



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA
E BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE PREDITIVA DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO IMATURAS
DE POLPA DENTÁRIA HUMANA PARA O TRATAMENTO
DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME E NEUROBLASTOMA
POR MEIO DE RNA-SEQ**

DENIS ADRIÁN DELVALLE MARTÍNEZ

Foz do Iguaçu
2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA
E BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE PREDITIVA DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO IMATURAS
DE POLPA DENTÁRIA HUMANA PARA O TRATAMENTO
DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME E NEUROBLASTOMA
POR MEIO DE RNA-SEQ**

DENIS ADRIÁN DELVALLE MARTÍNEZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza (ILACVN) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Hermes José Schmitz.

Coorientador Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi

Foz do Iguaçu
2022

DENIS ADRIÁN DELVALLE MARTÍNEZ

**ANÁLISE PREDITIVA DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO IMATURAS
DE POLPA DENTÁRIA HUMANA PARA O TRATAMENTO
DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME E NEUROBLASTOMA
POR MEIO DE RNA-SEQ**

DENIS ADRIÁN DELVALLE MARTÍNEZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza (ILACVN) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Hermes José Schmitz

UNILA

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi

UNIFESP

Prof. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade

UNILA

Prof. Dra. Maria Claudia Gross

UNILA

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Denis Adrián Delvalle Martínez

Curso: Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade

	Tipo de Documento
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Análise preditiva do potencial terapêutico de exossomos derivados de células-tronco imaturas de polpa dentária humana para o tratamento de glioblastoma multiforme e neuroblastoma por meio de RNA-Seq

Nome do orientador: Prof. Dr. Hermes José Schmitz

Nome do coorientador: Prof. Dr. Rodrigo P. Araldi

Data da Defesa: ____/____/____

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho a minha maravilhosa
família que me apoia em todas e cada uma
das minhas aventuras.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha família por ser o pilar mais importante da minha vida, pelas demonstrações de amor incondicional e por ter me apoiado até nas impossibilidades mais remotas das minhas aventuras. Aos meus pais pela educação recebida, por serem pessoas admiráveis, sobretudo exemplos de vida, por demonstrar para mim que não existem limites nesse mundo, por me permitir pensar que, se existisse uma outra vida, não seria melhor sem eles. À minha mãe “Ma!” por ser a mulher mais maravilhosa deste mundo, por acreditar em mim até quando nem eu mais podia, por ser a fonte principal da minha força de vontade para todas as minhas batalhas. Araka’eve ndahypaichéne che mborayhu nderehe, che symi. Ao meu pai “Pa!” por ser um homem sábio e forte perante as adversidades da vida, pelos melhores e mais pertinentes conselhos e por ser o melhor filho para a minha avó, merece tudo por isso, tudo. Ao meu irmão “Rody” por ser o meu primeiro irmão (ou inimigo natural kkk), por ser uma pessoa que daria até o que não tem para ver bem a quem ama, pela honra de ser o pai do meu sobrinho lindo e maravilhoso. Ao “Andy” meu segundo irmão, por ser o meu melhor amigo, por ser todos os meus sentidos quando os meus próprios não estão dando conta de si mesmos, pela parceria mais perfeita e única que existe e por ser o meu infinito pano de lágrimas. À minha avó “Ña Ema” por ser a minha segunda mãe, a rainha da casa, pelo amor e carinho infinitos, por me permitir viajar com as suas lindas histórias de vida e pela sua educação de “vovó” (que me fez ser “el más malcriado” de todos). À minha cunhada, irmã e amiga “Lidu” por ser aquela pessoa divertida e sem problemas para nada, pelo seu carinho e pelos momentos mais felizes juntos. Ao meu sobrinho “Sebas” o mais novo da orquestra, por ser o brilho nos olhos da família e por representar a minha esperança no mundo. Ao meu avô “Ernesto” porque você nunca se foi, sempre esteve aqui comigo, desde onde for que o senhor esteja. Sempre estarei agradecido pelo exemplo de vida que o senhor representa e por ser o melhor avô deste mundo. A minha avó Elisa que me ensinou a não perder a esperança nunca. Ao meu avô Teófilo “Tum” por cuidar dos netos como os seus próprios filhos e por tanto amor e carinho. Aos meus tios e tias, primos e primas que estiveram comigo sempre me apoiando durante esta aventura. Obrigado por ser a melhor família. Amo todos vocês.

Às melhores amigas que ganhei até o dia de hoje. Àquelas pessoas que alguma vez dedicaram o seu valioso tempo para compartilhar comigo eternos momentos. Essas pessoas, que apesar da distância ou tempo sem se ver, permanecem comigo, unidos por fortes laços de

afeto e carinho. Para essas pessoas que me ensinam que a vida é melhor, simplesmente tendo alguém ao lado. Obrigado por ser a família que escolhi.

Ao meu orientador, professor e amigo Hermes “H.”, por ter me ensinado a amar cada vez mais à Biologia, por me demonstrar que existem pessoas incrivelmente inteligentes neste mundo, pelo acompanhamento durante todo o curso, pelas conversas de livre espontaneidade e sobretudo por acreditar em mim e aceitar caminhar ao meu lado nesta batalha, a mais nova.

Ao meu coorientador, professor e amigo Rodrigo “Rô”, por ser aquela luz no final do túnel, pela sua impressionante paciência e entrega, pela humildade e dedicação na educação e na ciência, por ser uma pessoa admirável. Também, lhe agradeço por confiar em mim, por trazer de novo ao mundo o meu espírito de orgulho e luta, por ser uma das pessoas mais maravilhosas deste mundo.

Aos professores, técnicos de laboratório e funcionários em geral da UNILA que me receberam com os braços abertos e compartilharam comigo os melhores e mais valiosos aprendizados. Aos professores do curso por terem se esforçado dia a dia para transformar o nosso querido “curso da Bio” em uma segunda casa, pelo comprometimento e dedicação perante as dificuldades da educação no mundo inteiro. Agradeço especialmente aos professores que se tornaram amigos durante todo este tempo, àqueles que compartilharam comigo experiências impagáveis e únicas, àqueles que acreditam na amizade entre aluno e docente e que humildemente se instalam nos melhores assentos da minha memória. Especialmente ao Cleto, Thati, Pablo, Hermes, Zanella e Elaine. Obrigado por serem motivo de orgulho e exemplos de vida.

Aos meus orientadores e coorientadores de todos os maravilhosos projetos de iniciações científicas e de extensão desenvolvidos ao longo do curso: Cristiane, Francisca, Cleto, Thati, Gilcélia, Irina e Rodrigo.

Agradeço também às pessoas que estiveram comigo neste último percurso, me outorgaram parte do seu valioso tempo e fizeram com que este trabalho possa ser realizado e da melhor maneira possível, especialmente ao: Rodrigo, Hermes, Gabriel, Felipe, Jefferson, Aldo e Celeste.

Aos meus colegas do curso que estiveram comigo durante todo este caminho. Obrigado por formar parte da minha família de biologia, por serem pessoas exemplares e por me permitirem aprender junto com vocês e de vocês. Agradeço especialmente, às duas colegas que ficaram do meu lado durante o curso inteiro, Alicia e Celeste.

Aos meus amigos da universidade, “amigos da facul”. Os que se tornaram um lar quando o meu próprio estava longe, não existe dinheiro no mundo que consiga pagar tudo o

que vocês são e fizeram por mim. Obrigado a todos e cada um de vocês (todos vocês não caberiam apenas nesta seção, mas tenho certeza que vocês sabem que fazem parte).

A todas as pessoas que estiveram comigo por algum tempo, aos que ainda estão e àqueles que continuarão estando nos próximos episódios desta série. Só tenho agradecimento e desejo o melhor dos sucessos sempre para suas vidas. Nada seria possível hoje sem todos vocês.

Agradecimento especial à família Krohn Martínez, especialmente ao Carlos Krohn e Lilian Martínez pelo acompanhamento de sempre e também pelo apoio e confiança desde o início desta aventura.

Agradeço à UNILA pela formação acadêmica e pessoal, pela oportunidade de viver experiências extraordinárias e por permitir que pessoas de diferentes países, culturas, sonhos se juntem para cumprir os seus objetivos. Agradeço incansavelmente pelo aprendizado dentro desta família e pela luz de esperança que ela representa dentro da América Latina e no mundo todo.

À Divisão de Reservatório da Itaipu Binacional pelo aprendizado e pelas experiências extraordinárias no período de estágio, levarei essas memórias comigo com muito carinho.

Agradeço imensamente à Cellavita Pesquisas Científicas Ltda. e ao Instituto Butantan pelo apoio financeiro para desenvolver a pesquisa referente a este trabalho de conclusão de curso e os projetos de iniciação científica e de desenvolvimento tecnológico.

Agradeço ao Brasil, um país irmão que me forneceu as ferramentas necessárias para conseguir realizar esta graduação fora do meu querido Paraguai. Agradeço pelo acesso a uma educação pública e de qualidade.

A você que está lendo estes agradecimentos e espero que este trabalho sirva de alguma maneira para conseguir o teu propósito.

E por fim, agradeço ao Denis do passado por fazer até o impossível virar realidade para conseguir que hoje, o Denis do presente possa escrever estas palavras e viver esta vida maravilhosa. Desde já agradeço ao Denis do futuro porque confio que quando voltar a ler este trabalho vai estar plenamente orgulhoso e se preparando para contar para nós sobre os novos episódios desta eterna história.

OBRIGADO! ;AGUYJEVETE! ;GRACIAS TOTALES!

“Na vida não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido. Agora é hora
de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é a malignidade mais comum de cérebro, sobretudo na população adulta (45-65 anos) e também a forma mais grave das neoplasias intracranianas, com uma taxa de sobrevivência média de oito meses. O neuroblastoma (NB) por sua vez representa a forma mais prevalente de câncer pediátrico, sendo responsável por até 90% de todos os cânceres na idade entre 1-2 anos e, 15% dos óbitos verificados na população pediátrica, sendo a malignidade extracraniana mais comum do sistema nervoso. Apesar dos notórios avanços na oncologia, a taxa de mortalidade por estas doenças permanece elevada. Desta forma, faz-se necessário desenvolver novas terapias mais eficientes para o tratamento destes e de outros cânceres. Neste sentido, este estudo buscou prever o potencial antineoplásico de exossomos derivados de células-tronco imaturas de polpa dentária humana (Exo-CTIPDh) para o tratamento do GBM e NB. Para isso, linhagens celulares de GBM (SH-SY5Y) e NB (U251) foram tratadas com 50 ug/mL dos Exo-CTIPDh. Após cinco dias, o RNA total foi isolado e submetido à análise de sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Os resultados mostraram que os Exo-CTIPDh são capazes de reprimir a expressão de genes associados à progressão e metastatização, incluindo a formação de células-tronco cancerígenas (que estão associadas à resistência à quimioterapia) destas malignidades e, promover a expressão de genes associados à adesão celular e recuperação do metabolismo oxidativo. Estes resultados sugerem que os Exo-CTIPDh podem ser empregados no tratamento do GBM e do NB. Entretanto, faz-se necessário validar os resultados *in silico* por meio de ensaios *in vitro* e estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Câncer, regulação gênica, sistema nervoso, vesículas extracelulares, terapia *cell-free*

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es la neoplasia maligna más común del cerebro, especialmente en la población adulta (45-65 años) y también la forma más grave de neoplasias intracraneales, con una tasa de supervivencia promedio de ocho meses. El neuroblastoma (NB) a su vez representa la forma más prevalente de cáncer pediátrico, representando hasta el 90% de todos los cánceres de 1 a 2 años y el 15% de las muertes en la población pediátrica, siendo la malignidad extracraneal la más común en el sistema nervioso. A pesar de los notables avances en oncología, la tasa de mortalidad por estas enfermedades sigue siendo alta. Por ello, es necesario desarrollar nuevas terapias más eficientes para el tratamiento de estos y otros cánceres. En este sentido, este estudio buscó predecir el potencial antineoplásico de exosomas derivados de células madre inmaduras de pulpa dental humana (Exo-CTIPDh) para el tratamiento de GBM y NB. Para ello, las líneas celulares GBM (SH-SY5Y) y NB (U251) fueron tratadas con 50 ug/mL Exo-CTIPDh. Después de cinco días, se aisló el ARN total y se sometió a análisis de secuenciación de ARN (RNA-Seq). Los resultados mostraron que Exo-CTIPDh es capaz de reprimir la expresión de genes asociados con la progresión y la metástasis, incluida la formación de células madre cancerosas (que están asociadas con la resistencia a la quimioterapia) de estas neoplasias malignas, y promover la expresión de genes asociados a la adhesión celular y la recuperación del metabolismo oxidativo. Estos resultados sugieren que Exo-CTIPDh puede usarse en el tratamiento de GBM y NB. Sin embargo, es necesario validar los resultados *in silico* mediante ensayos *in vitro* y estudios preclínicos.

Palabras-clave: Cáncer, regulación génica, sistema nervioso, vesículas extracelulares, terapia *cell-free*

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignancy of the brain, especially in the adult population (45-65 years old) and also the most severe type of intracranial neoplasms, with an average survival rate of eight months. Neuroblastoma (NB) represents the most prevalent type of pediatric cancer, accounting for up to 90% of all cancers at 1-2 years of age 15% of deaths in the pediatric population, being the most common extracranial malignancy of the nervous system. Despite the advances in oncology, the mortality rate for these diseases remains high. Thus, novel and more efficient therapies for the treatment of these and other cancers are necessary. In this sense, this study aimed to predict the antineoplastic potential of exosomes derived from human immature dental pulp stem cells (Exo-hIDPSCs) for the treatment of GBM and NB. For this, cell lines from human GBM (SH-SY5Y) and NB (U251) were treated with 50 ug/mL of Exo-CTIPDh. After five days, total RNA was isolated and subjected to RNA sequencing analysis (RNA-Seq). The results showed that Exo-CTIPDh were able to repress the expression of genes associated with the cancer progression and metastasis, including the formation of cancer stem cells (which are associated with resistance to chemotherapy), and, promoted the expression of genes associated with cell adhesion and recovery of oxidative metabolism. These results suggest that Exo-CTIPDh can be used for GBM and NB treatment. However, validation of these *in silico* results through *in vitro* assays and preclinical studies is still necessary.

Keywords: Cancer, gene regulation, nervous system, extracellular vesicles, cell-free therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glioblastoma multiforme, tipo de câncer agressivo que se origina no cérebro ou na medula espinhal.....	22
Figura 2. O neuroblastoma (NB) se origina no SN, mais frequentemente no tecido nervoso das glândulas supra-adrenais.....	24
Figura 3. Controle de qualidade do sequenciamento das linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh.....	43
Figura 4. Percentual de sequências alinhadas de acordo com o genoma humano de referência (GRCh37).....	44
Figura 5. Número de <i>Reads</i> (leituras) contados nas células de NB e GBM controle e tratadas com os Exo-CTIPDh.....	45
Figura 6. Biótipos dos transcritos mapeados através do alinhamento com o Genoma humano GRCh37.....	46
Figura 7. Redução de dimensionalidade das células de NB e GBM controle e tratadas com os Exo-CTIPDh.....	47
Figura 8. Diagramas de Venn mostrando os genes comum e diferencialmente expressos nas linhagens estudadas (SH-SY5Y e U251).....	48
Figura 9. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	49
Figura 10. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	50
Figura 11. Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM reprimidos após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	51
Figura 12. Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM reprimidos após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	53
Figura 13. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	54
Figura 14. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	55
Figura 15. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	57
Figura 16. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	58

Figura 17.Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM diferencialmente expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de escore Phred e o seu nível de acurácia correspondente.....	39
Tabela 2. Resultados da análise de qualidade do RNA isolado das linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh.....	42
Tabela 3. Lista de genes associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico das linhagens SH-SY5Y e U251 expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	52
Tabela 4. Lista de genes associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico das linhagens SH-SY5Y e U251 com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	56
Tabela 5. Lista de genes reprimidos associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico da linhagem SH-SY5Y diferencialmente expressos (pelo menos três vezes mais do que do controle) após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	60
Tabela 6. Lista de genes reprimidos associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico da linhagem U251 diferencialmente expressos (pelo menos três vezes mais do que do controle) após o tratamento com os Exo-CTIPDh.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Água DEPC	Água tratada com Dietil Pirocarbonato
ATCC	American Type Cell Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BAM	Binary Alignment Map
BHE	Barreira hemato-encefálica
BPF	Boas práticas de fabricação
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the Unites States
cDNA	DNA complementar
cIMPACT- NOW	Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy
CTC	Células-tronco cancerígenas
CTIPDh	Células Tronco Imaturas de Polpa Dentária humana
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CTN	Célula Tronco Neuronal
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DGE	Differential Gene Expression
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBI	European Biotechnology Information
EUA	Estados Unidos da América
Exo-CTIPDh	Exossomos derivados de células-tronco imaturas da polpa dentária humana
FPKM	fragments per kilobase of transcript per million reads mapped
FPM	fragments per million reads mapped
GBM	Glioblastoma multiforme
GLOBOCAN	Global Cancer
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSNAP	Genomic Short-read Nucleotide Alignment Program
HIF	fator induzido por hipoxia
HTSeq	high-throughput sequencing data
INCA	Instituto Nacional de Câncer – Brasil
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
lncRNA	Long non-coding RNA
miRNAs	Micro-RNAs
mRNA	RNA mensageiro
MRP	Multiple resistance proteins
MV	Microvesículas
NB	Neuroblastoma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute - EUA
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORA	Over-representation Analysis
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PIA	Proteína inibidora de apoptose
QC	Quality control
RCF	Relative Centrifugal Force

