de polissomos

Lise para isolamento de polissomos

As células e os tecidos foram lisados com tampão 20 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma), 100 mM KCl (Sigma), 10 mM MgCl₂ (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma), 1 mM DTT (Sigma), 100 µg/mL ciclohexamida (Sigma) e inibidor de protease (Promega) em Politron, sendo centrifugados por 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a separação polissomal, e uma amostra deste sobrenadante foi separada para a análise de RNA total.

Gradiente 7-47%

O extrato foi fracionado em um gradiente linear de sacarose 7-47% preparado em 20 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma), 100 mM KCl (Sigma), 10 mM MgCl₂ (Sigma), 1 mM DTT (Sigma) e centrifugado por 2h30min a 39,000 rpm em uma ultracentrífuga com o rotor SW41Ti (Beckman Coulter) a 4 °C, o que garante que os mRNAs associados a ribossomos estarão separados daqueles solúveis. A absorbância a 254nm foi detectada em fluxo contínuo e as frações (1ml cada) coletadas.

3.1.1.4 Sequenciamento de RNAs pelo Ion PGM

Extração de RNA

O RNA foi extraído com o reagente TRIzol, da Life Technologies, de acordo com o protocolo sugerido pela empresa.

Depleção de RNA ribossomal

Para depletar o RNA ribossômico das amostras utilizou-se o kit RibominusTM, da Invitrogen, que consiste em sondas magnéticas associadas a estreptavidina e sondas biotinizadas que se ligam ao rRNA. Assim, após a incubação da sonda biotinizada com a amostra, a sonda magnética é aplicada e colocada em campo magnético, fazendo com que a sonda, ligada ao rRNA, precipite, sendo este depletado da amostra. Para um segundo momento, foi utilizada uma nova versão deste kit, o RibominusTM V2, que engloba a mesma técnica.

Purificação de mRNA

Para purificar o RNA mensageiro das amostras utilizou-se o kit OligotexTM, da Qiagen, que consiste em sondas que se ligam à cauda poli-A dos RNAs mensageiros. A resina do kit consiste em partículas de poliestireno de látex com uma dimensão uniforme, com oligonucleotídeos dC₁₀T₃₀ ligados covalentemente à superfície e que se ligam à cauda poli-A do mRNA. Assim, estas partículas possibilitam a purificação do mRNA sem a contaminação de outros tipos de RNAs, e esta purificação é feita a partir de centrifugações, que separarão estas partículas ligadas ao mRNA.

Sequenciamento das amostras

Para o sequenciamento dos RNAs utilizou-se os equipamentos Ion Personal Genome Machine® (PGMTM) System. A construção da biblioteca de cDNA segue o protocolo Ion Total RNA-Seq Kit v2. Resumidamente, o RNA é misturado a controles internos, os spike-in. Os RNAs são fragmentados com RNase III por um curto período de tempo (3 a 10 minutos, dependendo da quantidade de RNA), e então purificados. Os RNAs são submetidos a uma PCR de transcriptase reversa para a

construção da biblioteca de cDNA, que é amplificada. Os fragmentos são anelados às beads específicas de cada equipamento através de uma PCR em emulsão.

3.1.2 Resultados e discussão do Capítulo I

Aqui, encontram-se os resultados e as discussões obtidos a partir dos experimentos realizados e supramencionados.

3.1.2.1 Padronização da identificação de RNAs polissomais através de sequenciamento

Iniciou-se o projeto realizando a purificação de polissomos de linhagens celulares de glioblastomas. Esta padronização fez-se necessária, pois era a primeira vez que a técnica da translátômica havia sido desenvolvida no laboratório. Para isso, utilizou-se as linhagens celulares LN-18. Neste primeiro experimento, optou-se também por utilizar uma condição em que as células foram tratadas com um inibidor da proteína RSK. Esta quinase está reconhecidamente envolvida com o controle traducional (ROMEO et al. 2012), de modo que se espera observar uma diferença da população de mRNAs diferencialmente traduzidos nestas condições.

Deste modo, as células LN-18 foram tratadas com o inibidor de RSK, Bi-D1870 10 μ M, e foi feito, então, o perfil polissomal dos extratos destas células (Figura 10). Uniram-se as frações 9, 10 e 11 para que fosse possível realizar a extração dos RNAs polissomais, e como controle extraiu-se RNA do extrato total. Obteve-se, portanto, 9 μ g de RNA total e 3 μ g de RNA polisomal de boa qualidade (Figura 10). Foi depletado o rRNA através do kit Ribominus e efetuou-se a construção de bibliotecas para sequenciamento no equipamento ION PGM (Life Technologies).

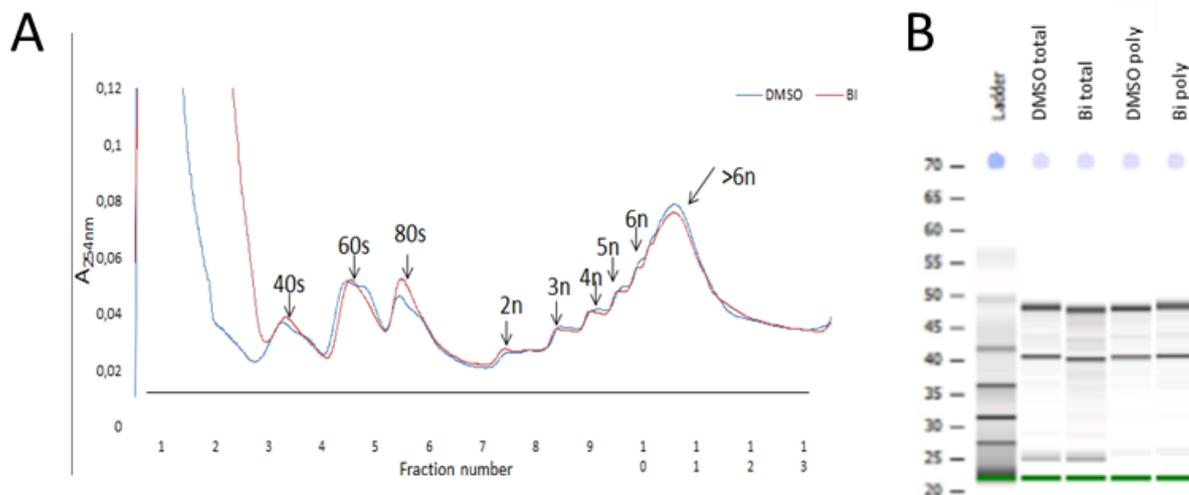


Figura 10 - Perfil polissomal da célula LN-18. As células LN18 foram tratadas, ou não, com o inibidor de RSK, Bi-D1870. A: os extratos foram submetidos à separação por densidade em gradiente de sacarose 7%-47% através de ultracentrifugação. A absorvância foi medida a 254nm. Estão representados os perfis de células tratadas com veículo (DMSO) e inibidor de RSK Bi-D1870 (Bi). B: as amostras foram submetidas a um teste de purificação de RNA. As bandas correspondem aos RNAs ribossomais 18s e 28s, mostrando a integridade destes.

Foram obtidas 3.163.212 leituras, indicando que a realização do sequenciamento foi executada com sucesso (Figura 11). Assim, esta primeira etapa de padronização mostrou que é possível a separação de RNA polissomal em quantidade e qualidade suficientes para o sequenciamento. A segunda etapa foi a análise bioinformática das sequências, que se iniciou com o alinhamento das sequências utilizando o banco de dados Ensembl (Tabela 1). No entanto, durante esta análise, pode-se observar que mais de 50% das sequências obtidas eram de RNAs ribossomais, sendo estas removidas das etapas posteriores de análise e indicadas na tabela 1 como reads filtradas. Na segunda etapa de análise, foram consideradas as sequências que se alinham somente uma vez no genoma, pois no caso de alinhamento em mais de uma posição não é possível determinar o gene que àquela sequência se refere. Após estas duas etapas, podemos ver a quantidade de reads limpas, ou seja, as que poderiam ser analisadas (clean reads). Como o número final de sequências que poderiam ser utilizadas foi muito baixo, abaixo da confiança

estatística para este tipo de análise, optou-se por realizar um novo experimento utilizando outras maneiras de purificar o RNA mensageiro.

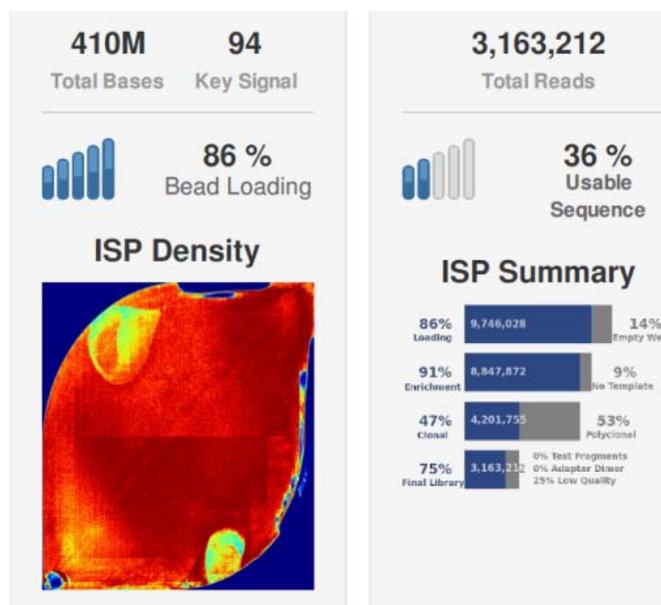


Figura 11 - Resultado de anelamento das beads no sequenciamento. Foram aneladas 86% de beads de modo uniforme no chip (ISP Density) e obtidas um total de 3.163.212 reads. Destas, 36% eram utilizáveis.

Tabela 1 - Resultado do sequenciamento.

	Dados brutos	Reads filtradas	Alinhadas uma vez	Clean reads
DMSO_{total}	658,695	68.94%	89,879	31.06%
Bi_{total}	732,649	59.17%	109,372	40.83%
DMSO_{poli}	744,908	54.61%	167,048	45.39%
Bi_{poli}	649,170	57.04%	157,221	42.96%

Os dados brutos indicam o número de leituras de cada amostra. Reads filtradas são aquelas excluídas por serem ribossomais. As reads foram alinhadas utilizando o banco de dados Ensembl e o número de leituras alinhadas apenas uma vez na sequência de referência está indicado. O número de sequências geradas foi baixo e a percentagem de leituras de mapeamento de RNA ribossomal elevada, reduzindo, assim, o número de leituras informativas.

Para testar a depleção de RNA ribossomal através de outros métodos utilizou-se o RNA total da linhagem celular LN-229, e a partir dele sucedeu-se com três protocolos diferentes. O primeiro consistia na depleção de rRNA utilizando uma

nova versão do kit Ribominus que, segundo o fabricante, havia sido melhorado com a adição de novas sequências de captura de RNA ribossomal. O segundo protocolo realizava a purificação de RNAm com o kit Oligotex (Qiagen), que consiste em sequências de PoliT que se ligam à cauda poli-A do mRNA, unidas a beads que purificam o RNA mensageiro. No terceiro protocolo foram usados os dois kits em sequência, realizando primeiramente a depleção do rRNA com Ribominus seguido da purificação de mRNA com Oligotex. Como é observado na Figura 12, o primeiro protocolo não pareceu ter eficiência satisfatória, já que só se pode observar RNAs de tamanho muito pequeno; os protocolos 2 e 3 parecem ter purificado a amostra de maneira muito similar. Obteve-se 8ng de RNA nos protocolos 2 e 3 e 20ng de RNA no protocolo 1. Procedeu-se, então, com o sequenciamento destes RNAs apenas com os protocolos 2 e 3, pois o protocolo 1 apresentou um padrão de RNA não habitual, apenas com fragmentos muito pequenos. Foi observado que nos protocolos 2 e 3 as bandas relativas aos RNAs ribossomais 18s e 28s parecem ter sido depletadas.

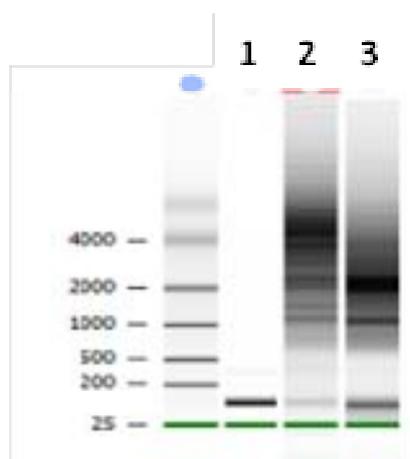


Figura 12 - Teste de purificação de rRNA. Perfil dos RNAs purificados em Bioanalyzer. O extrato celular de LN 229 foi submetido a 3 protocolos para testar a purificação do RNA. O protocolo 1 consistia na depleção de rRNA apenas com o kit ribominus®; o protocolo 2, na purificação de mRNA com o kit Oligotex®; e o protocolo 3, na união dos dois protocolos anteriores. O RNA foi submetido à separação eletroforética no equipamento Bioanalyzer. Observou-se a ausência das bandas de 28S e 18S, indicando depleção satisfatória dos RNAs ribossomais. Para o protocolo 1, observou-se apenas RNAs muito pequenos.

O sequenciamento foi realizado no equipamento ION PGM (Life Technologies). Foi obtido um carregamento de beads de 75% (Figura 13) com um total de 4.512.172 reads, das quais obteve-se entre 90% e 97% de clean reads (Tabela 2). Assim, determinou-se o melhor protocolo para o posterior sequenciamento dos RNAs polissomais obtidos dos tumores a serem estudados.

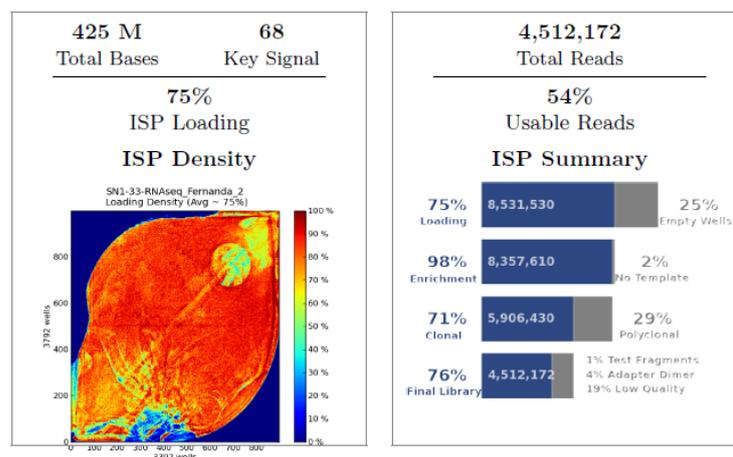


Figura 13 - Resultado de anelamento das beads no sequenciamento. Foram aneladas 75% de beads e obtidas um total de 4.512.172. Destas, 54% eram utilizáveis.

Tabela 2 - Resultado do sequenciamento.

Protocolo	Dados brutos	Reads filtradas	clean reads
Oligotex®	2.331.888	9,76	90,24%
Ribominus®+ Oligotex®	2.092.377	2,96	97,04%

Os dados brutos indicam o número de leituras de cada amostra. Reads filtradas são as excluídas por serem ribossomais. As reads foram alinhadas utilizando o banco de dados Ensembl. O número de sequências geradas foi satisfatório e a percentagem de leituras de mapeamento de RNA ribossomal foi reduzida, mostrando que a purificação de mRNA foi eficaz.

Neste sequenciamento, a porcentagem de reads filtradas foi bem menor, mostrando que a purificação de mRNA foi mais eficaz que a depleção de rRNA. Foi possível analisar 90% das reads. Determinou-se, então, que o modo mais eficiente de purificação de RNA mensageiro é através do kit Oligotex.

3.1.2.2 Avaliação do efeito do congelamento sobre a população de RNAs polissomais

Como não era conhecido o efeito do congelamento sobre a estabilidade da estrutura polissomal, foi imprescindível avaliar este fator nas amostras, considerando a intenção de se utilizar tumores congelados no biobanco.

Para avaliar o efeito do congelamento sobre amostras tumorais, foram injetadas células tumorais de glioblastoma (LN-229) subcutaneamente em 3 camundongos (projeto CEUA 057/13) para a obtenção de tumores xenoenxertados. Quando os tumores atingiram 1cm³ de volume, os animais foram eutanasiados e os tumores retirados, sendo estes divididos em duas partes: metade submetida à extração imediata e a outra metade congelada em freezer a -80°C por 15 dias; após este período, foi submetida à extração. Após a extração, ambas as metades foram submetidas à separação polissomal (Figura 14).

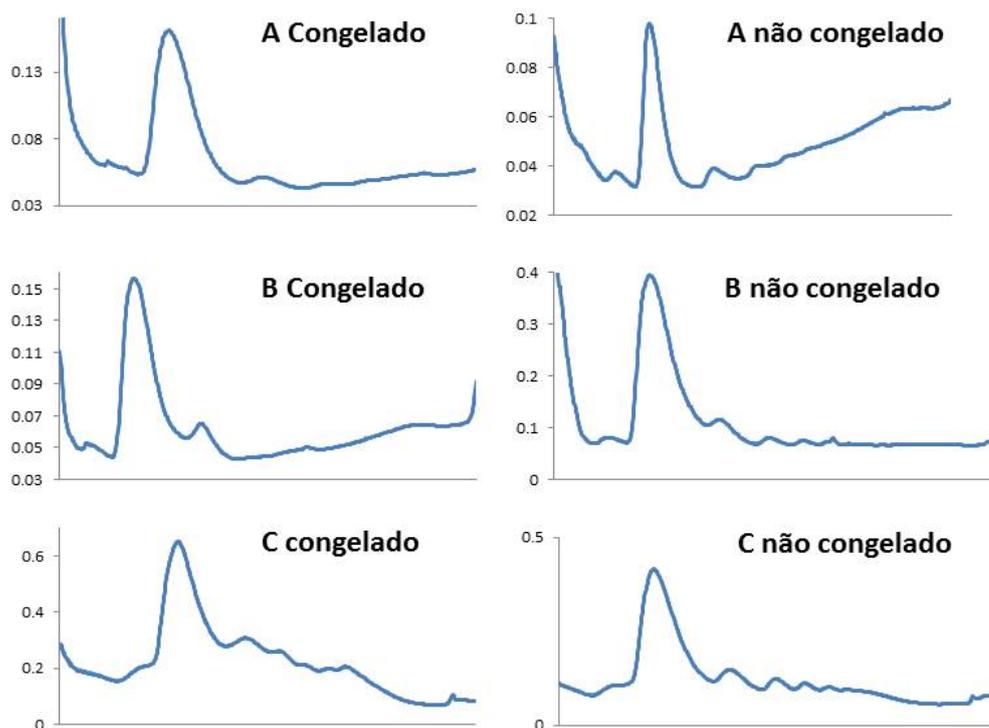


Figura 14 - Perfil polissomal dos tecidos congelados e não congelados. Os RNAs polissomais foram separados em gradiente de sacarose 7%-47% e a absorvância foi medida a 254nm. As frações correspondentes aos polissomos que foram coletados.

A partir dos perfis, a eficiência traducional foi mensurada pela área abaixo da curva do pico relativo ao 80S e do pico relativo aos polissomos. Quando a razão polissomos/80S é menor, significa que a maior parte dos ribossomos não está associada a mRNAs, implicando em um estado traducional reduzido. Quando a razão polissomos/80S é maior, significa que uma maior proporção dos ribossomos está associada a mRNAs, implicando em um estado traducional mais ativo. Pode-se observar que a relação entre os picos relativos ao 80S e os polissomos mantém-se constante entre os tecidos congelados e não congelados (Figura 15), sugerindo que não houve interferência do congelamento sobre a estabilidade dos polissomos.

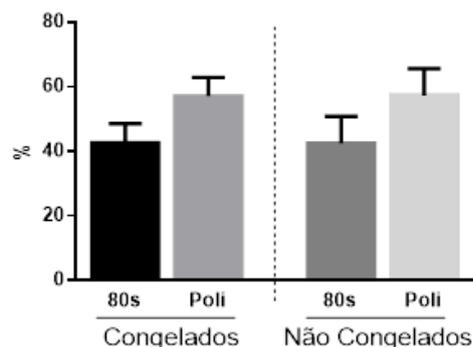


Figura 15 - Taxa traducional dos tecidos. A relação entre os picos 80s e o polissomal dos tecidos congelados e não congelados indica se os polissomos estão intactos; se houver dissociação da estrutura o pico de 80s será maior. No gráfico estão expressas as barras de erro. Não há significância estatística. Teste de Kruskal-Wallis.

Para confirmar este resultado realizou-se o sequenciamento dos RNAs totais e polissomais congelados e não congelados no equipamento ION PGM, seguindo as orientações do fabricante. Para a construção da biblioteca foi utilizada a purificação de mRNA da Qiagen, padronizado anteriormente neste trabalho. Foi feita uma correlação entre os resultados para que fosse possível analisar se há diferença causada pelo congelamento do tecido (Figura 16).

Para determinar se os RNAs identificados são comparáveis nas duas condições, os níveis de expressão de cada gene foram plotados em um gráfico de pontos. A correlação entre eles foi, então, calculada. Considera-se que em todas as comparações o R obtido é maior que 0,89, indicando que o congelamento afeta somente um número muito pequeno de genes e demonstrando a viabilidade da utilização de tecido do biobanco para estas abordagens. Deste modo, atestou-se a viabilidade de utilização de tecido congelado para este projeto.

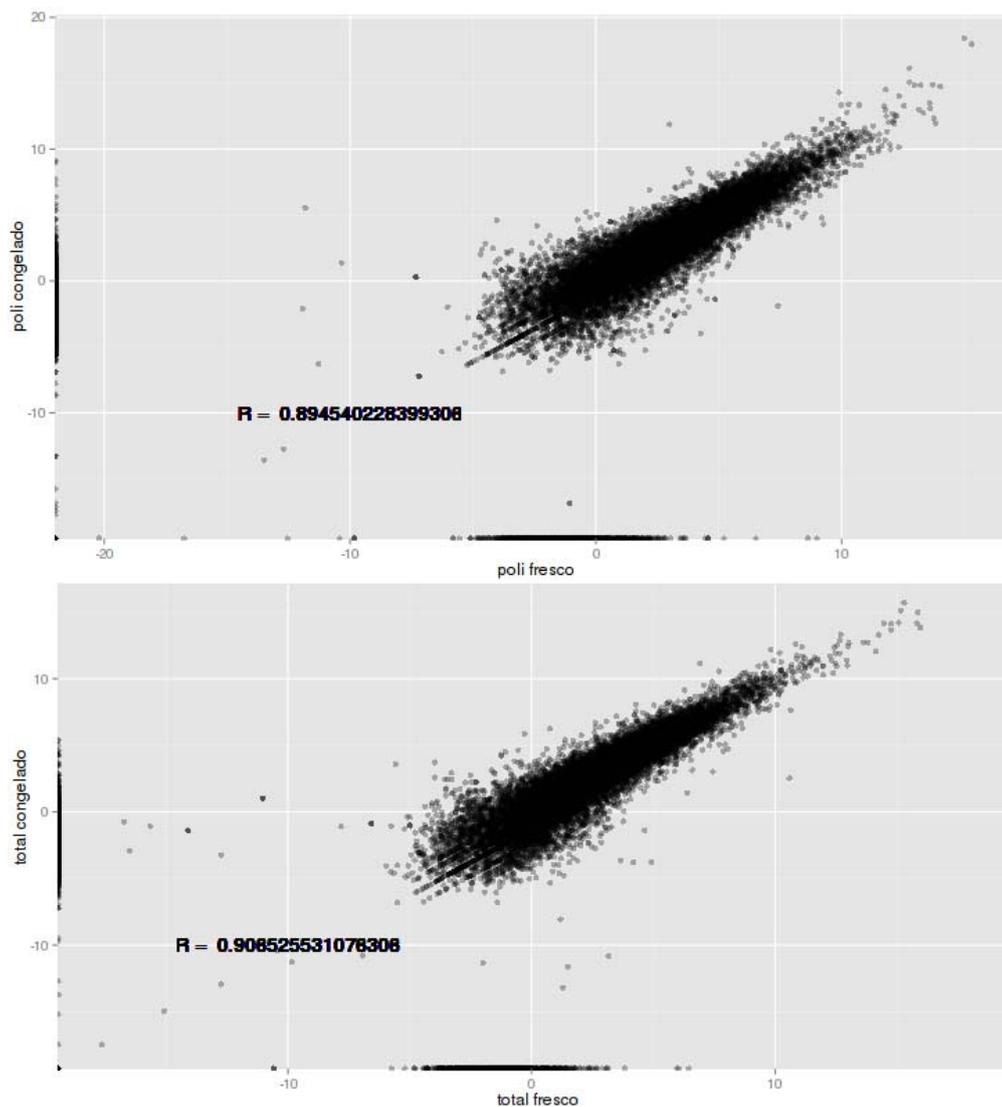


Figura 16 - Correlação entre as populações de RNA. A correlação entre os RNAs polissomais do tecido congelado e do tecido fresco é forte ($R=0,89$), assim como a correlação entre os RNAs totais dos tecidos congelado e fresco ($R=0,9$). Como não há diferença na população de RNAs entre tecido congelado e não congelado, é possível utilizar tecidos guardados no banco para posteriores análises

3.1.3 Conclusões parciais do Capítulo I

A partir destes primeiros experimentos de padronização foi capaz de se estabelecer o melhor protocolo para a purificação dos mRNAs para um futuro sequenciamento. Ao utilizar o kit Oligotex o sequenciamento dos mRNAs teve-se livre o suficiente RNAs ribossomais, com índices acima de 90%.

Verificou-se também que os tecidos congelados em biobanco são compatíveis com a utilização para a nossa técnica proposta, sendo que o congelamento não afetou

a população dos mRNAs totais ou polissomais, como observado nas análises. Assim, ao padronizar e disponibilizar esta técnica na instituição permite-se o desenvolvimento de novos projetos que abordem o controle traducional em tecidos, assim como a continuação deste projeto.

3.2 CAPÍTULO II - PRIMEIRA TRANSLATÔMICA

Após a padronização de todas as etapas necessárias, iniciou-se o trabalho com as amostras dos pacientes. Através de uma colaboração estabelecida com o departamento de neurocirurgia do A. C. Camargo Cancer Center, foi possível a obtenção de uma amostra de grande tamanho e visível heterogeneidade. As amostras foram divididas em oito fragmentos, que após a análise de um patologista foram divididas em alto e baixo graus histológicos. Sendo assim, este capítulo versa sobre a heterogeneidade tumoral neste caso de glioblastoma avaliada através do perfil de mRNAs diferencialmente traduzidos. Esta etapa do trabalho foi realizada concomitantemente aos problemas atingidos durante as etapas de sequenciamento, nas quais foi obtida uma contaminação com RNA ribossomal muito grande. Naquele momento, optou-se por tentar uma abordagem através de microarrays, o que não exigiria a purificação do mRNA.

3.2.1 Material e métodos do Capítulo II

Abaixo, os materiais e os métodos referentes ao capítulo segundo.

3.2.1.1 Extrato para separação polissomal

Os tecidos foram lisados com tampão (20 mM Tris · HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM, DTT, 100 µg/mL ciclohexamida e inibidor de protease) em Politron e centrifugados por 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a separação polissomal. Uma amostra deste sobrenadante foi separada para a análise de RNA total.

3.2.1.1 Separação polissomal

O extrato foi fracionado em um gradiente linear de sacarose 7-47% ou 15%-50%, preparado em 20 mM TrisHCl pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT e centrifugado por 2h30min a 39,000 rpm em uma ultracentrífuga com o rotor SW41Ti (Beckman Coulter) a 4 °C, o que garante que os mRNAs associados a ribossomos estarão separados dos solúveis. A absorbância a 254nm foi detectada em fluxo contínuo e as frações coletadas. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol, da Life Technologies, de acordo com o protocolo sugerido pela empresa.

3.2.1.2 Ensaio Whole Human Genome 4x44K

O perfil de expressão gênica foi avaliado em 32 grids divididos em: 4 amostras de baixo grau em duplicata (fração total e polissomal) e 4 amostras de alto grau em duplicata (fração total e polissomal), utilizando-se a plataforma Whole Human Genome 4x44K (Agilent Technologies, CA, USA), que é composta por 43.376 sequências biológicas e 32 sondas para controles positivos Spike in.

Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo Two-color microarray-based gene expression analysis, utilizando o Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, CA, USA). A pré-síntese de cDNA foi realizada utilizando 800ng de RNA total, 2µL da diluição dos Spikes A e B e 1,2µL de T7 Promoter Primer. A síntese de cDNA consistiu na adição de 5X First Strand Buffer, DTT 0,1M, dNTP mix, 0,5µL da enzima RNase Out e 1µL da enzima MMLV-RT. A transcrição de cDNA para cRNA ocorreu por reação contendo 15,3µL de água estéril, 4X Transcription Buffer, 50% PEG, DDT 0,1M, 8µL de NTP mix, 0,5µL de RNase Out, 0,6µL de Inorganic Pyrophosphatase, 2,4µL de Cy3 ou Cy5 e 0,8 µL da enzima T7 RNA Polimerase. A purificação das sondas ocorreu com a utilização do RNeasy Mini Kit (Quiagen, TE, USA), seguindo as especificações do fabricante. A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras, utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Cerca de 825ng de cada amostra teste foi combinada a 825ng da amostra referência. Foram adicionados 10X Blocking Agent, 25X Fragmentation Buffer e água para um volume final de 55µL. A mistura de hibridação (100µL) foi adicionada às lâminas e estas permaneceram no forno de hibridação por 16 horas, a 37C e

20rpm. A lavagem das lâminas ocorreu em banhos consecutivos nas soluções de Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Acetonitrila (Sigma-Aldrich, MO, USA) e Stabilization and drying solution. Os sinais de fluorescência foram capturados no scanner Agilent, utilizando o software Scan Control 8.1 (Agilent Technologies, CA, USA). Todos os casos preencheram os critérios de qualidade do fabricante, o que inclui, principalmente, análises de background, uniformidade da hibridação, intensidade dos sinais verde e vermelho e variação das duplicatas.

3.2.1.3 Síntese de cDNA e Real-Time PCR

Tratamento do RNA com DNase

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen LifeTechnologies), 1 μ g do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foi acrescentado 1,5 μ L de tampão DNase, 1 μ L de DNase I e água ultrapura na quantidade suficiente para completar 15 μ L de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15min e, em seguida, foi acrescida de 1 μ L de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10min.

Reação de Transcrição Reversa (RT)

A transcrição reversa do RNA total obtido foi realizada em todo o volume da reação anterior, ao qual foi adicionado 1 μ l de Random Primers (50ng/ μ l), 1 μ l de dNTP (10mM) e 1 μ l de oligo(dT)₂₀ (50 μ M). Essa reação ficou por 5min a 65°C e, em seguida, foram adicionados 4,7 μ l de tampão de transcriptase reversa (5X First-Strand Buffer), 1 μ l de DTT (0,1M) e 1 μ l da enzima SuperScript™ III RT (200 U/ μ l). Posteriormente, a mistura foi incubada a 25°C por 5min, seguido de um período de 60 min a 55°C e, finalmente, um período de 15min a 70°C. Ao final, a amostra foi diluída em água ultrapura até a concentração de 10ng/ μ l. Foi feito um pool de mesma concentração contendo cDNA de todas as amostras estudadas.

Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR)

Foram adicionados 2 μ l da reação de RT de cada amostra a uma mistura contendo 5 μ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), 0,2 μ l de primers “forward” e “reverse” (10 μ M) (tabela 1) e o volume foi completado para

12,5µl com água ultrapura. A placa foi lida em Termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram feitas duplicatas experimentais e biológicas para cada amostra.

Para a análise dos dados, foram obtidos, para cada amostra e gene, os valores de Ct em log₂ (Threshold cycle - o ciclo em que o sinal de fluorescência cruza a linha do threshold). A partir desse valor, foram obtidos o Δ Ct (Ct da célula de interesse - Ct do pool) e o $\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct da célula de interesse - Δ Ct de genes endógenos). O valor da expressão gênica de cada amostra pode, então, ser calculado a partir da fórmula $2^{\Delta\Delta$ Ct}.

3.2.1.4 Western Blot

As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel SDS-PAGE com voltagem controlada (65V por 20min e 125V por aproximadamente 90min), utilizando tampão de corrida [Tris 25mM, Glicina (Sigma Aldrich) 191mM, SDS 0,1%]. A porcentagem do gel de poli-acrilamida variou de 7% a 14%, dependendo da proteína a ser analisada.

Para a localização da proteína no gel foi utilizado um marcador de peso molecular (Bio-Rad). Após a corrida, foi feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose 0,45µm (GE Healthcare), utilizando-se voltagem controlada (100V por 1h) e tampão de transferência [Tris 25mM, Glicina 191mM, SDS 0,1%; Metanol (Sigma Aldrich) 20%]. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1h com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T [NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4 e Tween® (Sigma Aldrich) 0,1%]. Foi colocado o anticorpo primário de escolha overnight a 4°C diluídos em solução 5% BSA em TBS-T. As membranas foram lavadas com TBS-T e foi colocado o anticorpo secundário acoplado à peroxidase [anti-Mouse (GE Healthcare) e anti-Rabbit (GE Healthcare)] por 1 hora à temperatura ambiente na diluição de 1:2500 na solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada em TBS-T e revelada com kit de quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific) em filme fotográfico (GE Healthcare). A quantificação densitométrica dos filmes foi realizada pelo software ImageJ e os gráficos gerados expressam a quantidade de proteína relativizada por um controle de carregamento.

3.2.1.5 Análise dos dados

Para a análise das informações de expressão gênica foi realizada a extração dos dados utilizando o programa Feature Extraction 10.1.1.1 (Agilent Technologies, CA, USA) e a obtenção da média da intensidade do sinal corrigida para background para cada canal de cor (log2ratio). Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e as réplicas técnicas apresentaram alta correlação de Pearson, sendo o valor da média das réplicas técnicas obtido para cada sonda. As análises dos perfis diferenciais de expressão entre os tecidos HG e LG foram realizadas usando o software BRB arrays tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), que trata de um pacote integrado para visualização e análise estatística de dados de expressão gênica em microarrays. Os dados foram filtrados e normalizados (método de normalização utilizando a mediana dos arrays como referência), e as análises de bioinformática foram empregadas. A principal análise realizada neste estudo foi a comparação de classes, que teve como objetivo determinar quais eram os genes diferentemente expressos entre classes predefinidas (HG *versus* LG). A comparação de classes entre grupos de amostras foi calculada pelo teste-t, com modelo de variância randômica, e foram consideradas as sondas com valor de p menor que 0.01 e fold change (FC) maior que 2. O agrupamento hierárquico para dois grupos foi realizado com a utilização da métrica distância Euclidiana e da ligação completa.

3.2.1.6 Primers utilizados

COL5A2 - F	AGCAAACCCATCCAGTGTACC
COL5A2 - R	CCATAAGCGAACTGAGACCCTC
ERBB2 - F	TGGAGTTATGGTGTGACTGTGT
ERBB2 - R	ATCAATGGTGCAGATGGGGG
FOXC1 - F	ACTTTGGGGAGATGGCGATT
FOXC1 - R	AGATAGGAGCGGCAGATAGC
HOXB5 - F	ACCCATCTCTCCCTTACCCA
HOXB5 - R	TCACACGTAGCACAGCATCC
ITGA11 - F	AGGTCCCTAAAAGCACTCAAGTACA
ITGA11 - R	TCACGGAAGATGAAGGGGCT
LOX - F	CGACCCCTACTACATCCAGG

LOX - R	CTTTGGGGAAATCTGAGCAGC
WISP1 - F	TGTGTAGCGTGGAATGTGTTTG
WISP1 - R	ACAAGAAAAGCCACCAACTCC
FGF1 - F	GGCTCCCTTTTGTCTTCCT
FGF1 - R	ATGCTGCCTTCCTAACCTGG
HEYL - F	CGCCTGAGATCCTGTTCACC
HEYL - R	CTGTTCTGCTGGGAACGACT
NTRK2 - F	CCTGGAATTGACGATGGTGC
NTRK2 - R	ACTTCTGTTCGTGGTGTCCC
BMP7 - F	ATAGGAGGTCTGATGGGTGC
BMP7 - R	TCGGGACACTTGGTTAGGATG
NFKB1 - F	CCTACGATGGAACCACACCC
NFKB1 - R	ATCTGCTCCTGCTGCTTTGA
GAPDH - F	TGCACCACCAACTGCTTAG
GAPDH - R	GAGGCAGGGATGATGTTC
HPRT1 - F	TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG
HPRT1 - R	GGCCTCCCATCTCCTTCATC
GUSB - F	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT
GUSB - R	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
ACTB - F	TTCCTGGGCATGGAGTC
ACTB - R	CAGGTCTTTGCGGATGTC

3.2.1.7 Casuística

Foi utilizado o tecido de apenas um paciente, do projeto com o número de aprovação no Comitê de Ética 1692/12.

3.2.2 Resultados e discussão do Capítulo II

Aqui, encontram-se os resultados e as discussões obtidos a partir dos experimentos realizados e supramencionados.

3.2.2.1 Descrição do primeiro caso clínico e obtenção do RNA polissomal

A partir da colaboração estabelecida com o departamento de neurocirurgia do A.C.Camargo Cancer Center, aprovada pelo Comitê de Ética com número 1962/12, foi possível a obtenção de tecido de astrocitomas provenientes das cirurgias realizadas no serviço. Através desta colaboração, teve-se acesso a um tecido tumoral de uma paciente com um tumor de grandes dimensões.

A paciente tinha 47 anos e, 6 meses antes do primeiro contato com o Cancer Center, passou por uma cirurgia em outro hospital. Na ocasião, teve ressecado um oligoastrocitoma anaplásico grau III, com um índice proliferativo medido pelo KI-67 de 40%. A paciente foi encaminhada ao Cancer Center para dar início à quimioterapia e à radioterapia, mas antes do início do tratamento foi detectada uma recorrência do tumor, sendo este novamente ressecado. Nesta segunda cirurgia, o laudo anatomopatológico indicou que se tratava de um glioblastoma e, a partir do procedimento, obteve-se o material estudado. O tecido obtido foi dividido em oito fragmentos, de 1cm³ cada, de acordo com características morfológicas macroscópicas, sendo que cada um destes fragmentos recebeu um número (1-8) para uma fácil identificação.

Foi realizada a análise histopatológica dos fragmentos, sendo as amostras de 1 a 4 classificadas como de alto grau e as de 5 a 8 como de baixo grau. Estas divisões foram feitas por um patologista, baseadas nas características de celularidade, pleomorfismo nuclear, proliferação endotelial e presença de necrose em pseudopaliçada. Cada fragmento foi submetido à lise, e uma fração deste lisado foi guardada para a extração do RNA total, sendo feito um perfil polissomal de cada lisado. O perfil polissomal foi realizado com sucesso para todas as amostras (Figura 17).

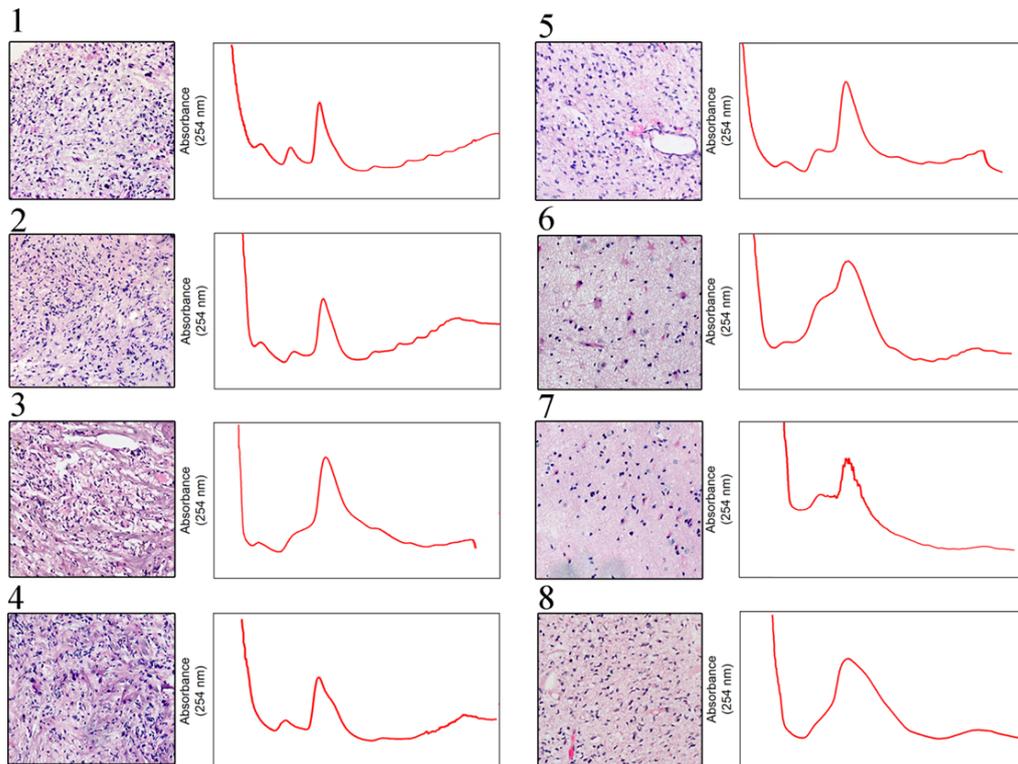


Figura 17 - Perfis polissomais de um glioblastoma. Uma amostra de glioblastoma humano foi dissecada em regiões diferentes com base na aparência macroscópica do tecido. As oito regiões do mesmo tumor foram submetidas à separação por ultracentrifugação de densidade num gradiente de sacarose a 7%-47%.

Para verificar se havia diferença nos níveis de tradução entre os tumores considerados de alto e baixo grau fez-se a quantificação dos gráficos polissomais, considerando, para isso, o pico referente ao 80s e o pico referente aos polissomos. Pode-se perceber que a razão polissomos/80s, que mede a taxa traducional, é maior nos casos de alto grau (Figura 18), com uma diferença estatisticamente significativa, o que indica que há mais polissomos nestes casos, ou seja, a tradução proteica está mais ativa nestes fragmentos caracterizados como de alto grau histológico.

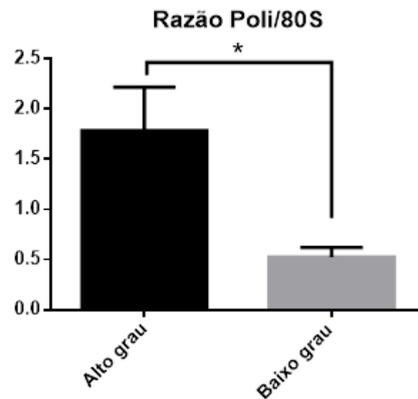


Figura 18 - Taxa traducional dos tecidos. A relação entre os picos polissomal e 80s dos tecidos foi analisada, e esta relação indica a quantidade relativa de polissomos baseado no pico de 80s. No gráfico estão expressas as barras de erro. Test T de Student $p=0,02$.

Foi feito também um ensaio de western blot destes fragmentos, visando observar as vias de mTOR (Figura 19) e de ERK (Figura 20) envolvidas com o controle da tradução. Considerando que os fragmentos numerados de 1 a 4 foram compreendidos como de alto grau histológico, e os numerados de 5 a 8 de baixo grau histológico, observa-se, nas quantificações, que não houve uma diferença na fosforilação das proteínas estudadas entre os diferentes graus histológicos. Pode-se também observar que os níveis de AKT total são maiores nos tecidos considerados de maior grau histológico, dado já visto em uma publicação do grupo (ALVARENGA et al. 2017), na qual a expressão de AKT se mostra aumentada em GBMs, estando correlacionada a uma sobrevida mais baixa.

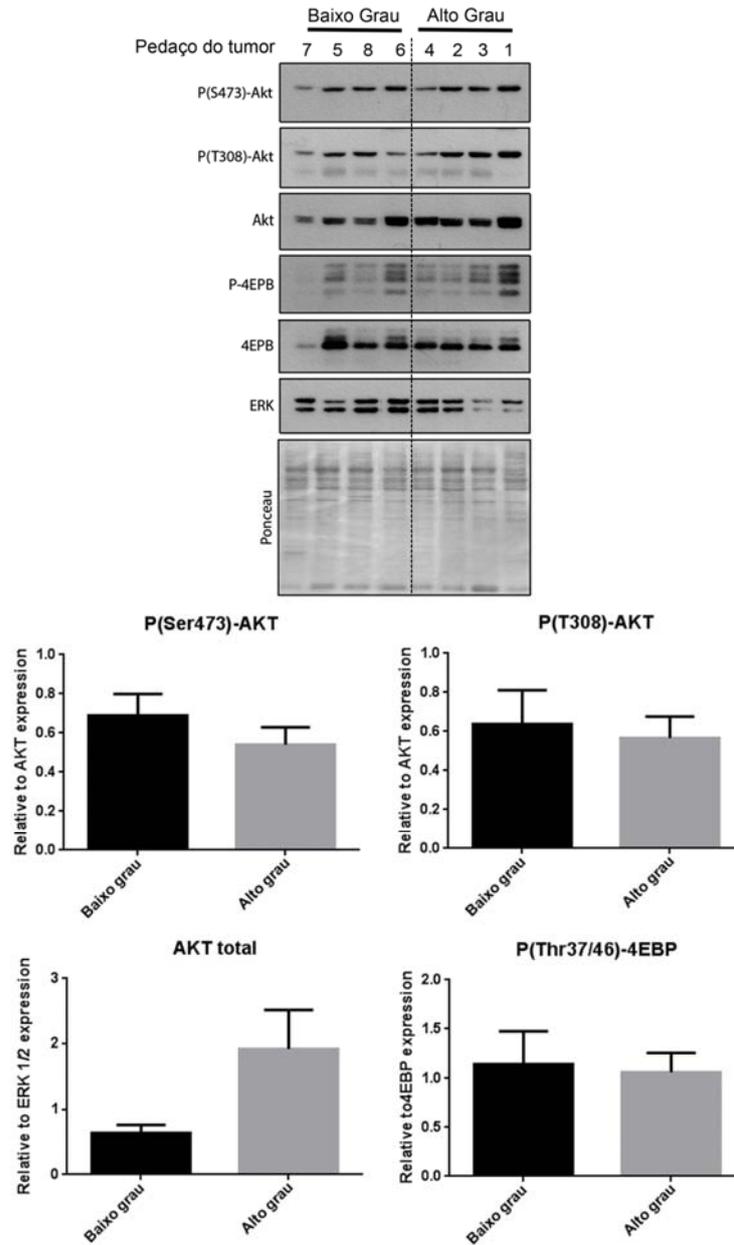


Figura 19 - Ensaio de western blot para as proteínas da via de mTOR. Utilizou-se fragmentos dos fragmentos analisados, relativos a baixo e alto graus histológicos. A quantificação foi realizada pelo software ImageJ.

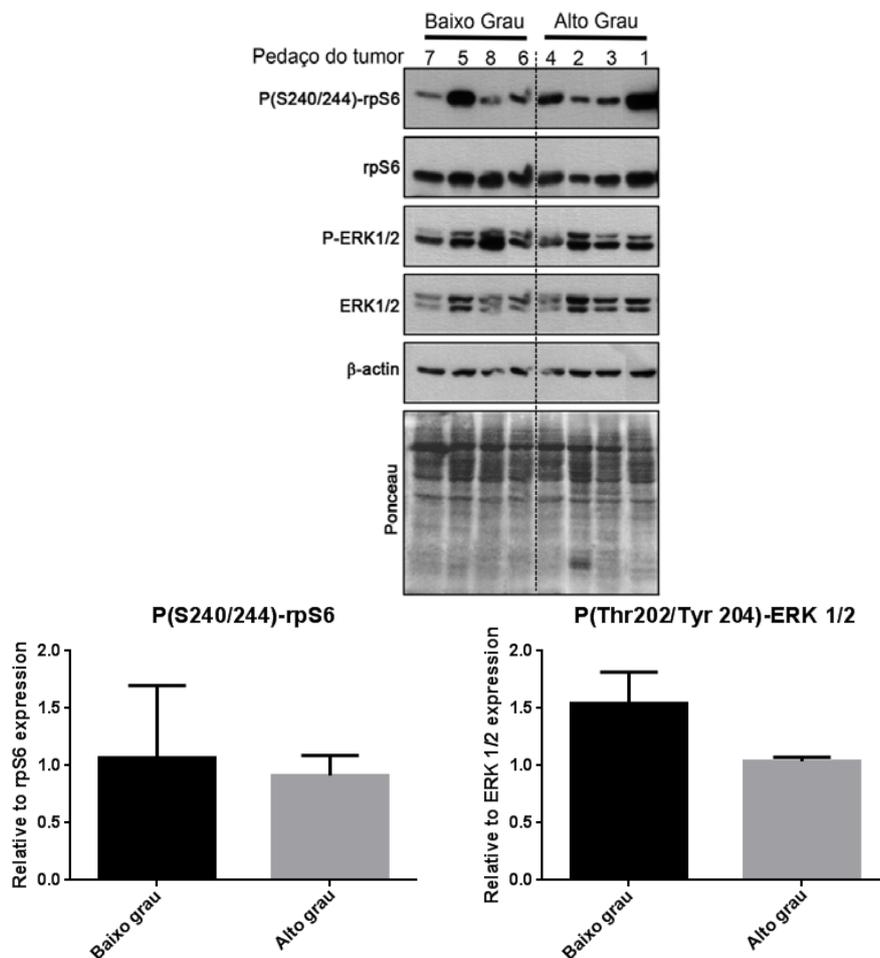


Figura 20 - Ensaio de western blot para as proteínas da via de ERK 1/2. Foram utilizados fragmentos dos fragmentos analisados, relativos a baixo e alto graus histológicos. A quantificação foi realizada pelo software ImageJ.

Partindo, então, para a análise dos RNAs, as frações relativas aos polissomos foram isoladas, sendo feita a extração do RNA com o reagente TRIzol, tanto do RNA total quanto do polissomal. A seguir, o RNA total e o polissomal foram extraídos e a qualidade foi verificada no equipamento Bioanalyzer (Figura 21), sendo os RNAs dosados em Nanodrop™. Obteve-se boa quantidade de RNA, compatível com a continuação do experimento (Tabela 3), assim como a qualidade dos RNAs também estava boa, analisada a partir do RIN, dado fornecido pela corrida do bioanalyzer.

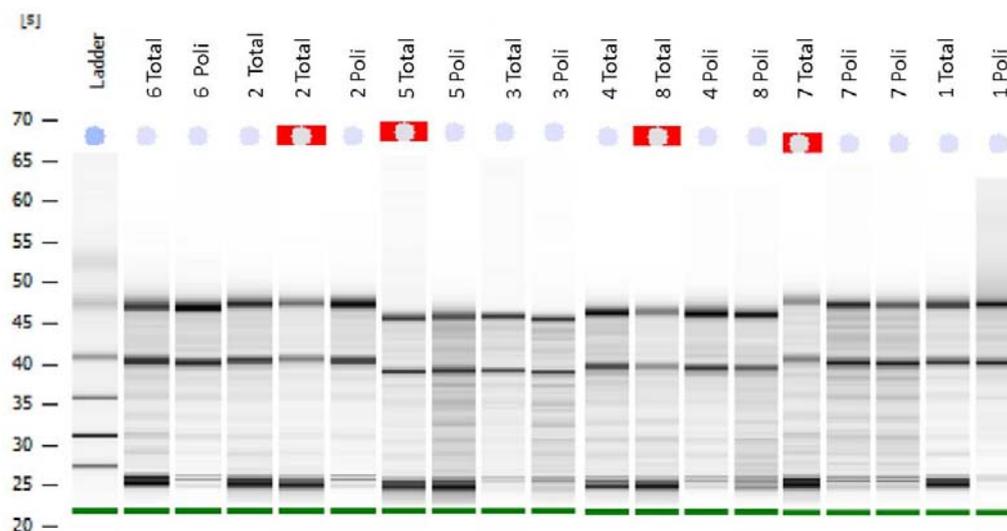


Figura 21 - Corrida de Bioanalyzer das amostras submetidas ao ensaio de microarray. Na imagem podemos inferir a qualidade do RNA pelas bandas de 18s e 28s do RNA ribossomal. Todos os fragmentos do tecido submetidos à análise apresentaram qualidade suficiente para o ensaio de microarray.

Tabela 3 - Concentração e quantidade total dos RNAs. A concentração foi medida pelo aparelho Nanodrop.

Fragmento	RNA total		RNA polissomal	
	Concentração (ng/μl)	Total de RNA (μg)	Concentração (ng/μl)	Total de RNA (μg)
1	100	5	30	1,5
2	14	0,7	19	0,95
3	82	4,1	74,2	3,7
4	26	1,3	42	2,25
5	102	5,1	199,2	9,96
6	135	6,75	38	1,9
7	200	10	90	4,5
8	34	1,7	18	0,9

3.2.2.2 Análise de translômica do primeiro caso de glioblastoma utilizando microarray da plataforma Agilent 4x44K

Devido às dificuldades relatadas acima, encontradas com o sequenciamento das amostras, padronizou-se também ensaios de microarray para avaliar a expressão dos RNAs polissomais. Algumas vantagens foram cruciais para que se optasse por tentar padronizar também esta tecnologia. São elas:

1. O microarray possui um custo bem menor em relação ao sequenciamento;
2. A análise dos microarrays é mais simplificada, dispensando o auxílio de bioinformatas e;
3. Os ensaios de microarray não são prejudicados pela presença de RNA ribossomal, dispensando as estratégias de depleção deste tipo de RNA.

O microarray foi realizado na instituição em colaboração com o laboratório da professora Dra. Silvia Rogatto, que já havia padronizado esta técnica. Utilizou-se uma plataforma de microarray de duas cores, o que permitiu sempre analisar cada uma das amostras juntamente com uma amostra de referência, no caso de RNA obtido da linhagem celular LN-229. Optou-se por utilizar uma linhagem celular, pois isso torna possível a obtenção de grande quantidade de RNA de uma única vez, sendo a amostra de referência utilizada sempre a mesma, diminuindo possíveis artefatos da técnica. Deste modo, obteve-se sempre uma relação entre a amostra analisada e o RNA da linhagem celular. Infelizmente, por problemas metodológicos, não foi possível analisar 2 amostras, os fragmentos 3 e 6. Então, a partir deste momento, as análises referem-se a 6 fragmentos no total.

A partir dos RNAs obtidos, fez-se o ensaio de microarray utilizando a plataforma Agilent 4 x 44k - two colors, de acordo com as especificações do fabricante, e as análises foram realizadas no BRB-ArrayTools. Este software permite fazer clusters não supervisionados das amostras. Realizou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP), ou Principal Component Analysis (PCA), procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas e chamadas de componentes principais. Esta transformação ocorre de forma que o primeiro componente principal (PC1) tem a maior variância possível (ou seja, é responsável

pelo máximo de variabilidade nos dados); o segundo componente principal (PC2) tem, portanto, a segunda maior variância possível, e assim sucessivamente. Observa-se na Figura 24 a utilização de PC1 e PC3 em que os tecidos polissomais se agrupam, juntos, e os totais também, ressaltando que a diferença entre o RNA total e o RNA polissomal é maior que a diferença entre graus histológicos.

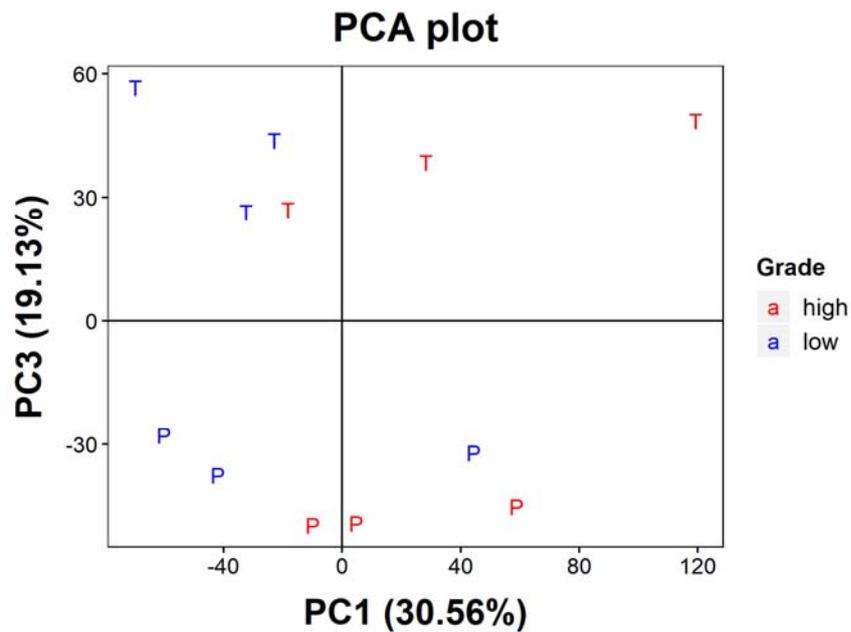


Figura 22 - Análise de Componentes Principais. Os diferentes fragmentos foram analisados e divididos de acordo com as principais diferenças entre eles. Pode-se observar em azul os tecidos classificados como sendo de baixo grau histológico e em vermelho os de alto grau. Vê-se que os tecidos polissomais agrupam-se, juntos, e os totais também.

Quando realizada a análise das amostras apenas do RNA polissomal, obteve-se 2 grupos distintos, relativos ao que se considera como amostras de alto e baixo grau (Figura 23).

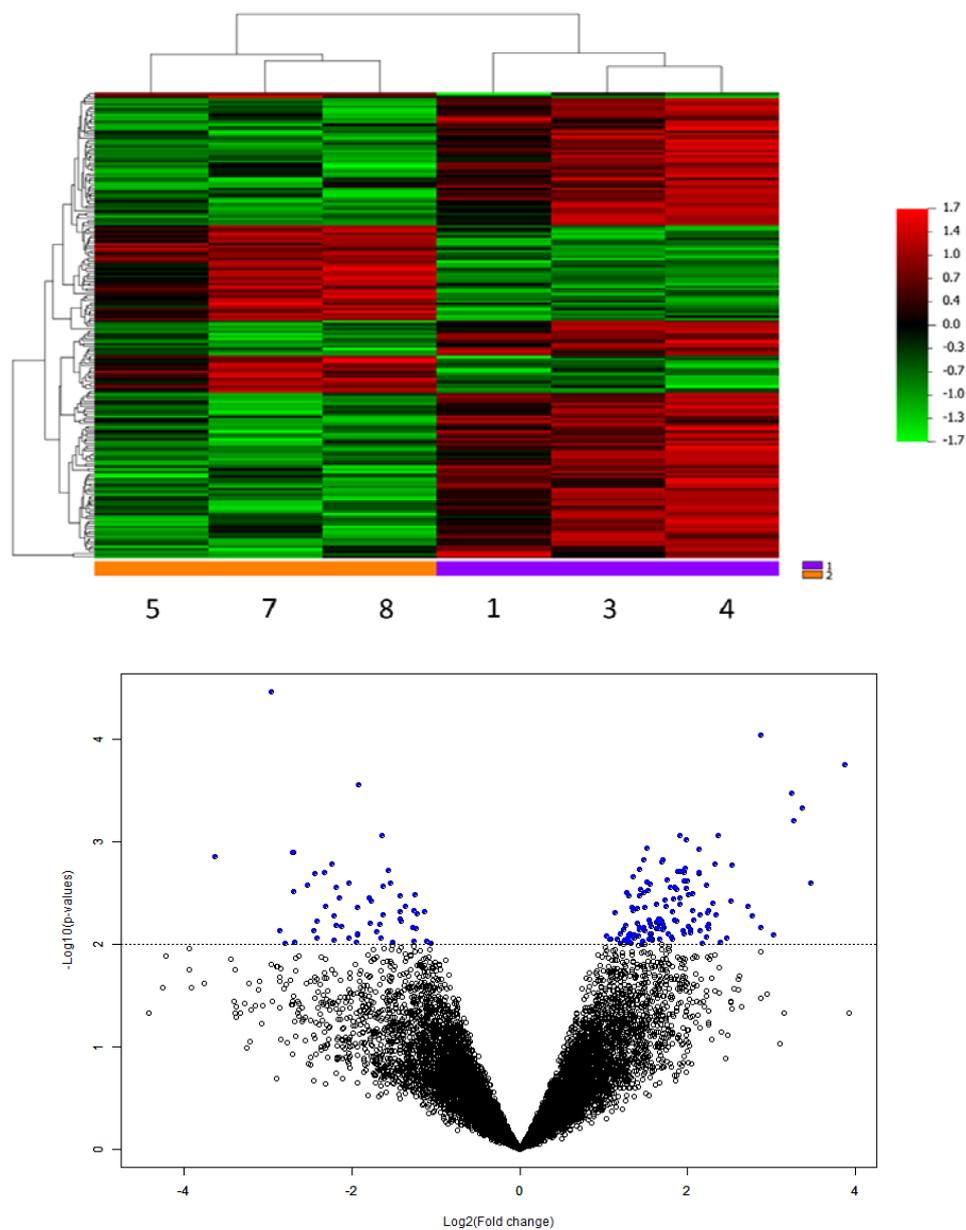


Figura 23 - Os RNAs polissomais purificados das amostras foram submetidos à análise de microarray. Foram encontrados 138 genes diferencialmente traduzidos ($p < 0.01$). Os tumores de alto grau foram agrupados e os de baixo grau também.

As amostras 1, 3 e 4 foram agrupadas, sendo alta a correlação entre elas. O mesmo ocorreu com o outro grupo de amostras, uma evidência de que há semelhanças moleculares que distinguem os dois grupos, concordando com a separação morfológica. Isso ainda se deu, da mesma forma, quando foram analisados

os RNAs totais, porém com um número menor de genes diferencialmente expressos (Figura 24).

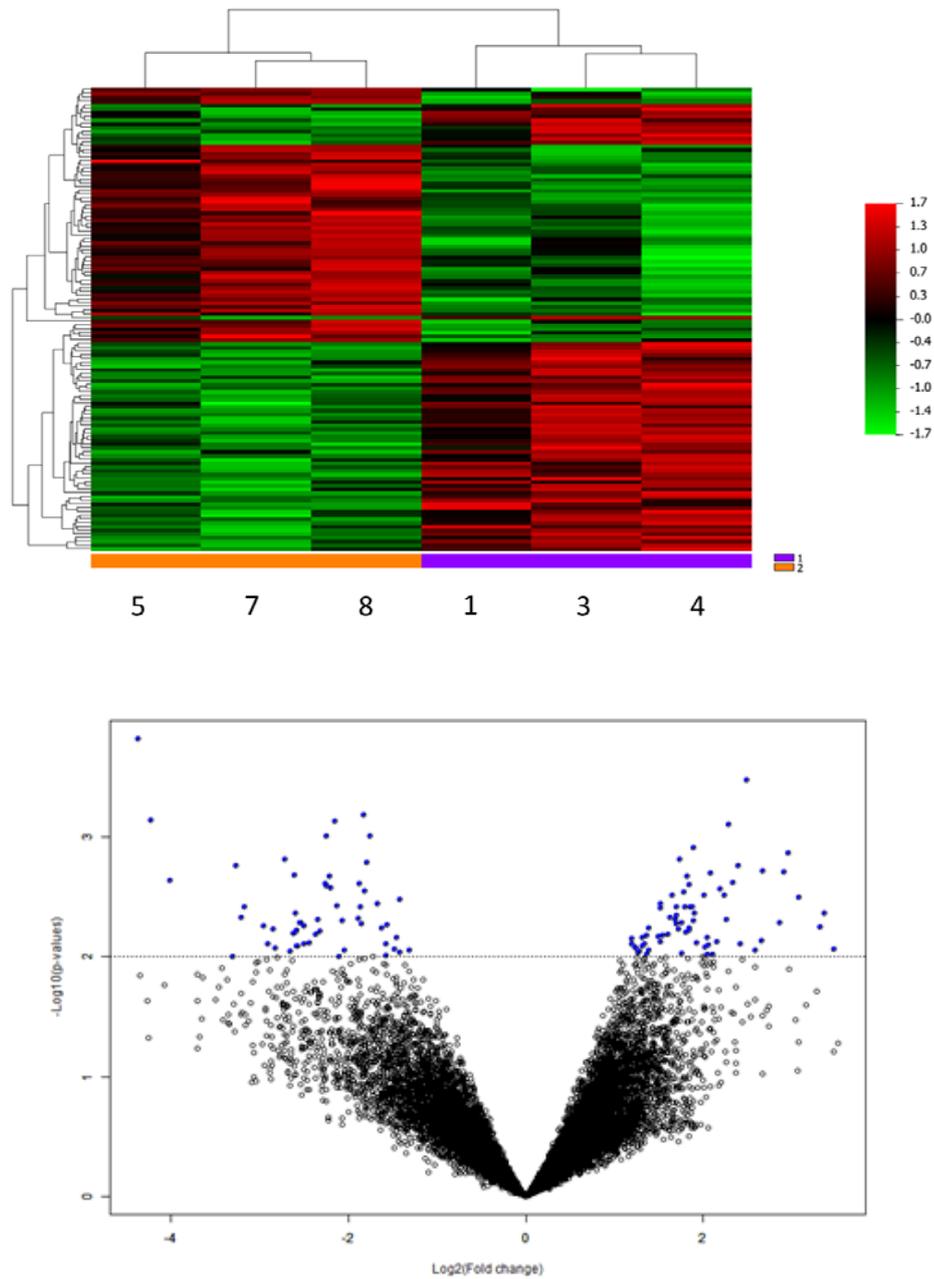


Figura 24 - Os RNAs totais purificados das amostras foram submetidos à análise de microarray. Foram encontrados 43 genes diferencialmente transcritos ($p < 0.01$). Os tumores de alto grau foram agrupados e os de baixo grau também.

Quando comparados estes dois grupos, de alto e baixo grau, quanto aos genes diferencialmente expressos, observou-se que na análise de RNA total há 43 genes diferencialmente expressos, observou-se que na análise de RNA total há 43 genes diferencialmente expressos. Já quando analisados os RNAs polissomais, foram encontrados 138 genes diferencialmente traduzidos, sendo que 12 destes são encontrados tanto na análise de RNA total quanto na dos RNAs polissomais (Figura 25).

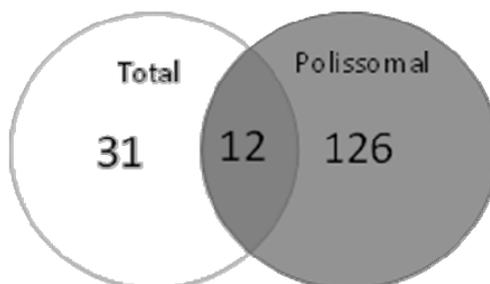


Figura 25 - O RNA purificado das amostras foi submetido à análise de microarray. 31 genes foram encontrados diferencialmente expressos para o RNA total, enquanto que 138 genes diferencialmente traduzidos foram encontrados para o RNA polissomal. Foram encontrados 12 genes em comum nas análises.

Fez-se também as análises de vias de sinalização alteradas no Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), a partir das quais identificou-se diversas vias alteradas (Figura 26). Para esta análise foram comparados sempre os tecidos de alto grau histológico contra os de baixo grau. A análise dos RNAs totais mostra a alteração das vias de metabolismo de carboidratos e lipídios, câncer e vias de manutenção celular. Já a análise dos RNAs diferencialmente traduzidos mostra a alteração das vias de movimento, crescimento e proliferação celular, mais ativas nos tecidos de alto grau histológico. É necessário ressaltar ainda que os p-values obtidos nas análises com o RNA polissomal são muito mais significativos do que os observados com o RNA total. Deste modo, com estes experimentos teve-se sucesso ao se analisar um tecido tumoral humano utilizando a técnica de translátômica, demonstrando que a regulação traducional de genes é um fator importante nestes tumores.

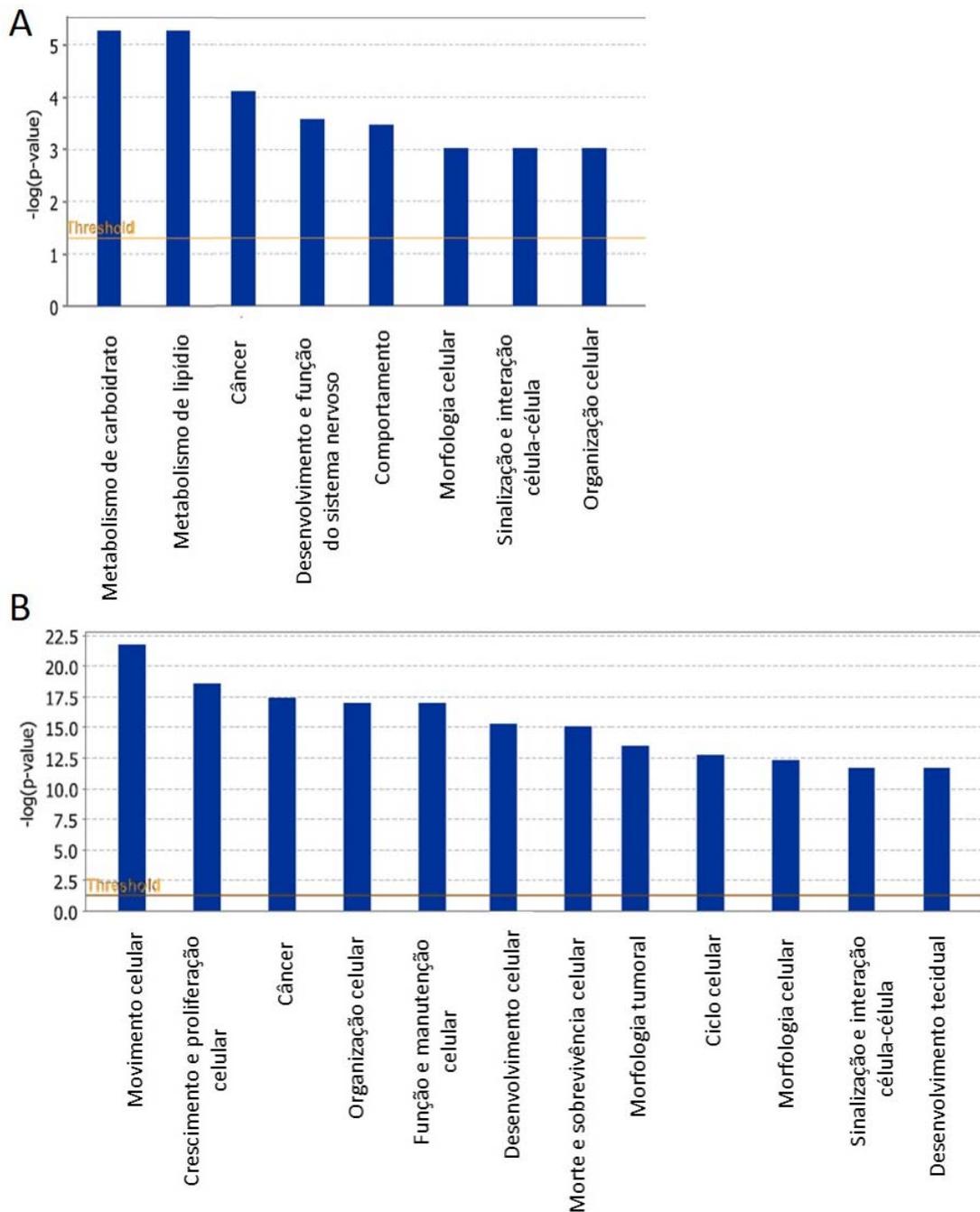


Figura 26 - Análise de funções alteradas, comparando tecidos de alto grau contra os de baixo grau. A: a análise dos RNAs diferencialmente expressos (totais) mostra a alteração das vias de metabolismo de carboidratos e lipídios, câncer e vias de manutenção celular. B: a análise dos RNAs diferencialmente traduzidos (polissomais) mostra a alteração das vias de movimento, crescimento e proliferação celular. Os fatores acima do limite de corte (threshold) estão mais expressos nos tecidos de alto grau.

A via de TGF β foi uma das vias analisadas, pois continha mais RNAs diferencialmente traduzidos. Considera-se, então, que os genes encontrados alterados diferem entre o RNA total e o RNA polissomal (Figura 25), sendo apenas 12 em comum, lembrando que os tecidos vieram de uma mesma paciente, e esse número indica que realmente ocorreu um controle traducional nos RNAs. Assim, ao se utilizar a técnica da translátômica é possível de serem identificados mais genes (Figura 27) diferencialmente expressos. Nota-se que ao se utilizar o RNA polissomal a análise é aprimorada, por encontrar um maior número de genes diferencialmente expressos, podendo encontrar diversas funções relacionadas ao desenvolvimento tumoral e celular e dar origem a estudos mais específicos sobre as vias efetivamente ativas no processo tumoral.

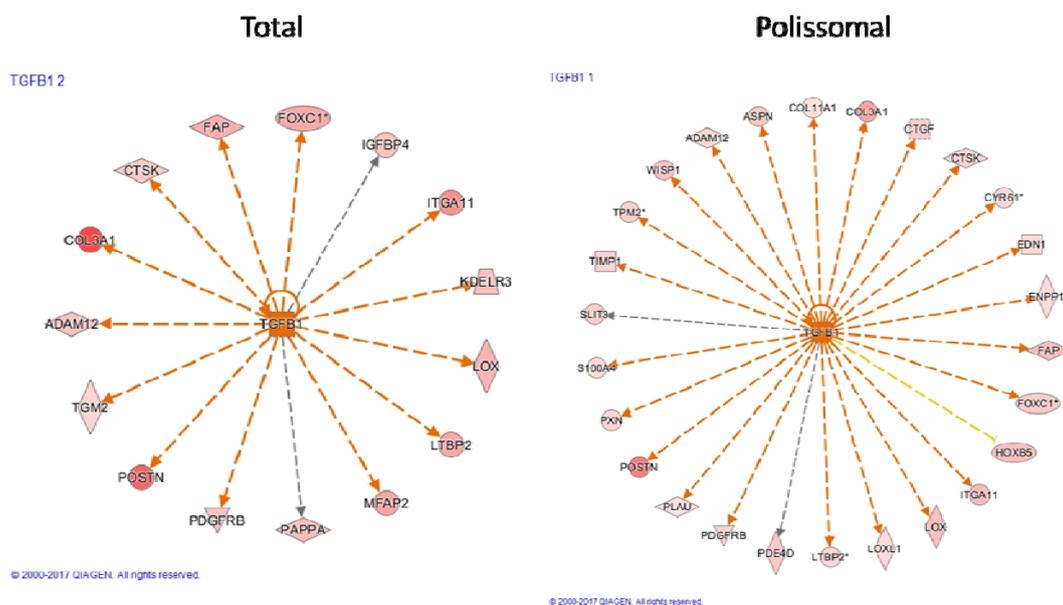


Figura 27 - Via de sinalização encontrada alterada no glioblastoma analisado. Genes relacionados com a via de sinalização TGF β diferencialmente expressos foram identificados pela análise com o software IPA. É possível observar que a análise dos RNAs polissomais foi capaz de encontrar um número maior de genes alterados nesta via. Foram encontrados apenas genes mais expressos nos tecidos de alto grau (vermelho). Os genes mais expressos nos tecidos de baixo grau estariam representados em verde.

Na literatura, a via de TGF β já foi descrita como um fator de pior sobrevida em glioblastomas (RODÓN et al. 2014). Na presente análise ela foi também encontrada nos tecidos de maior grau histológico, podendo evidenciar a relação entre a evolução do tumor nestas áreas e a sua progressão.

Vê-se também que em um mesmo tumor foram obtidas regiões diferentes, evidenciando a heterogeneidade tumoral existente nos glioblastomas. Comparando os tecidos de alto grau contra os de baixo grau, alcançou-se diversas vias de sinalização alteradas (Figuras 25 e 26), inclusive a via de TGF β , mais ativa nos tecidos de alto grau. Na literatura, essa heterogeneidade já foi descrita (PATEL et al. 2014; QAZI et al. 2017; TENG et al. 2017), e estes estudos revelam, inclusive, que diferentes subtipos realmente residem dentro do mesmo tumor. A heterogeneidade pode, assim, até ser considerada uma das razões para a alta recorrência destes tumores e à resistência à terapia.

Para a validação dos resultados obtidos pelo microarray, realizou-se experimentos de Real-Time PCR (Tabelas 4 e 5). Os genes escolhidos para esta validação foram aqueles com maior fold-change entre as comparações dos tecidos de alto grau histológico e as de baixo grau, de vias já descritas como envolvidas em crescimento, sobrevivência, entre outras. Os genes *FOXCl*, *HOXB5*, *WISPI*, *ITGA11*, *COL5A2*, *BMP7*, *NTRK2* e *HEYL* foram selecionados entre os diferencialmente traduzidos (RNA polissomal), o gene *FGF1* foi selecionado entre os diferencialmente transcritos (RNA total), o gene *LOX* foi selecionado entre os diferencialmente transcritos e traduzidos (ambas as amostras) e os genes *ERBB2* e *NFkB* foram selecionados como genes que não apresentam alterações em nenhuma das amostras.

Para a seleção dos controles internos da reação, fez-se uma placa com 3 amostras totais e 3 amostras polissomais, com 7 genes: *RPL35*, *TUB*, *ACTB*, *HPRT*, *GAPDH*, *GUSB* e *HMB*. Com estes resultados, escolheu-se os dois genes com menor variação entre as amostras: *ACTB* e *HPRT*. Gerou-se, então, estes genes para todas as amostras, sendo utilizados como controles endógenos para a comparação com os outros genes.

Foram Realizados os experimentos para todos os genes escolhidos. Vê-se nas Tabelas 2 e 3 os resultados obtidos para o microarray e para o real-time. Para valores

no real-time acima de 2 pode-se considerar que houve aumento, e para valores abaixo de 0,5 que houve diminuição nas amostras “high grade” em comparação às “low grade”. Assim, observa-se que todos os genes analisados foram validados.

Tabela 4 - Validação da técnica de microarray, através de qPCR. Foram validadas as amostras polissomais.

<i>Polissomais</i>	<i>Fold-Change (High/Low)</i>	
	Microarray	Real-time
<i>FOXC1</i>	3.79	3.11
<i>HOXB5</i>	5.56	2.95
<i>LOX</i>	5.83	1.5
<i>WISP1</i>	5.60	2.42
<i>ITGA11</i>	5.83	2.76
<i>COL5A2</i>	6.14	2.9
<i>BMP7</i>	0.43	0.41
<i>NTRK2</i>	0.39	0.22
<i>HEYL</i>	2.39	1.59
<i>ERBB2</i>	No significant change	No significant change
<i>NFkB</i>	No significant change	No significant change

Tabela 5 - Validação da técnica de microarray, através de qPCR. Foram validadas as amostras totais.

<i>Totais</i>	<i>Fold-Change (High/Low)</i>	
	Microarray	Real-time
<i>LOX</i>	4.35	4.11
<i>FGF1</i>	0.15	0.16
<i>NFkB</i>	No significant change	No significant change
<i>ERBB2</i>	No significant change	No significant change

Para verificar se estes genes encontrados diferencialmente traduzidos estariam sob controle da maquinaria de mTOR, realizou-se um ensaio *in vitro*. Para este experimento, foi escolhido o gradiente de sacarose 15%-50%, pois com ele a porção polissomal sofre uma maior separação, e como se pretende diferenciar os

polissomos abaixo de 3n e acima de 3n esta foi a melhor opção. Após a separação polissomal em perfil de sacarose (Figura 28), as frações são identificadas ente 80s, fração leve (light) de polissomos (2n e 3n) e fração pesada (heavy) de polissomos (acima de 3n), sempre utilizando o RNA total também como controle. Dessas frações foram extraídos o RNA para a síntese do cDNA.

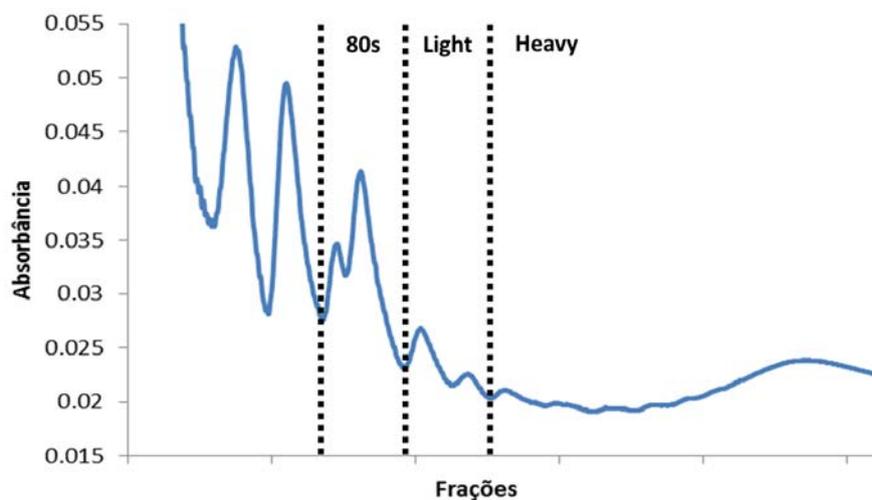


Figura 28 - Perfil polissomal realizado em gradiente 15%-50%. Estão evidenciadas as regiões relativas ao 80s, polissomos leves (light) e polissomos pesados (heavy).

Como uma primeira etapa, foi realizada uma qPCR com diversos genes endógenos para que fosse possível verificar quais teriam uma expressão constante ao longo do perfil polissomal (Figura 28). Notou-se que alguns genes apresentam uma expressão constante (B2M, TBP1, ACTB, HPRT) e outros apresentam variação (TUB). Decidiu-se utilizar para controle endógeno os genes B2M e TBP1, pois apresentaram a menor variação, evidenciados na Figura 29.

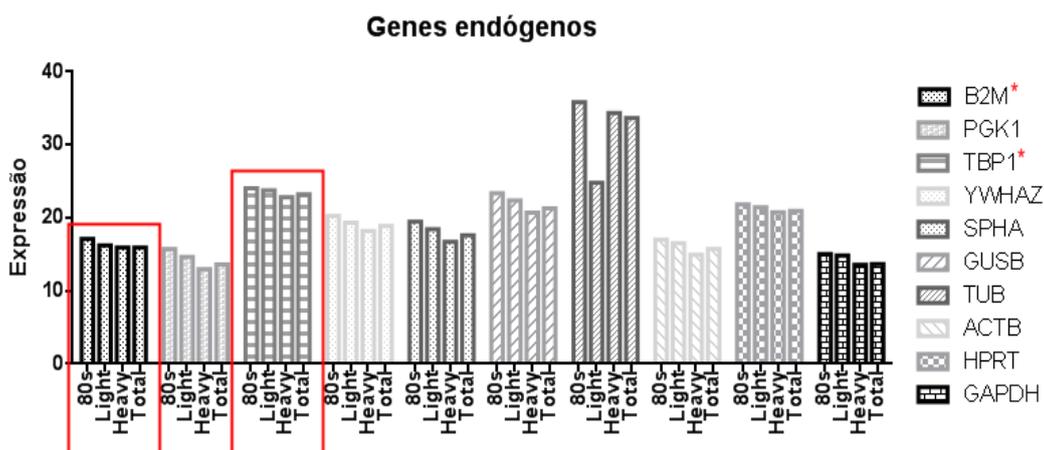


Figura 29 - Avaliação da variação na qPCR dos genes endógenos. Foram avaliados genes descritos como endógenos na literatura para a verificação das menores variações ao longo das frações obtidas no perfil.

Fez-se um tratamento nas células com o inibidor de mTOR Torina para avaliar se os genes encontrados diferencialmente traduzidos nos tecidos estão sob controle traducional de mTOR. A célula U87MG foi tratada com Soro Fetal Bovino (FCS) apenas, ou em combinação com a Torina (Figura 30). Com o tratamento apenas com o FCS observou-se um aumento na fosforilação de P70S6K e 4E-BP, alvos de mTOR, mostrando que a via foi ativada. Quando é adicionada a Torina ao tratamento nota-se uma drástica redução na fosforilação destas proteínas, mostrando a eficácia da inibição de mTOR.

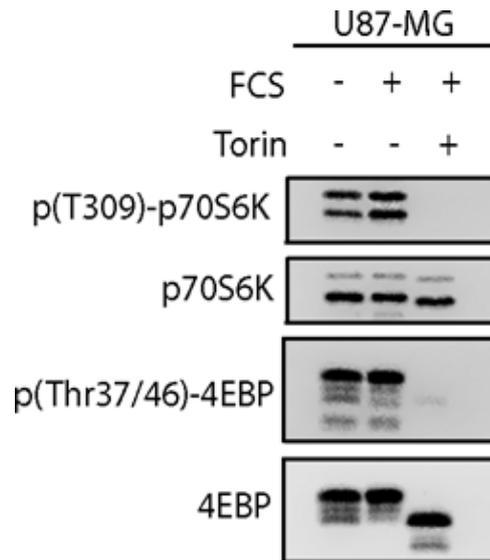


Figura 30 - Células tratadas com Soro Fetal Bovino (FCS) e Torina, um inibidor de mTOR. As células U87-MG foram tratadas por 6 horas para depois ser realizado o extrato. Pode-se observar a perda de fosforilação das proteínas alvo de mTOR, p70S6K e 4E-BP frente ao tratamento com Torina.

Foi feita a separação polissomal dos extratos celulares em perfil 15%-50% (Figura 31). Compreende-se, no tratamento com SFB, um aumento nos polissomos e diminuição no pico de 80s, evidenciando um aumento na tradução. Já no tratamento com Torina, há um aumento do pico 80s e diminuição dos polissomos, evidenciando um bloqueio na tradução.

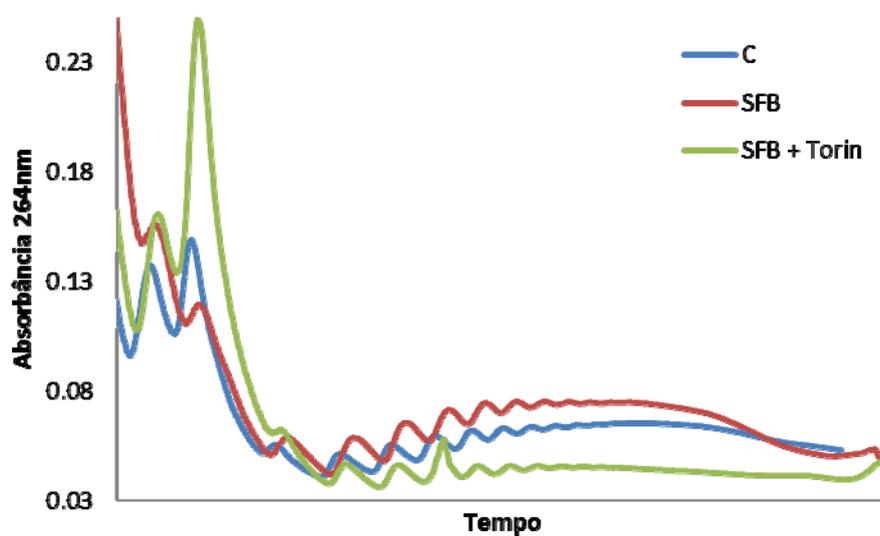


Figura 31 - Perfil polissomal da célula U87-MG. As células foram tratadas ou não com o inibidor de mTOR, Torina, e Soro Fetal Bovino (SFB). Os extratos foram submetidos à separação por densidade em gradiente de sacarose 15%-50% através de ultracentrifugação. A absorbância foi medida a 254nm. Estão representados os perfis de células tratadas com veículo (DMSO), SFB e Torina.

A partir deste perfil foram selecionadas as frações correspondentes ao pico 80s, aos polissomos leves (light) (2n e 3n) e aos polissomos pesados (heavy) (>3n). O RNA foi extraído destas condições, juntamente com o RNA total, não submetido à separação polissomal. Esse RNA foi quantificado e foi feito o cDNA a partir deles. Assim, iniciou-se os experimentos de real-time. Escolheu-se 3 genes cujo mRNA já é descrito como 5' TOP, ou seja, controlado por mTOR (NAP1L1, RPL13 e RPL35), e os genes já validados na análise como diferencialmente traduzidos entre os tecidos de baixo e alto grau. Para a comparação foi relativizado o valor obtido na real-time dos polissomos pesados (acima de 3n) com o RNA total (Figura 32). Pode-se observar que os genes controlados por mTOR, marcados com o quadrado vermelho, sofrem grande redução na expressão sob o tratamento de Torina, o que não acontece com os genes encontrados na análise do caso descrito no capítulo.

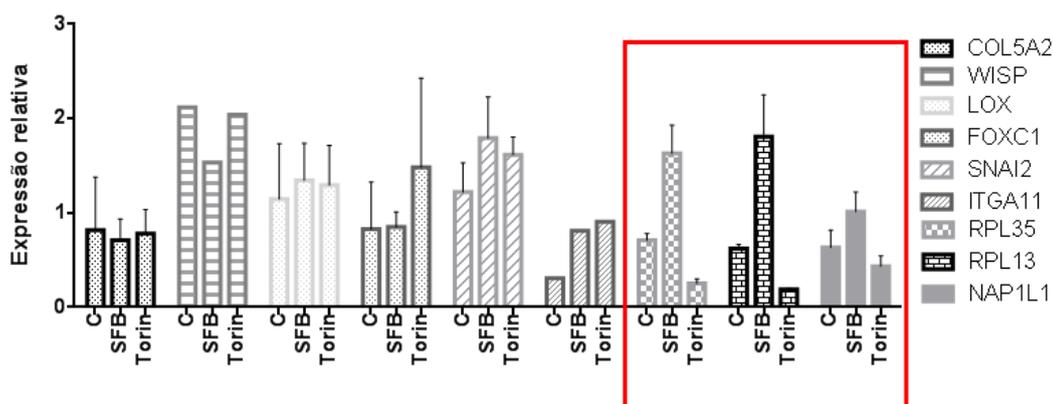


Figura 32 - Expressão dos genes avaliada por qPCR. Foram analisados os genes diferencialmente traduzidos para avaliar a regulação por mTOR. Apenas os genes utilizados como controle mostraram regulação por mTOR. Os genes encontrados na análise não estão sob regulação de mTOR.

Esse resultado concorda com o obtido no western blot, já que não foram encontradas diferenças na fosforilação das proteínas alvo de mTOR neste caso. Estes genes diferencialmente traduzidos estariam então sob controle de outra maquinaria, não mTOR. Assim, procurou-se na literatura e em outros trabalhos do laboratório listas de genes cuja tradução poderia ser regulada por outras vias. Para estudar os genes regulados por RSK1, RSK2 ou ambas, foi contemplado um estudo realizado em nosso laboratório, ainda não publicado, utilizando a linhagem celular LN-18 nocaute para estas proteínas. Neste mesmo estudo também foram analisados os genes regulados pela Torina (possíveis 5' TOP) na linhagem celular LN-18. Utilizou-se também bancos de dados em que foram observados genes cuja tradução era dependente de eIF2 α . Para estudar outras regulações buscou-se outros trabalhos e também outros bancos de dados de genes 5' TOP, tais como os de Paolini (PAOLINI et al. 2018), os de Hsieh (HSIEH et al. 2012) e de Yamashita (YAMASHITA et al. 2008), respectivamente. Os genes encontrados diferentemente traduzidos com esses bancos de dados foram comparados (Figura 33), o que possibilitou observar que a maioria deles, neste caso, não está presente em grande parte destes bancos de dados.

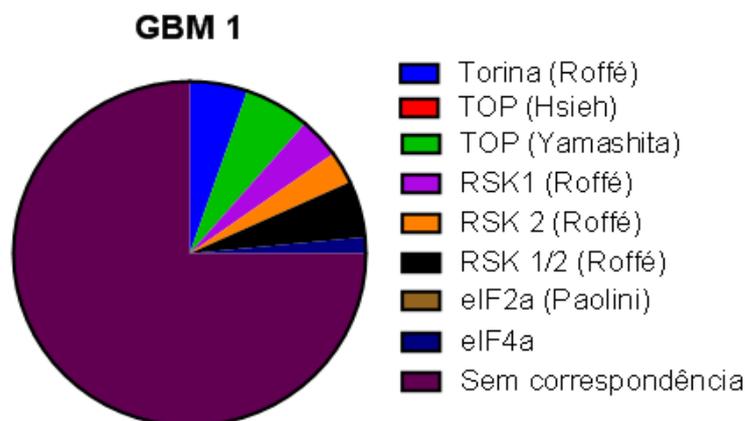


Figura 33 - Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado. Foram buscados nos bancos de dados genes em comum com os encontrados na análise. No gráfico são indicadas as porcentagens de genes em comum para cada caso.