RIN	RNA integrity number
RLE	Relative Log Expression
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RPM	Rotações por minuto
RUM	RNA-Seq Unified Mapper
SAM	Sequence Alignment Map
SH-SY5Y	Linhagem celular do Neuroblastoma
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Short Read Archive
sRNA	Small RNA
STAR	Spliced Transcript Alignment to Reference
TEM	transdiferenciação epitélio-mesênquima
TMM	Trimmed Mean of M-values
TMZ	Temozolomida
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPM	transcript per million
U251	Linhagem celular do Glioblastoma multiforme
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VE	Vesícula extracelular
WHO CNS	World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Câncer: O maior problema de saúde pública mundial.....	20
1.2 Cânceres do sistema nervoso (SN).....	20
1.3 Glioblastoma multiforme (GBM).....	21
1.4 Neuroblastoma (NB).....	23
1.5 Terapia celular avançada com células-tronco mesenquimais.....	25
1.6 Terapia cell-free (baseada em exossomos): Uma nova abordagem terapêutica.....	27
1.7 Plataformas de sequenciamento de RNA (RNA-Seq).....	28
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção do meio condicionado.....	35
3.2 Isolamento dos exossomos.....	35
3.3 Análise do potencial terapêutico dos Exo-CTIPDh.....	36
3.3.1 Sequenciamento de RNA total (RNA-Seq).....	36
3.3.2 Análise do Controle de qualidade dos arquivos fastq.....	38
3.3.3 Determinação dos transcritos diferencialmente expressos.....	39
3.3.4 Avaliação de vias enriquecidas.....	41
4 RESULTADOS	42
4.1 RNAs isolados apresentaram qualidade satisfatória para o sequenciamento.....	42
4.2 A qualidade do RNA após sequenciamento demonstrou ser satisfatória.....	42
4.3 Transcritos expressos foram mapeados em genes codificadores de proteínas.....	44
4.4 Exo-CTIPDh são capazes de modificar o perfil transcricional das linhagens celulares de NB e GBM.....	47
4.5 Exo-CTIPDh regulam positivamente vias associadas à apoptose, adesão e metabolismo oxidativo.....	49
4.6 Exo-CTIPDh regulam negativamente vias associadas à metástase e formação de células-tronco cancerígenas.....	52

4.7 Exo-CTIPDh regula a expressão de genes associados ao desenvolvimento do sistema nervoso.....	56
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	67
7 REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: O maior problema de saúde pública mundial

De acordo com dados da GLOBOCAN, em 2020 foram registrados 19,3 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de óbitos pela doença em todo o mundo, fazendo do câncer a segunda principal causa de óbito (GLOBOCAN, 2020). Apesar dos notórios avanços na oncologia, as projeções epidemiológicas do câncer para 2040 são alarmantes, sendo esperado um aumento de 47% do número de novos casos (*i.e.*, 27,5 milhões de casos incidentes) e 16,3 milhões de óbitos por câncer em todo mundo (GLOBOCAN, 2020). Entretanto, o cenário epidemiológico do câncer se torna ainda mais alarmante para países em desenvolvimento como o Brasil. Isto porque a falta de atenção primária em saúde contribui com uma maior incidência de casos de câncer, com reflexos negativos na taxa de mortalidade pela doença (INCA, 2019). Por esta razão, para 2040 é esperado um aumento de 65,6% no número de novos casos de câncer e 77,3% no número de óbitos pela doença na América Latina (GLOBOCAN, 2020). Estes números fazem do câncer o maior problema de saúde pública mundial, sobretudo para a América Latina (INCA, 2019).

1.2 Cânceres do sistema nervoso (SN)

Embora as malignidades do sistema nervoso (SN) representam de 1,4 a 1,8% de todos os casos de câncer (INCA, 2022), a taxa de incidência para o Brasil se encontra cerca de 11.000 novos casos/ano para o período entre 2020 e 2022 (INCA, 2019).

De modo geral, estas malignidades surgem por causa do crescimento descontrolado de células transformadas no cérebro e na medula espinhal (sistema nervoso central - SNC). Embora estas malignidades sejam mais prevalentes na população adulta (sobretudo gliomas), elas também podem acometer crianças (sobretudo neuroblastomas) (Stewart & Wild, 2014).

Com o objetivo de padronizar a classificação dos tumores do SNC, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu um sistema de classificação internacional. Este sistema, conhecido por WHO CNS, foi publicado pela primeira vez em 1979 (WHO CNS1). Desde então, este sistema já passou por seis revisões, sendo a última delas (WHO CNS5) publicada em 2021 (Zülch, 1979; Kleihues; Burger & Scheithauer, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000; Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016; Louis *et al.*, 2021).

Em 1979, os tumores primários do SNC se classificavam de acordo com a célula de origem do processo neoplásico e eram categorizados em quatro diferentes graus (de I a IV) de acordo com critérios clínico-patológicos de agressividade (Zülch, 1979). Já em sua última edição, publicada em 2021, o WHO CNS5 incluiu as recomendações do *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy (cIMPACT-NOW)*, levando em consideração os importantes avanços da biologia molecular, sobretudo no que diz respeito ao diagnóstico dos tumores do SNC (Louis *et al.*, 2021).

Dentre as diferentes malignidades do SN incluídas no WHO CNS5 se encontram o (i) glioblastoma multiforme (GBM) – neoplasia maligna primária intracraniana e, (ii) o neuroblastoma (NB) – neoplasia maligna de origem embrionária que, embora se origine a partir de formas primitivas de células nervosas, se desenvolve fora do SNC (*i.e.*, extracranialmente) (Louis *et al.*, 2021; American Cancer Society, 2022).

1.3 Glioblastoma multiforme (GBM)

Dentre as neoplasias malignas do SNC, o GBM, também conhecido por astrocitoma de grau IV, representa a malignidade mais comum e agressiva que acomete o cérebro, sendo mais prevalente na população adulta com 45-65 anos (Wilson; Karajannis & Harter, 2014; Ostrom *et al.*, 2021). De acordo com o relatório quadrienal do *Central Brain Tumor Registry of United States (CBTRUS)*, publicado em 2020, o GBM apresenta uma incidência de 3,2 casos a cada 100 mil habitantes nos EUA (Ostrom *et al.*, 2021). Embora não haja dados atualizados da incidência da doença no Brasil, dados de 2012 mostram que o país possui a maior taxa de incidência de GBM em relação aos demais países da América, registrando até 13,3 casos da doença a cada 100 mil brasileiros (Trevisan *et al.*, 2019). Estes dados são alarmantes, já que o GBM apresenta uma taxa de sobrevivência média de 15-16 meses, com menos de 30% dos pacientes sobrevivendo após o segundo ano do diagnóstico (Abedi *et al.*, 2021). O prognóstico desfavorável da doença se deve à elevada taxa de proliferação celular e angiogênese (American Cancer Society, 2022), que justifica sua classificação como grau IV, conforme proposto pelo WHO CNS5 (Louis *et al.*, 2021).

O GBM também pode ser classificado como primário ou secundário. O GBM primário corresponde a 90% dos casos e compreende tumores *de novo* que não se originam de neoplasias pré-existentes. Já o GBM secundário corresponde a tumores originados a partir de astrocitoma pré-existente de baixo grau (Ohgaki & Kleihues, 2013). O GBM secundário

apresenta um comportamento menos agressivo e, portanto, um melhor prognóstico quando comparado ao GBM primário (Wilson; Karajannis & Harter, 2014).

Apesar da agressividade do GBM, que tende a se difundir intracranialmente (**Figura 1**) por meio da extensão direta ou da infiltração para tecidos cerebrais adjacentes, as metástases extracraniais são raramente reportadas (Seo *et al.*, 2012).

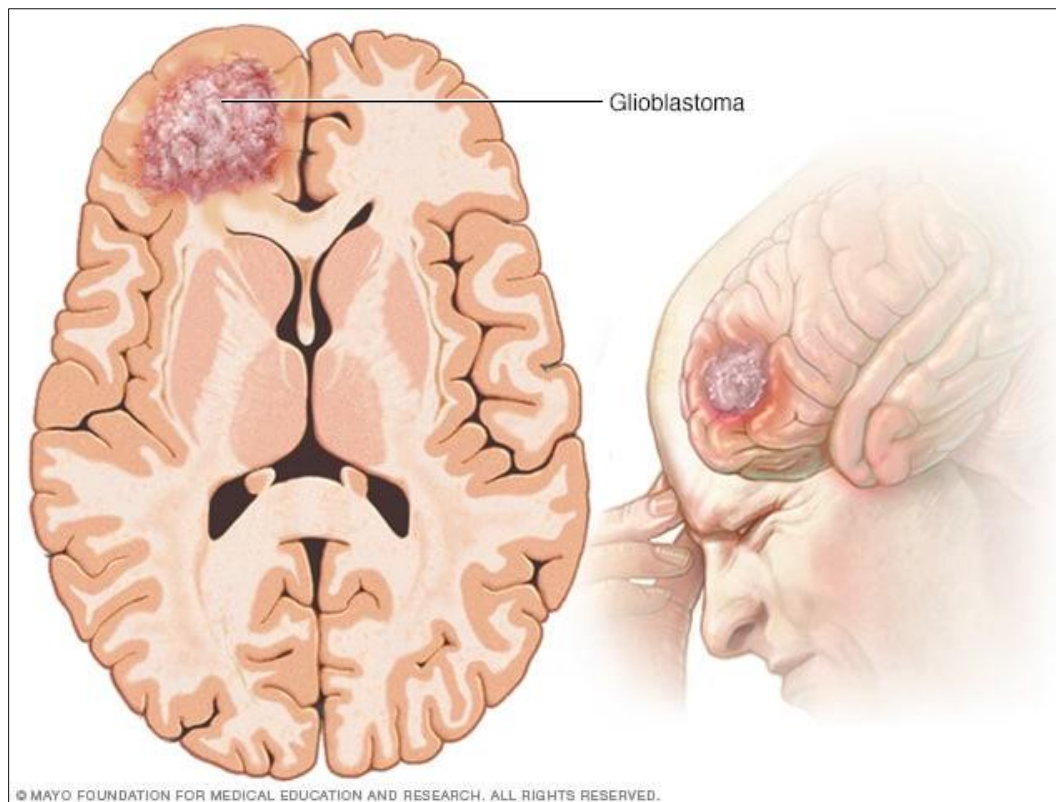


Figura 1. Glioblastoma multiforme, tipo de câncer agressivo que se origina no cérebro ou na medula espinhal. Os GBMs se originam a partir de células chamadas astrocitos.
Fonte: Mayo Clinic, 2020.

De modo geral, o tratamento padrão do GBM consiste na ressecção cirúrgica da neoplasia, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). Embora a ressecção cirúrgica continue sendo a principal forma de tratamento para o GBM, ela apresenta baixo impacto na taxa de sobrevivência dos pacientes, ampliando a sobrevida em apenas seis meses (Wilson; Karajannis & Harter, 2014). Além do mais, dependendo da localização anatômica, o GBM pode não ser ressecável ou sua ressecção pode causar importantes danos cerebrais, impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Quando combinada à radioterapia, a ressecção cirúrgica do GBM pode estender a sobrevida

dos pacientes por até 12 meses e, em associação à TMZ, pode aumentar a sobrevivência em até quase 15 meses (Wilson; Karajannis & Harter, 2014).

Apesar dos notórios avanços na oncologia, o GBM permanece sendo uma das malignidades mais letais (Noch *et al.*, 2018). Isto porque o tratamento da doença é limitado por uma série de fatores. Dentre estes fatores, a barreira hemato-encefálica (BHE) representa o maior desafio para o tratamento da doença. Isto porque, uma vez que a BHE impede o acesso de drogas ao cérebro, acaba limitando a ação da maioria dos quimioterápicos disponíveis no mercado (Noch *et al.*, 2018; Aldape *et al.*, 2019). Além disso, os mecanismos de exclusão de drogas, decorrente do aumento dos níveis de expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRPs, do inglês *multiple resistance proteins*) verificados durante a transição epitélio-mesênquima (TEM), também conferem resistência à quimioterapia, impactando negativamente a sobrevivência dos pacientes (Declèves *et al.*, 2006, Zanders *et al.*, 2019).

1.4 Neuroblastoma (NB)

O neuroblastoma (NB) representa a terceira neoplasia maligna mais comum na infância e adolescência, com uma incidência anual global de 10,5 casos a cada um milhão de crianças com até 15 anos e, 5,9 casos a cada um milhão de crianças com até 15 anos no Brasil (Nunes *et al.*, 2018).

O NB é uma malignidade que se origina no SN, mais frequentemente no sistema nervoso simpático, a partir de células progenitoras da crista neural (neuroblastos) (Heck *et al.*, 2009) e na sequência se desenvolve ao longo do gânglio simpático, localizado próximo à coluna vertebral (NCI, 2022), justificando sua localização extracraniana (Balaguer & Castel, 2008; American Cancer Society, 2022). Embora o NB seja comumente observado nas glândulas supra-adrenais (no sistema nervoso simpático), os tumores do NB também podem se desenvolver em áreas do abdômen, peito, cabeça e medula espinhal - áreas nas quais são verificados nichos de células nervosas (Balaguer & Castel, 2008; American Cancer Society, 2022) (**Figura 2**).

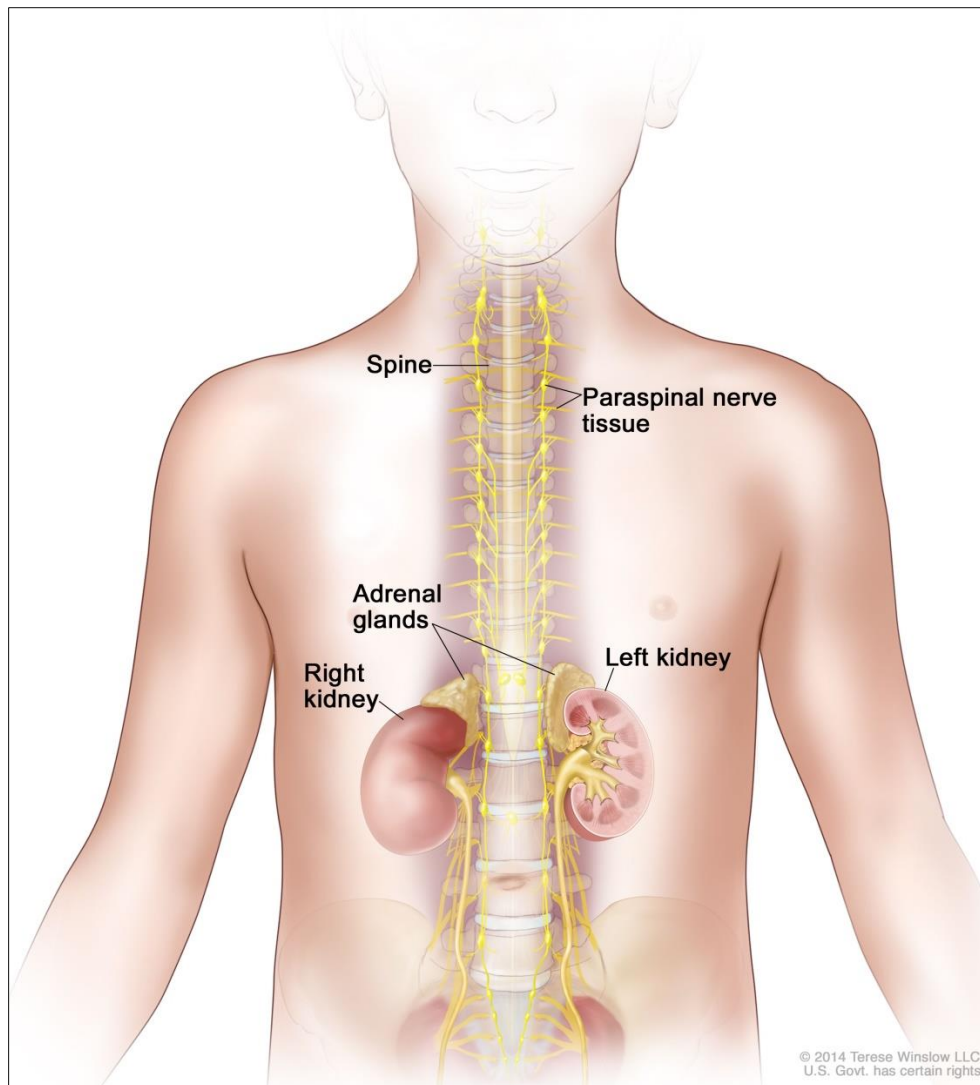


Figura 2. O neuroblastoma (NB) se origina no SN, mais frequentemente no tecido nervoso das glândulas supra-adrenais. Existem duas glândulas supra-adrenais (no inglês, adrenal glands), uma sobre cada rim, na região posterior do abdômen superior. Porém, o NB pode se iniciar no tecido nervoso do pescoço, tórax, abdome ou pélvis (tecido nervoso para-espinhal). **Fonte:** NCI, 2022.

Por apresentar sinais e sintomas não específicos e, por vezes se apresentar de forma assintomática, o NB geralmente é diagnosticado nos estágios mais avançados da doença. Esta característica, associada à rápida progressão da doença, faz com que o NB seja responsável por 15% dos óbitos registrados em crianças em todo o mundo (Smith & Foster, 2018; Nunes *et al.*, 2018).

Embora a taxa de sobrevivência em cinco anos de pacientes do grupo de baixo risco (*i.e.*, crianças com idade de até cinco anos) seja superior a 95%, esta taxa reduz para 50%

para pacientes do grupo de alto-risco (*i.e.*, crianças com idade superior a cinco anos) (Wienke *et al.*, 2021). Entretanto, antes do tratamento multimodal intenso, a sobrevida global em cinco anos de pacientes com NB era inferior a 15% (Smith & Foster, 2018).

De modo geral, o tratamento do NB depende do tipo e do grupo de risco em que o paciente se encontra (Warlet *et al.*, 2018; NCI, 2022). Para os NBs pequenos (< 5 cm de diâmetro), a ressecção é conveniente e resolve a maioria destes casos (NCI, 2022). Porém, o problema se encontra com os tumores maiores e com maiores taxas de proliferação. Nesse caso, é necessária a quimioterapia, que por vezes resulta em inúmeros efeitos colaterais devido à baixa seletividade destas drogas às células cancerígenas (De Bernardi *et al.*, 2008; American Cancer Society, 2022). Como alternativa, tem-se buscado novas abordagens terapêuticas, como por exemplo imunoterápicos, já que estes exibem maior seletividade às células cancerígenas, reduzindo a toxicidade sistêmica destas drogas (American Cancer Society, 2022). Além da quimio e imunoterapia, a radioterapia e a terapia com retinóides também têm sido empregadas no tratamento do NB (American Cancer Society, 2022; NCI, 2022). Apesar disso, a taxa de mortalidade pela doença ainda permanece elevada (NCI, 2022).

1.5 Terapia celular avançada com células-tronco mesenquimais

As células-tronco são reconhecidas por sua capacidade de se autorrenovar de forma assimétrica e diferenciar em distintas categorias funcionais de células de acordo com o potencial de diferenciação (Blau *et al.*, 2001; Kerkis *et al.*, 2022).

De modo geral, as células-tronco podem ser classificadas em: (i) células-tronco embrionárias ou (ii) adultas (Hernández & Dorticós, 2004). As células-tronco embrionárias são isoladas da mórula (células totipotentes) ou blastocisto (células pluripotentes), exibindo uma ampla capacidade de diferenciação para praticamente todos os tipos de tecidos. Por esta razão, estas células estão associadas a um risco aumentado para a formação de teratomas, limitando o uso terapêutico destas células. Já as células-tronco adultas são isoladas de tecidos somáticos (adultos) e, portanto, exibem uma capacidade limitada de diferenciação (multipotência), não conferindo risco para a formação de teratomas. Por esta razão, estas células têm sido extensivamente exploradas para o tratamento de uma plethora de doenças incuráveis, incluindo o câncer (Araldi *et al.*, 2020).

Dentre as células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) despontam como candidatos preferenciais à terapia celular avançada. Isso porque, as CTMs podem ser facilmente isoladas a partir de diferentes tecidos como medula óssea, tecido adiposo, placenta, cordão umbilical, geléia de Wharton, endométrio, leite materno, sangue menstrual e polpa dentária) (Pittenger *et al.*, 1999; Rangappa *et al.*, 2003; Honda & Ohshima, 2022). Além disso, estas células podem ser facilmente expandidas em condições *in vitro*, permitindo a obtenção de quantidades suficientes de CTMs para fins terapêuticos (Kerkis *et al.*, 2022).

Neste sentido, a polpa dentária de dentes decíduos desponta como uma importante fonte de obtenção de células-tronco imaturas de polpa dentária humana (CTIPDh), já que não exige nenhum procedimento invasivo para a obtenção do material biológico (Honda & Ohshima, 2022). Além do mais, estas células podem ser propagadas por várias passagens, mantendo seu potencial de diferenciação para as três linhagens mesenquimais, *i.e.*, adipócitos, osteócitos e condrócitos (Araldi *et al.*, 2020). Somado a isso, por compartilhar assinaturas transcricionais com células da crista neural, as CTIPDh apresentam propriedades neuroprotetoras e neuroregenerativas superiores às demais CTMs que, combinadas ao seu também elevado potencial anti-inflamatório, fazem das CTIPDh candidatos em potencial para o tratamento de doenças relacionadas ao SNC (Araldi *et al.*, 2020).

Porém, estudos têm mostrado que o potencial terapêutico das CTMs, incluindo as CTIPDh não se deve à capacidade de diferenciação e substituição de células não saudáveis por saudáveis como postulado há mais de uma década. A primeira evidência que levou a esta conclusão veio de um estudo envolvendo um modelo animal para lesão renal induzida por doses tóxicas de glicerol e tratado com CTMs. Neste estudo, foi mostrado que apenas um reduzido número de CTMs (menos de 1%), administradas de forma sistêmica (por via intravenosa), permanece viável após o transplante. Esta observação não justificaria a melhora no quadro clínico dos animais verificada no estudo, já que as CTMs que permanecem viáveis seriam insuficientes para regenerar o tecido renal lesionado (Duffield *et al.*, 2005).

Reforçando estes resultados, estudos subsequentes confirmaram que menos de 1% das CTMs administradas enxertam no tecido-alvo permanecendo viáveis por mais de uma semana (Eggenhofer *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Araldi *et al.*, 2020). Além disso, Takahashi *et al.* (2006) demonstraram que a administração sistêmica do meio condicionado de CTMs em ratos com lesões cardíacas associadas ao infarto agudo do miocárdio é capaz de

umentar a densidade de capilares sanguíneos e melhorar a função cardíaca, trazendo evidências de que fatores naturalmente secretados pelas CTMs no meio de cultura poderiam mediar a resposta terapêutica. Tal hipótese foi extensivamente confirmada em estudos posteriores que levaram à postulação da teoria de que o potencial terapêutico das CTMs se deve à ação de fatores tróficos naturalmente produzidos e secretados por estas células seja na forma livre ou dentro de vesículas extracelulares (Haraszti *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019; Gurunathan *et al.*, 2019).

1.6 Terapia *cell-free* (baseada em exossomos): Uma nova abordagem terapêutica

A descoberta de que o potencial terapêutico das CTMs se deve à ação de fatores tróficos produzidos e secretados por estas células tem estimulado o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica chamada de terapia *cell-free*.

A terapia *cell-free* se baseia na utilização de vesículas extracelulares (VEs), sobretudo exossomos, para fins terapêuticos. Isto porque as VEs agem como importantes carreadores naturais de biomoléculas, participando da comunicação intercelular tanto em condições fisiológicas como fisiopatológicas (Gomzikova & Rizvanov, 2017; Evangelista *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2020). Por isso, não é surpreendente que estas VEs também possam mediar a comunicação do microambiente tumoral (Da Costa *et al.*, 2021).

Como visto, as células produzem e secretam uma multitude de biomoléculas que agem em diferentes vias de sinalização (Gomzikova & Rizvanov, 2017; Pittenger *et al.*, 2019; Haider & Aramini, 2020). Tais moléculas podem ser secretadas na forma livre ou contidas em VEs (Gomzikova & Rizvanov, 2017; Pittenger *et al.*, 2019). Porém, em sua forma livre, estas moléculas podem ser facilmente hidrolisadas ou oxidadas (Han *et al.*, 2016), ao passo que, quando contidas em VEs, são menos suscetíveis à degradação (Han *et al.*, 2016; Araldi *et al.*, 2020).

As VEs correspondem a um grupo heterogêneo de vesículas, classificadas de acordo com seu tamanho, origem ou conteúdo como: (i) corpos apoptóticos, medindo geralmente mais que 1000 nm microvesículas (MV), (ii) com diâmetro de 100-1000 nm, e (iii) exossomos, vesículas bem menores, com diâmetro entre 30-200 nm (Witwer *et al.*, 2019; Araldi *et al.*, 2020). Dentre estas, os exossomos têm sido amplamente investigados e biotecnologicamente explorados (Phan *et al.*, 2018; Witwer *et al.*, 2019; Araldi *et al.*, 2020). Isto porque, durante sua biogênese (através da via endocítica), as células apresentam uma

maquinaria capaz de endereçar com seletividade RNAs codificadores e não codificadores, proteínas, lipídeos e metabólitos para o lúmen destas vesículas (Han *et al.*, 2016; Maas *et al.*, 2017; Maheshwari *et al.*, 2017).

Além disso, os exossomos têm demonstrado ser um importante nanocarreador de moléculas, sobretudo hidrossolúveis, podendo ser explorados como veículo de *delivery* de quimioterápicos (Pullan *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020). Entretanto, a atividade terapêutica dos exossomos pode variar de acordo com o tecido de origem, já que estas vesículas possuem assinaturas transcricionais em comum com as células de origem (Ruivo *et al.*, 2017; Von Schulze & Deng, 2020).

Desta forma, considerando as múltiplas funções dos exossomos, incluindo a capacidade de carrear moléculas bioativas como RNAs codificadores (mRNAs) e não codificadores (sRNAs, miRNAs e lncRNAs), proteínas, lipídeos e metabólitos (Zhou *et al.*, 2018), não seria surpreendente que os exossomos pudessem regular vias associadas à oncogênese. Neste sentido, estudos têm demonstrado que os exossomos derivados de CTMs possuem diferentes propriedades antineoplásicas, sendo capazes de: (i) inibir o crescimento tumoral e a angiogênese no carcinoma espinocelular oral (Rosenberger *et al.*, 2019); (ii) induzir a apoptose por mecanismos dependentes do fator de necrose tumoral (TNF) em linhagens de células cancerígenas de maneira dose-dependente (Yuan *et al.*, 2017; Joo *et al.*, 2020); (iii) agir como veículo de *delivery* para entrega de quimioterápicos (Liu *et al.*, 2019); (iv) aumentar a eficácia de medicamentos antitumorais (Lou *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). Estes resultados fazem dos exossomos derivados de CTMs candidatos em potencial à terapia *cell-free* para o tratamento do câncer (Da Costa *et al.*, 2021). Apesar destas evidências, novos estudos são necessários para desvendar o(s) mecanismo(s) de ação destes exossomos. Neste sentido, o sequenciamento do RNA (RNA-Seq) tem se mostrado uma valiosa ferramenta de predição, não somente da ação terapêutica dos exossomos, como também do mecanismo de ação destas nanovesículas (Da Costa *et al.*, 2021).

1.7 Plataformas de sequenciamento de RNA (RNA-Seq)

O RNA consiste em um componente essencial para as células, não apenas um intermediário central entre o genoma e o proteoma. Além disso, as moléculas de RNA exercem funções regulatórias na biologia celular (Hrdlickova; Toulouse & Tian, 2016; Goswami & Sanan-Mishra, 2022). Assim, estudar a identidade e abundância de cada

molécula de RNA sob uma condição celular específica é sumamente importante para compreender a expressão gênica e identificar novas espécies de RNA (Hrdlickova; Toulouse & Tian, 2016). Com isto, o sequenciamento de RNA facilitou a determinação de transcritos, a quantificação dos níveis de expressão gênica e o reconhecimento das funções do RNA (Goswami & Sanan-Mishra, 2022).

Nos últimos anos, o RNA-Seq tem servido como uma ferramenta indispensável para as análises do transcriptoma, possibilitando o estudo de genes diferencialmente expressos (DGE, do inglês *differential gene expression*), permitindo assim, conseguir estudar o perfil transcricional de células e/ou tecidos (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Esta técnica foi complementada pelo desenvolvimento novos algoritmos que permitem filtrar e analisar os dados obtidos, compreendendo a função biológica de genes em diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos (Goswami & Sanan-Mishra, 2022). Por isso, não é surpreendente que a análise do RNA-Seq exija o desenvolvimento de um *workflow* que reúna os diferentes algoritmos empregados na análise.

De modo geral, o RNA-Seq tem início com a extração do RNA total das espécimes estudadas, seguido do enriquecimento de RNAs mensageiros ou depleção dos RNAs ribossomais (Hrdlickova; Toulouse & Tian, 2016). Depois disso, é realizada a síntese do DNA complementar (cDNA), seguida pelo desenvolvimento da biblioteca de sequenciamento, envolvendo a ligação de sequências adaptadoras. Em seguida, a biblioteca é sequenciada com uma profundidade de sequenciamento de aproximadamente 10 a 30 milhões de leituras (*reads*) por amostra. Com isto, as sequências obtidas são avaliadas através de análises *in silico* que auxiliam na (i) verificação da qualidade das bases sequenciadas, (ii) remoção das sequências adaptadoras utilizadas, (iii) alinhamento das sequências obtidas com o genoma de referência, (iv) seguida da quantificação dos transcritos mapeados e (v) da normalização das contagens de genes entre as amostras e, por fim, (vi) na análise estatística das diferenças de expressão de genes, de maneira individual e ou entre grupos de amostras (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019).

Com relação às diferentes tecnologias de sequenciamento de RNA, a mais utilizada é a Illumina *short-read sequencing*, sendo responsável por 95% da totalidade da informação de RNA-seq disponível na base de dados de bioinformática *Short Read Archive* (SRA, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) construída através da colaboração do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, EUA), *European Biotechnology*

Information (EBI) e do *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Esta base funciona como repositório público de dados de sequenciamento de RNA (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019).

Embora o *Short-read sequencing* consista em uma ferramenta robusta para comparações em larga escala de dados de RNA-Seq, existem potenciais vieses que podem ser originados nas fases de preparação de amostras ou nas etapas de análises *in silico*. Para isso, foram postuladas algumas recomendações a fim de garantir as boas práticas do RNA-Seq (Conesa *et al.*, 2016; Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Entre estas boas práticas estão os cuidados com: (i) o número de replicatas biológicas, (ii) a profundidade de leitura, (iii) o tamanho das leituras e, (iv) se as *reads* serão *single-end* (*i.e.*, se será sequenciada apenas a fita 3' ou 5') ou *paired-end* (*i.e.*, se serão sequenciadas ambas as fitas 3' e 5') (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019).

De forma geral, são sugeridas ao menos 4 replicatas biológicas para assegurar os resultados do RNA-Seq (Lamarre *et al.*, 2018; Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Já para a profundidade de leituras que determina o número alvo de sequências *reads* obtidas por amostra, se observa que, embora na maioria dos experimentos de DGE em eucariotos se aceitem uma profundidade de leitura de 10 a 30 milhões de *reads*, é sugerido que, para estudos com números menores de replicatas biológicas seja utilizado uma maior profundidade de leitura (entre 50 a 100 milhões de *reads*) (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Com relação ao tamanho das leituras e se elas serão *single-end* ou *paired-end*, deve-se considerar que *reads* mais longas fornecem uma maior cobertura do RNA sequenciado, o que facilita a identificação de isoformas gênicas e, mesmo que os fragmentos sequenciados apresentam entre 50 a 200 pb, se recomenda um tamanho médio de 150 pb e que seja realizado o sequenciamento *paired-end* para conseguir uma cobertura significativa do genoma de referência (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019).

Uma vez definidos estes parâmetros, os cDNAs construídos são sequenciados, resultando em um arquivo no formato FASTQ (extensão .fastq). O arquivo gerado deve ser processado através de um rígido processo que requer múltiplas etapas de verificação da qualidade (controle de qualidade - QC, do inglês *quality control*). Estas etapas são realizadas com auxílio de *softwares* como FastQC e MultiQC, RNA-QC-Chain (Zhou *et al.*, 2018), entre outros (Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Nesta etapa, se busca verificar se as bases sequenciadas foram corretamente identificadas e que não houve contaminações por materiais

genéticos residuais ou produtos de outras bibliotecas previamente construídas (Zhou *et al.*, 2018; Stark; Grzelak & Hadfield, 2019). Após esta análise do controle de qualidade, é feita a remoção das sequências de adaptadores. Estes adaptadores podem ser removidos com auxílio de *softwares* como o Cutadapt (Martin, 2011), Trimmomatic (Bolger; Lohse; Usadel, 2014) ou com a função *soft-clipping* da plataforma STAR (do inglês, *Spliced Transcript Alignment to Reference*) (Dobin *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2016).

Na sequência, as *reads* precisam ser mapeadas com base no genoma de referência. Assim, se recomenda utilizar algoritmos de mapeamento dedicados ao RNA-Seq que contém dados de anotações gênicas derivadas de sequências com diferentes junções éxon-éxon como: GSNAP (Wu *et al.*, 2016), MapSplice (Wang *et al.*, 2010), RUM (Grant *et al.*, 2011), TopHat (Trapnell; Patcher; Slazberg, 2009) e STAR (Dobin *et al.*, 2013). Embora cada alinhador apresente vantagens em termos de performance, velocidade de alinhamento e utilização de memória distintas (Kukurba & Montgomery, 2015), o STAR foi adotado universalmente. Isto porque, em um estudo comparativo com vários alinhadores, o STAR exibiu uma elevada performance, sendo capaz de mapear 94% das *reads* a uma velocidade de 309,2 milhões de *paired-end reads* por hora de forma linear, enquanto os demais alinharam menos de 86% das *reads* a uma velocidade média entre 8 (no TopHat2) e 1,8 milhões de *paired-end reads* por hora (no GSNAP) (Dobin *et al.*, 2013).

Depois do alinhamento, o STAR gera um arquivo de texto no formato SAM (do inglês, *Sequence Alignment Map*), ou BAM (do inglês, *Binary Alignment Map*) (Dobin & Gingeras, 2015). Com isto, o arquivo gerado através do alinhamento deve ser submetido à contagem de genes. Assim, os programas que podem ser utilizados nesta etapa são o HTSeq (Anders; Pyl; Huber, 2015; Putri *et al.*, 2022) e o *Rsubread* (Liao; Smyth & Shi, 2019) (com o seu algoritmo *featurecounts*) (Liao; Smyth & Shi, 2014). Não foram encontrados na literatura estudos comparativos sobre estes *softwares*, mas ambos são universalmente utilizados. Na etapa de contagem de genes é produzida uma matriz de contagem que consiste em uma tabela com a identificação do gene seguida do número de vezes que a leitura de cada gene/caractere foi mapeada (Anders; Pyl & Huber, 2015; Putri *et al.*, 2022). Porém, para estimar com acurácia o nível de expressão de cada gene, as contagens devem ser normalizadas, buscando corrigir a variabilidade decorrente do tamanho dos fragmentos formados e a profundidade do sequenciamento (Kukurba & Montgomery, 2015; Zhao *et al.*, 2021).