3.2.3 Conclusões parciais do Capítulo II

Com este ensaio foi observado que a separação polissomal realmente é uma técnica importante por permitir a análise dos RNAs traduzidos. Essa informação mostrou-se mais relevante nas análises aqui presentes, evidenciando mais alvos alterados nas vias responsáveis pela progressão tumoral.

Compreendeu-se também a heterogeneidade tumoral presente no glioblastoma. A partir da separação de um único tecido tumoral em oito fragmentos, que foram confirmados por patologistas como sendo heterogêneos, viu-se, pelas análises moleculares, que realmente os fragmentos considerados de maior grau histológico tinham vias associadas à progressão tumoral mais ativas. A maioria dos genes identificados como diferencialmente traduzidos nas análises aqui realizadas não parecem estar sob regulação do complexo de mTOR, eIF2 α ou eIF4G.

3.3 CAPÍTULO III - SEGUNDA TRANSLATÔMICA

Com o sucesso obtido na etapa anterior, decidiu-se, portanto, continuar o projeto com mais três tecidos de pacientes atendidos na instituição. Estes tecidos também tiveram suas lâminas analisadas por patologistas e assim contaram com regiões divididas em alto e baixo grau histológico. Estes materiais foram submetidos

à separação polissomal e a uma análise de microarray. Naquele momento, teve-se acesso a uma plataforma mais recente, o HTA (Human Transcriptome Array 2.0).

3.3.1 Material e métodos do capítulo III

Abaixo, os materiais e os métodos referentes ao capítulo terceiro.

3.3.1.1 Extrato para separação polissomal

Os tecidos foram lisados com tampão (20 mM Tris · HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 100 µg/mL ciclohexamida e inibidor de protease) em Politron e centrifugados por 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a separação polissomal e uma amostra dele foi separada para a análise de RNA total.

3.3.1.2 Separação polissomal

O extrato foi fracionado em um gradiente linear de sacarose 7-47% preparado em 20 mM TrisHCl pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT e centrifugado por 2h30min a 39,000 rpm em uma ultracentrífuga com o rotor SW41Ti (Beckman Coulter) a 4 °C, o que garante que os mRNAs associados a ribossomos estarão separados daqueles solúveis. A absorbância a 254nm foi detectada em fluxo contínuo e as frações coletadas.

3.3.1.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído com o reagente da Sigma, TRI Reagent®. Utilizou-se também o kit da Zymo Research “Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus”.

3.3.1.4 Western Blot

As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel SDS-PAGE com voltagem controlada (65V por 20min e 125V por aproximadamente 90min), utilizando tampão de corrida [Tris 25mM, Glicina (Sigma Aldrich) 191mM, SDS 0,1%]. A porcentagem do gel de poli-acrilamida variou de 7% a 14%, dependendo da proteína a ser analisada.

Para a localização da proteína no gel foi utilizado um marcador de peso molecular (Bio-Rad). Após a corrida foi feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose 0,45µm (GE Healthcare), utilizando voltagem controlada (100V por 1h) e tampão de transferência [Tris 25mM, Glicina 191mM, SDS 0,1%; Metanol (Sigma Aldrich) 20%]. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1h com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T [NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, Tween® (Sigma Aldrich) 0,1%]. Foi colocado o anticorpo primário de escolha overnight a 4°C, diluídos em solução 5% BSA em TBS-T. As membranas foram lavadas com TBS-T e foi colocado o anticorpo secundário acoplado à peroxidase [anti-Mouse (GE Healthcare) e ao anti-Rabbit (GE Healthcare)] por 1 hora à temperatura ambiente na diluição de 1:2500 na solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada em TBS-T e revelada com kit de quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific) em filme fotográfico (GE Healthcare). A quantificação densitométrica dos filmes foi realizada pelo software ImageJ e os gráficos gerados expressam a quantidade de proteína relativizada por um controle de carregamento.

3.3.1.5 Casuística

Foi utilizado o tecido de três pacientes, do projeto com o número de aprovação no Comitê de Ética 1692/12.

3.3.1.6 Ensaio Human Transcriptome Array 2.0 (HTA)

O perfil de expressão foi avaliado em três tecidos, cada um destes com uma amostra equivalente a high grade e uma a low grade. Foram avaliados o RNA total e o polissomal de cada caso, somando, assim, 12 amostras, sendo respeitado o protocolo sugerido pela empresa. Resumidamente, o RNA é misturado ao RNA Spike controle do kit e é realizada a síntese da primeira fita de cDNA. É sintetizada, então, a segunda fita de cDNA com as enzimas e os reagentes fornecidos pela empresa. A partir desta segunda fita de cDNA é sintetizado cRNA com a enzima T7 RNA polimerase, sendo este cRNA purificado e quantificado. Se a quantidade estiver compatível, uma fita senso de cDNA será sintetizada e então o RNA será hidrolisado com RNase H. O cDNA simples fita é purificado, fragmentado e

marcado pela enzima desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) com o reagente “DNA labeling reagente”, ligado à biotina. O DNA marcado é hibridizado no chip e a leitura é realizada após a lavagem na estação fluídica. A plataforma utilizada, a Human Transcriptome Array 2.0 (HTA), possui sondas para 245,349 transcritos, e todos os casos preencheram os critérios de qualidade do fabricante.

3.3.1.7 Análise dos dados

A análise do ensaio de HTA foi realizada no nível de genes. A extração dos dados foi realizada pelo software Expression console, da Affymetrix, em que foram também realizados os controles de qualidade e a normalização por RMA.

Com o software R foram anotados os transcript clusters, sendo transformados em refseq, e a partir deste foi encontrado o NP. Foram filtrados os transcript clusters que possuíam mais de um NP referente a diferentes genes. O software GraphPad Prism foi utilizado para a construção dos gráficos.

3.3.2 Resultados e Discussão do Capítulo III

Aqui, encontram-se os resultados e as discussões obtidos a partir dos experimentos realizados e supramencionados.

3.3.2.1 Descrição dos três casos clínicos

Como resultado da colaboração com o departamento de neurocirurgia do A. C. Camargo Cancer Center, obteve-se acesso a outros três tecidos tumorais de três pacientes, todos de grandes dimensões e heterogêneos, com áreas semelhantes a gliomas de baixo grau e áreas de glioblastoma.

O primeiro paciente (GBM32) é uma mulher de 46 anos. A primeira cirurgia foi realizada em fevereiro de 2016, em que foi feita uma ressecção subtotal; não foi feita ressecção radical da face medial do tumor para evitar uma possível lesão de estruturas eloquentes. O índice mitótico medido pelo marcador Ki-67 foi de 30%. Em maio do mesmo ano, foi detectada uma progressão da doença, sendo a paciente submetida novamente à cirurgia, e a partir desta segunda cirurgia foi que se obteve o material para análise.

O segundo paciente (GBM 33) é um homem de 76 anos. Foi realizada uma ressecção subtotal, com provável resíduo em situação mesial profunda. O índice mitótico medido pelo marcador KI-67 foi de 70%.

O terceiro paciente (GBM 34) é também um homem, mas de 53 anos. Foi realizada uma ressecção radical subtotal. O índice mitótico medido pelo marcador Ki-67 foi de 50%.

3.3.2.2 Obtenção do RNA polissomal

Os tecidos foram processados da mesma forma que no primeiro caso, sendo dissecados e separados visualmente pelas características macroscópicas. Uma amostra de cada fragmento foi fixada e analisada por patologistas para a posterior separação. A separação polissomal foi realizada em perfil 7%-47% (Figuras 34 e 35). O tecido do GBM 32 foi separado de acordo com a presença ou ausência de necrose (Figura 34).

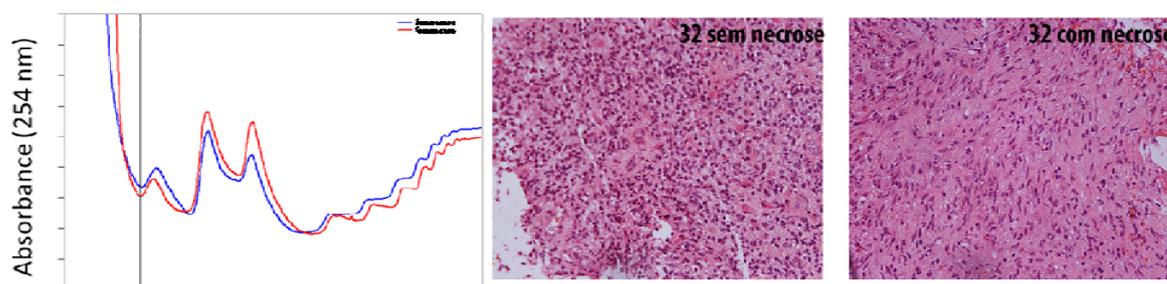


Figura 34 - Lâminas coradas com HE para a análise do grau histológico e perfis polissomais dos glioblastomas. Uma amostra de glioblastoma humano foi dissecada em regiões diferentes com base na aparência macroscópica do tecido, regiões com ou sem necrose. As duas regiões foram submetidas à separação por ultracentrifugação de densidade num gradiente de sacarose a 7%-47%, sendo representado em azul o tecido sem necrose e em vermelho o que possui necrose. A absorbância foi medida a 254 nm. As frações obtidas a respeito dos polissomos foram unidas e submetidas à extração de RNA com TRI reagent®.

Os tecidos dos GBMs 33 e 34 foram separados de acordo com a aparência relativa ao grau histológico, ou seja, áreas de menor ou maior grau histológico (Figura 35).

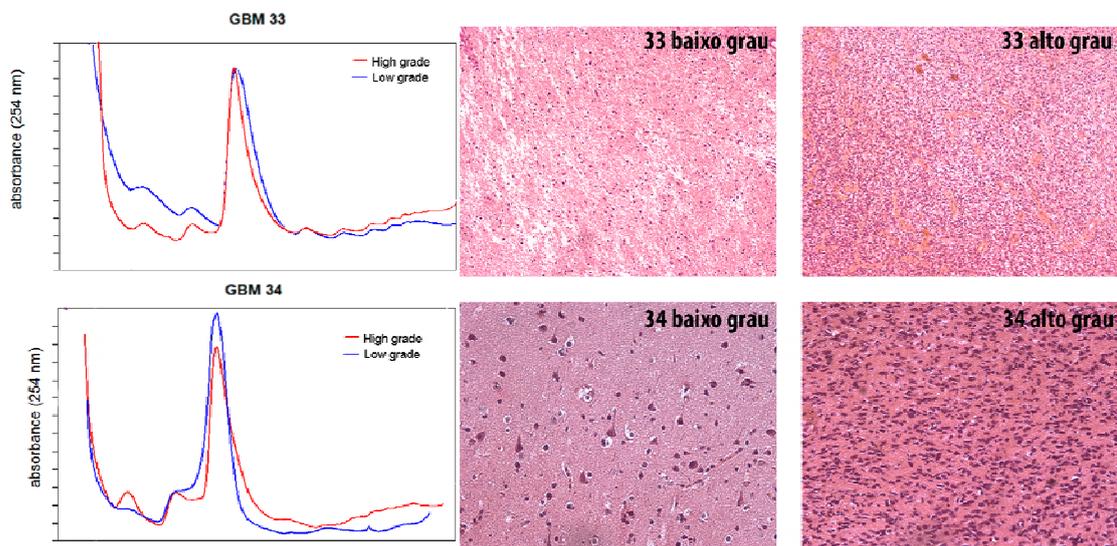


Figura 35 - Lâminas coradas com HE para a análise do grau histológico e perfis polissomais dos glioblastomas. Duas amostras de glioblastoma humano foram dissecadas em regiões diferentes com base na aparência macroscópica do tecido. As duas regiões de cada tumor foram submetidas à separação por ultracentrifugação de densidade num gradiente de sacarose a 7%-47%, sendo representado em azul o tecido de baixo grau e em vermelho o de alto grau. A absorvância foi medida a 254 nm. As frações obtidas a respeito dos polissomos foram unidas e submetidas à extração de RNA com TRI reagent®.

Para verificar se havia diferença nos níveis de tradução entre os fragmentos considerados de alto e baixo grau, fez-se a quantificação dos gráficos polissomais, considerando, para isso, o pico referente ao 80s e o referente aos polissomos (Figura 36).

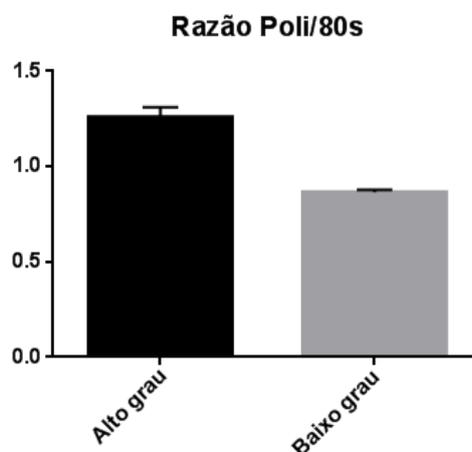


Figura 36 - Taxa traducional dos tecidos. A relação entre os picos polissomal e 80s dos tecidos foi analisada. Esta relação indica a quantidade relativa de polissomos baseado no pico de 80s.

Foi então realizada a extração do RNA das frações relativas aos polissomos, assim como a do RNA total, obtendo-se quantidades satisfatórias de RNA (Tabela 5). Para avaliar a qualidade do RNA foi feita uma corrida de bioanalyzer (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação dos RNAs extraídos. A quantificação foi realizada no equipamento nanodrop e o RIN calculado no aparelho Bioanalyzer.

		<i>Concentração (ng/ul)</i>		<i>RIN</i>	
		Total	Polissomal	Total	Polissomal
GBM 32	Com necrose	148.43	137.13	8.5	7.1
	Sem necrose	158.33	98.01	7.9	8.8
GBM 33	High	81.6	67.75	8.5	7.7
	Low	97.5	133.83	6.1	8.3
GBM 34	High	87.23	97.74	7.9	8.1
	Low	91.84	70.3	5.8	6.2

3.3.2.3 Análise de translátômica

A quantidade e a qualidade do RNA obtido estavam dentro do esperado. Realizou-se o ensaio de microarray utilizando a plataforma Human Transcriptome Array 2.0 (HTA), Affymetrix, que é superior à plataforma 4X44K no número de sequências presentes em cada chip, o que aumenta a informação encontrada. Durante o protocolo há dois pontos em que a reação é quantificada, e todas as amostras

passaram com quantidades superiores às mínimas necessárias. Deste modo, conclui-se que as análises em que se utilizou microarray foram satisfatórias.

Os dados foram plotados em um gráfico cartesiano, no qual no eixo das ordenadas foram plotados os níveis da transcrição e no eixo das abscissas os níveis de tradução, sendo cada gene representado pelo ponto no gráfico que corresponde ao seu nível traducional e transcricional. Se o gene está diferencialmente transcrito, mas não traduzido, ele estará representado pela cor amarela; se estiver apenas diferencialmente traduzido, ele estará representado pela cor verde no gráfico. A cor roxa mostra os genes diferencialmente transcritos e traduzidos. Em uma primeira análise, foram comparados os níveis de transcrição e tradução, sendo que se não houvesse interferência do processo traducional a relação entre os genes transcritos e traduzidos deveria ser 1 (Figuras 37 e 38). Observou-se que a relação variou entre 0,27 (GBM 33) e 0,79 (GBM 34), evidenciando uma regulação traducional nestas amostras. Outros autores (ANDERSON e SEILHAMER 1997) também encontraram esta diferença, mostrando a importância de estudos que analisem a regulação da tradução.

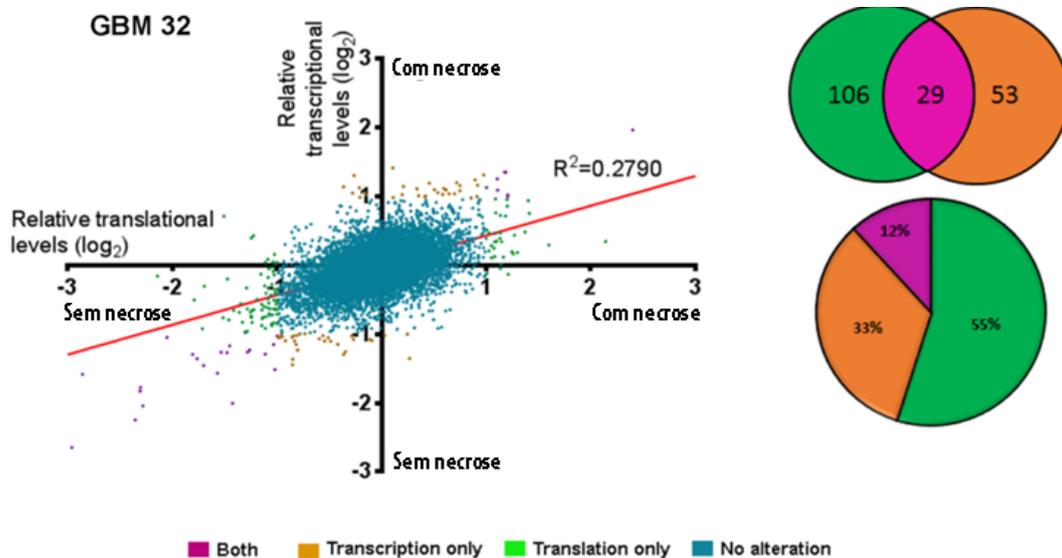


Figura 37 - Gráfico de pontos da expressão relativa dos genes diferencialmente transcritos e traduzidos. Foi calculada a diferença de expressão entre o fragmento com necrose e o sem necrose. Se não houvesse interferência do processo traducional a relação entre os genes transcritos e traduzidos deveria ser 1. Diagrama de Venn do número de genes encontrados diferencialmente transcritos e traduzidos.

Vê-se na Figura 37 os números de genes diferencialmente transcritos e/ou traduzidos. No GBM 32, há 106 genes diferencialmente traduzidos, 53 genes diferencialmente transcritos e 29 genes diferencialmente transcritos e traduzidos, quando comparados os tecidos com ou sem necrose.

Do mesmo modo apresentado no capítulo 2, buscou-se na literatura e em outros trabalhos do laboratório genes regulados traducionalmente. Para estudar os genes regulados por RSK1, RSK2 ou ambas, foi utilizado um estudo realizado na instituição, e para estudar as outras regulações buscou-se trabalhos da literatura, como os para eIF2 α (PAOLINI et al. 2018) e outros bancos de dados de genes 5' TOP (YAMASHITA et al. 2008; HSIEH et al. 2012). Comparou-se, então, os genes encontrados diferentemente traduzidos com esses bancos de dados (Figura 38) e observou-se que, do mesmo modo apresentado no caso anterior, a maioria dos genes diferencialmente traduzidos não está presente em grande parte destes bancos de dados.

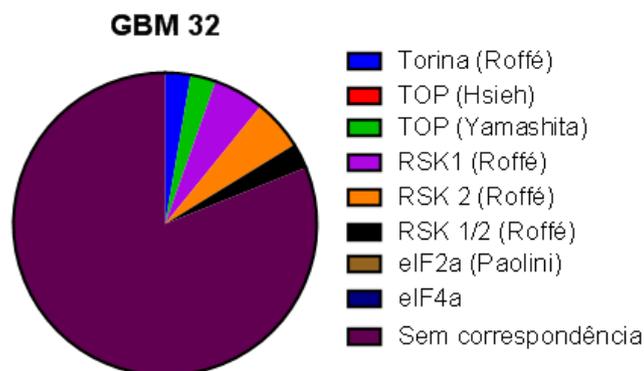


Figura 38 - Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado. Foram buscados nos bancos de dados genes em comum com os encontrados na presente análise. No gráfico são indicadas as porcentagens de genes em comum para cada caso.

No GBM 33, encontramos 170 genes diferencialmente traduzidos, 235 genes diferencialmente transcritos e 314 genes diferencialmente transcritos e traduzidos, quando comparadas as amostras de alto e baixo graus histológicos (Figura 39). Já para o GBM 34, há 1500 genes diferencialmente traduzidos, 942 genes diferencialmente transcritos e 3123 genes diferencialmente transcritos e traduzidos

(Figura 39), quando comparadas as amostras consideradas de alto e baixo graus histológicos.

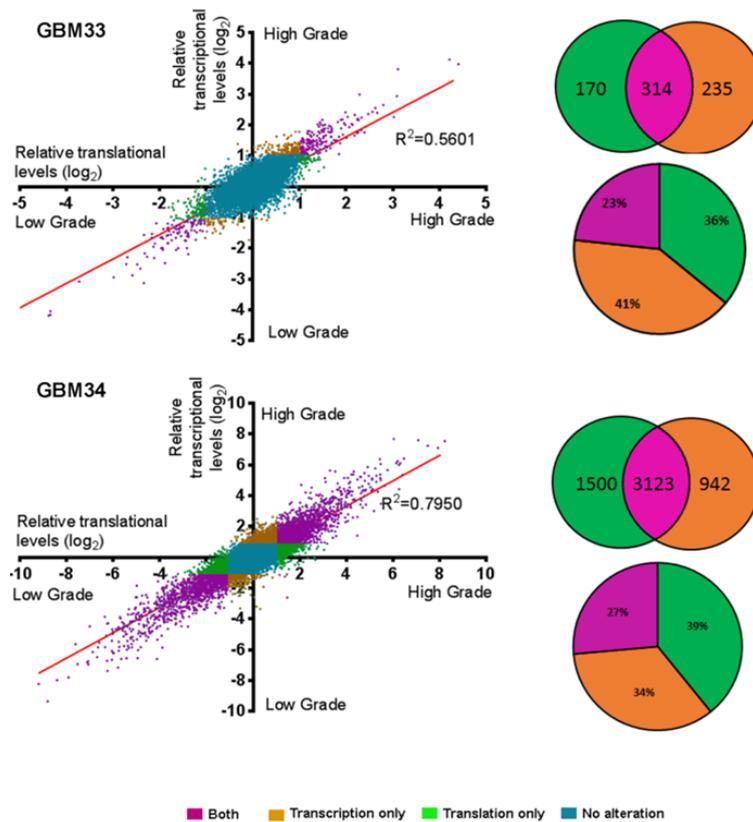


Figura 39 - Gráfico de pontos da expressão relativa dos genes diferencialmente transcritos e traduzidos. Foi calculada a diferença de expressão entre o fragmento high/low. Se não houvesse interferência do processo traducional a relação entre os genes transcritos e traduzidos deveria ser 1. Diagrama de Venn do número de genes encontrados diferencialmente transcritos e traduzidos

Compreende-se que no GBM 34 a diferença entre os fragmentos de alto e baixo graus histológicos foi muito maior do que para os GBM 32 e GBM 33, resultando em um número muito superior de genes diferencialmente transcritos e traduzidos. Outros trabalhos também encontraram diferentes genes regulados apenas traducionalmente, ou apenas no nível da transcrição, tais como os de (SPANGENBERG et al. 2013) e (KRISHNAN et al. 2014), porém com diferentes genes encontrados.

Novamente buscou-se na literatura e em outros trabalhos do laboratório genes regulados traducionalmente (Figura 40). Notou-se que de modo igual aos casos já analisados, a maioria dos genes diferencialmente traduzidos não está presente em grande parte destes bancos de dados.

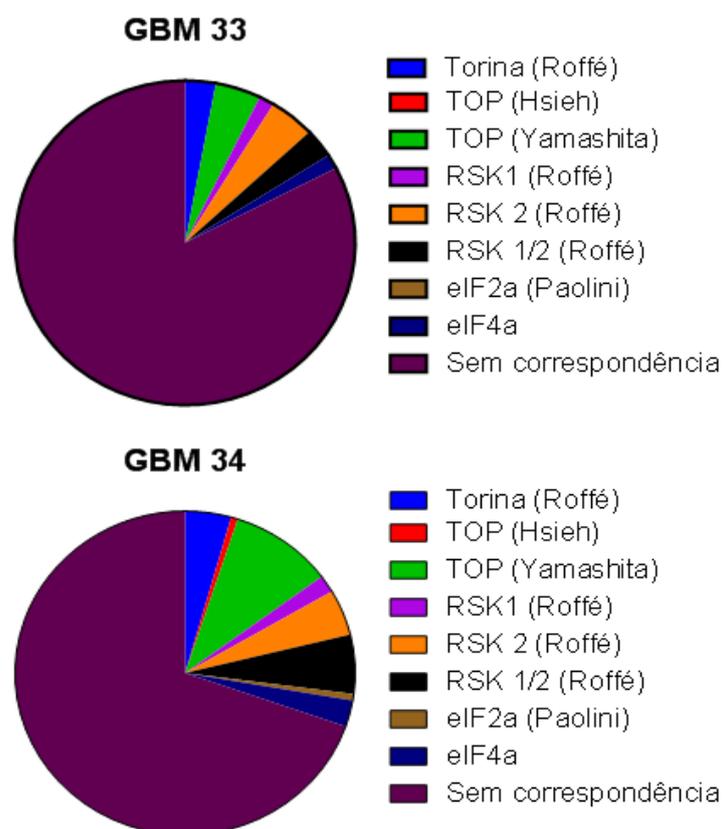


Figura 40 - Porcentagem encontrada de genes em cada banco de dados estudado. Foram buscados nos bancos de dados genes em comum com os encontrados na presente análise. No gráfico são indicadas as porcentagens de genes em comum para cada caso.

Parte-se, então, para a análise das interações e dos processos biológicos encontrados enriquecidos na comparação entre os dois fragmentos de cada tecido, tanto com os RNAs totais quanto com os polissomais. Para tal, foi utilizado o © STRING CONSORTIUM 2018 (SZKLARCZYK et al. 2017). Na Figura 41 observa-se os processos biológicos enriquecidos e as interações entre os genes em cada análise do GBM 32. Vale ressaltar que a análise do fragmento com necrose no RNA polissomal não encontrou nenhum processo enriquecido, talvez por ser um

fragmento com pouca tradução. Nos fragmentos sem necrose viu-se que a análise da translatoômica (polissomal) evidenciou mais genes com conexões entre eles, mostrando a relevância de se purificar o RNA traduzido.

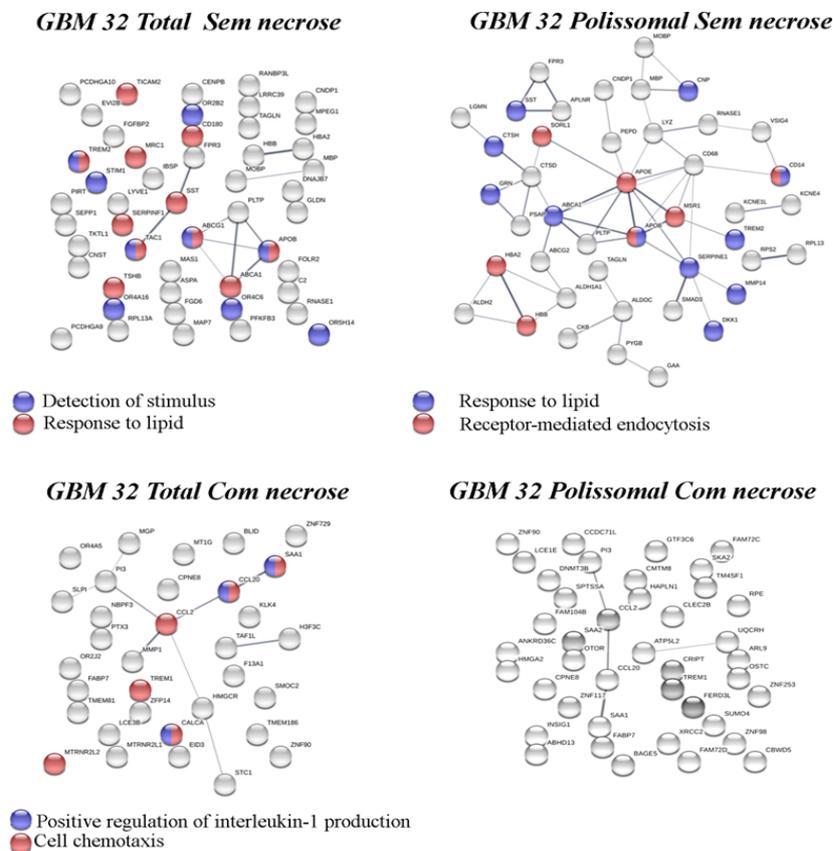


Figura 41 - Interações e Processos biológicos enriquecidos no GBM 32. Foram analisados os processos biológicos enriquecidos com base nos genes diferencialmente transcritos ou traduzidos entre os tecidos com ou sem necrose. Foi utilizado o © STRING CONSORTIUM 2018 para a análise. Cada gene é representado por um círculo e as interações entre eles são representadas por linhas, e quanto mais grossa a linha maior o nível de evidência da interação. As cores representam processos biológicos enriquecidos de acordo com o Gene Ontology.

Para o GBM 33 foram encontrados mais processos, também mais relevantes, como vê-se na Figura 42. A translatoômica nos dois casos possibilitou uma análise com mais genes de cada processo. Nos tecidos de baixo grau pode-se ver processos relacionados à inflamação e ao sistema imune. Utilizou-se, para tanto, o © STRING CONSORTIUM 2018, porém este não possui em seu banco de dados processos

alterados como câncer ou outras doenças, apenas processos fisiológicos normais. Foram encontrados, todavia, nos tecidos de alto grau, genes relacionados à proliferação, havendo também diversos exemplos de genes já descritos como envolvidos no câncer, na progressão tumoral ou na proliferação, como o gene ADAM23, envolvido no crescimento tumoral em tumores de mama (COSTA et al. 2015), com pior sobrevida em pacientes com carcinoma de ovário (MA et al. 2018). Interessantemente encontrou-se também, no tecido de alto grau, na análise polissomal, o gene AURKA, que codifica a proteína mitótica quinase Aurora 1. Esta proteína já foi descrita como responsável por modular as células iniciadoras tumorais em glioblastomas (WILLEMS et al. 2017), e quando ativada mantém as características de células tronco tumorais em células de glioblastoma (HSU et al. 2016), estando envolvida com a resistência e a recorrência tumoral.