Neste sentido, diversos métodos de normalização são utilizados, como por exemplo: TPM (do inglês, *transcript per million*), RPKM (do inglês *reads per kilobase per million reads mapped*), FPKM (do inglês, *fragments per kilobase of transcript per million reads mapped*), TMM (do inglês, *Trimmed Mean of M-values*) (Robinson & Oshlack, 2010) e o RLE (do inglês, *Relative Log Expression*) (Anders & Huber, 2010). Apesar de todos esses métodos serem viáveis à normalização (Kukurba & Montgomery, 2015; Zhao *et al.*, 2021), o FPM (do inglês, *fragments per million reads mapped*) é reconhecido como o método “padrão-ouro” (Zhao *et al.*, 2021), já que diferente dos demais métodos, não promove a super representação de genes altamente expressos, tampouco mascara a expressão de genes pobremente expressos, evitando resultados falso-positivos ou -negativos (Anders & Huber, 2010).

Junto com a normalização das matrizes de expressão é necessário remover genes com níveis de expressão baixo ou sem nenhuma expressão (*i.e.*, genes com leituras menores que 10) (Sha; Phan & Wang, 2015). O DESeq2 é uma plataforma que recomenda a exclusão de genes com um total de menos de 10 leituras (Anders & Huber, 2010). Para isso, o programa de expressão diferencial Noiseq (Tarazona *et al.*, 2015) fornece métodos específicos para a exclusão desses genes. Este processo é conhecido como etapa de filtração. Uma vez concluídas as etapas de normalização e filtração é possível analisar a expressão diferencial das células estudadas. Nesta etapa, é possível encontrar genes que estejam estatisticamente *up* ou *downregulated* quando comparados dois grupos experimentais. Existem várias ferramentas para realizar esta análise, mas embora diversos artigos de *benchmark* trazem comparações entre elas, não há um consenso sobre qual é a mais vantajosa (Quinn; Crowley & Richardson, 2018; Stupnikov *et al.*, 2021).

É sabido que a expressão diferencial é limitada em relação ao grande número de informações que produz e à interpretabilidade das mesmas (Khang & Lau, 2015; Xie; Jauhari; Mora, 2021). Tendo isso em conta, foram construídas ferramentas que utilizam os dados de expressão diferencial para contextualizar os resultados obtidos nas análises explicadas precedentemente. Tais ferramentas se baseiam em análises conhecidas como enriquecimento de vias (Subramanian *et al.*, 2005), nas quais a expressão gênica é utilizada com o intuito de identificar vias que estão alteradas ao comparar diferentes grupos experimentais. Nesta etapa, a lista de genes diferencialmente expressos é utilizada para identificar grupos de genes que tornam uma via estatisticamente enriquecida. As vias

resultantes desta análise provêm de bancos de dados especializados como o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa *et al.*, 2021), *Reactome* (Griss *et al.*, 2005), *WikiPathways* (Martens *et al.*, 2021), *Disease Ontology* (Schriml, 2012), *The Network of Cancer Genes* (An *et al.*, 2016), entre outros. Estes bancos integram dados multiômicos, dados *in silico*, dados curados manualmente e dados experimentais para determinar quais genes são importantes e em quais vias biológicas podendo ser, por exemplo, vias relacionadas a doenças.

Além disso, esses diversos bancos de dados são empregados nas análises de enriquecimento de vias. Existem vários algoritmos capazes de realizar essa comparação. Entre os algoritmos mais utilizados na literatura estão o *Over-representation Analysis* (ORA) (Boyle *et al.*, 2004) e o método *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (Subramanian *et al.*, 2005). Com relação a estas ferramentas a literatura traz um grande debate sobre a eficácia de todos os algoritmos e diferentes *benchmarks* demonstraram a existência de uma baixa concordância entre eles (Xie; Jauhari & Mora, 2021; Coenye, 2021). Por isso, independente do algoritmo escolhido, deve ser feita uma profunda exploração dos dados de enriquecimento, em termos de contexto biológico relacionado à natureza do experimento e com validação experimental (Xie; Jauhari & Mora, 2021).

Somado a isso, também pode ser realizada uma análise de redes que permitem prever possíveis interações gênicas e, com isso, avaliar as vias biológicas que se encontram reguladas (Merico *et al.*, 2010; Kosvira; Ntzioni & Chouvarda, 2021).

Contudo, levando em consideração o prognóstico desfavorável do GBM e do NB, terapias alternativas paliativas para os desafios relacionados a estas malignidades se fazem necessárias. Desta forma, a terapia *cell-free* baseada em Exo-CTIPDh emerge como potencial tratamento. Além disso, tendo em conta que já existem metodologias consolidadas tanto para a produção de CTIPDh como para o isolamento de exossomos, se faz necessário estudar o efeito e o mecanismo de ação dos Exo-CTIPDh em células de GBM e NB. Para isso, o presente estudo buscou prever o potencial terapêutico destes exossomos através das ferramentas *in silico* de análise de expressão diferencial de genes e os procedimentos padrão do RNA-Seq.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo prever o potencial terapêutico de exossomos derivados de células tronco imaturas da polpa dentária humana (Exo-CTIPDh) para o tratamento do glioblastoma multiforme (GBM) e neuroblastoma (NB) usando linhagens celulares comerciais destes tipos tumorais (estudo *in vitro*) através de sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

2.2 Objetivos específicos

Este estudo teve como objetivos:

- Avaliar o RNA-Seq de acordo com as boas práticas de análise, seguindo as etapas abaixo descritas:
 - verificação da qualidade do sequenciamento (controle de qualidade)
 - alinhamento das sequências obtidas com o genoma de referência
 - contagem da expressão dos genes mapeados
 - normalização da matriz de contagem
 - identificação dos genes regulados pela ação dos Exo-CTIPDh por meio da análise de expressão diferencial
 - avaliação da possível interação dos genes diferencialmente expressos e verificação das vias biológicas por eles reguladas.
- Prever a ação biológica dos genes regulados pelo tratamento com os Exo-CTIPDh por meio do enriquecimento de vias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do meio condicionado

As CTIPDh utilizadas neste estudo foram produzidas pela empresa Cellavita Pesquisas Científicas Ltda. (Valinhos-SP, Brasil) sob condições de boas práticas de fabricação (BPF), de acordo com a RDC214/2018 para produtos de terapia celular avançada. As células foram expandidas até a passagem cinco (P5), que corresponde ao componente ativo do produto investigacional NestaCell. Após cinco dias de cultura, o meio completo das CTIPDh na P5 (meio DMEM/Ham's F12, suplementado com 15% de soro HyClone, 1% da solução de penicilina/estreptomicina e 2 mM de L-glutamina – todos da Gibco, Carlsbad, EUA), foi substituído por meio sem soro. Após 24 horas, o meio condicionado foi coletado, envasado e criopreservado a -80°C. O meio condicionado criopreservado foi transportado para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan em gelo seco, onde permaneceu estocado a -80°C até o momento do isolamento dos exossomos. O processo de produção destas células é protegido pela patente US20160184366A1.

3.2. Isolamento dos exossomos

Para o isolamento dos exossomos, o meio condicionado foi descongelado em temperatura ambiente e filtrado através de filtros de acetato de celulose de 0,22 µm. Em seguida, foi realizada a transferência do meio filtrado para tubos de acetato de 13 mL (Hitachi-Koki, Japão) os quais foram, previamente, inseridos nos adaptadores do rotor swinging modelo P40ST da ultracentrífuga (Hitachi-Koki, Japão). Os tubos foram pesados, primeiramente, para equilibrar os pesos usando balança analítica. Na sequência, o rotor foi inserido na ultracentrífuga preparativa Himac modelo CP80WX (Hitachi-Koki, Japão). O material foi ultracentrifugado conforme proposto na patente depositada (patente provisória número 11131.046PROV). Por fim, o sobrenadante foi coletado por aspiração, com auxílio de pipeta de 100-1.000 µL e, os exossomos precipitados foram eluídos em 100 µL de solução fisiológica estéril a 0,9% (salina). Os Exo-CTIPDh isolados foram armazenados a -20°C. A natureza exosomal das vesículas isoladas foi confirmada por meio do ensaio de rastreamento de nanopartículas e pela imunodeteção do marcador exosomal CD63 (os procedimentos de obtenção do meio e o isolamento dos exossomos foram desenvolvidos pela Cellavita Pesquisas Científicas Ltda.). Os exossomos obtidos através deste processo industrial correspondem ao produto investigacional NestaExo, que vem sendo avaliado em estudos *in vitro* e pré-clínicos como candidato terapêutico para o tratamento de doenças

neurodegenerativas como doença de Huntington, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica, bem como para o tratamento de diferentes malignidades, incluindo o NB e GBM.

3.3. Análise do potencial terapêutico dos Exo-CTIPDh

As linhagens celulares U251 (glioblastoma multiforme) e SH-SY5Y (neuroblastoma), comercialmente adquiridas do *American Type Cell Collection* (ATCC, EUA), foram cultivadas em frascos de 25 cm² contendo 5 mL de meio completo (meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) até obterem confluência de 60-70%. Quando nesta confluência, as células foram tratadas com uma única dose de 50 µg/mL de Exo-CTIPDh (valor este equivalente a aproximadamente 2x10⁸ exossomos) por 120 horas. Como controles, foram utilizadas as linhagens celulares de U251 e SH-SY5Y não tratadas com os exossomos (controle negativo). Desta forma, se utilizaram quatro amostras, duas tratadas com os Exo-CTIPDh e duas sem o tratamento, levando em consideração as duas linhagens celulares, uma para cada câncer.

3.3.1. Sequenciamento de RNA total (RNA-Seq)

Com o objetivo de avaliar os transcritos diferencialmente expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh, foi realizado o sequenciamento de RNA total (RNA-Seq). Para isso, foram realizadas as etapas abaixo descritas:

Isolamento do RNA total: Para o isolamento do RNA total, as monocamadas de células tratadas e não tratadas com os Exo-CTIPDh foram enzimaticamente desagregadas com 1 mL da solução de tripsina (Gibco, Carlsbad, EUA) por cinco minutos a 37°C. As células tripsinizadas foram transferidas para tubos de centrifuga de fundo cônico de 15 mL (tipo Falcon) contendo 3 mL de meio completo. Os tubos foram centrifugados a 400 X g (RCF) por 5 minutos a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante.

Na sequência, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) ao *pellet* de células. O material foi homogeneizado com auxílio de pipeta (técnica de *up and down*) e, então transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL de fundo cônico. Um volume de 100 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) foi adicionado a cada amostra. O material foi homogeneizado por inversão por dez vezes e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, o material foi centrifugado a 13.000 RPM por 15 minutos a 4°C. A primeira fase (contendo o RNA isolado) foi coletada por aspiração e transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL.

Posteriormente, foi adicionado 1 μ L de glicogênio (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 250 μ L de álcool isopropílico. As amostras foram homogeneizadas por inversão por dez vezes e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, o material foi centrifugado a 13.000 RPM por 30 minutos a 4°C, desprezando o sobrenadante. Ao *pellet* de RNA foi adicionado 1 mL de etanol 90%. O material foi centrifugado a 13.000 RPM por 20 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante por inversão. A etapa de lavagem foi realizada por duas vezes. Após a lavagem, o RNA obtido foi ressuscitado em 100 μ L de água DEPC (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e destinado à análise de concentração e qualidade do RNA.

Análise da concentração e qualidade do RNA isolado: A concentração total de RNA isolado foi confirmada usando o equipamento BioAnalyzer 2100 (Agilent, Carlsbad, EUA). Através deste equipamento é possível avaliar a qualidade de amostras por meio da separação por tamanho, voltagem-induzida e fluorescência-induzida. Para isto, o RNA obtido é corado por meio de um intercalante e submetido a um campo eletro-voltáico. A intensidade de fluorescência emitida pelas bandas 28S e 18S (do mRNA) é detectada para o cálculo da área destas bandas (Schroeder *et al.*, 2006). A partir disso, é calculada a razão entre as áreas das bandas (28S/18S). Os valores obtidos representam a integridade do RNA isolado (RIN - *RNA integrity number*). O RIN varia de 1 a 10, tendo em conta o nível de degradação do RNA (Schroeder *et al.*, 2006). De forma geral, se considera que um RIN maior que 7 é apropriado para análise (Sheng *et al.*, 2017). Porém, valores de RIN menores também podem ser utilizados nas pesquisas de transcriptômicas, desde que sejam feitos os devidos cuidados na construção das bibliotecas, como por exemplo, a depleção ribossomal (Puchta; Boczkowska & Jolanta, 2020).

Sequenciamento do RNA: O RNA isolado e quantificado foi enviado à empresa *CD Genomics* (Shirely, Nova Iorque, EUA) para a realização do sequenciamento completo do RNA com depleção de RNA ribossomal, ou seja, sequenciamento de RNA mensageiro (mRNA - RNA codificante de produtos proteicos), *long non-coding RNA* (lncRNA - RNA com mais de 200 nucleotídeos que apresenta função regulatória por interagir com outros mRNAs, não é codificante) e *small RNA* (sRNA - RNA também não codificante, tem menos de 200 nucleotídeos e tem função regulatória por interagir com outros RNAs) (Gagnon & Corey, 2012; Olovnikov; Aravin & Toth, 2012; Ulitsky, 2018). Para isso, as bibliotecas de cDNA construídas (para todos os tipos de RNA mencionados) foram fragmentadas e, a cada fragmento foi adicionado um adaptador Illumina (RA5-5'-GTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-3' e RA3-5'-AGATCGGAAGAGCACACGTCT-3'). O material foi sequenciado na plataforma HiSeq

4000 (Illumina, Carlsbad, EUA). Com isto, foram estabelecidas um total de 50 milhões de leituras (*reads*) *paired-end* para cada amostra, atendendo aos princípios das boas práticas do RNA-Seq. Os arquivos gerados foram exportados e enviados na extensão .fastq para as análises subsequentes.

3.3.2. Análise do Controle de qualidade dos arquivos fastq

Os arquivos exportados e enviados na extensão .fastq foram analisados seguindo a *pipeline* de análise para RNAs codificadores (mRNA) desenvolvida pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan e dedicada à predição *in silico* do mecanismo de ação de produtos candidatos a terapia *cell-free*. Estas análises foram realizadas usando a ferramenta Galaxy (disponível em <https://usegalaxy.org/>), que consiste em uma plataforma *online* que serve para gerar e executar fluxos de trabalho (*workflows*) em bioinformática (Giardine *et al.*, 2005). Esta análise contempla as seguintes etapas:

Avaliação da qualidade dos arquivos: Inicialmente, os arquivos .fastq foram submetidos a uma primeira análise de controle de qualidade (QC – *quality control*) usando o programa FastQC, que verifica as bases chamadas durante o sequenciamento, trazendo importantes parâmetros quanto a qualidade do material sequenciado. Para este estudo, foram adotados os seguintes parâmetros de QC: (i) o escore Phred de cada base sequenciada (qualidade por base) e (ii) a média do escore Phred de cada sequência obtida. A avaliação destas variáveis, em conjunto, permite determinar a qualidade individual de cada nucleotídeo identificado/sequenciado, bem como a qualidade de cada sequência obtida (Sheng *et al.*, 2017). O escore Phred é um índice de qualidade que indica a probabilidade da base ser chamada de maneira correta (chamadas são as saídas de nucleotídeos do sequenciador). O escore Phred (Q) é calculado pela fórmula: $Q = -10 \log E$, onde *E* representa a probabilidade de erro. Os valores de Q variam de 2 a 40, assim, de acordo com o escore obtido é avaliado o nível de acurácia, conforme mostrado na **Tabela 1** (Sathyanarayanan *et al.*, 2018). Nos dados de sequenciamento do Illumina, a faixa de qualidade de base esperada geralmente fica entre 0 a 50. O escore médio de qualidade esperado geralmente é em torno de 30 a 40 (Sheng *et al.*, 2017).

Tabela 1. Valores de escore Phred escore e o seu nível de acurácia correspondente.

Escore Phred (Q)	Erro (E)	Acurácia (1 – Erro)
10	1/10 = 10%	90%
20	1/100 = 1%	99%
30	1/1000 = 0,1%	99,9%
40	1/10000 = 0,01%	99,99%
50	1/100000 = 0,001%	99,999%
60	1/1000000 = 0,0001%	99,9999%

Fonte: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035531872-Phred-scaled-quality-scores>

Além do escore Phred, este estudo também avaliou o (iii) conteúdo de Guaninas (G) e Citocinas (C) de cada sequência, já que, de acordo com o pareamento Watson-Crick e a regra de Chargaff, o conteúdo destas bases deve ser equivalente. Logo, a não equivalência do conteúdo destas bases indica possíveis contaminações por RNAs exógenos ou microrganismos (Sheng *et al.*, 2017). Outro parâmetro avaliado foi a (iv) distribuição dos tamanhos das sequências obtidas, que permite elucidar a uniformidade dos fragmentos gerados (Watson & Crick, 1953; Sheng *et al.*, 2017).

Alinhamento ao genoma de referência: Uma vez confirmado que as sequências geradas apresentaram qualidade satisfatória, estas sequências obtidas foram alinhadas usando o alinhador STAR versão 2.7.8a (disponível em <https://www.biostars.org/p/428681/>) (Parnell *et al.*, 2011). Para isso, foi utilizado o genoma GRCh37, obtido da anotação do genoma humano de referência (disponível em https://www.gencodegenes.org/human/release_36lift37.html). Esta etapa permitiu mapear os genes expressos pelas amostras sequenciadas.