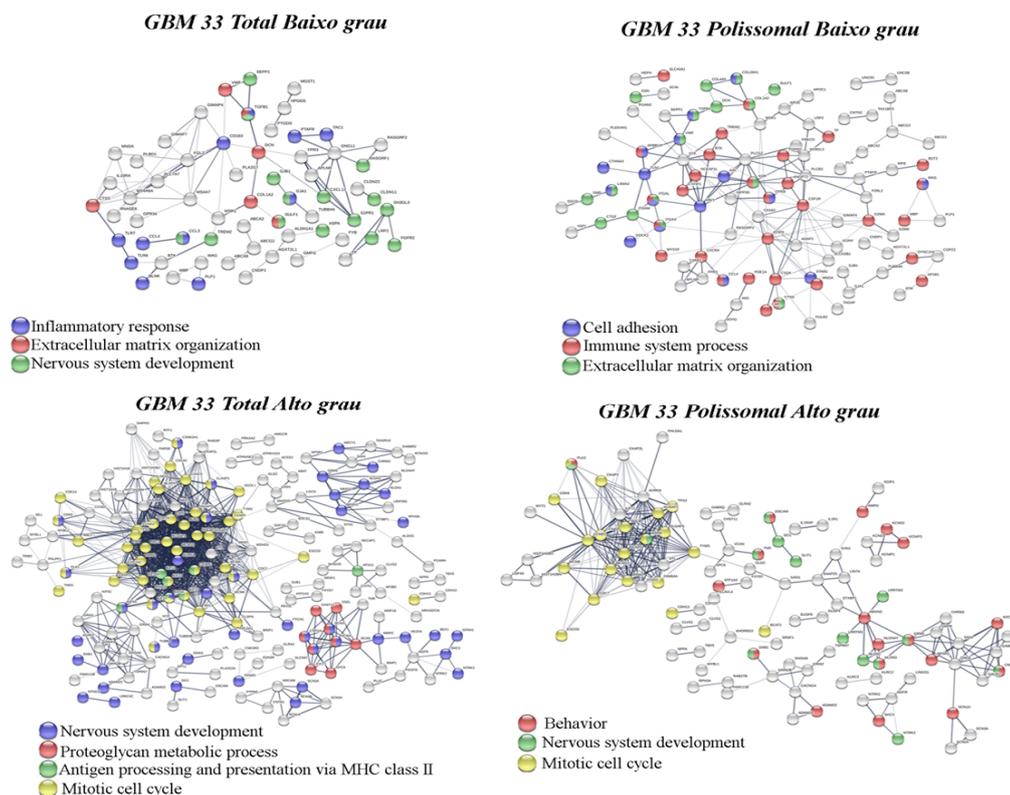


Figura 42 - Processos biológicos enriquecidos no GBM 33. Foram analisados os processos biológicos enriquecidos com base nos genes diferencialmente expressos entre os tecidos de alto ou baixo grau. Foi utilizado o © STRING CONSORTIUM 2018 para a análise.

Para o GBM 34 foi encontrado um número muito maior de genes diferencialmente transcritos e traduzidos entre os fragmentos, o que gerou uma análise de processos enriquecidos muito mais complexa (Figura 43). Um dos processos encontrados e considerado mais interessante foi o relacionado à montagem e à organização ciliar, enriquecido no fragmento polissomal de alto grau. Já foi mostrado na literatura que a sua inibição aumenta a morte celular e a sensibilidade à temozolamida (HOANG-MINH et al. 2016), e justamente do fragmento de maior grau há o aumento deste processo, podendo ser uma evidência da maior resistência destas células. Há, também, o processo de divisão celular enriquecido neste fragmento, enquanto que nos fragmentos de menor grau encontram-se processos mais relacionados ao desenvolvimento de sistema nervoso e de sinalização celular.

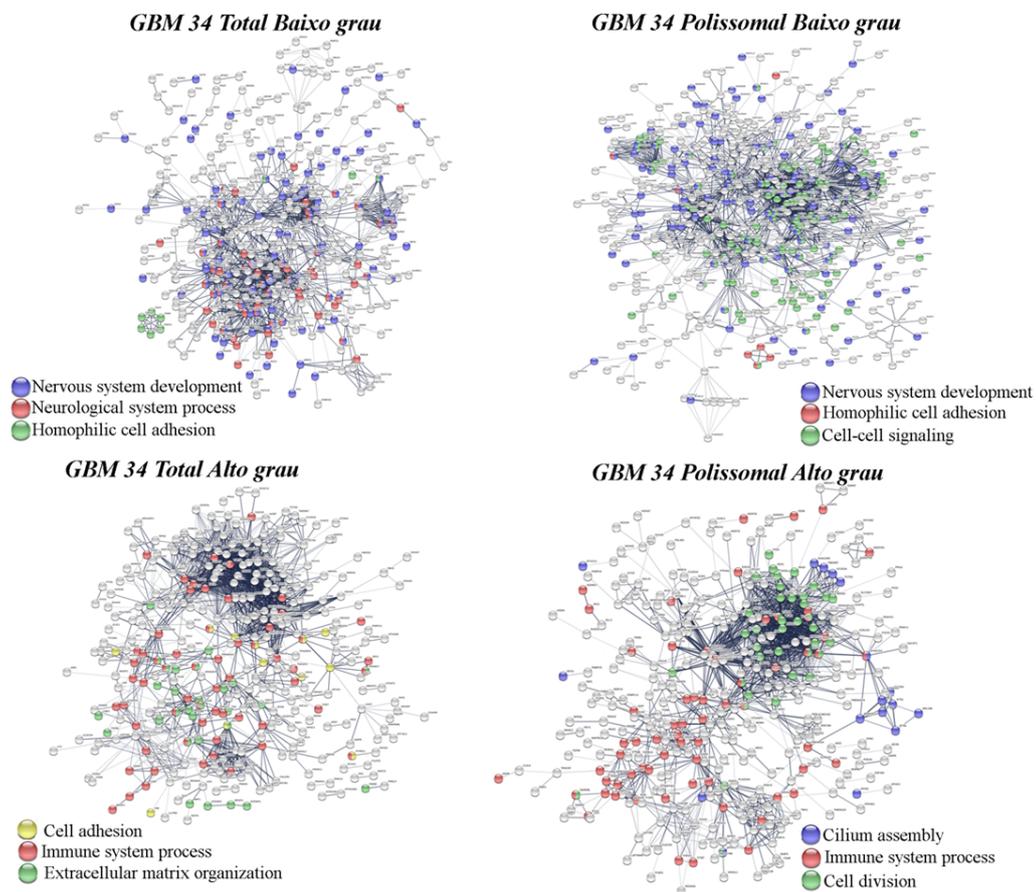


Figura 43 - Processos biológicos enriquecidos no GBM 34. Foram analisados os processos biológicos enriquecidos com base nos genes diferencialmente expressos entre os tecidos de alto ou baixo grau. Foi utilizado o © STRING CONSORTIUM 2018 para a análise.

Foi realizado também um ensaio de western blot com essas mesmas amostras, com o intuito de analisar a ativação de proteínas responsáveis pelo controle da tradução, reguladas por mTOR, 4E-BP e P70S6K (Figura 44).

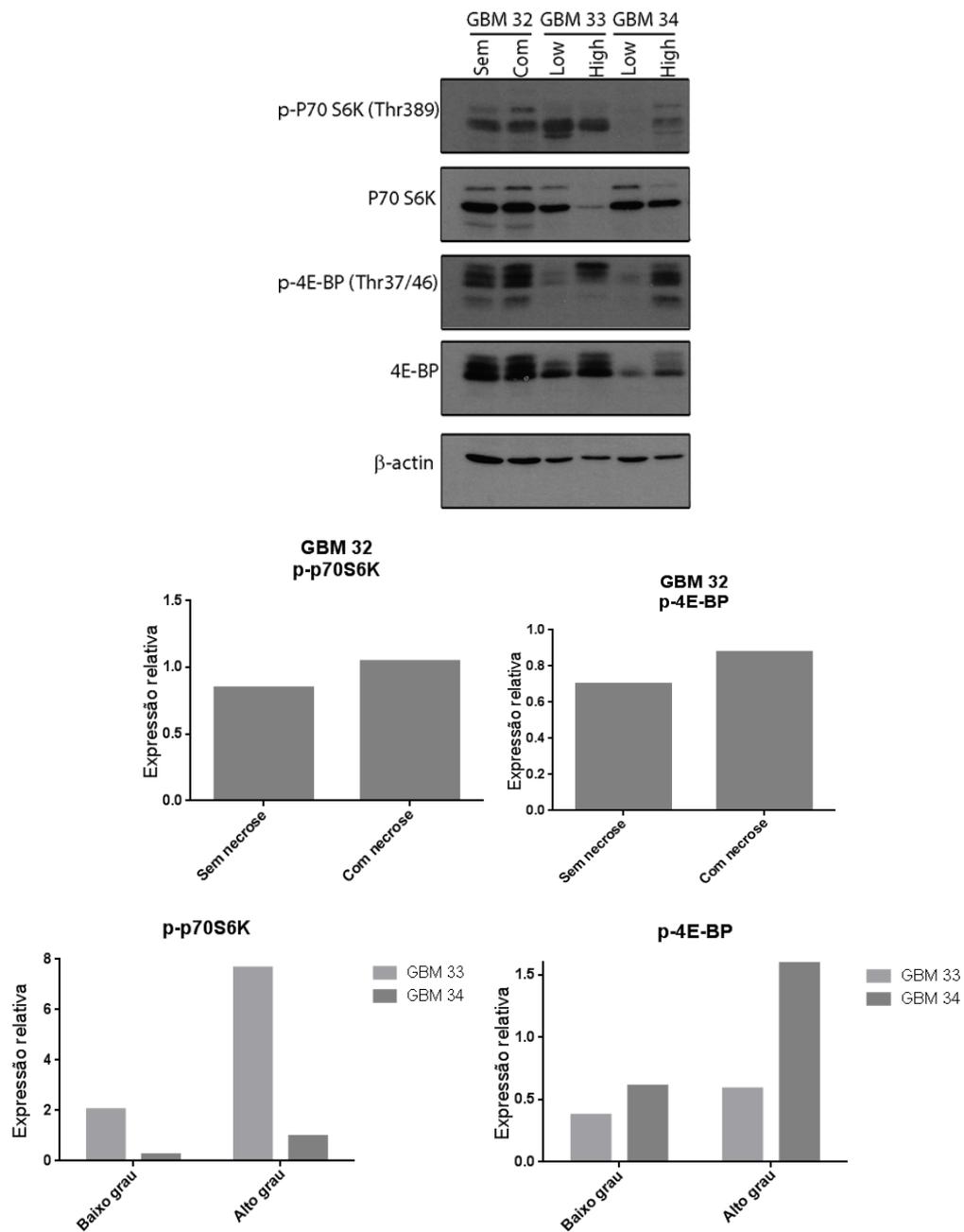


Figura 44 - Ensaio de western blot. Foram analisadas as proteínas reguladoras de tradução p70S6K e 4E-BP. A quantificação foi realizada pela relativização entre a proteína fosforilada e a total.

No GBM 34 de alto grau ambas as proteínas P70 S6K e 4E-BP, reguladas pela via de mTOR, apresentam maior nível de fosforilação no fragmento de alto grau histológico em comparação ao de baixo grau, o que sugere, assim, a ativação da via de mTOR somente no fragmento de alto grau. Este mesmo caso foi o que apresentou maior diferença de RNAs diferencialmente transcritos e traduzidos. Adicionalmente, comparando-o ao seu perfil polissomal, verifica-se que o fragmento de maior grau histológico possui realmente um maior pico polissomal.

O GBM 33 apresentou uma grande diferença na fosforilação de 4E-BP, sendo que o fragmento de maior grau histológico tem uma maior fosforilação desta proteína, evidenciando que a via de mTOR possivelmente está mais ativa que no fragmento de menor grau histológico. Tal fato concorda com o observado em seu perfil polissomal, em que o fragmento de maior grau histológico apresenta um maior pico polissomal.

Já o GBM 32 não apresentou diferenças na fosforilação das proteínas estudadas, sendo que as que foram avaliadas mostraram-se ativas (fosforiladas). Também apresentou poucos genes diferencialmente traduzidos, ou seja, a maquinaria de controle de tradução mediada por mTOR estaria ativada nos dois fragmentos estudados. Observando o perfil polissomal deste caso, não há grande diferença entre o tecido com ou sem necrose, e apenas o tecido sem necrose tem uma tradução um pouco mais ativa. Supõe-se, portanto, que por ter uma menor celularidade no tecido com necrose as diferenças observadas devam-se a este menor número de células.

3.3.3 Conclusões parciais do capítulo III

Reproduziu-se com sucesso a técnica da translátômica em mais 3 tecidos com regiões histologicamente diferentes. Os tecidos GBM 32 com histologias de alto e baixo graus pareceram muito semelhantes, no que diz respeito à transcrição e à tradução. A comparação entre os tecidos mostrou apenas 106 genes diferencialmente traduzidos e 53 diferencialmente transcritos, sendo 23 diferencialmente transcritos e traduzidos. No exame da ativação das proteínas analisadas da via de mTOR também não houve diferença entre o tecido considerado de alto grau histológico e o de baixo grau, visto que os tecidos, possivelmente, não são tão heterogêneos, apresentando

apenas um maior índice de celularidade e desorganização do tecido, visto nas imagens de HE dos tecidos.

Já os tecidos do GBM 33 apresentaram mais de 100 genes diferencialmente transcritos ou traduzidos, um número ligeiramente mais alto que o observado no GBM 32. Estes fragmentos também apresentaram diferenças no perfil polissomal e na análise da ativação das proteínas da via de mTOR, mostrando que havia certa diferença na tradução entre os tecidos. No fragmento de alto grau foram também encontrados diversos genes relacionados à progressão tumoral.

Os tecidos do GBM 34 apresentaram um número muito maior de genes diferencialmente transcritos e traduzidos. Na análise da translaticônica, entorno de mil genes puderam ser identificados. Foram observadas diferenças na fosforilação das proteínas estudadas da via de mTOR e no perfil polissomal, com o pico 80s maior no tecido de menor grau histológico. Foi encontrado o processo biológico relacionado aos cílios mais enriquecido no fragmento de alto grau, processo que quando inibido confere à célula maior sensibilidade ao tratamento quimioterápico temozolamida.

3.4 CAPÍTULO IV - TRANSLATÔMICA DOS TECIDOS DO BIOBANCO

Durante a realização das etapas anteriores, percebeu-se que o processo de extração de RNA era realizado em um volume muito grande. Imaginou-se que se fosse possível concentrar todos os polissomos em um número menor de frações, a extração seria otimizada. Assim, foi desenvolvida uma nova metodologia de isolamento de RNAs polissomais baseada em um gradiente descontínuo. Além desta nova metodologia, estabeleceu-se uma colaboração com o Dr. Ola Larsson, do Karolinska Institutet, que possibilitou aos pesquisadores o aprendizado e a implementação da tecnologia de sequenciamento para uma única célula, o que permitia o aproveitamento de tecidos com dimensões reduzidas.

Por outro lado, havia mais uma dificuldade técnica, a degradação dos RNAs de parte das amostras durante o processo de isolamento polissomal e, deste modo, o número de amostras incluídas inicialmente foi reduzido. Para lidar com esta

dificuldade, estipulou-se uma colaboração com o Dr. Rui Reis, do Hospital de Amor (antigo Hospital de Câncer de Barretos), através da qual expandimos a casuística.

Assim, neste capítulo são descritas a separação polissomal no novo gradiente padronizado, a extração do RNA, a construção da biblioteca e a posterior análise de todas as amostras obtidas dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital de Amor.

3.4.1 Material e métodos do capítulo IV

Abaixo, os materiais e os métodos referentes ao capítulo quarto.

3.4.1.1 Extrato dos tecidos

O tecido foi mantido em armazenamento a -80°C até o momento da lise. Cada fragmento foi colocado em um triturador de tecido, tipo Potter-Elvehjem, com 425 μl de tampão de lise hipotônico (50mM Tris-base, 2.5mM MgCl_2 , 1.5mM KCl em água livre de nucleases, todos da Sigma, 50 μl de cicloheximida [10mg/ml, Sigma], 1 μl DTT [1M, Sigma] e 24 μl de complexo de vanadil ribonucleósido). Após a primeira homogeneizada do tecido no triturador, foram adicionados a ele 25 μl de Triton X-100 10% (Sigma) e 25 μl de Deoxicolato de sódio 10% (Sigma), sendo, depois, novamente homogeneizado. Este extrato foi transferido para um tubo previamente gelado e centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e deste 50 μl reservados para a extração do RNA total; o restante foi aplicado no gradiente de sacarose.

3.4.1.2 Gradiente 5-34-55%

O extrato foi fracionado em um gradiente com três concentrações de sacarose: 5%, 34% e 55%, preparado da seguinte forma: 20mM HEPES, 100mM KCl e 5mM MgCl_2 e centrifugado por 2 horas a 35.000 rpm em uma ultracentrífuga com o rotor SW41Ti (Beckman Coulter) a 4°C , o que garante que os mRNAs associados a ribossomos estejam separados daqueles solúveis, na interface entre as soluções 34% e 55%. A absorvância a 254nm foi detectada em fluxo contínuo e as frações coletadas.

3.4.1.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído com o reagente TRI reagente, da Sigma, juntamente com o kit da qiagen RNeasy Mini Kit. Resumidamente, o TRI reagente foi adicionado em uma relação 1:1 com a solução com o RNA. Foi adicionado clorofórmio em uma relação de 0,2ml para cada ml de TRI reagente. A amostra foi vortexada por 15 segundos, incubada na bancada por 3 minutos e centrifugada a 14.000rpm por 15 minutos, a 4°C. A fase clara foi então separada e a ela adicionado 2 volumes de etanol 99,5% e 15ug/ml de Acrilamida linear (Thermo Fischer), sendo vortexados por 15 segundos. Foi, depois, centrifugada a 10000g por 40 minutos a 4°C. O RNA forma um pellet, o qual, após a remoção do sobrenadante, é ressuspenso.

Logo o RNA foi quantificado no equipamento *Qubit™*, seguindo as especificações do fabricante, sendo utilizado o “*Qubit™ RNA HS Assay Kit*”. Para a análise da qualidade do RNA utilizou-se o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Dependendo da concentração do RNA, foi escolhido o chip do equipamento mais adequado (RNA 6000 Pico Kit para RNAs abaixo de 25ng/ul e RNA 6000 Nano Kit para RNAs com a concentração acima de 25ng/μL).

3.4.1.4 Construção de biblioteca de cDNA Single Cell

Para a construção das bibliotecas dos RNAs dos tecidos de pacientes, por ter pouca quantidade, optou-se por usar um protocolo de Single cell, seguindo o protocolo estabelecido por PICELLI et al. (2014). Primeiramente, 10ng de RNA são incubados a 72°C por 3 minutos, com oligo-dT30 para hibridação. É realizada, na sequência, a síntese do cDNA com a enzima SuperScript II (Invitrogen) (100U), adicionando também o tampão específico da enzima (1X), DTT (5mM), TSO (1uM), Betaine (1M), MgCl₂ (10mM) e inibidor de RNase (5U) (Promega). A reação de síntese é feita da seguinte maneira: 42°C por 90 minutos, 10 ciclos de 50°C por 2 minutos e 42°C por mais 2 minutos, e 70°C por 15 minutos. Em seguida é feita a pré-amplificação, na qual se adiciona a enzima KAPA HiFi HotStart e os IS PCR primers. É feita, então, uma PCR com os passos: 3 minutos a 98°C para a desnaturação, 8 ciclos de 98°C por 20s, 67°C por 15s, 72°C por 6 minutos e 5 minutos em 72°C.

O cDNA obtido na reação de transcrição reversa será utilizado para a construção de biblioteca de sequenciamento, sendo, antes, purificado através de beads magnéticas (Agencourt AMMPure XP magnetic beads [Beckman Coulter®]) adicionadas a cada amostra na proporção 1:1 (v/v), incubadas por 8 minutos a temperatura ambiente, utilizando uma placa de 96 poços. São colocadas sobre uma placa magnética por 5 minutos até que as beads tenham sido coletadas em algum canto de cada poço por atração magnética. Cada poço é lavado duas vezes com 200 μ L de EtOH 80% fresco. Cada amostra é eluída utilizando-se 17,5 μ L de água, encubando-se por 2 minutos e recolocando as amostras sobre a placa magnética por 1 minuto.

Para a primeira etapa da biblioteca é realizada uma fragmentação com 4ng de cDNA obtidos da primeira etapa deste protocolo com a enzima Tn5 (0,2 μ M), PEG 8000K (25%) e tampão TAPS 1X (50 mM TAPS-NaOH (pH 8,5), 25 mM MgCl₂ e 50% DMF) em 20 μ L de volume final a 55°C por 5 minutos. A reação é parada adicionando 0,2% de SDS e encubando em temperatura ambiente por 5 minutos. Só após este passo é realizada a amplificação dos fragmentos, utilizando-se a enzima KAPA HiFi polimerase, com 25 μ L da reação de fragmentação anterior e adicionada a KAPA HiFi Polymerase (1U), Fidelity buffer (1 X), index 1 primer N7xx (0,2 μ M), index 2 primer N5xx (0,2 μ M), dNTP mix (0,3 μ M) e água para 50 μ L de volume final de reação; nesta etapa são adicionados primers com index para a identificação de cada amostra. A reação é feita da seguinte forma: 95°C por 1 minuto, 95°C por 15s, 55°C por 10s, 68°C por 2 minutos, 5 ciclos de 95°C por 15s, 65°C por 10s e 68°C por 2 minutos, seguida novamente pela purificação, mas agora na proporção de 0,6:1 (v/v).

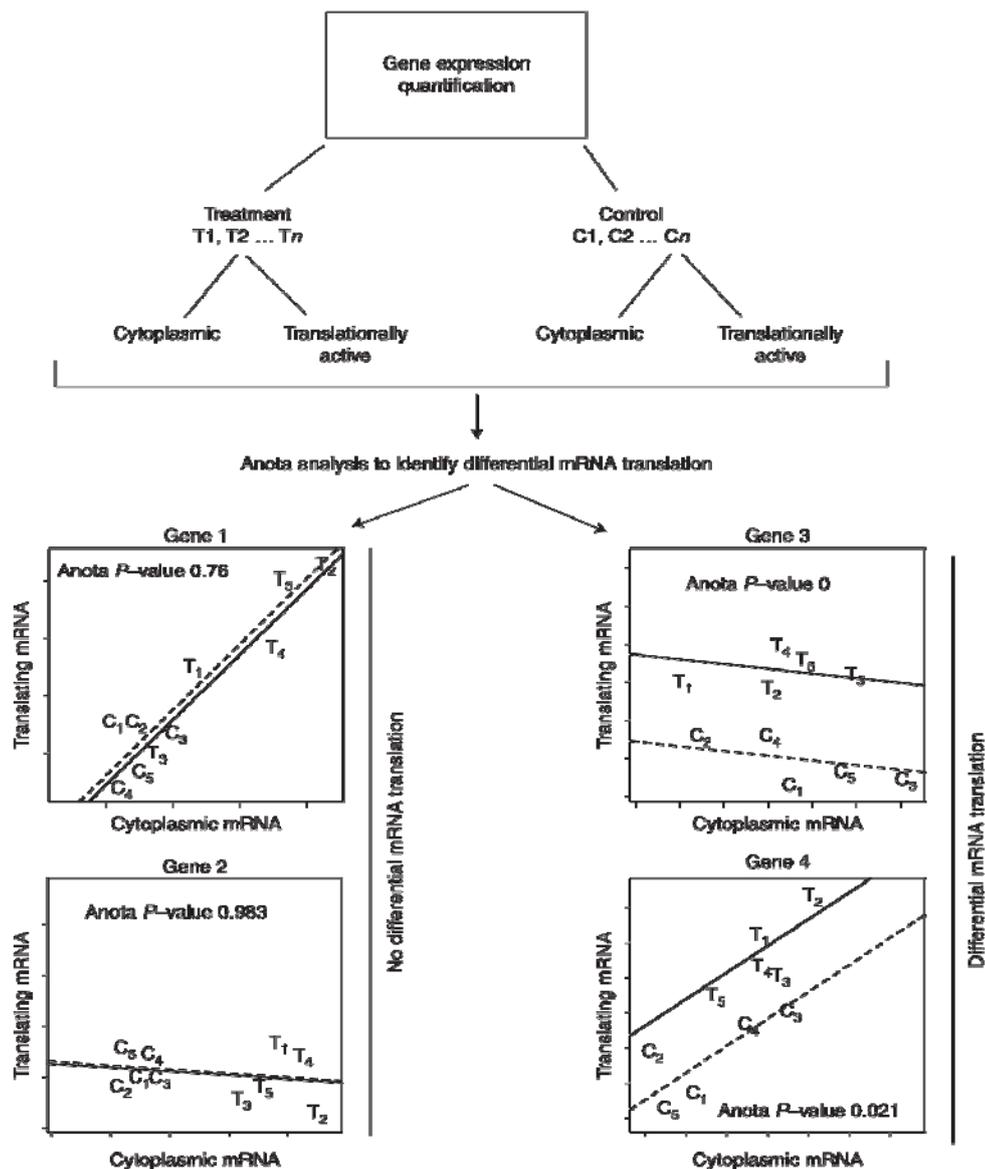
3.4.1.5 Análise dos dados

Foi determinada a população de mRNAs associados a polissomos através da comparação dos mRNAs presentes nas frações polissomais com aqueles presentes no extrato total. Há, no entanto, uma dificuldade interpretativa fundamental, já que os níveis de mRNAs ativamente traduzidos podem ser devidos a diferenças nos níveis de mRNAs transcritos. A correção para o nível de mRNAs totais historicamente tem sido feita dividindo-se os níveis de mRNA ativamente traduzidos pelos níveis de

mRNAs totais obtidos em paralelo. Contudo, foi demonstrado que esta correção não é realmente efetiva, pois a variância entre replicadas causa uma interferência significativa no resultado final, gerando o que se denominou de correlação espúria, que leva à identificação de um número substancial de falsos positivos e negativos (LARSSON et al. 2010).

Um método mais sensível e específico para a análise da atividade de tradução é a regressão linear de variância parcial (APV), para corrigir os níveis de mRNA totais, e um método de redução de variância (RVM), para aumentar o poder estatístico da análise (LARSSON et al. 2010). Para cada gene é plotado o valor de expressão no RNA total (eixo X, variável independente) e polissomal (eixo Y, variável dependente) em duas condições experimentais, e para este teste devem ser utilizadas ao menos três replicatas, de modo que para cada gene haverá ao menos 6 pontos no gráfico (Figura 45, gene 1). A seguir é realizada uma regressão linear para todos os pontos ($y=ax+b$), em que se calcula a inclinação da reta (a). No teste de APV assume-se que se as duas condições experimentais foram realizadas no mesmo dia, a variância experimental deveria ser comum entre elas. A partir dessa premissa, pode-se realizar uma nova regressão linear para cada condição experimental, sendo que a inclinação da reta (a) deve ser a mesma para ambas, gerando então duas retas paralelas, uma para cada condição experimental (Figura 45). Os valores onde as retas cruzam o eixo y (quando $x=0$) são obtidos e a diferença entre eles representa somente a alteração traducional daquele gene nas duas condições experimentais (Figura 45). Já o método de redução de variância (RVM) utiliza a variância do experimento como um todo (todos os genes identificados) para corrigir e reduzir a variância experimental observada em cada gene, aumentando, assim, o poder estatístico. Estas análises devem ser realizadas para cada gene, pois estes métodos foram incorporados no pacote estatístico ANOTA2Seq (“analysis of translational activity”), implementado na linguagem de computação R e contendo as abordagens analíticas e as saídas para a realização da análise (LARSSON et al. 2011; OERTLIN et al. 2018) (REF). Foram selecionados “hits” que apresentaram a maior variação traducional após a análise estatística.

As leituras de RNAseq foram mapeadas com o genoma de referência humano GRCh38 utilizando o programa Bowtie. Os genes com contagem zero foram excluídos da análise.



Fonte: LARSSON et al. (2013).

Figura 45 - Identificação da tradução diferencial de mRNAs pelo programa Anota.

Dados obtidos pelo sequenciamento de mRNAs polissomais e citoplasmáticos podem ser analisados pelo programa Anota. A linha sólida representa a condição do tratamento; a pontilhada, a condição de controle. As intersecções das linhas no eixo y são comparadas para encontrar a variação dos valores de mRNAs. Os genes 3 e 4 são diferencialmente transcritos, mas os genes 1 e 2 não. São mostrados números simulados.

3.4.2 Casuística do capítulo IV

Foram utilizadas 69 amostras tumorais, de tamanho de 1 a 3 cm³, provenientes de pacientes com gliomas. As amostras já estavam disponíveis, armazenadas a -80°C no Banco de Tumores do A. C. Camargo Cancer Center e do Hospital de Amor. Além destes tumores armazenados, foram recebidas também amostras de cirurgias de gliomas, em que se contou com a aprovação no Comitê de Ética 1775/13 e 1692/12.

Critérios de Inclusão

Foram incluídos 69 casos de pacientes diagnosticados com glioma, sem tratamento prévio, que possuam prontuários disponíveis no A.C.Camargo Cancer Center ou no Hospital de Amor. Os pacientes precisariam, evidentemente, aceitarem participar do estudo.

Critérios de Exclusão

Foram excluídas as amostras de pacientes que realizaram tratamento quimio ou radioterápico antes da cirurgia, assim como as amostras que não possuíam representação adequada no banco de tumores ou cujo prontuário não esteja disponível. Foram excluídos os pacientes com outras patologias associadas. Foram excluídas da análise final de genes diferencialmente traduzidos as amostras cujo RNA total ou polissomal extraído não atingiu qualidade suficiente para a construção da biblioteca para sequenciamento.

3.4.3 Resultados e discussão do capítulo IV

Aqui, encontram-se os resultados e as discussões obtidos a partir dos experimentos realizados e supramencionados.

3.4.3.1 Padronização de novo gradiente de sacarose para isolamento de RNA polissomal

Durante os primeiros experimentos realizados, uma das dificuldades encontradas durante o procedimento de extração do RNA polissomal foi o grande volume em que as amostras ficavam após o perfil polissomal (cerca de 5 ml), o que

atrapalhava o processo de extração do RNA e provocava perda de material (principalmente pela necessidade de utilização de tubos cônicos de 50 mL, o que ocasiona uma maior dispersão da amostra pela parede do tubo). Deste modo, foi necessária a padronização de um novo tipo de gradiente, pois o RNA polissomal deveria ficar retido em menos frações de modo a otimizar a etapa de extração.

Assim, um novo gradiente foi desenvolvido em colaboração com o Dr. Ola Larsson (Karolinska Institutet, Estocolmo - Suécia), sendo descontínuo e constituído de três “steps”, conforme representado na Figura 46. Este novo gradiente foi padronizado por mim em colaboração com os outros autores da publicação (LIANG et al. 2018). O primeiro “step” a ser aplicado no tubo para ultracentrífuga é a solução de sacarose 5%; em seguida, aplica-se a solução de sacarose 34% e, por fim, a solução de sacarose 55%. O gradiente repousa por duas horas a 4°C para que ocorra uma pequena difusão nas superfícies de separação, suavizando os “steps” (LIANG et al. 2018).

Durante a separação na ultracentrífuga, os polissomos separam-se dos ribossomos isolados e acumulam-se na superfície de separação entre a sacarose a 34% e a 55%, gerando um pico único que pode ser facilmente coletado em um volume pequeno. Correndo o perfil na velocidade de 1 mL/min e com frações de 500 µL, o pico de polissomos pode ser coletado em 2 frações, ou seja, em 1 mL final, um volume consideravelmente menor em comparação aos 5 ou 6 mL coletados no protocolo anterior, que utilizava um gradiente linear clássico 7-47%.

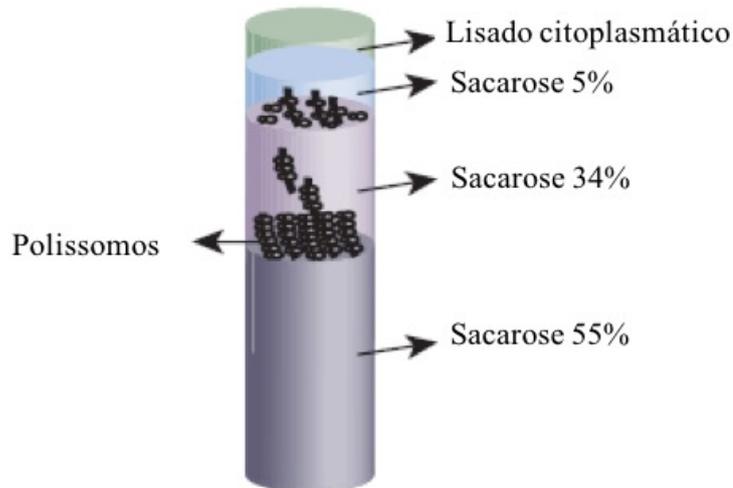


Figura 46 - Imagem ilustrativa da distribuição das diferentes soluções de sacarose no novo gradiente descontínuo padronizado neste período. Estão exemplificados os diferentes mRNAs e como seria a sua distribuição no gradiente de sacarose.

Para verificar a eficiência de separação do novo gradiente, as células em cultura foram lisadas (14 placas de 150mm de diâmetro da linhagem MCF7 [ATCC® HTB-22™] com 70% de confluência) e os polissomos separados pelo novo método. Conforme ilustrado no painel A da Figura 47, pode-se observar que há uma excelente separação entre o pico correspondente ao 80S e o que os polissomos se concentram. Para mostrar que o segundo pico corresponde realmente ao polissomos, ele foi isolado e corrido novamente em um gradiente linear 5-50% (Figura 47, B).

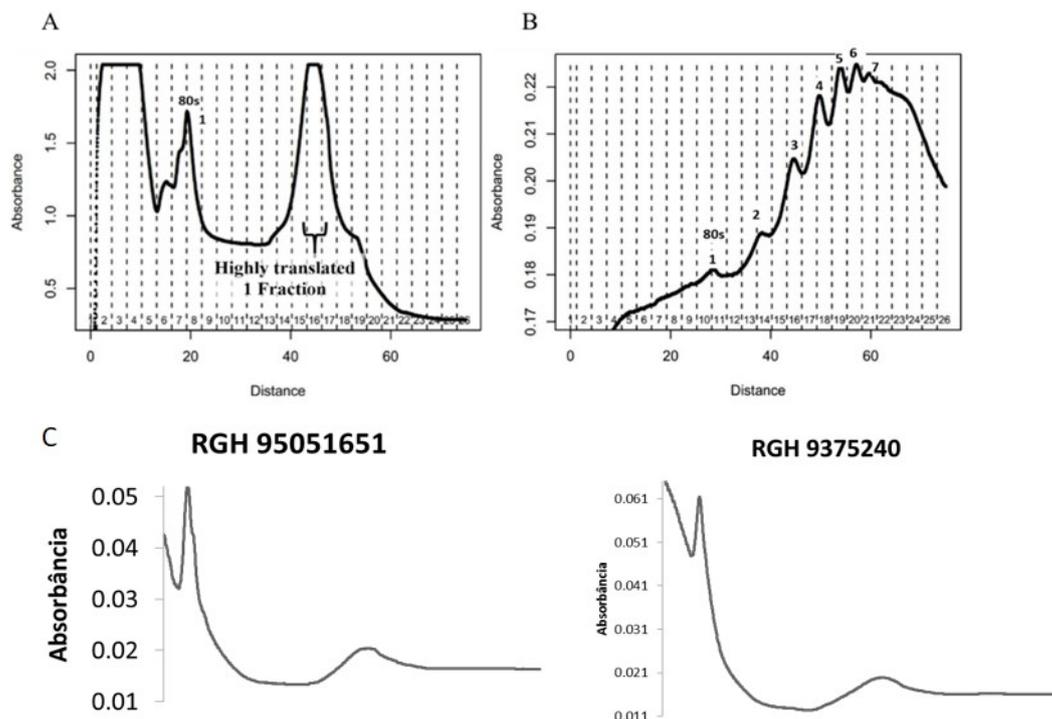


Figura 47 - Perfil polissomal da linhagem. Painel A - Perfil polissomal da linhagem MCF7. O perfil foi realizado utilizando o “two-step” gradiente. Painel B - As frações 16 e 17 do perfil A foram isoladas e corridas em um gradiente linear tradicional 5-50%. Pode-se observar o aparecimento dos polissomos no perfil, evidenciando que o gradiente two-step é capaz de separar os polissomos em um número menor de frações. Painel C - Exemplo dos perfis polissomais realizados. Foram escolhidos dois perfis representativos de todos os realizados com os tecidos obtidos para o estudo.

De acordo com o painel B da Figura 47, é possível observar que os polissomos se separam perfeitamente e que não há contaminação de RNAs livres, 40S ou 60S. Há uma pequena contaminação com 80S que, no entanto, não irá atrapalhar o sequenciamento dos mRNAs associados aos polissomos. Nesta figura nota-se o pico, agora separado entre os polissomos, e então é possível ver os picos relativos ao mRNA ligado a 2 ribossomos, 3 ribossomos, etc. Vê-se na Figura 47 C dois perfis representativos do que foi obtido, com o pico relativo ao 80s e as frações polissomais.

3.4.3.2 Realização do perfil polissomal em amostras de gliomas

Após a padronização do novo gradiente, este foi utilizado para a separação de polissomos em 69 amostras de gliomas provenientes do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital do Amor. Foram incluídas 5 amostras de astrocitomas pilocíticos (grau I), 10 amostras de astrocitomas difusos (grau II), 4 amostras de astrocitomas anaplásicos (grau III) e 40 amostras de glioblastomas (grau IV). Assim, os tecidos utilizados no estudo foram submetidos à separação polissomal no gradiente 5%-34%-55%, como é possível observar na Figura 47 C os perfis representativos do que foi obtido. Para verificar se havia diferença nos níveis de tradução entre os gliomas de diferentes graus, fez-se a quantificação dos gráficos, obtidos a partir deste novo perfil, considerando, para isso, o pico referente ao 80s e o referente aos polissomos (Figura 48). Percebe-se que a mediana da razão polissomos/80s não difere entre os tecidos, embora exista nos glioblastomas um número maior de tecidos com uma maior taxa traducional (razão polissomos/80S).

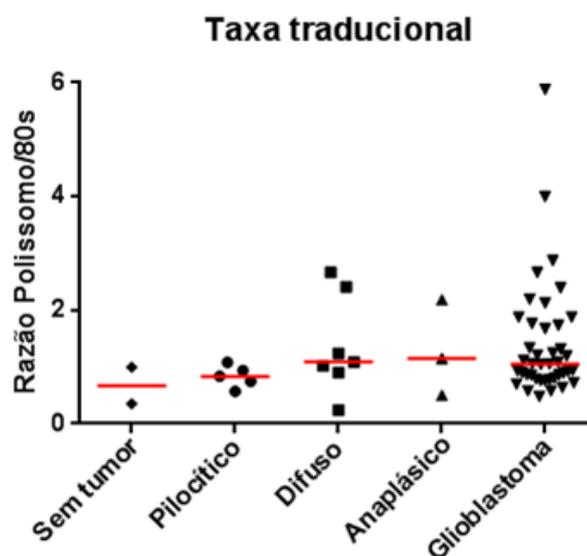


Figura 48 - Relação entre os picos polissomal e 80s dos tecidos analisados e sua histologia. Esta relação indica a quantidade relativa de polissomos baseada no pico de 80s.

Considerando que existe uma grande heterogeneidade nas taxas traducionais observadas no GBMs, avaliou-se se estas taxas poderiam estar relacionadas a algum parâmetro clínico, como a sobrevida, então calculou-se a sobrevida média entre os tecidos de glioblastoma que apresentavam maior e menor taxa traducional (usando a mediana da taxa traducional como critério de corte). Não foi encontrada, contudo, uma correlação entre a taxa traducional e a sobrevida dos pacientes (Figura 49).

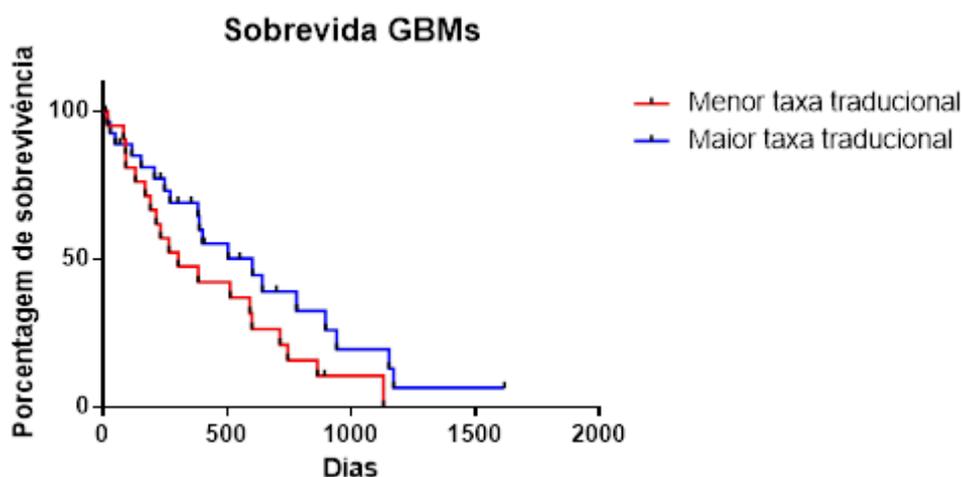


Figura 49 - Correlação entre a sobrevida dos pacientes e a taxa traducional. A taxa de tradução foi calculada pelo perfil polissomal, relacionando o pico 80s com o de polissomos. Não houve diferença entre os casos com alta taxa traducional e baixa taxa traducional.

O mesmo foi observado em relação à idade ao diagnóstico dos pacientes (Figura 50). Porém, o que se pode observar é que os pacientes com menos de 20 anos ao diagnóstico tinham todos uma baixa taxa traducional, o que é evidenciado na Figura 50, em azul.

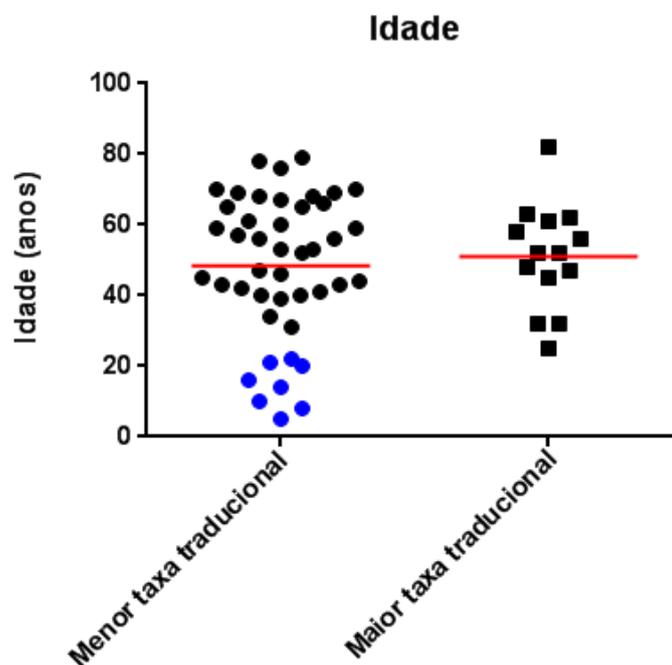


Figura 50 - Correlação entre a idade ao diagnóstico dos pacientes e a taxa traducional. Foi calculada a taxa de tradução através da comparação entre os picos 80s e o polissomal do perfil. Não houve diferença na idade entre os casos com alta taxa traducional e baixa taxa traducional. Em azul estão indicados os pacientes com menos de 20 anos ao diagnóstico.

3.4.3.3 Construção das bibliotecas e sequenciamento das amostras

A partir dos perfis polissomais foram separadas as frações correspondentes aos polissomos, além do RNA total. Este material foi enviado para o laboratório do colaborador, Dr. Ola Larsson, no Karolinska Institutet, em Estocolmo, Suécia. Lá, realizou-se a extração do RNA de todas as amostras, incluindo RNA total e polissomal, utilizando o kit da Qiagen Rneasy Mini Kit. Seguiu-se o protocolo sugerido pela empresa.

A qualidade do RNA foi avaliada através de eletroforese no equipamento bioanalyzer. Na figura 51 pode-se ver um exemplo de uma das corridas realizadas. O equipamento calcula a qualidade através da presença dos picos de RNA 18S e 28S, mostrando um índice denominado RIN. Foram considerados RIN acima de 6 como RNA íntegro para continuar com o protocolo. Para quantificar o RNA utilizou-se o kit Qubit High Sensitivity, embora algumas das amostras não possuíssem a quantidade de RNA mínima para a quantificação (250 pg/ μ L) (too low) (Tabela 7).

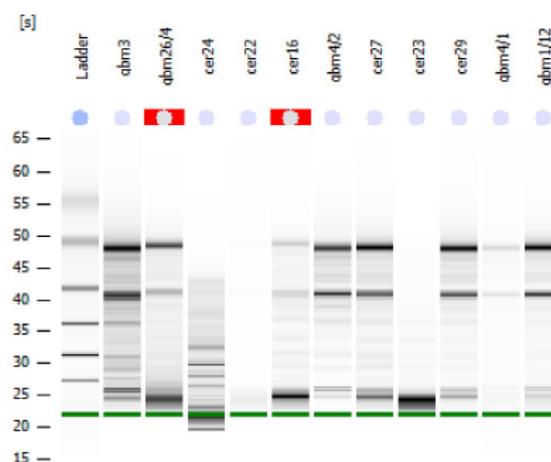


Figura 51 - Resultado do bioanalyzer realizado para os RNAs extraídos. Nele podemos observar amostras íntegras (cer27, cer29, gbm1/12), amostras degradadas (gbm3, cer24) e amostras nas quais não havia RNA suficiente para análise (cer22, cer23).

As amostras então agrupadas em 4 categorias: RNA íntegro (RIN>6) e alta quantidade (>10ng/ul), RNA íntegro e baixa quantidade, RNA degradado e alta quantidade e RNA degradado e baixa quantidade. Para a realização do sequenciamento as amostras com RIN menor que 6 não foram utilizadas. Para possibilitar a utilização de amostras com baixa quantidade, foi realizado o sequenciamento com a técnica de construção de bibliotecas para célula única SmartSeq2 e, assim, puderam ser sequenciadas 94 amostras de 47 tumores (uma amostra total e uma amostra polissomal por tumor).

Tabela 7 - Quantificação dos RNAs extraídos. Os RNAs foram quantificados em Qubit.

	<i>Número de amostras total</i>	<i>Número de amostras polissomal</i>
RIN > 6, quantidade > 10ng/ul	38	30
RIN < 6, quantidade > 10ng/ul	22	6
RIN > 6, quantidade < 10ng/ul	2	10
RIN < 6, quantidade < 10ng/ul	7	23

A integridade das amostras foi calculada pelo equipamento Bioanalyzer.

As bibliotecas foram construídas utilizando-se uma técnica padronizada pelos pesquisadores deste laboratório, descrita na Nature Protocols (PICELLI et al. 2014). Esta técnica permite utilizar até o RNA relativo a uma única célula, amplificando-o, e o pouco material que havia naquele momento pode ser utilizado para a construção da biblioteca. Após, foi realizada uma corrida no equipamento Bioanalyzer de cada amostra para verificar se o tamanho dos fragmentos obtidos está correto, mostrando que a construção foi realizada com sucesso (Figura 52). Foi feita também a corrida com o Pool das amostras, que é a mistura das amostras que será efetivamente sequenciada. Todas as bibliotecas apresentavam os fragmentos na média de 200-300pb, no padrão necessário. Foi realizado, então, o sequenciamento destas bibliotecas de cDNA no equipamento Illumina HiSeq, por uma facility instalada no Instituto Karolinska.

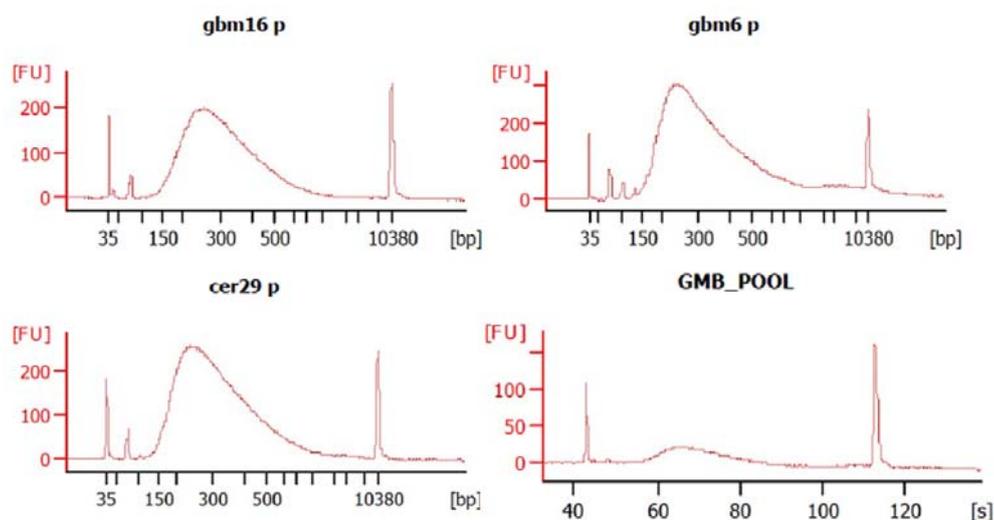


Figura 52 - Perfis representativos de preparações de bibliotecas finais. A região enriquecida em torno de 200 - 300 bp ilustra o possível sucesso da construção da biblioteca, com boa qualidade de cDNA em fragmentos pequenos para serem sequenciados de forma eficiente.

As análises destes resultados foram efetuadas pelo pesquisador Ola Larsson, que possui ampla experiência na área, tendo diversos papers já publicados com a análise de RNAs polissomais. Larsson desenvolveu, inclusive, um pacote estatístico voltado para este tipo de análise, o ANOTA2.

Foram obtidas mais de 7 milhões de leituras totais por amostra. Após o mapeamento com o mRNA, foi feito um cutt-off de 4 milhões de leituras para que fosse possível selecionar apenas as amostras a serem analisadas. Não houve diferença no número de leituras obtidas entre amostras totais e polissomais (Figura 53).

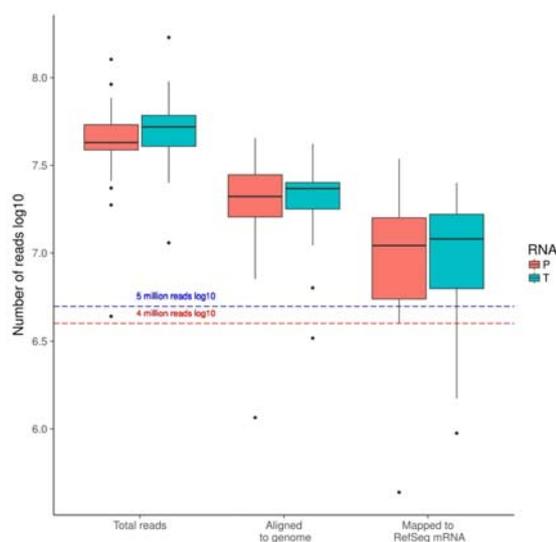


Figura 53 - Número de leituras obtidas. No gráfico estão indicadas as leituras após o sequenciamento e após o alinhamento ao genoma e à referência de mRNA. Tanto para o RNA polissomal quanto para o RNA total não houve diferenças no número de leituras obtidas.

3.4.3.4 Análise de dados e correlação com dados clínicos

Foram coletados os dados referentes ao tipo histológico do tumor, a idade do paciente, o sexo, o histórico familiar de câncer, a extensão da ressecção, a lateralidade do tumor, a localização e os primeiros sintomas apresentados dos 69 pacientes com gliomas (tabela 7). Fez-se a coleta dos dados de todos os pacientes e também a casuística daqueles cujo tecido foi sequenciado.

Observou-se que a maioria dos pacientes (55%) possui glioblastoma, o que concorda com a literatura (OSTROM et al. 2014), sendo em sua maioria homens (67%) com idade média de 47 anos. Estes seguiram, em sua maioria, o tratamento padrão após a cirurgia, ou seja, quimioterapia com temozolamida e radioterapia. A sobrevida média está bem acima do citado na literatura, sendo que para os pacientes

com as amostras sequenciadas temos a média de 826 dias e mediana de 550 dias, considerando a sobrevida até a data em que os dados foram coletados, sendo que neste momento 42 destes pacientes já faleceram e 27 permanecem vivos.

Nota-se também que a taxa de tecidos sequenciados foi maior para os tecidos obtidos do biobanco do Hospital de Amor (100%), seguido pelas cirurgias do A.C.Camargo Cancer Center (61%), sendo que a menor taxa de sucesso foram as amostras do biobanco do A.C.Camargo Cancer Center (37%). Isso se deve, talvez, ao fato de que as amostras do biobanco da instituição são mais antigas e o processo de congelamento pode ter sido mais demorado. Os tecidos das cirurgias, como são manuseados imediatamente e já congelados, conservaram-se mais.

As análises demonstradas a seguir referem-se a 24 dos 49 tumores sequenciados. Os demais tumores ainda estão em processo de sequenciamento na Facility do Karolinska Institutet e até o momento desta tese não se teve acesso aos resultados.

Tabela 8 -- Identificação dos tecidos disponíveis para a utilização no presente projeto.

Grau	Total	Sequenciados	Clusters		
			1	2	3
I	5	5	0	0	0
II	10	5	0	0	0
III	4	4	0	0	0
IV	50	33	6	5	6
Total	69	47	6	5	6
Sexo					
F	19	13	2	1	2
M	50	34	4	4	4
Total	69	47	6	5	6
Idade					
Média	48,26	47,8	50,5	62	61,2
Mediana	50,5	48,5	55,5	60	53
Varição	5 a 82	5 a 79	14 a 70	47 a 78	45 a 79
Localização					
Frontal	19	13	1	1	1
Temporal	22	12	4	1	1
Parietal	18	13	1	3	1
Outros	10	9	0	0	3
Total	69	47	6	5	6
Quimioterapia					
Temozolamida	24	23	1	2	1
Outros	4	3	0	0	0
Ignorado	26	5	2	0	4
Nenhuma	15	16	3	3	0
Radioterapia					
Sim	35	31	2	3	1
Ignorado	23	5	1	2	5
Não	11	11	3	0	
Sobrevida (dias)					
Média	737,89	705,3	152,3	290,2	634,5
Mediana	505	445,5	150	190	648,5
Varição	9 a 2857	9 a 2857	18 a 303	91 a 864	355 a 892
Origem					
Biobanco A.C.Camargo	19	7	0	0	0
Biobanco Hospital de Amor	24	24	4	5	2
Cirurgia A.C.Camargo	26	16	2	0	4

Nela estão indicados todos os tecidos e os que efetivamente foram sequenciados.

A primeira análise realizada foi a Análise de Componentes Principais (ACP), ou Principal Component Analysis (PCA), que gera componentes principais com as maiores variâncias possíveis (ou seja, as responsáveis pelo máximo de variabilidade nos dados). Deste modo, neste tipo de análise, as amostras mais parecidas entre si irão se segregar em grupos no gráfico. Utilizando os dados de RNA total e

polissomal das amostras de GBM para construir um gráfico de PCA, viu-se que as amostras polissomais segregam em um grupo, e as amostras totais em outro (Figura 54). Este dado é surpreendente, mostrando que o RNA total e polissomal provenientes da mesma amostra não se agrupam, isto é, são mais diferentes entre si do que o RNA polissomal de diferentes amostras. Este dado também evidencia que devem haver processos traducionais comuns a todas as amostras.

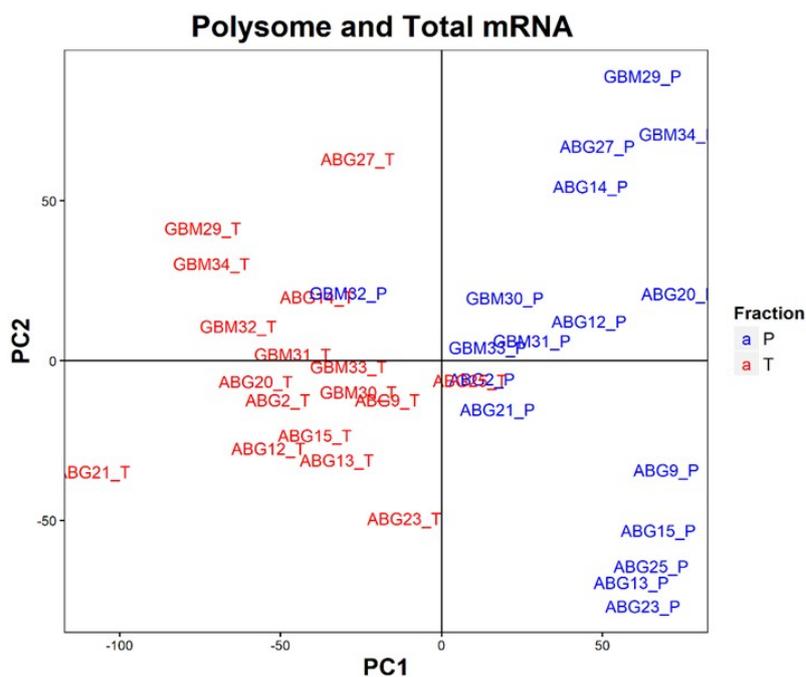


Figura 54 - Gráfico de PCA das amostras de glioblastomas. No gráfico são indicados os nomes de cada amostra. O componente principal 1 foi capaz de separar amostras totais de polissomais.

A seguir, foram utilizados apenas os dados de RNAs polissomais de GBMs nas análises de PCA (Figura 55). Compreende-se que as amostras se separam em 3 grupos, aqui nomeados de clusters 1, 2 e 3. Estes 3 grupos também podem ser observados quando é realizada uma análise de “unsupervised hierarchical clustering” (Figura 55).

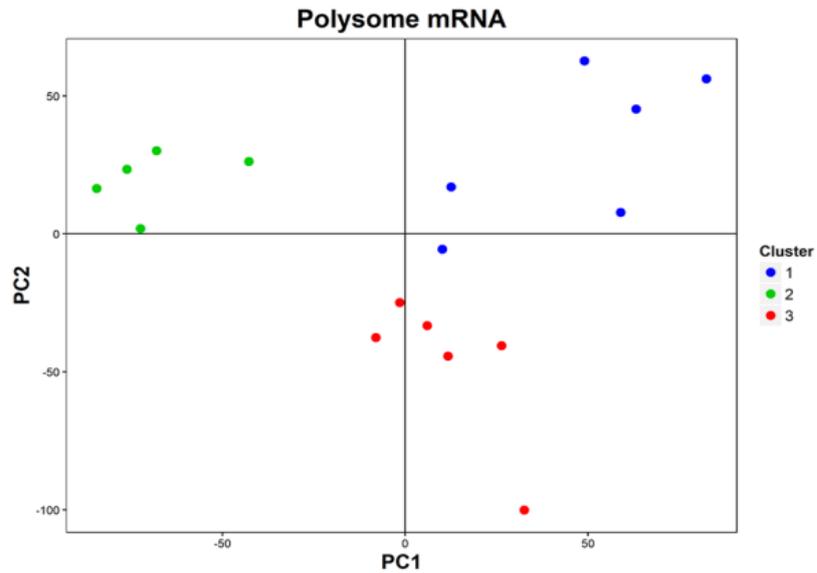


Figura 55 - Gráfico de PCA das amostras polissomais de glioblastomas. No gráfico são indicados os clusters por cores, de acordo com a separação pelo PCA. O cluster 1 é indicado em azul, o 2 em verde e o 3 em vermelho.

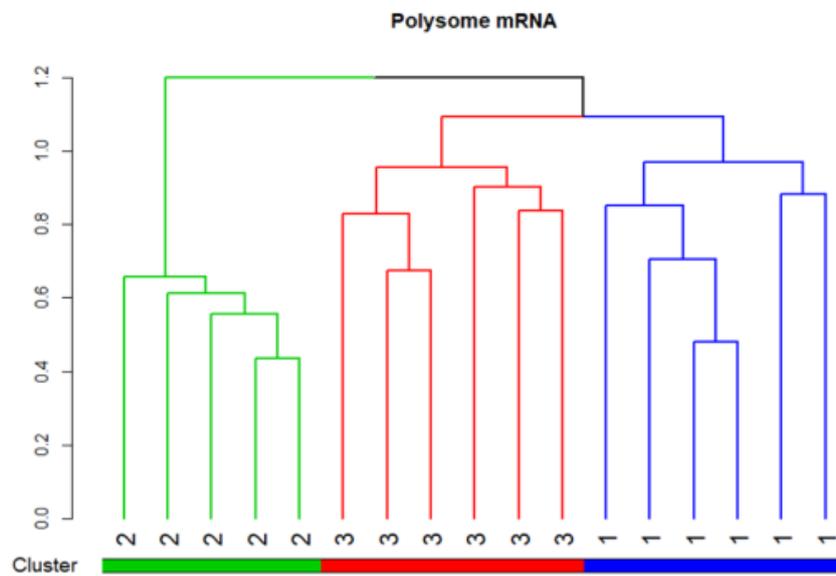


Figura 56 - Clusters gerados pela análise não supervisionada dos dados de RNA polissomal. São indicados os clusters por cores, de acordo com a separação pelo PCA.

Por outro lado, utilizando o RNA total para realizar os mesmos tipos de análises, no PCA (Figura 57) não é muito evidente a formação de grupos. Quando se utiliza a análise através de “unsupervised hierarchical clustering” observa-se a separação em 3 grupos, nomeados de cluster 4, 5 e 6 (Figura 58). No entanto, vê-se também que a força de separação medida através do FDR é maior para os RNAs polissomais que para os RNAs totais.