3.3.3. Determinação dos transcritos diferencialmente expressos

Com o objetivo de identificar os transcritos diferencialmente expressos entre as linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh, foram realizados os seguintes passos:

Contagem e Normalização de leituras alinhadas a genes. Uma vez terminado o alinhamento, o programa STAR gerou arquivos do formato BAM. Estes arquivos foram processados pelo programa *Rsubread*, considerado o pacote que fornece mais eficiência para a contagem de leituras (Liao; Smyth & Shi, 2019). Neste pacote de programas se encontra a função *featureCounts* que permitiu contabilizar o número de leituras associado a cada gene disponível na plataforma de modelos gênicos *Ensembl* (sistema que permite realizar análises genômicas comparativas) (Herrero *et al.*, 2016). Através desta análise foi obtida uma matriz de contagem que consiste em uma tabela composta dos identificadores dos genes (*gene ID*), seguida do número de vezes que a leitura de cada transcrito foi mapeada.

Com a obtenção da matriz de contagem de genes, foi realizada uma normalização das leituras. Esta normalização é necessária para conseguir estimar com acurácia a expressão de cada gene. Assim, todas as contagens devem ser corrigidas em termos de variabilidades indesejadas decorrentes da diversidade de tamanho das sequências formadas e à profundidade do sequenciamento. Desta forma, os números de leituras obtidos foram processados pela função FPM (do inglês, *fragments per million mapped fragments*) no pacote de programas DESeq2 versão 1.36.0 (disponível em <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) (Tarazona *et al.*, 2015), no ambiente R versão 4.2.2 (disponível em <https://www.r-project.org/>) e RStudio versão 4.2.1 (disponível em <https://cran.r-project.org/>). Essa função normaliza a contagem de genes de acordo com o número total de *reads* da amostra, tornando comparáveis amostras com números de *reads* dissimilares (Anders; Pyl & Huber, 2015).

Filtragem da expressão dos genes associados. Neste processo, os genes que apresentaram menores níveis de expressão (*i.e.*, contagem inferior a 10) foram retirados usando o método 3 do filtro Noiseq versão 2.40.0, método robusto que permitiu a remoção dos genes com expressão baixa (disponível em: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/NOISeq.html>) (Tarazona *et al.*, 2012, 2015). Além disso, as amostras foram analisadas qualitativamente em relação aos biótipos de genes encontrados.

Uma vez que os dados de expressão foram normalizados e filtrados, foi realizada uma análise de redução de dimensionalidade. Esta análise entre as amostras foi desenvolvida por meio do algoritmo UMAP, indicada para dados ômicos de RNA (McInnes; Healy & Melville, 2018).

Análise da expressão diferencial dos transcritos. Esta análise foi realizada por meio da função NoiseqSim, do pacote Noiseq mencionado precedentemente. Este procedimento

levou em consideração um *False Discovery Rate* de 0,95, ou *p* valor ajustado de 0,05, conforme recomendado pelo manual do pacote de funções *NoiSeq* (Tarazona *et al.*, 2016). Após esta análise foram obtidas as listas de genes diferencialmente expressos e os respectivos *ranks* e *Log2 - fold-change* (razão logarítmica dos valores de expressão de um gene em condições diferentes) (Love; Huber & Anders, 2014). A partir disso, foi possível procurar as vias associadas à expressão dos genes encontrados para as linhagens celulares.

3.3.4. Avaliação de vias enriquecidas

Buscando responder como o tratamento com os Exo-CTIPDh altera vias associadas ao GBM e NB, as listas de genes diferencialmente expressos entre as linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh foram submetidos à análise de enriquecimento de vias usando a ferramenta *Web Gestalt* (disponível em <http://www.webgestalt.org/>). Para isso, os genes diferencialmente expressos foram enriquecidos usando as funções *Geneontology* por vias biológicas (para determinar a função biológica destes genes), seguido do enriquecimento de vias usando as bases de dados KEGG, Panther, Reactome e Wikpathway (disponíveis na própria ferramenta).

Com o intuito de contextualizar as vias enriquecidas e elucidar seu efeito biológico, as mesmas foram submetidas à análise de redes, conhecida como *network analysis*, na plataforma STRING (disponível em <https://string-db.org/>). Nesta análise, é construída uma rede de interações gênicas, que organiza os genes enriquecidos em forma de *clusters*. Com isto, foi possível reconhecer *clusters* de acordo com o contexto biológico das células estudadas. Além disso, por meio desta análise, conseguiu-se reconhecer os genes centrais, que representam de maneira mais representativa dito contexto.

Por fim, uma vez selecionadas as vias e reconhecidos os genes centrais relacionados às doenças estudadas, foi possível analisar esses genes em conjunto, em termos de função biológica à qual representam. Assim, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação e reconhecer potenciais padrões biológicos, recorreu-se à literatura científica.

4. RESULTADOS

4.1. RNAs isolados apresentaram qualidade satisfatória para o sequenciamento

Como parte do processo de controle de qualidade do RNA-Seq, o RNA total isolado das linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh foram submetidos a uma análise de integridade do RNA. Os resultados mostraram que os RNAs isolados das linhagens U251 controle (RIN = 8) e SH-SY5Y tratada com os Exo-CTIPDh (RIN = 8,1) apresentaram valores de RIN superiores a sete, indicando a preservação da integridade do RNA isolado (**Tabela 2**). Porém, para as linhagens U251 tratada com os Exo-CTIPDh (RIN = 5,9) e SH-SY5Y controle (RIN = 5,7) foram observados valores de RIN inferiores a sete (**Tabela 2**), sugerindo uma menor preservação da integridade do RNA. Apesar disso, estas amostras também foram submetidas ao RNA-Seq, considerando que este parâmetro é apenas um controle inicial e as etapas subsequentes de verificação da qualidade do sequenciamento fornecem evidências mais robustas quanto à qualidade e profundidade do sequenciamento.

Tabela 2. Resultados da análise de qualidade do RNA isolado das linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh.

Células	RIN	[RNA] ng/uL	28S/18S (área)
U251 Controle	8	26.3	1,7
U251 Exo-CTIPDh	5.9	74.3	1,4
SH-SY5Y Controle	5.7	205	0,5
SH-SY5Y Exo-CTIPDh	8.1	133	1,7

4.2. A qualidade do RNA após sequenciamento demonstrou ser satisfatória

Com o objetivo de verificar a qualidade do sequenciamento, os arquivos FASTQ foram submetidos a um rígido processo de controle de qualidade, conforme preconizado nas boas práticas do RNA-Seq. Os resultados mostraram que as quatro amostras sequenciadas apresentaram um escore Phred médio de 36 (**Figura 3**), o que qualifica com mais de 99,9% de precisão cada base sequenciada, conforme a **Tabela 1**. Além disso, também foi observado que os fragmentos sequenciados apresentaram um tamanho médio de 150 pb (**Figura 3**), indicando que a fragmentação dos RNAs isolados (etapa que precede a construção das bibliotecas de cDNA) aconteceu de forma homogênea, conforme esperado. Somado a isso,

também foi observada uma distribuição equitativa do conteúdo de guaninas (G) e citocinas (C) nas quatro amostras sequenciadas (**Figura 3**), indicando a ausência de contaminações por ácidos nucleicos exógenos. Juntos, estes resultados mostram que o sequenciamento apresentou elevada qualidade, tendo sido aprovado nos três parâmetros de controle de qualidade analisados, mesmo para as amostras que apresentaram valores de RIN menor que sete (**Tabela 2**).

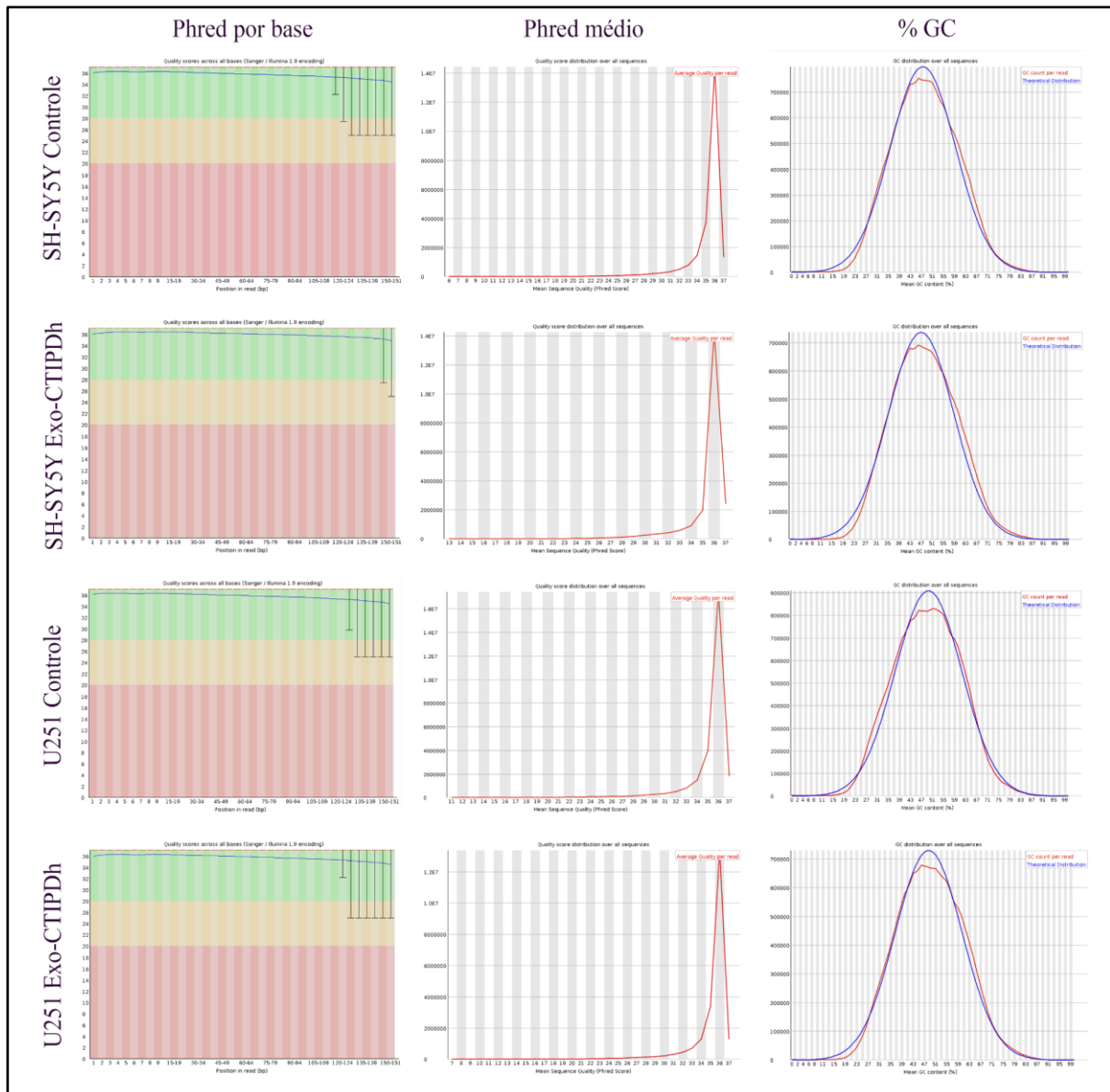


Figura 3. Controle de qualidade do sequenciamento das linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh. Os resultados indicam que todas as bases identificadas apresentam um **escore Phred** por base acima de 20. Concomitantemente, **a média do escore Phred** se mostrou igual a 36 o que determina uma acurácia de 99,9% do sequenciamento, conforme especificado na **Tabela 2**. Se identificou também, uma distribuição equitativa do conteúdo de guaninas e citocinas (%GC), evidenciando a ausência de contaminação nas amostras. Resultados obtidos através do *software* FastQC.

4.3. Transcritos expressos foram mapeados em genes codificadores de proteínas

Após confirmado que o sequenciamento das quatro amostras apresentou qualidade satisfatória para os três parâmetros avaliados (**Figura 3, Tabela 2**), as sequências foram alinhadas com o genoma humano de referência GRCh37 buscando mapear os genes expressos. Os resultados mostraram que mais de 90% das sequências obtidas alinharam com sequências gênicas únicas do genoma de referência (**Figura 4**), confirmando a qualidade do sequenciamento, já que, de acordo com a literatura, é recomendado que no mínimo 50% das sequências obtidas alinhem com genes unicamente mapeados no genoma de referência (Sheng *et al.*, 2016).

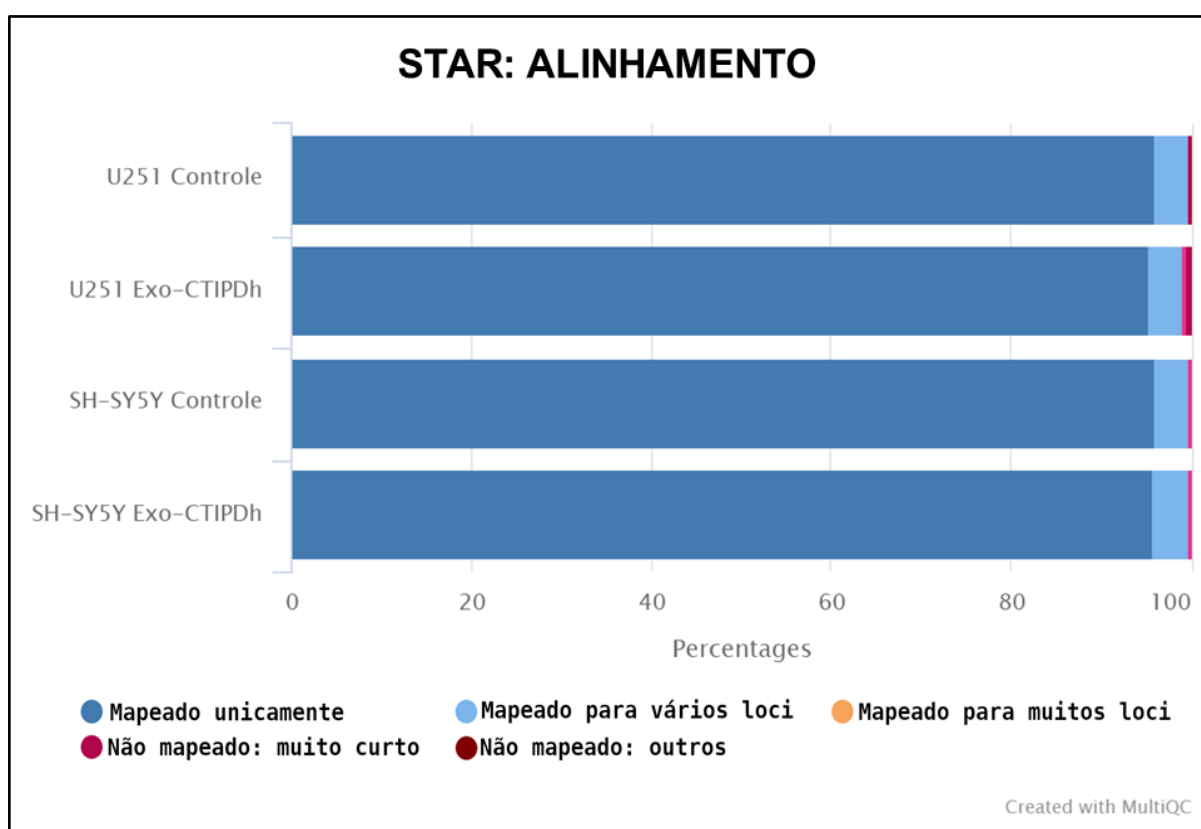


Figura 4. Percentual de sequências alinhadas de acordo com o genoma humano de referência (GRCh37). Os resultados demonstram que mais de 90% das sequências foram mapeadas em regiões únicas do genoma de referência. Análise realizada através da *software* STAR.

Uma vez constatado que o resultado do RNA-Seq contemplou os critérios de qualidade propostos pela literatura (Ewels *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018), as leituras de cada gene foram contadas e, na sequência, normalizadas, gerando assim uma matriz única de leitura para cada transcrito identificado. Após a contagem, foi observado que o sequenciamento apresentou uma profundidade mínima de 25 milhões de leituras para cada

amostra (**Figura 5**), confirmando a qualidade do RNA-Seq. Isto porque, para as análises de expressão diferencial, é recomendado que o sequenciamento atinja uma profundidade mínima de 10 milhões de leituras (Ewels *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018).

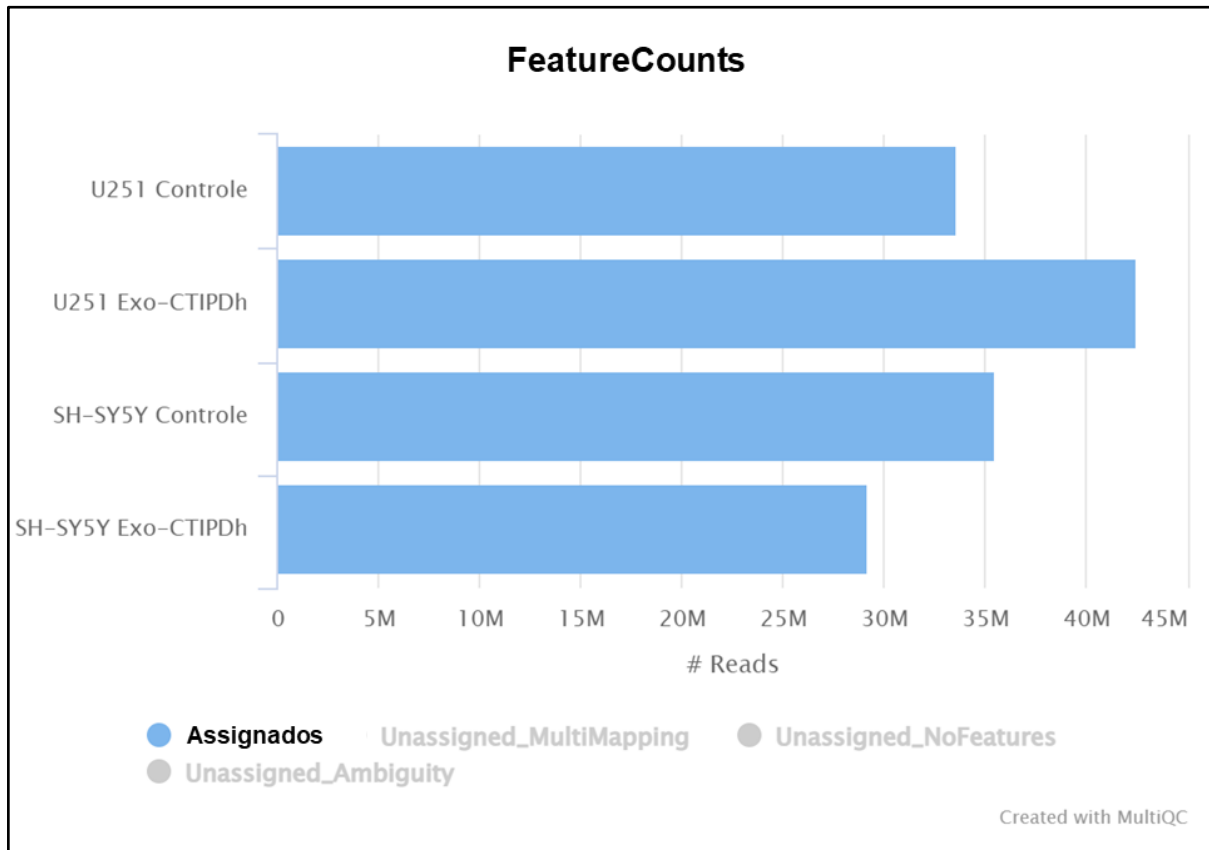


Figura 5. Número de *Reads* (leituras) contados nas células de NB e GBM controle e tratadas com os Exo-CTIPDh. Os resultados mostram que mais de 25 milhões de leituras foram registradas e associadas a cada gene (barra azul). Dados obtidos por meio da função *featureCounts* do programa *Rsubread*.

Confirmando a qualidade do sequenciamento, também foi verificado que mais de 90% das sequências expressas pelas quatro amostras foram mapeadas em regiões codificadoras de proteínas (*i.e.*, mRNAs) (**Figura 6**). Este resultado está de acordo com o esperado, tendo em vista que a biblioteca de cDNA construída foi dedicada ao sequenciamento de mRNAs. Além disso, os resultados mostraram ausência de contaminação por RNA ribossomal, mostrando que a depleção destes RNAs ocorreu com êxito.

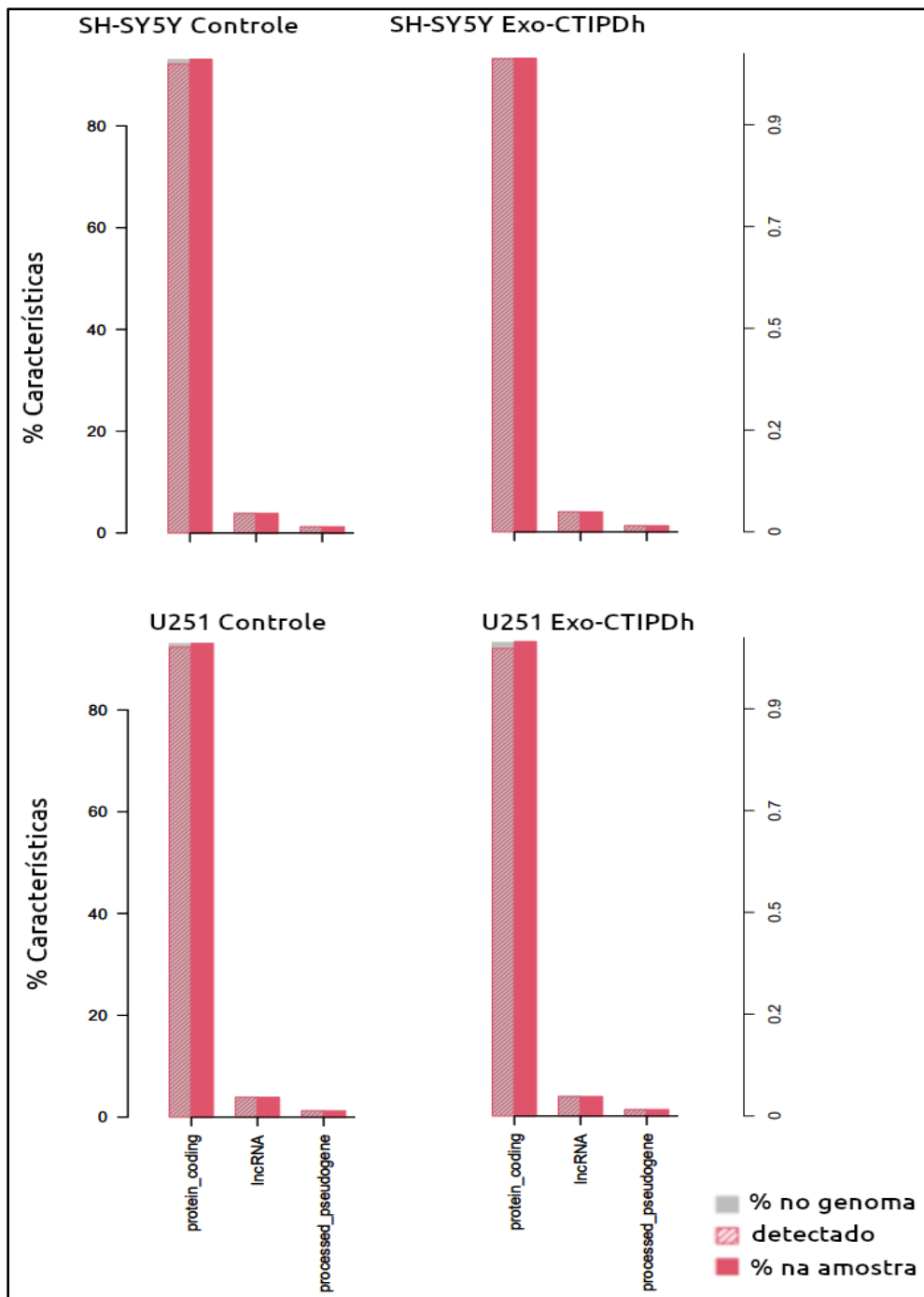


Figura 6. Biótipos dos transcritos mapeados através do alinhamento com o Genoma humano GRCh37. Os resultados indicam que mais de 90% dos genes identificados para as células de NB e GBM controle e tratadas com os Exo-CTIPDh, foram mapeados em genes codificadores de proteínas (mRNAs). As barras em cinza representam o percentual de cada tipo de transcrito (descrito no eixo x) no genoma de referência. Já as barras vermelhas indicam a quantidade de cada biótipo nas amostras sequenciadas, enquanto que as barras hachuradas em vermelho destacam a proporção de transcritos (por tipo) nas amostras sequenciadas e alinhadas ao genoma de referência. Resultados obtidos por meio do *software* NoiSeq.

4.4 Exo-CTIPDh são capazes de modificar o perfil transcricional das linhagens celulares de NB e GBM

Buscando avaliar os perfis transcriptômicos das diferentes linhagens, bem como avaliar se o tratamento com os Exo-CTIPDh é capaz de modificar a expressão global dos genes expressos por estas células, foi realizada uma análise de redução de dimensionalidade pelo método UMAP. Os resultados mostraram um distanciamento linear significativo entre as linhagens de SH-SY5Y e U251, como esperado (**Figura 7**). No entanto, também foi verificado um distanciamento linear entre as linhagens controle e tratadas (**Figura 7**), indicando que os Exo-CTIPDh são capazes de modificar a expressão global tanto do NB como do GBM.

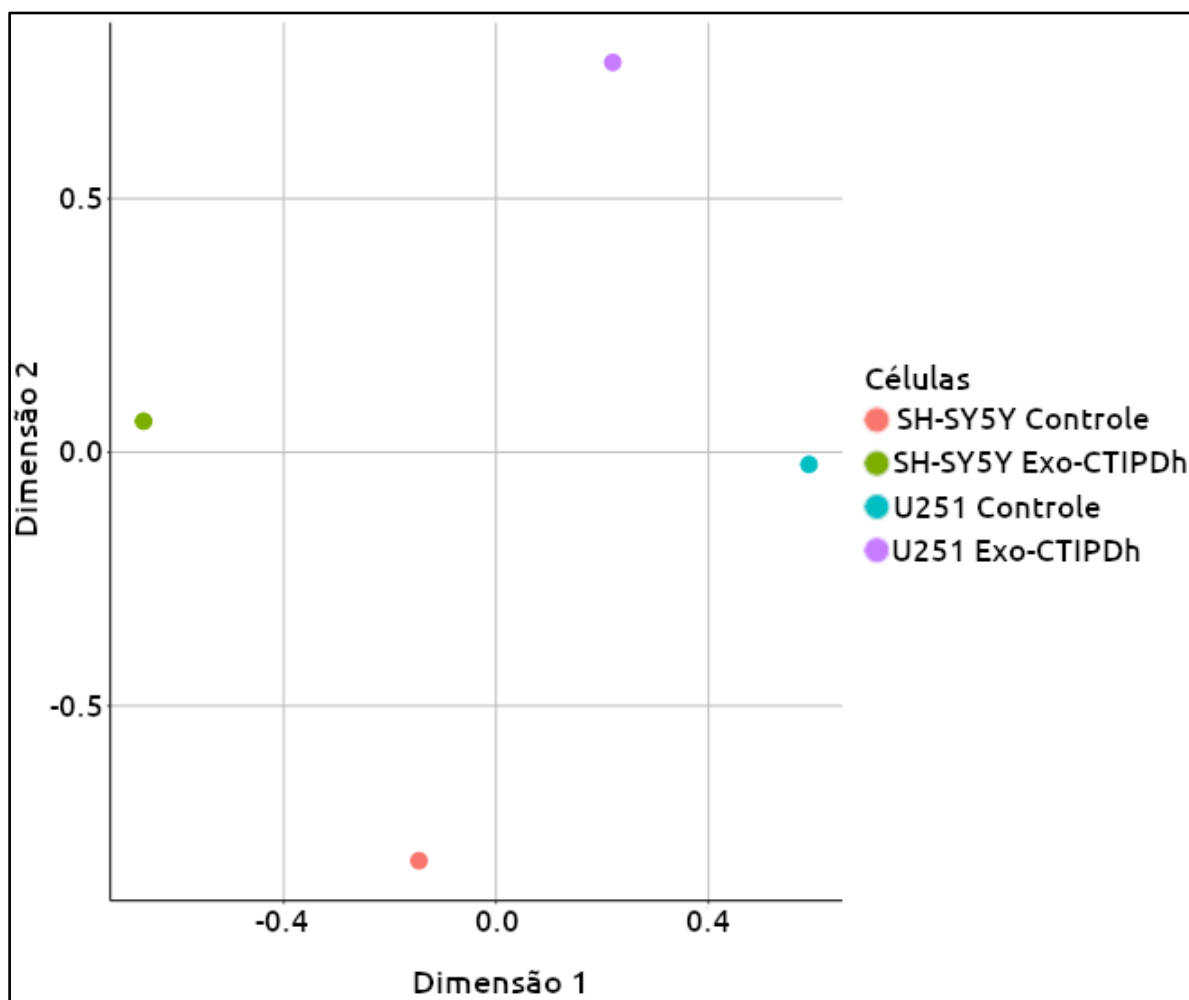


Figura 7. Redução de dimensionalidade das células de NB e GBM controle e tratadas com os Exo-CTIPDh. Os resultados obtidos demonstram um distanciamento linear significativo entre as células controle e tratadas para cada linhagem (SH-SY5Y e U251), sugerindo a modulação global do perfil transcriptômico dessas células. Resultados obtidos através do algoritmo UMAP.

Com o objetivo de reconhecer a ação molecular dos Exo-CTIPDh, a listas de contagem de genes normalizadas e filtradas, das linhagens de U251 e SH-SY5Y controle e tratadas com os exossomos foram comparadas entre si. Os resultados mostraram que os Exo-CTIPDh foram capazes de promover a expressão de 217 genes na linhagem SH-SY5Y e 380 genes na linhagem U251 (**Figura 8**). Por outro lado, o tratamento com os Exo-CTIPDh promoveu a repressão de 368 genes na linhagem SH-SY5Y e 371 genes na linhagem U251 (**Figura 8**). Além disso, dos 9.754 e 9.285 genes expressos em ambas as linhagens SH-SY5Y e U251 controle e tratadas, respectivamente, foi observado que os Exo-CTIPDh foram capazes de regular a expressão de 21 e 148 genes nas linhagens SH-SY5Y (Tabela suplementar 1) e U251 (Tabela suplementar 2), respectivamente, na ordem de três vezes ou mais (destes genes, foram enriquecidos e analisados aqueles que apresentaram regulação negativa após o tratamento com os Exo-CTIPDh). Estes resultados mostram que os Exo-CTIPDh são capazes de modificar a expressão global tanto da linhagem celular de NB (SH-SY5Y), como de GBM (U251), como observado na **Figura 8**.

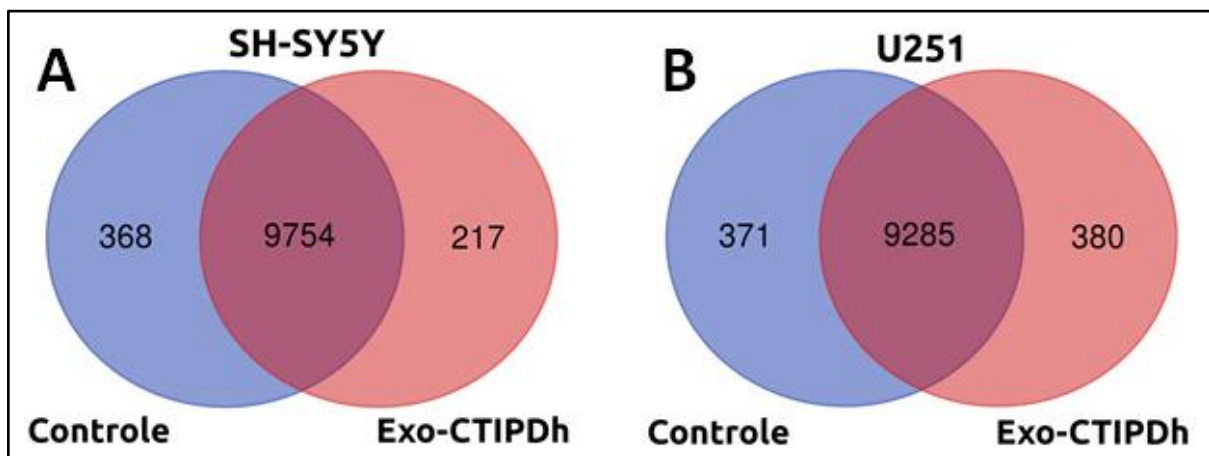


Figura 8. Diagramas de Venn mostrando os genes comum e diferencialmente expressos nas linhagens estudadas (SH-SY5Y e U251). Para a linhagem SH-SY5Y (NB), 9754 genes foram comumente expressos entre as células controle e tratadas, enquanto que 368 genes foram expressos exclusivamente nas células controle e 217 genes expressos apenas nas células tratadas com Exo-CTIPDh (**A**). Para a linhagem U251 (GBM), 9285 genes foram expressos entre as células controle e tratadas, sendo observados 371 genes expressos exclusivamente nas células controle e 380 genes expressos nas células tratadas (**B**).

4.5. Exo-CTIPDh regulam positivamente vias associadas à apoptose, adesão e metabolismo oxidativo

Com o objetivo de avaliar a ação biológica dos genes expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh (*i.e.*, 217 para a linhagem SH-SY5Y e 380 para a linhagem U251, **Figura 8**), estes genes foram inicialmente submetidos a uma análise de interação gênica (análise de rede) utilizando a ferramenta STRING. Os resultados mostraram que os genes que ganharam expressão após o tratamento com os Exo-CTIPDh em ambas as linhagens celulares se agrupam em três diferentes *clusters* (**Figuras 9 e 10**, linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente), sugerindo que estes genes encontram-se associados à regulação de vias biológicas.