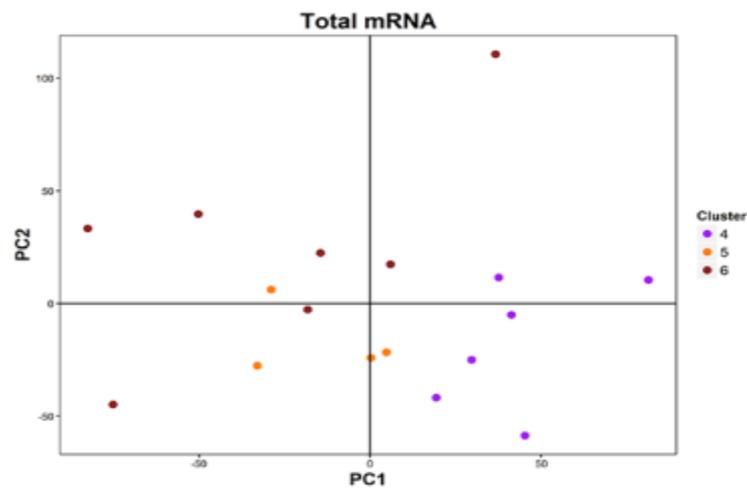


Figura 57 - Gráfico de PCA das amostras totais de glioblastomas. No gráfico são indicados os clusters por cores, de acordo com a separação pelo PCA. O cluster 4 é indicado em roxo, o 5 em laranja e o 6 em vinho.

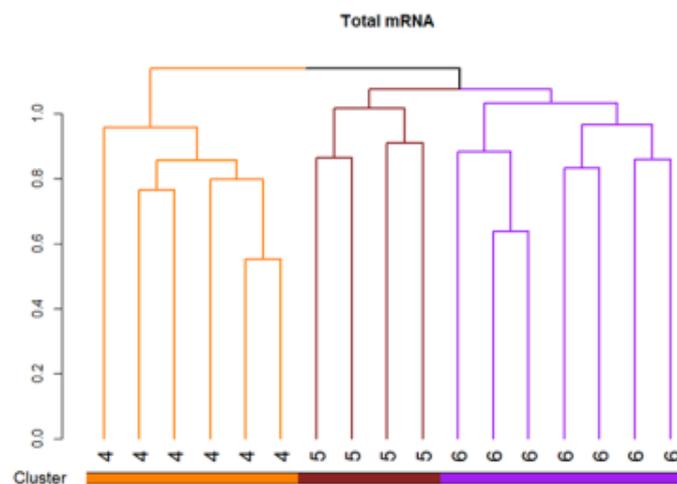


Figura 58 - Clusters gerados pela análise não supervisionada dos dados de RNA total. São indicados os clusters por cores, de acordo com a separação pelo PCA.

Ao comparar os clusters obtidos na análise do RNA total e polissomal atentase-se que os grupos formados são diferentes (Figura 59). Nesta figura, as amostras foram separadas de acordo com o RNA total (Figura 59) e nas barras coloridas abaixo foram identificados o grupo do RNA polissomal a que pertence cada amostra. Assim, descortina-se que os genes identificados nos RNAs totais e polissomais foram diferentes, separando as amostras em grupos também distintos.

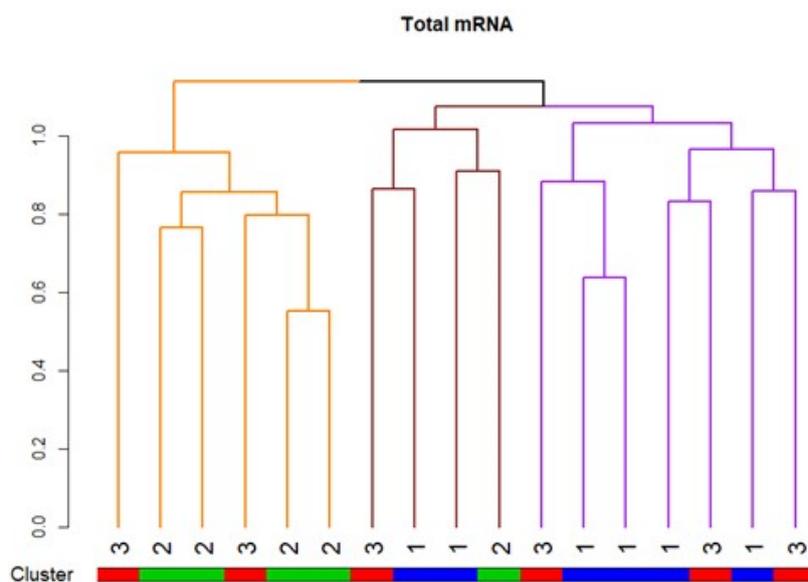


Figura 59 - Comparação entre os grupos gerados pela análise de RNA total e polissomal. O gráfico indica clusters gerados pela análise não supervisionada do RNA total. Abaixo do gráfico foi indicado a qual grupo cada amostra pertence, de acordo com a separação pelo RNA polissomal (números 1 a 3 e cores azul, verde e vermelho).

Para identificar se haveria significado biológico para os diferentes grupos formados pelos padrões de expressão de RNA total e polissomal, os dados de sobrevivência dos pacientes foram utilizados. Observando os grupos gerados pela análise do RNA polissomal (Figura 60), encontra-se que o cluster 3 tem uma sobrevivência muito maior. Já nos clusters formados pelo RNA total (Figura 61) não existe esta diferença de sobrevivência. Tem-se, dessa forma, uma evidência de que os grupos formados através da expressão do RNA polissomal possuem um significado biológico mais relevante do que os formados a partir da expressão de RNA total.

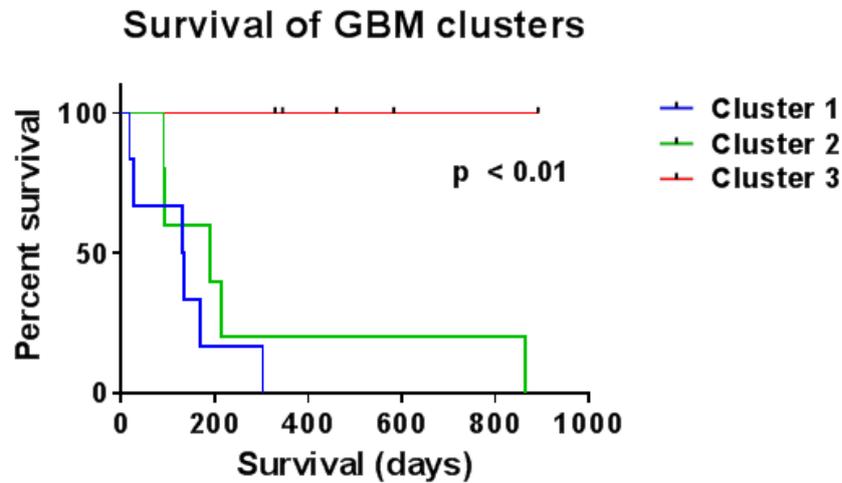


Figura 60 - Sobrevida relativa aos clusters gerados na análise do RNA polissomal. Para a análise foram utilizados os dados de sobrevida de cada paciente e o cluster obtido pela análise dos RNAs polissomais.

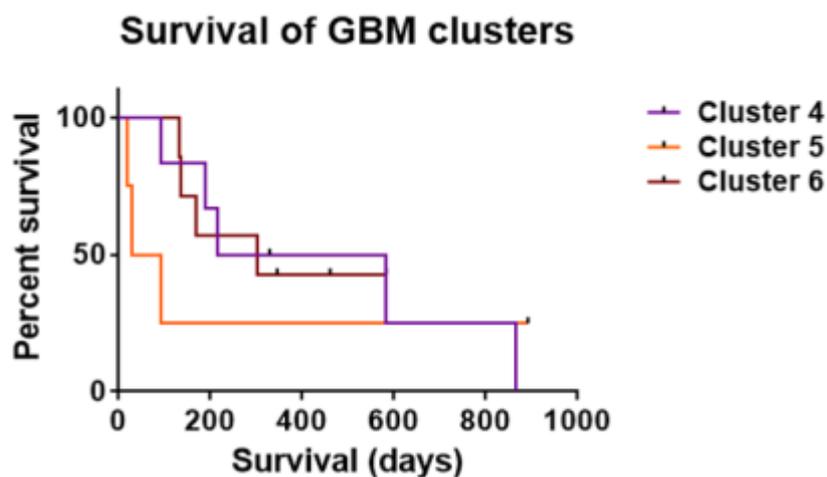


Figura 61 - Sobrevida relativa aos clusters gerados na análise do RNA total. Para a análise foram utilizados os dados de sobrevida de cada paciente e o cluster obtido pela análise dos RNAs totais.

Em análises prévias da literatura, alguns subgrupos moleculares, como os G-CIMP, apresentam melhor sobrevida. No entanto, este mesmo grupo apresenta uma média de idade muito inferior aos demais subgrupos moleculares (30 anos *versus* 60 anos), o que pode contribuir significativamente para um melhor prognóstico. Para que seja possível excluir desta análise de que a sobrevida estivesse sendo afetada

pela idade média dos pacientes, analisou-se a idade dos pacientes no momento do diagnóstico entre os diferentes clusters, não se observando nenhuma diferença estatisticamente relevante (Figura 62).

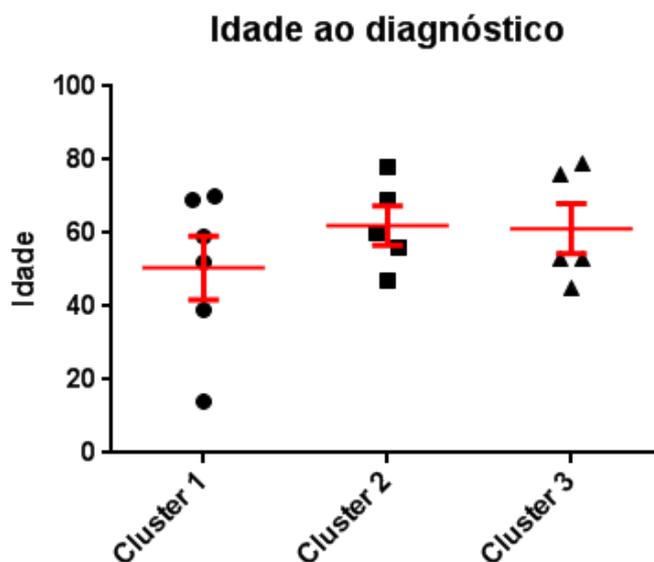


Figura 62 - Idade ao diagnóstico dos pacientes de cada cluster gerado na análise dos RNAs polissomais. Não há diferença na idade ao diagnóstico dos pacientes.

Partiu-se, então, para uma análise mais específica dos genes diferencialmente traduzidos. Foram feitas comparações de vias biológicas diferencialmente traduzidas entre os três clusters (Figura 63). Vimos que o grupo 1 apresenta enriquecimento de vias relacionadas ao metabolismo de RNA, ubiquitinação e processos que requerem organização de citoesqueleto, como a formação de cílios. O grupo 2 possui processos relacionado à angiogênese e remodelamento de cromatina. O grupo 3 possui processos relacionados à mitocôndrias e metabolismo aeróbio.

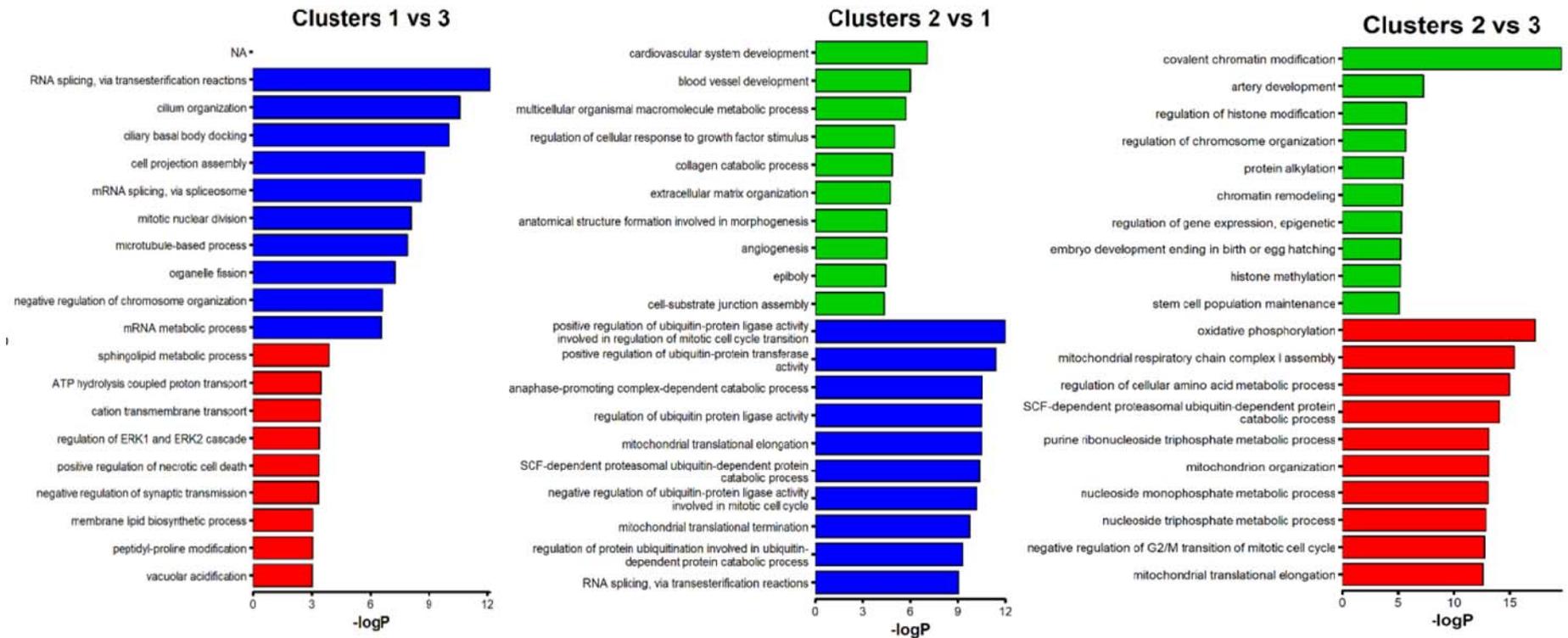


Figura 63 - Processos mais ativos em cada um dos clusters, quando comparados aos outros. O perfil de genes diferencialmente traduzidos em cada grupo foi comparado aos dois outros grupos. Os genes foram classificados em processos biológicos (Gene Ontology) e os mais estatisticamente relevantes foram representados graficamente. Em azul estão os processos do grupo 1, em verde os do grupo 2 e em vermelho os do grupo 3.

Olhando em maior detalhe alguns processos, como a formação de cílios (Figura 64), vê-se uma redução muito acentuada desse processo nas amostras do cluster 3. Interessantemente, um trabalho da literatura mostra que isso pode estar relacionado com a resposta à quimioterapia (NAKAMURA e PARKER 2016). No trabalho dos pesquisadores a deleção da proteína PCM1 está correlacionada com a maior sensibilidade celular ao tratamento com TMZ, e na presente análise esta proteína tem a menor expressão justamente no grupo com maior sobrevida.

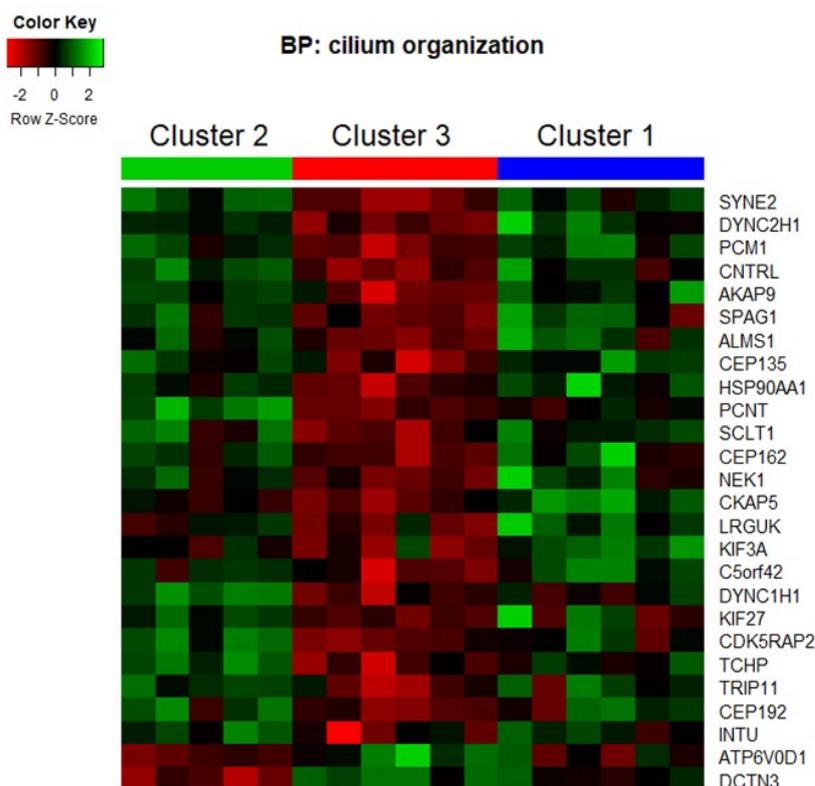


Figura 64 - Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) de RNAs mensageiros diferencialmente traduzidos nos clusters. Pode-se observar uma menor expressão dos RNAs ligados à organização de cílios no cluster 3.

Foi analisada também a tradução de genes com motivo 5' TOP, alvo de regulação por mTORC1 (NANDAGOPAL e ROUX 2015). Entre os mRNAs com estas características estão os que codificam proteínas ribossomais. Nota-se que no cluster 2 há uma maior expressão das proteínas ribossomais (Figura 65), sugerindo que o cluster 2 apresenta maior resposta da via de mTOR.

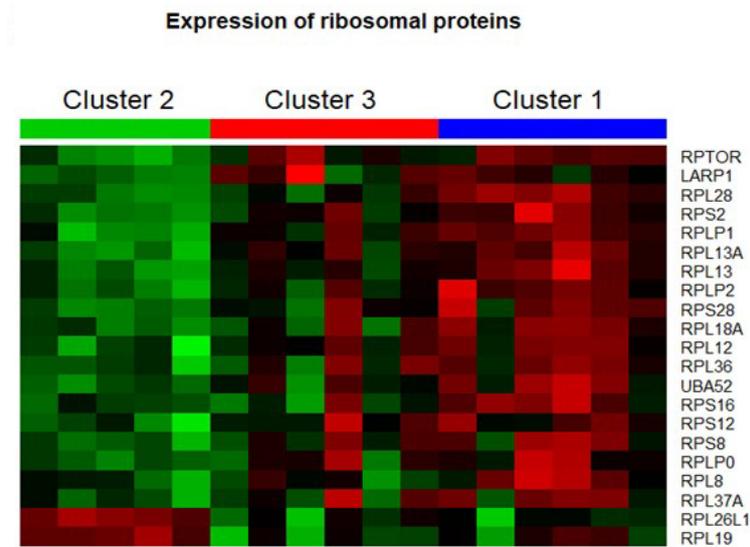


Figura 65 - Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) dos genes de proteínas ribossomais. Nota-se uma menor expressão dos RNAs ribossomais no cluster 1 e uma alta expressão destes no cluster 2.

Encontra-se, curiosamente, também uma diferença na expressão de RPTOR e RICTR, componentes dos complexos mTORC1 (RPTOR) e mTORC2 (RICTR), sendo que o cluster 3, aquele com a maior sobrevivência, apresenta uma baixa expressão de ambas as proteínas. O cluster 2 apresenta alta expressão de RPTOR (mTORC1) e o cluster 1 de RICTR (Figura 66).

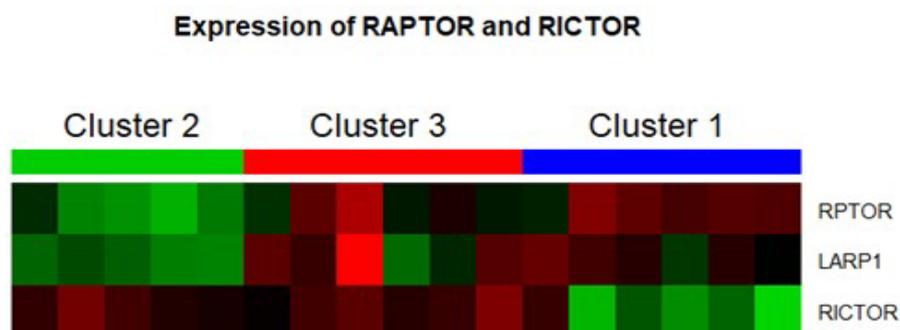


Figura 66 - Perfil de expressão na forma gráfica (heat map) da expressão de RPTOR, LARP1 e RICTR. O cluster 2 apresenta alta expressão de RPTOR e Larp1, componentes do mTORC1, e o cluster 1 apresenta alta expressão de RICTR, componente do mTORC2. O cluster 3 apresenta baixa expressão das três proteínas.

Coincidentemente, o aluno Arthur Alvarenga havia investigado, durante sua dissertação de mestrado, a expressão protéica de Raptor e Rictor em um tissue microarray contendo 180 amostras de gliomas e glioblastomas (ALVARENGA 2012). Resgatando estes dados, foi encontrada uma expressão inversamente correlacionada das duas proteínas (Figura 67), sendo que a baixa expressão de ambas também está relacionada à melhor sobrevida destes pacientes (Figura 68).

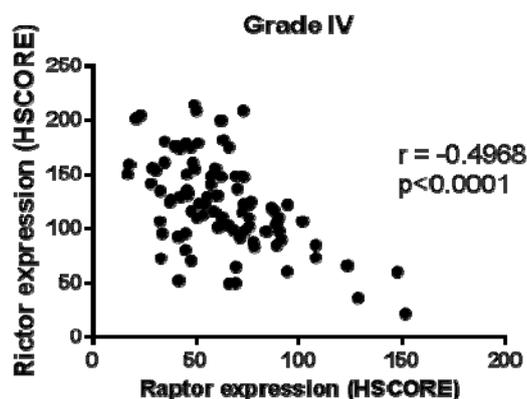


Figura 67 - Correlação da expressão das proteínas RICTR e RPTOR nos TMAs. Um TMA contendo 180 amostras foi submetida à reação de imunohistoquímica para as proteínas RPTOR e RICTOR. Foi utilizado o parâmetro HSCORE para a avaliação da expressão. O resultado indica uma relação negativa entre a expressão das proteínas estudadas.

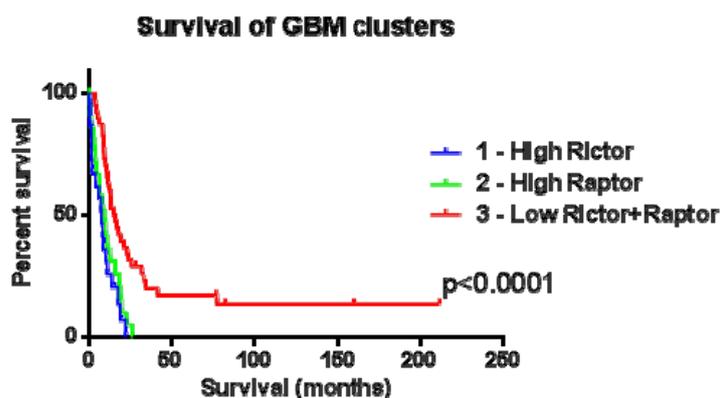


Figura 68 - Resultados de sobrevida obtidos a partir do TMA. Correlação da expressão das proteínas RICTR e RPTOR com a sobrevida dos pacientes. Os pacientes com alta expressão de RICTOR ou RAPTR apresentam menor sobrevida quando comparados aos pacientes com baixa expressão destas proteínas.

Estudos anteriores do consórcio TCGA já haviam criado grupos de pacientes com base em perfis de expressão gênica. No entanto, estes grupos têm pouca relevância clínica, não apresentando diferenças de sobrevida (VERHAAK et al. 2010). Para comparar a classificação aqui proposta com as do TCGA, utilizou-se o RNA total para classificar as amostras nos grupos anteriormente propostos, a fim de compará-lo com os grupos gerados pelo RNA polissomal. Os grupos, como pode ser observado, não são equivalentes, ou seja, a classificação baseada nos genes diferencialmente traduzidos não é correspondente ao que foi sugerido pelo TCGA (Figura 69). Porém, acredita-se que a classificação proposta neste trabalho expressa uma melhor correlação clínica do que aquela proposta no TCGA, o que sugere que a informação obtida através do RNA polissomal está mais próxima ao fenótipo final.

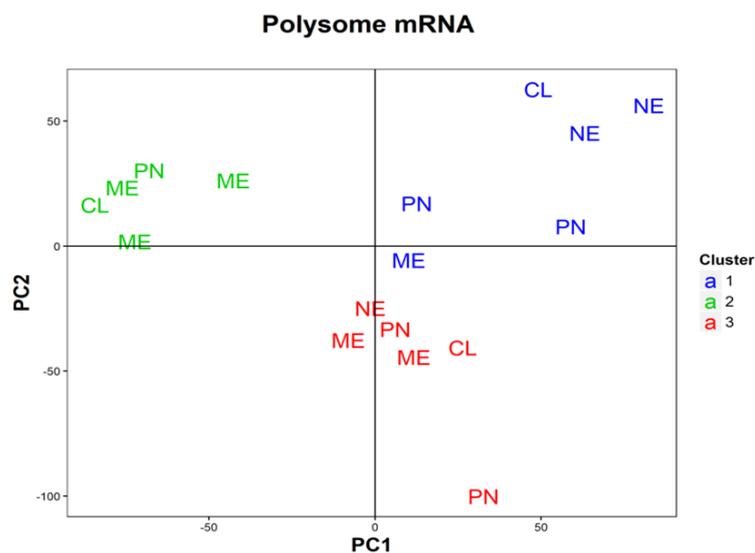


Figura 69 - Classificação das amostras nos grupos estabelecidos pelo TCGA. As amostras de GBM foram plotadas no gráfico PCA com base no RNA polissomal, sendo evidenciados os clusters 1 (azul), 2 (verde) e 3 (vermelho), como descrito anteriormente. Paralelamente a isso, as amostras foram classificadas nos grupos proneural (PN), neural (NE), mesenquimal (ME) e clássico (CL), propostos por Verhaak e colaboradores em 2010, utilizando os dados de RNA total. O grupo do TCGA a que pertence cada amostra foi indicado no gráfico PCA. Percebe-se que não há um enriquecimento dos grupos do TCGA nos clusters 1, 2 ou 3.

Assim, os dados aqui trazidos demonstram que há uma grande diferença entre a expressão gênica no nível de RNA e de proteínas, o que leva à criação de grupos moleculares não clinicamente relevantes e propostas terapêuticas não efetivas. De fato, observa-se um grande número de estudos clínicos que não chega a validar as inovações terapêuticas para esta doença. A classificação molecular, de acordo com os RNAs ativamente traduzidos, pode representar uma alternativa na busca para drogas alvo. O cluster 1 apresenta um aumento das vias associadas a mitocôndrias, sugerindo que pacientes deste grupo poderiam se beneficiar de drogas inibidoras de mitocôndrias. O cluster 2 apresenta aumento do processo de tradução dependente de mTORC1 e aumento de vias de angiogênese, podendo, então, serem melhores respondedores às terapias baseadas em anti-angiogênicos, como o já utilizado bevacizumab e os inibidores da via de mTOR, como o everolimus.

O bevacizumab é um anticorpo monoclonal humanizado contra o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que induz a vascularização, aumenta a permeabilidade da barreira hemato-encefálica e causa edema extracelular (GERSTNER et al. 2009), sendo a droga aprovada para o tratamento de glioblastomas pela primeira vez em 2009 (COHEN et al. 2009). No entanto, dois estudos clínicos fase III com populações da Europa, Ásia e Estados Unidos (AVAglio study (CHINOT et al. 2014), e RTOG0825 study (GILBERT et al. 2014) falharam na perspectiva de mostrar uma melhora na sobrevida global dos pacientes. Os estudos mostram um aumento na sobrevida livre de doença, porém com diversos efeitos colaterais. No estudo RTOG0825, os pacientes foram separados em subgrupos, utilizando um painel de assinatura gênica contendo 9 genes (*AQP1*, *CHI3L1*, *EMP3*, *GPNMB*, *IGFBP2*, *LGALS3*, *OLIG2*, *PDPN*, *RTN1*), o que não foi, entretanto, capaz de identificar um subgrupo com melhor benefício terapêutico.

Do mesmo modo que o observado nos estudos com o bevacizumab, os estudos fase II com o everolimus (inibidor de mTOR) em pacientes com glioblastomas não apresentaram resultados significativos em melhorar a sobrevida destes sujeitos (NCCTG N057K) e NRG Oncology RTOG 0913 (CHINNAIYAN et al. 2018) e apenas houve um aumento na toxicidade do tratamento. Porém, sugere-se neste trabalho que apenas os pacientes do cluster 2, o único grupo que apresenta um

aumento na expressão de proteínas da via de mTOR, teriam benefícios com este tratamento.

O cluster 3 tem a mais alta sobrevida, de 21,1 meses, e caracteriza-se pela presença elevada de mitocôndrias, baixo cílio e baixas vias mTORC1 e 2 associadas. Os resultados sugerem que este grupo de pacientes também poderia se beneficiar de drogas anti-mitochondriais, mas não de terapias anti-angiogênicas ou baseadas em everolimus.

Se estes estudos clínicos fossem, no entanto, realizados subdividindo os pacientes nos clusters aqui apresentados, e selecionando apenas os pacientes do cluster mais indicado, talvez os resultados fossem diferentes. Esses grupos não podem ser definidos por RNA total e, portanto, não correspondem a classificações moleculares anteriores.

Em conclusão, os dados desta tese demonstram que o mRNA traduzido diferencialmente é capaz de identificar subgrupos moleculares de GBMs que estão fortemente associados à prática clínica e, portanto, tem o potencial de identificar novas abordagens terapêuticas e biomarcadores.

3.4.3.4.1 Glioblastomas e gliomas de baixo grau

Além da realização da análise com os tecidos de glioblastomas, foram comparados também os gliomas de diferentes graus. Na análise comparativa de vias biológicas entre os tecidos de alto e baixo graus, notou-se que nos GBMs encontram-se enriquecidas vias associadas à proliferação celular, enquanto que nos gliomas de baixo grau encontram-se enriquecidas vias associadas ao sistema nervoso, como transmissão sináptica (Figura 70). Este resultado é comparável com dados do TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network 2008), que comparou gliomas de alto e baixo graus em que as principais diferenças obtidas foram esses mesmos processos.