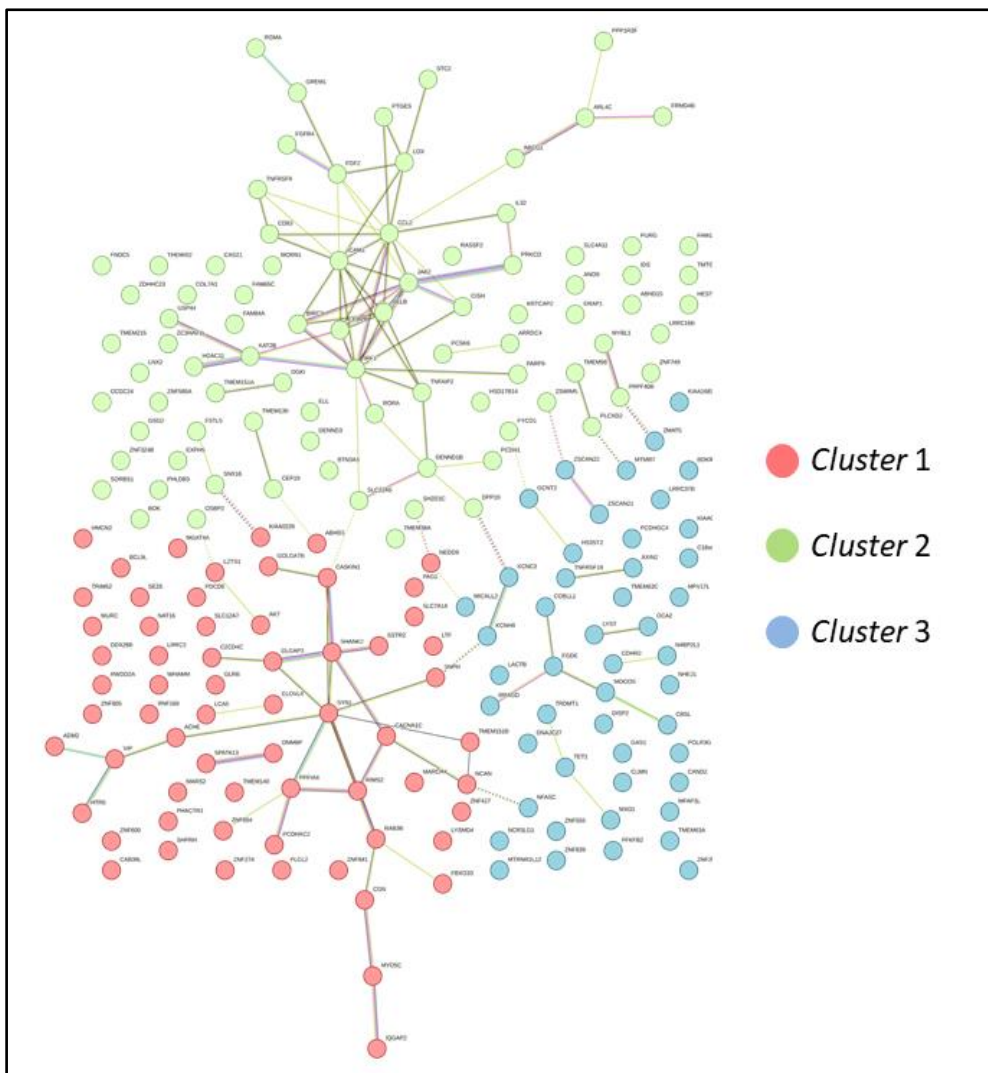


Figura 9. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 3 *clusters* gênicos correspondentes aos 217 genes identificados nas células de NB que passaram a ser expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1, 2 e 3) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

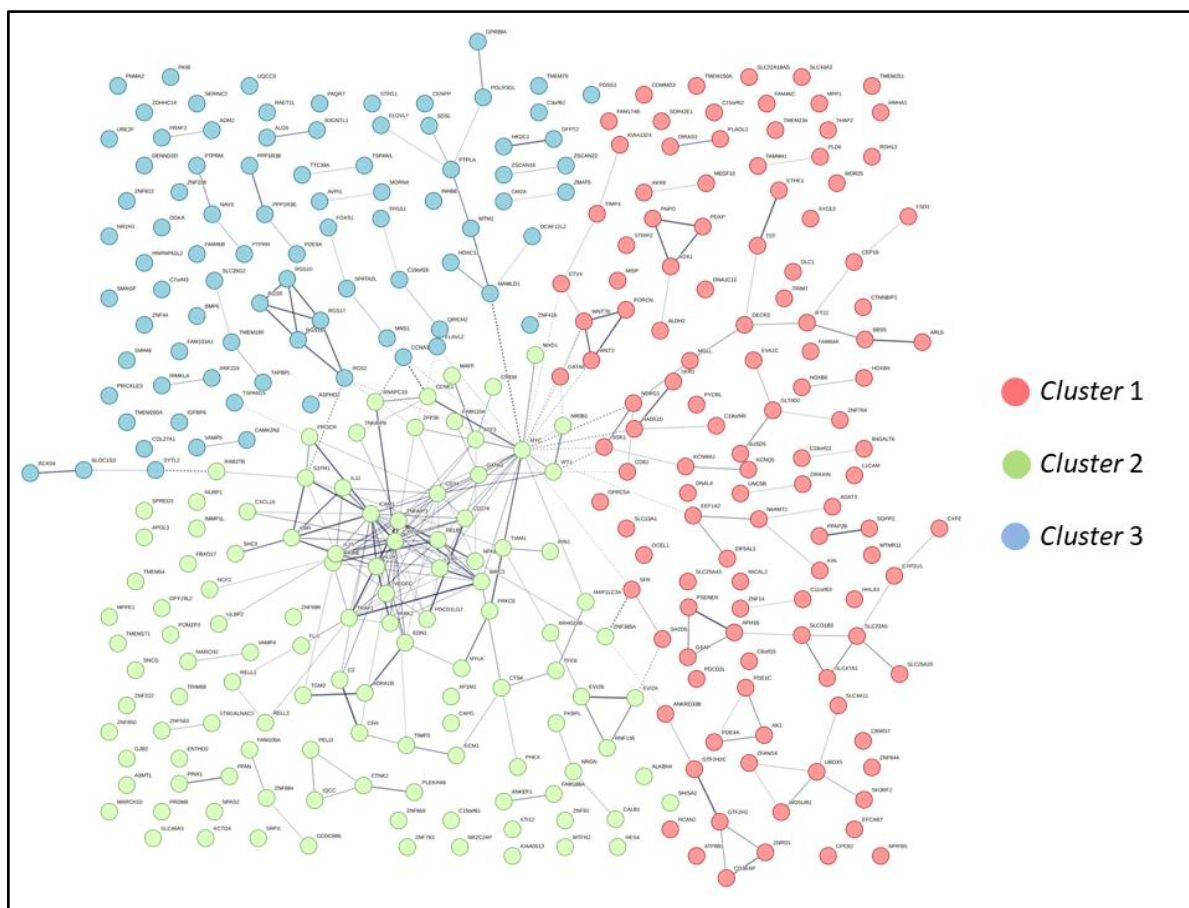


Figura 10. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 3 *clusters* gênicos correspondentes aos 380 genes identificados nas células de GBM que passaram a ser expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1, 2 e 3) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

Na sequência, estes genes foram submetidos a uma análise de enriquecimento com o objetivo de identificar a ação biológica dos genes que ganharam expressão após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Para esta análise, foram considerados 212 genes (dos 217 genes exclusivamente expressos na linhagem SH-SY5Y tratada com os Exo-CTIPDh) e 366 (dos 380 genes exclusivamente expressos na linhagem U251 tratada com os Exo-CTIPDh). Isto porque não há informações biológicas precisas acerca de alguns dos genes que ganharam expressão após o tratamento com os Exo-CTIPDh nas bases de dados usadas para o enriquecimento de vias. Os resultados mostraram que 58,5% (124/212) e 53,5% (196/366) dos genes que ganharam expressão após o tratamento com os Exo-CTIPDh nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente, estão associados à regulação biológica, sobretudo de processos metabólicos (**Figura 11**).

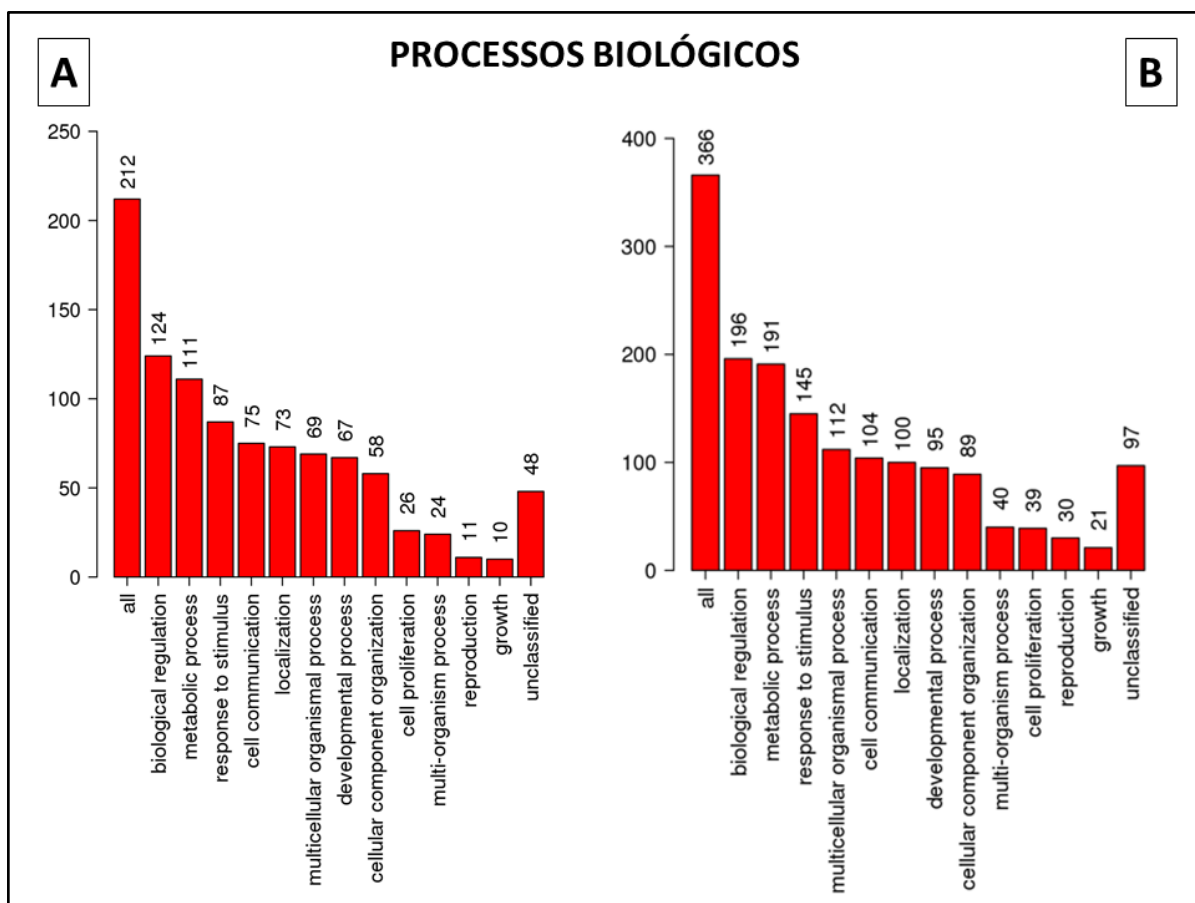


Figura 11. Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM reprimidos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados demonstraram que 58,5% (124/212) (A) e 53,5% (196/366) (B) dos genes expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh, estão associados à regulação biológica, sobretudo ligada a processos metabólicos nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente. Resultados obtidos através do Web Gestalt.

Os resultados também mostraram que os Exo-CTIPDh promoveram a expressão de genes envolvidos na (i) via de sinalização de fator de necrose tumoral (TNF, via associada ao *cluster 2*, **Figura 9**), apoptose (via associada ao *cluster 2*, **Figura 9**), sinalização por caderina (via associada aos *cluster 1, 2 e 3*, **Figura 10**) e via de adesão celular na linhagem SH-SY5Y (via associada ao *cluster 1, 2 e 3*, **Figura 10**) e, (ii) metabolismo da vitamina B6 (via associada ao *cluster 1*, **Figura 10**) na linhagem U251. Os genes associados a estas vias são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Lista de genes associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico das linhagens SH-SY5Y e U251 expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. FDR - taxa de descoberta falsa - métrica estatística que permite determinar a acurácia do enriquecimento de vias biológicas.

SH-SY5Y				U251
Via de TNF	Apoptose	Caderina	Adesão celular	Metabolismo de B6
BIRC3	BIRC3	CDHR2	ACHE	AOX1
CCL2	BOK	PCDH1	CCL2	PDXP
CEBPB	PRKCD	PCDHAC2	CD83	PNPO
ICAM1	RELB	PCDHGC4	CDHR2	
IRF1			CEBPB	
			COL7A1	
			GCNT2	
			GREM1	
			ICAM 1	
			IL32	
$p= 0,00253$	$p= 0,0248$	$p= 0,07374$	$p= 0,0010074$	$p= 0,000033$
FDR = 0,825	FDR = 0,9342	FDR = 1	FDR = 1	FDR = 0,101

5.6. Exo-CTIPDh regulam negativamente vias associadas à metástase e formação de células-tronco cancerígenas

Os genes cuja expressão foi reprimida pela ação biológica dos Exo-CTIPDh foram igualmente submetidos à análise de interação gênica pela ferramenta STRING, cujos resultados mostraram que os genes reprimidos em ambas as linhagens tratadas se agrupam em três diferentes *clusters* (**Figura 12 e 13** linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente).

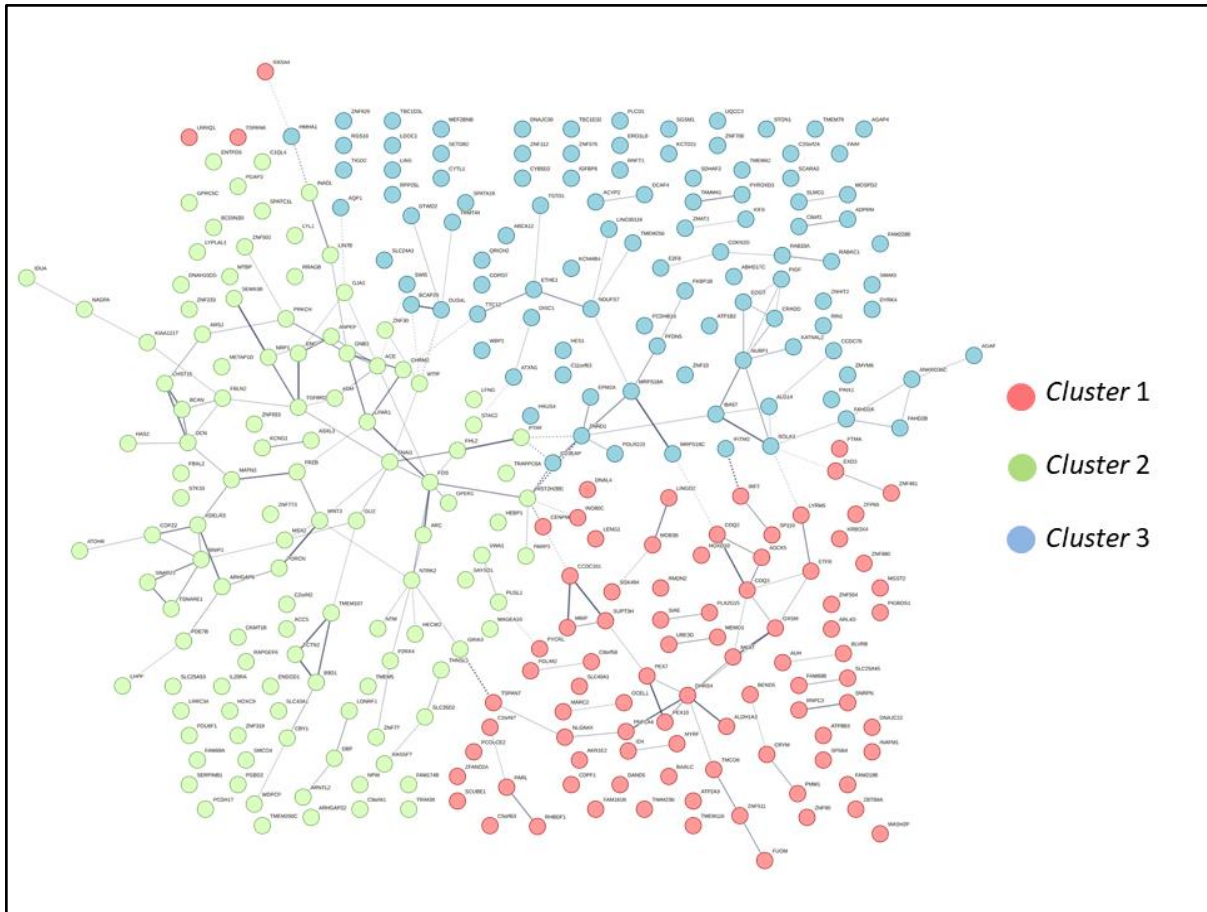


Figura 12. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 3 *clusters* gênicos correspondentes aos 368 genes identificados nas células de NB que deixaram de ser expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1, 2 e 3) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