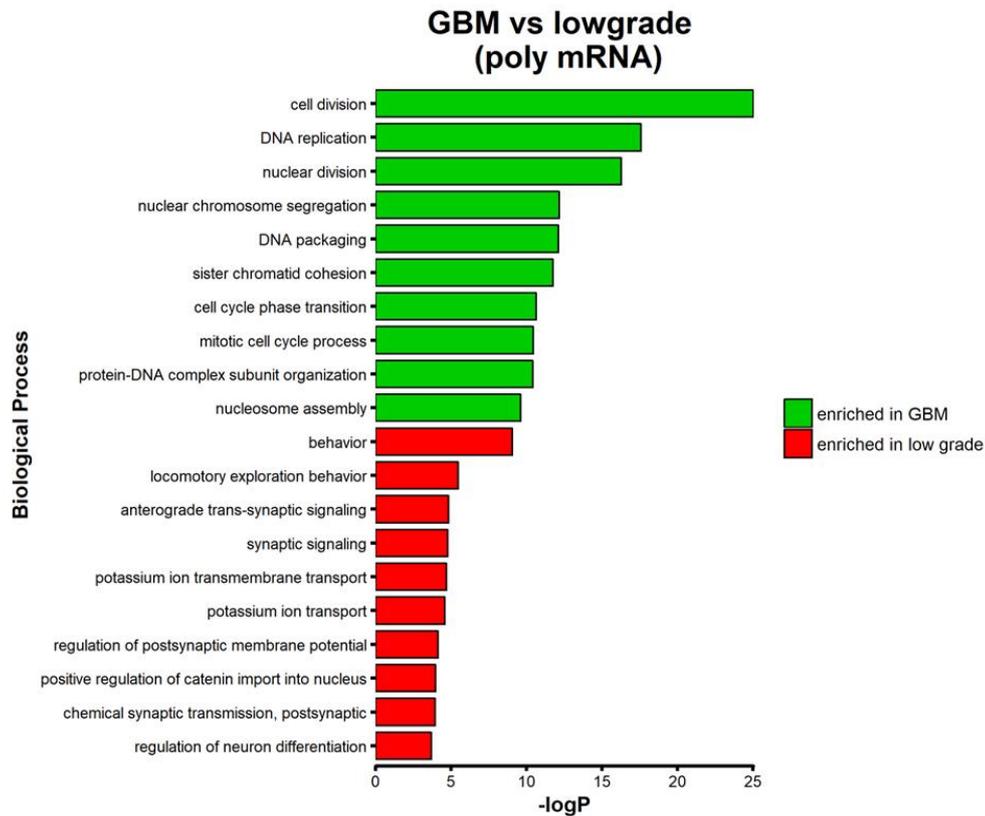


Figura 70 - Perfil de processos biológicos diferencialmente expressos entre os glioblastomas e os gliomas de baixo grau. O perfil de genes diferencialmente traduzidos nos gliomas e nos glioblastomas foi comparado. Os genes foram classificados em processos biológicos (Gene Ontology) e os mais estatisticamente relevantes foram representados graficamente. Em verde estão representados os processos mais enriquecidos nos GBMs e em vermelho os mais enriquecidos nos gliomas de baixo grau.

No entanto, quando são realizadas as análises de agrupamento não supervisionadas os resultados parecem indicar fenômenos diferentes. Utilizando os dados de RNA total das amostras de todos os gliomas para construir um gráfico de PCA, observou-se que as amostras de menor grau histológico segregam em um grupo, e as amostras de glioblastomas em outro (Figuras 71 e 72), pelo PC2. Através do agrupamento não supervisionado (*unsupervised hierarchical clustering*) viu-se que os gliomas de baixo grau se agrupam separadamente aos gliomas de alto grau. Por outro lado, utilizando os RNAs polissomais, os gliomas de baixo grau misturam-se com os glioblastomas, não havendo uma diferença marcante entre eles. Pode-se ver pelo *unsupervised hierarchical cluster* (Figuras 71 e 72) que os gliomas de baixo

grau segregam juntamente com os glioblastomas nos mesmos grupos formados na análise realizada só com os glioblastomas.

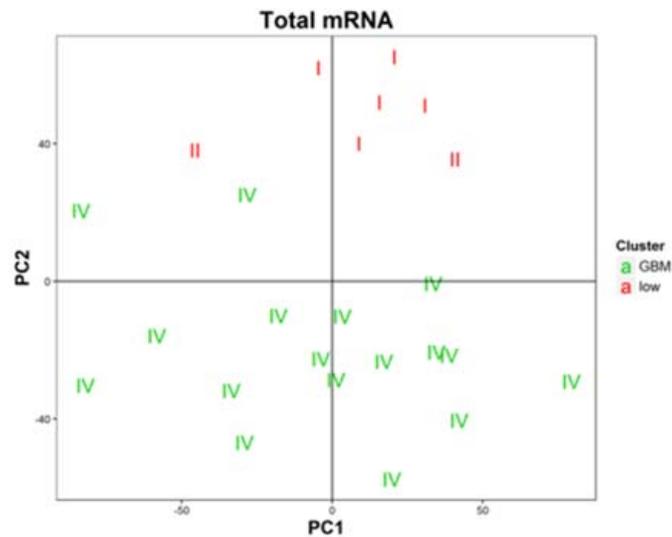


Figura 71 - Gráfico de PCA obtido com o RNA total de gliomas. No gráfico, as amostras estão plotadas com o seu grau histológico marcado, para melhor visualização. Pode-se ver que os glioblastomas (grau IV) segregam em um grupo e as amostras de menor grau em outro.

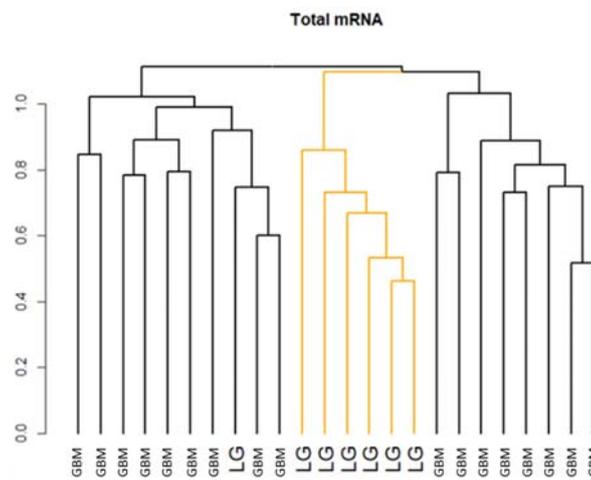


Figura 72 - Clusters gerados pela análise não supervisionada do RNA total. São indicadas as de glioblastoma (GBM) ou baixo grau (LG). Em laranja o novo cluster formado, dos gliomas de baixo grau. O único LG separado com os GBMs é um astrocitoma difuso (Grau II).

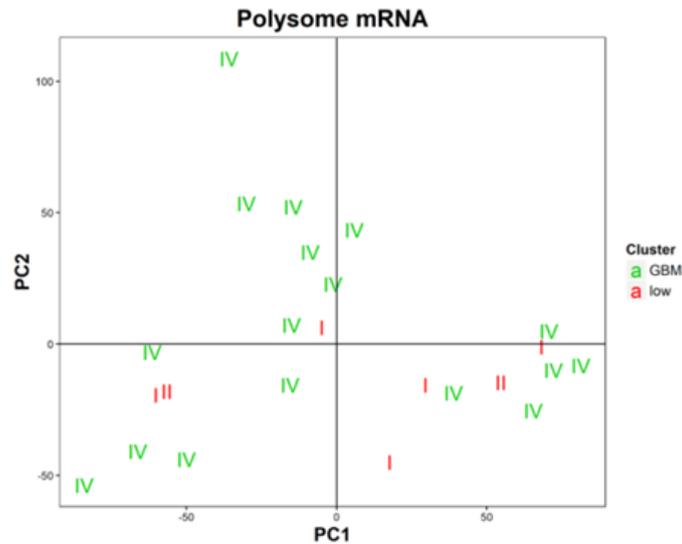


Figura 73 - Gráfico de PCA das amostras polissomais de gliomas. No gráfico, as amostras estão plotadas com o seu grau histológico marcado, para melhor visualização.

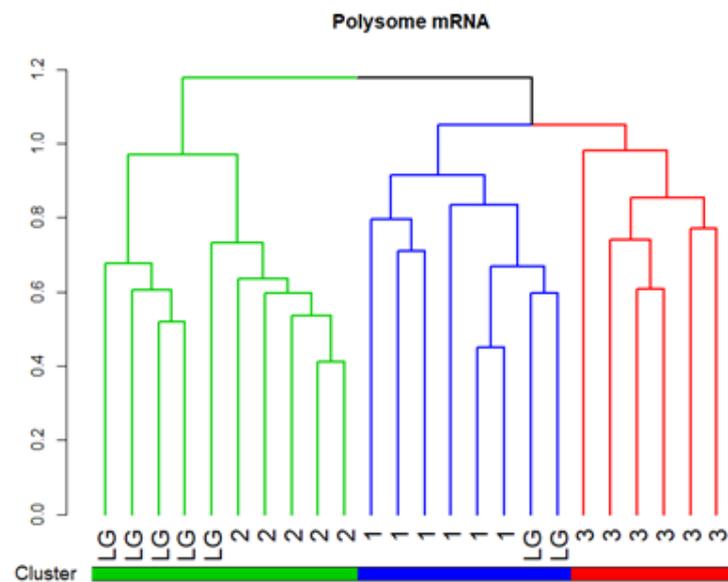


Figura 74 - Clusters gerados pela análise não supervisionada, indicando para cada amostra o cluster definido pela análise do RNA polissomal. Os números indicam os clusters formados na análise dos glioblastomas com o RNA polissomal, e os LG são os gliomas de baixo grau. Os dois LG separados no cluster 1 são um astrocitoma pilocítico e um difuso (Grau I e II respectivamente). Os LG separados no cluster 2 são 4 astrocitomas pilocíticos e 1 difuso.

Este resultado pareceu muito surpreendente. Por um lado, quando se estabelecem os grupos de alto e baixo grau e se realiza a comparação entre eles, observam-se processos relacionados à proliferação e ao sistema nervoso, respectivamente. No entanto, estas diferenças não são significativas a ponto de contribuírem para um agrupamento diferencial na análise não supervisionada. Mais surpreendente ainda é o fato de que foram incluídos na análise tumores de grau I, que possuem um perfil mutacional completamente diferente dos tumores de grau II a IV, sendo, inclusive, considerados entidades distintas. Ou seja, os dados aqui trazidos parecem indicar que o perfil de expressão de proteínas está sendo regulado independentemente de alterações gênicas celulares e que tumores de alto e baixo grau, apesar de muito diferentes geneticamente, apresentam comportamentos biológicos semelhantes.

Considerando que os comportamentos biológicos semelhantes visualizados através do RNA polissomal não sejam regulados por alterações genéticas intrínsecas, supõe-se que estejam, então, refletindo uma resposta ao microambiente tumoral, como uma resposta ao sistema imune, à presença de vascularização ou outros. Se esta hipótese for verdadeira, a manipulação do microambiente tumoral, como o infiltrado imune ou a vascularização em subgrupos específicos de pacientes, seria independente do grau histológico do tumor. Deste modo, os tratamentos poderiam ser equivalentes em gliomas de alto e baixo graus.

3.4.4 Conclusões parciais do capítulo IV

Um novo gradiente foi determinado para a utilização em técnicas de perfil polissomal. O desenvolvimento de um gradiente não-linear permite que o fracionamento acumule os polissomos mais pesados em um número menor de frações a serem coletadas, e este ponto é fundamental para que, metodologicamente, a extração de mRNAs associados a polissomos (RNA polissomal) seja otimizada. Tal modificação é crucial para análises de transcriptômica em amostras de tecido humano congelados, pois, de forma geral, são amostras muito pequenas e que fornecem uma quantidade reduzida de macromoléculas. Foi aplicada também a construção de bibliotecas com o protocolo Smart-Seq2. Desta forma, é possível observar a descrição metodológica que permite o isolamento e o sequenciamento do RNA

polissomal desde a retirada do BioBanco até a biblioteca final pronta para que possa ser sequenciada.

Após o sequenciamento, foi realizada a análise da translatômica dos tecidos, capaz de separar os glioblastomas em 3 grupos, diferentes dos grupos já propostos na literatura, com diferentes vias alteradas. Estas vias são potenciais alvos terapêuticos para novos tratamentos, inclusive drogas já aprovadas que poderiam ser utilizadas em casos específicos, nos quais as vias alvo se encontram alteradas. A análise dos gliomas parece demonstrar que, embora muito diferentes geneticamente, os gliomas de alto e baixo graus possuem processos biológicos ativos muito semelhantes, de modo que poderiam ser exploradas estratégias terapêuticas semelhantes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo estudar o controle traducional para auxiliar na melhor compreensão da biologia tumoral de gliomas. Este aspecto foi abordado inicialmente com um foco metodológico para o desenvolvimento de uma metodologia experimental que permitisse a identificação de RNAs diferencialmente traduzidos. Após a padronização e a análise da viabilidade da técnica em modelos celulares, iniciaram-se os estudos com tecidos tumorais humanos.

Nos capítulos II e III foi expressa a técnica padronizada em um pequeno número de tecidos, o que revelou a necessidade de otimização do método. Finalmente, por meio da adaptação de um novo gradiente para aperfeiçoamento da técnica de perfil polissomal, em amostras de tecido humano pequenas, este pode ser aplicado em um conjunto de tecidos de gliomas congelados. Após o fracionamento por meio do perfil polissomal, a padronização da construção de biblioteca SmartSeq2 viabilizou o sequenciamento e a obtenção do perfil de RNAs diferencialmente traduzidos.

Os padrões de expressão de RNA e RNA diferencialmente traduzido mostraram-se radicalmente diferentes, com a formação de subgrupos moleculares muito distintos entre si. A utilização do RNA diferencialmente traduzido sugere a formação de 3 grupos moleculares, com impacto prognóstico muito diferenciado e alvos terapêuticos também diversos. O estudo dos gliomas de baixo grau também manteve a formação dos mesmos subgrupos moleculares, sugerindo que os grupos refletissem uma resposta ao microambiente tumoral, o que seria mais relevante biologicamente do que alterações gênicas específicas.

Sendo assim este trabalho foi essencial para o estabelecimento da técnica da translômica, estando agora disponível para utilização por outros pesquisadores. Sua aplicação permitirá a descoberta de novos alvos terapêuticos e personalização de terapias alvo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. Como as células leem o genoma: do DNA à proteína; p.340-9.

Alvarenga A. **O controle da tradução pela via de mTOR nos mecanismos de tumorigênese em glioblastomas**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Alvarenga AW, Machado LE, Rodrigues BR, et al. Evaluation of Akt and RICTOR expression levels in astrocytomas of all grades. **J Histochem Cytochem** 2017; 65:93-103.

Amaldi F, Pierandrei-Amaldi P. TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. **Prog Mol Subcell Biol** 1997; 18:1-17.

Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis** 1997; 18:533-7.

Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, Von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol** 2008; 116:597-602.

Blais JD, Filipenko V, Bi M, et al. Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. **Mol Cellular Biol** 2004; 24:7469-82.

Blais JD, Addison CL, Edge R, et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. **Mol Cell Biol** 2006; 26:9517-32.

Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. **Mayo Clin Proc** 2007; 82:1271-86.

Burger PC, Rawlings CE, Cox EB, McLendon RE, Schold SC, Bullard DE. Clinicopathologic correlations in the oligodendroglioma. **Cancer** 1987; 59:1345-52.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-8.

Ceccarelli M, Barthel FP, Noushmehr H, Iavarone A, Verhaak RGW. Subsets and pathways of progression in diffuse molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. **Cell** 2016; 164:550-63.

Chen Y-W, Nader G A, Baar KR, Fedele MJ, Hoffman EP, Esser K A. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. **J Physiol** 2002; 545:27-41.

Chinnaiyan P, Won M, Wen PY, et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. **Neuro Oncol** 2018; 20:666-73.

Cortesi L, Rossi E, Della Casa L, et al. Protein expression patterns associated with advanced stage ovarian cancer. **Electrophoresis** 2011; 32:1992-2003.

Costa-Mattioli M, Monteggia LM. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci** 2013; 16:1537-43.

Costa ET, Barnabé GF, Li M, et al. Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LGI4 and nitric oxide signals. **Oncogene** 2015; 34:1270-9.

Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. **Endocr Relat Cancer** 2000; 7:115-29.

Dalziel K. Isocitrate dehydrogenase and related oxidative decarboxylases. **FEBS Lett** 1980; 117:K45-K55.

Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. **Nature** 2009; 462:739-44.

Dong H, Wang S. Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. **Front Med China** 2012; 6:48-55.

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene** 2004; 23:3151-71.

Fu S, Fan J, Blanco J, et al. Polysome profiling in liver identifies dynamic regulation of endoplasmic reticulum translationalome by obesity and fasting. **PLoS Genet** 2012; 8:1-11.

Garay JP, Gray JW. Omics and therapy: a basis for precision medicine. **Mol Oncol** 2012; 6:128-39.

Garber K. Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. **J Natl Cancer Inst** 2010; 102:926-8.

Geisbrecht B V, Liang X, Morrell JC, Schulz H, Gould SJ. The mouse gene PDCR encodes a peroxisomal delta(2), delta(4)-dienoyl-CoA reductase. **J Biol Chem** 1999; 274:25814-20.

Giusti L, Iaconi P, Da Valle Y, et al. A proteomic profile of washing fluid from the colorectal tract to search for potential biomarkers of colon cancer. **Mol Biosyst** 2012; 8:1088-99.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol** 1999; 19:1720-30.

Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer Cell** 2005; 8:179-83.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, et al. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. **Ann Neurol** 1994; 36:714-21.

Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annu Rev Biochem** 2014; 83:779-812.

Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation Among Pathology , Genotype , and Patient Outcomes in Glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65:846-54.

Hoang-Minh LB, Deleyrolle LP, Nakamura NS, et al. PCM1 depletion inhibits glioblastoma cell ciliogenesis and increases cell death and sensitivity to Temozolomide. **Transl Oncol** 2016; 9:392-402.

Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. **Nature** 2012; 485:55-61.

Hsu Y-C, Kao C-Y, Chung Y-F, Lee D-C, Liu J-W, Chiu I-M. Activation of Aurora A kinase through the FGF1/FGFR signaling axis sustains the stem cell characteristics of glioblastoma cells. **Exp Cell Res** 2016; 344:153-66.

Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, et al. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. **Oncogene** 2003; 22:7155-69.

Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **J Neurooncol** 2012; 107:359-64.

Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. PTEN signaling in gliomas. **Neuro Oncol** 2002; 4:196-211.

Krishnan K, Ren Z, Losada L, Nierman WC, Lu LJ, Askew DS. Polysome profiling reveals broad translome remodeling during endoplasmic reticulum (ER) stress in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics** 2014; 15:159.

Larsson O, Perlman DM, Fan D, et al. Apoptosis resistance downstream of eIF4E: Posttranscriptional activation of an anti-apoptotic transcript carrying a consensus hairpin structure. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:4375-86.

Larsson O, Li S, Issaenko OA, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E-induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. **Cancer Res** 2007; 67:6814-24.

Larsson O, Nadon R. Gene expression - time to change point of view? **Biotechnol. Genet Eng Rev** 2008; 25:77-92.

Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. Identification of differential translation in genome wide studies. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:21487-92.

Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. Anota: analysis of differential translation in genome-wide studies. **Bioinformatics** 2011; 27:1440-1.

Larsson O, Tian B, Sonenberg N. Toward a genome-wide landscape of translational control. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5:a012302.

Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. **Nat Publ Gr** 2017; 19:158-74.

Liang S, Bellato HM, Lorent J, et al. Polysome-profiling in small tissue samples. **Nucleic Acids Res** 2018; 46:e3.

Lü X, De La Peña L, Barker C, Camphausen K, Tofilon PJ. Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. **Cancer Res** 2006; 66:1052-61.

Ma R, Tang Z, Sun K, et al. Low levels of ADAM23 expression in epithelial ovarian cancer are associated with poor survival. **Pathol Res Pract** 2018; 214:1115-22.

Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, et al. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. **PLoS One** 2007; 2:e242.

Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cancer Invest** 2012; 30:48-56.

Masvidal L, Hulea L, Furic L, Topisirovic I, Larsson O. mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees. **RNA Biol** 2017; 14:1299-305.

Nandagopal N, Roux PP. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. **Translation** 2015; 3:e983402.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG Island Methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. **Cancer Cell** 2010; 17:510-22.

Oertlin C, Lorent J, Gandin V, et al. **Generally applicable transcriptome-wide analysis of translational efficiency using anota2seq**. Posted May 14, 2018. Available from: <URL:<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/05/14/106922.full.pdf>> [2018 set 12]

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res** 2004; 64:6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma **Cancer Sci** 2009; 100:2235-41.

Oliver L, Olivier C, Marhuenda FB, Campone M, Vallette FM. Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications. **Curr Mol Pharmacol** 2009; 2:263-84.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro Oncol** 2014; 16:896-913.

Otulakowski G, Duan W, O’Brodivich H. Global and gene-specific translational regulation in rat lung development. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2009; 40:555-567.

Palam LR, Baird TD, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation. **J Biol Chem** 2011; 286:10939-49.

Paolini NA, Moore KS, di Summa FM, Fokkema IFAC, ’t Hoen PAC, von Lindern M. Ribosome profiling uncovers selective mRNA translation associated with eIF2 phosphorylation in erythroid progenitors **PLoS One** 2018; 13:e0193790.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science** 2008; 321:1807-12.

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science** 2014; 344:1396-401.

Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. **Nat Protoc** 2014; 9:171-81.

Polunovsky VA, Bitterman PB. The cap-dependent translation apparatus integrates and amplifies cancer pathways. **RNA Biol** 2006; 3:10-7.

Prados MD, Levin V. Biology and treatment of malignant glioma. **Semin Oncol** 2000; 27:1-10.

Purves D, Fitzpatrick D, Katz LC, et al. **Neuroscience**. Oxford: Oxford University Press; 2000. Studying the nervous systems of humans and other animals; p.1-11.

Qazi MA, Vora P, Venugopal C, et al. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. **Ann Oncol** 2017; 28:1448-56.

Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. **Mol Cell** 2003; 12:889-901.

Ramanathan A, Robb GB, Chan S, Biolabs NE. mRNA capping: biological functions and applications. **Nucleic Acids Res** 2016; 44:7511-26.

Reinert LS, Shi B, Nandi S, et al. MCT-1 protein interacts with the cap complex and modulates messenger RNA translational profiles. **Cancer Res** 2006; 66:8994-9001.

Reis Filho JS, Montemór Netto MR, Sluminskyet BG, et al. Oligodendrogliomas: estudo anatomopatológico e clínico de 15 casos. **Arq Neuro-Psiquiatr** 1999; 57:249-54.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature** 2005; 433:477-80.

Rodón L, González-juncà A, Inda M, Sala-hojman A, Martínez-sáez E, Seoane J. Active CREB1 promotes a malignant TGF b 2 autocrine loop in glioblastoma 2014; 4:1230-42.

Ruggero D, Montanaro L, Ma L, et al. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. **Nat Med** 2004; 10:484-6.

Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:729.

Sathornsumetee S, Reardon D A., Desjardins A, Quinn J A., Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **Cancer** 2007; 110:12-24.

Schwanhausser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature** 2011; 473:337-42.

Scott J, Tsai Y-Y, Chinnaiyan P, Yu H-Hm. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. **Int J Radiat Oncol** 2011; 81:206-10.

Spangenberg L, Shigunov P, Paula A, et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem Cell Res** 2013; 11:902-12.

Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Changing paradigms-an update on the Multidisciplinary management of malignant glioma. **Oncologist** 2006; 11:165-80.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol** 2009; 10:459-66.

Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Res** 2017; 45:D362-8.

Teng J, Carla da Hora C, Kantar RS, et al. Dissecting inherent intratumor heterogeneity in patient-derived glioblastoma culture models. **Neuro. Oncol** 2017; 19:820-32.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol** 2015; 23:1985-96.

Tortosa A, Ino Y, Odell N, et al. Molecular genetics of radiographically defined de novo glioblastoma multiforme. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2000; 26:544-52.

Tréton X, Pédruzzi E, Cazalshatem D, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology** 2011; 141:1024-35.

Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. **Nature** 2012; 483:479-83.

van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:166-93.

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell** 2010; 17:98-110.

Willems E, Lombard A, Dedobbeleer M, Goffart N, Rogister B. The unexpected roles of aurora a kinase in glioblastoma recurrences. **Target Oncol** 2017; 12:11-8.

Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell** 2011; 19:17-30.

Xu X, Zhao J, Xu Z, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. **J Biol Chem** 2004; 279:33946-57.

Yamashita R, Suzuki Y, Takeuchi N, Wakaguri H. Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:3707-15.

Young SK, Wek RC. Upstream open reading frames differentially regulate gene-specific translation in the integrated stress response. **J Biol Chem** 2016; 291:16927-35.

Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1a. **Science** 2009; 324:261-5.

Zhu Y, Parada LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:616-26.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 05 de junho de 2013.

A

Dra. Glaucia Noeli Maroso Hajj.

Aluna: Fernanda Cristina Sulla Lupinacci (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1775/13

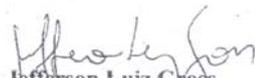
“Translatômica aplicada ao descobrimento de alterações moleculares em gliomas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 07/05/2013, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Biologia Celular e Molecular;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Biologia Celular e Molecular;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e processadas Pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma do Estudo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



A.C. Camargo
Cancer Center

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: GÊNERO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: GÊNERO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Papel de microvesículas na biologia de tumores cerebrais: implicações no diagnóstico e tratamento

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Vilma Regina Martins – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

- Tiago Góss dos Santos – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Glaucia Hajj – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Martin Roffe – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Paulo Sanematsu Jr – Departamento de Neurocirurgia – A.C. Camargo Cancer Center
- Marilene Lopes – Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB – USP
- Fernanda Lupinacci – aluna de doutorado – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Paula do Amaral Ribeiro – aluna de mestrado – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Fernanda Ferreira – aluna de mestrado – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

24 meses

Rúbrica do responsável
pela aplicação do termo

Rúbrica do
participante:

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “Papel de microvesículas na biologia de tumores cerebrais: implicações no diagnóstico e tratamento”, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

O convite para a participação no presente estudo está sendo realizado após sua consulta no Departamento de Neurocirurgia, onde serão esclarecidas todas as questões referentes ao seu diagnóstico e tratamento.

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Avaliar se micropartículas encontradas em pacientes com tumor de cérebro têm algum papel durante a evolução da doença e comparar o conteúdo destas com microvesículas de pacientes sem a doença.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Micropartículas são pequenas estruturas produzidas pelas células das pessoas, sejam elas saudáveis ou acometidas por alguma doença. Estudos iniciais sugerem que estas micropartículas possam ter algum papel no desenvolvimento do câncer. No entanto, mais estudos devem ser feitos para que o papel destas micropartículas seja melhor compreendido. Neste projeto, investigaremos as micropartículas em amostras de sangue e do tecido tumoral de pacientes com tumores de cérebro, com o objetivo de conhecer melhor a sua função nesta doença. Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos a você, mas talvez sejam úteis no futuro, permitindo um diagnóstico mais informativo e um maior conhecimento a respeito desta doença.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Para participar do estudo você deverá ter:

- Diagnóstico de tumor de cérebro de alto ou baixo grau.

Critério de exclusão:

- Ter recebido qualquer tratamento prévio (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia).

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso você concorde em participar deste estudo, será feita uma coleta de quinze mililitros (15 mL) de sangue pelo anestesiologista após o processo de anestesia e antes do ato cirúrgico. Para os pacientes diagnosticados com tumor de cérebro, a coleta do fragmento do tumor (de tamanho aproximado 2-3 cm³) será feita pelo neurocirurgião e não comprometerá em nada o procedimento cirúrgico, tampouco seu diagnóstico, uma vez que só iremos utilizar os fragmentos que o patologista e a equipe cirúrgica julgarem que não irão comprometer a avaliação futura.

Você não terá despesas adicionais decorrentes da participação nesta pesquisa, e deste modo não será ressarcido de gastos com transporte ou alimentação no dia da cirurgia. O sangue coletado, processado e seus componentes ficarão armazenados até a sua utilização, em freezers apropriados, localizados no Centro Internacional de Pesquisa (sob responsabilidade da Dra. Vilma Regina Martins). O fragmento do tumor será imediatamente encaminhado para o laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro Internacional de Pesquisa, onde os pesquisadores irão isolar células específicas do tumor e cultivá-las para posterior manipulação.

Um novo método de estudo é o Patient Derived Xenograft ou PDX, em português: Enxerto (tumor) Originado do Paciente. Os PDX são produzidos em camundongos através do transplante de

Rúbrica do responsável
pela aplicação do termo

Rúbrica do
participante:

uma pequena parte de seu tumor no animal. Essa pequena parte do tumor transplantada no animal irá formar um novo tumor, semelhante ao que se desenvolveu em você. O PDX faz com que o tumor de um paciente agora possa ser estudado e tratado em um camundongo. O PDX mantém grande parte das características do tumor do paciente, sendo extremamente útil para pesquisa de biomarcadores da doença. Biomarcadores são moléculas encontradas em um indivíduo que podem indicar algum acontecimento biológico importante para uma determinada situação, neste caso, um tumor.

Uma pequena parte do tumor será aproveitada para isolar as células tumorais no laboratório. Estas células serão utilizadas para pesquisar características típicas do tumor e para testar novas medicações contra o câncer. Assim, parte dos fragmentos do tumor será analisada no laboratório e outra parte será implantada nos camundongos seguindo normas éticas internacionais e aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da instituição. Os animais serão cuidados e, no momento que o tumor-PDX chegar a um tamanho de 1 centímetro, o animal será anestesiado, o tumor será removido para avaliação e o sangue será coletado para análise das microvesículas. Todos os procedimentos realizados no animal serão realizados dentro das melhores condições, o animal não sofrerá e não será submetido a nenhum procedimento que lhe cause dor ou qualquer desconforto. O tumor do animal será utilizado para estudar detalhes da doença.

Importante, as células tumorais que serão isoladas do seu tumor são consideradas imortais, ou seja, podem ser mantidas por tempo indeterminado em condições laboratoriais específicas. Devido a essa característica, essas células podem ser utilizadas em estudos futuros.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do AC Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição”.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

A sua participação neste estudo não irá lhe trazer nenhum benefício pessoal direto. Contudo, os resultados podem contribuir para o maior entendimento dos fatores que determinam o avanço e a agressividade do tumor de cérebro, e desta forma podem ajudar outras pessoas no futuro.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Rúbrica do responsável
pela aplicação do termo

Rúbrica do
participante:

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. Para qualquer dúvida em relação a sua participação neste projeto, entrar em contato com Vilma Regina Martins (011) 2189-5000 – ramal: 2977, de segunda à sexta das 8:00 às 18:00 horas.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

() Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

() Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

() Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA;

Rúbrica do responsável
pela aplicação do termo

Rúbrica do
participante:



A.C. Camargo
Cancer Center

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Vilma Regina Martins
Laboratório de Biologia Tumoral e Biomarcadores do Centro Internacional de Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2189-5000
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo / Rua Taguá, 440 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar** desse estudo de forma livre e esclarecida autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela aplicação do termo

_____/_____/_____
Data