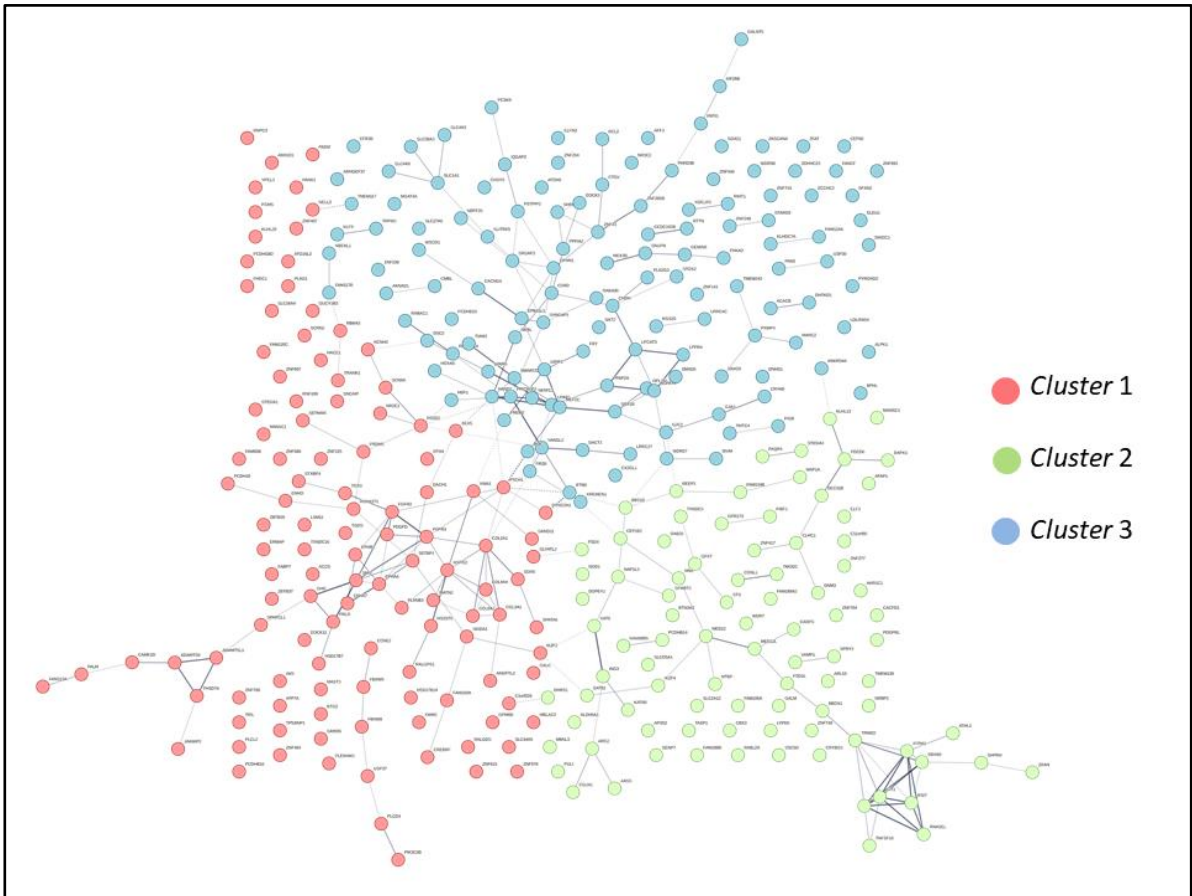


Figura 13. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 3 *clusters* gênicos correspondentes aos 371 genes identificados nas células de GBM que deixaram de ser expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1, 2 e 3) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

Posteriormente, foi possível observar que 48,8% (172/352) e 58,5% (215/367) dos genes que foram levados à repressão pelo Exo-CTIPDh estão associados à regulação biológica, sobretudo de processos metabólicos nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente (**Figura 14**).

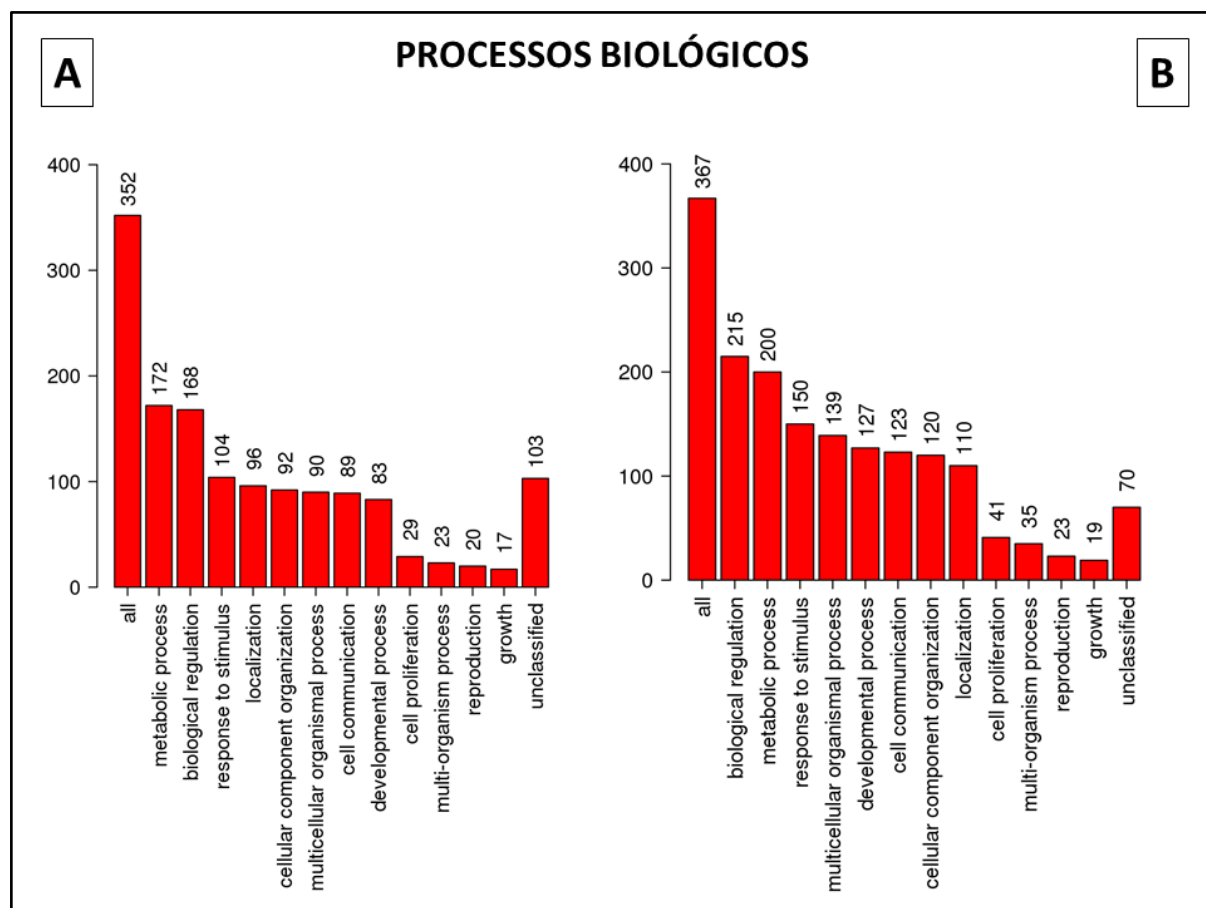


Figura 14. Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM com expressão reprimida após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados demonstraram que 48,8% (172/352) (**A**) e 58,5% (215/367) (**B**) dos genes reprimidos após o tratamento com os Exo-CTIPDh estão associados à regulação biológica, sobretudo ligados a processos metabólicos nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente. Resultados obtidos através do Web Gestalt.

Na sequência, os genes que tiveram sua expressão reprimida pela ação biológica do Exo-CTIPDh foram submetidos à análise de enriquecimento de via. Os resultados mostraram que os Exo-CTIPDh foram capazes de reprimir genes relacionados a (i) via de sinalização do receptor adrenérgico beta 3 (via associada ao *cluster 2*, **Figura 12**) e do receptor de ocitocina (via associada aos *cluster 2* e *3*, **Figura 12**), na linhagem SH-SY5Y e, (ii) ativação do fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1a, via associada aos *cluster 1* e *2*, **Figura 13**), via de sinalização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, via associada aos *cluster 1*,

2 e 3, **Figura 13**) e a via de sinalização de Wnt (via associada aos *cluster* 1, 2 e 3, **Figura n**), para a linhagem U251. Os genes associados a estas vias são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Lista de genes associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico das linhagens SH-SY5Y e U251 reprimidos após o tratamento com os Exo-CTIPDh. FDR - taxa de descoberta falsa - métrica estatística que permite determinar a acurácia do enriquecimento de vias biológicas.

SH-SY5Y		U251		
Receptor beta 3	Receptor de ocitocina	Ativação de HIF-1 ^a	Sinalização PDGF	Via Wnt
GNB3	GNB3	EGLN1	ELF3	DACT1
SNAP23	PLCD1	PIK3C2B	JAK2	FRZB
	PRKCH		OPHN1	KREMEN1
	SNAP23		PDGFRL	NFATC1
			SRGAP3	PCDH18
				PCDHB14
				PCDHB15
				PCDHB16
				PCDHGB2
				SMARCD3
$p= 0,0398$ FDR = 0,469	$p= 0,0000023578$ FDR = 0,543	$p= 0,11091$ FDR = 1	$p= 0,13815$ FDR = 0,1	$p= 0,10394$ FDR = 1

4.7. Exo-CTIPDh regula a expressão de genes associados ao desenvolvimento do sistema nervoso

Foi analisada a expressão (em termos quantitativos) dos genes expressos em ambas as linhagens controle e tratadas (9.754 e 9.285 genes expressos entre as linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente) (**Figura 8**). Para esta análise, foram considerados os genes diferencialmente expressos, cuja contagem nas linhagens tratadas com os Exo-CTIPDh tenha sido maior ou igual a três vezes do valor de expressão verificado nas respectivas linhagens controle (*i.e.*, contagem de leituras das linhagens controle/contagem de leituras das linhagens tratadas com valor igual ou maior a três). Os resultados mostraram que os Exo-CTIPDh foram capazes de regular a expressão de 21 genes na linhagem SH-SY5Y e 148 na linhagem U251 (Tabela suplementar 1 e 2, respectivamente).

Além disso, para avaliar sua ação biológica, estes genes foram submetidos à análise de interação gênica. Os resultados indicaram que os genes expressos em um nível maior ou igual a três vezes do valor de expressão identificado nas células controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh se agrupam em dois *clusters* distintos para a linhagem SH-SY5Y

(Figura 15), enquanto que para a linhagem U251 se construíram três *clusters* diferentes (Figura 16). Estes resultados sugerem que, embora os Exo-CTIPDh sejam capazes de modificar a expressão global de genes tanto do NB como do GBM, estes exossomos apresentam uma ação mais expressiva na linhagem de GBM.

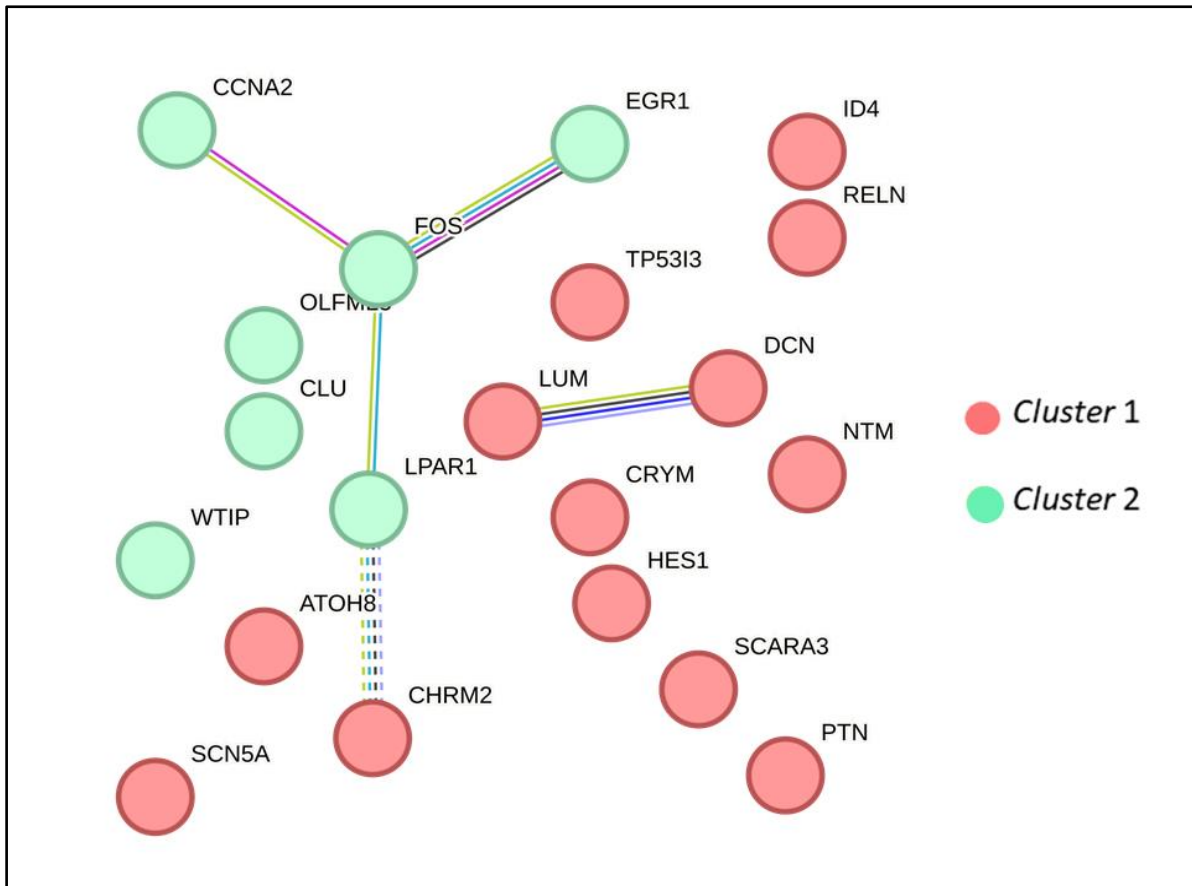


Figura 15. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de SH-SY5Y expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 2 *clusters* gênicos correspondentes aos 21 genes identificados nas células de NB que passaram a ser superexpressos em um nível de três vezes maior que do controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1 e 2) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

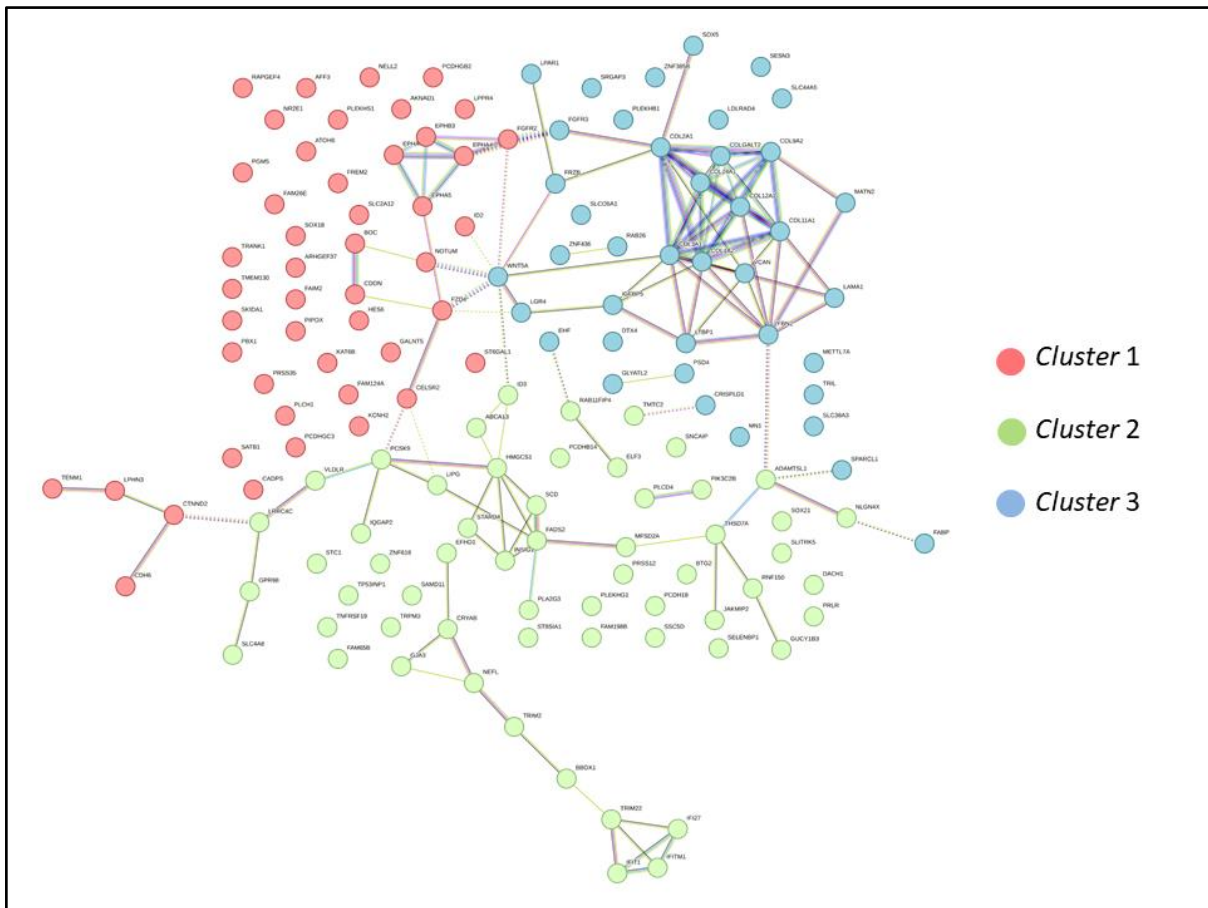


Figura 16. Análise de interações gênicas clusterizadas dos genes de U251 expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados apresentaram a existência de 3 *clusters* gênicos correspondentes aos 148 genes identificados nas células de NB que passaram a ser superexpressos em um nível de três vezes maior que do controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Cada *cluster* (1 e 2) representa um conjunto distinto de genes associados. Resultados obtidos a partir do *software* STRING.

Na sequência, os genes diferencialmente expressos pelos Exo-CTIPDh foram submetidos a uma análise de enriquecimento de vias. Os resultados mostraram que 85,7% (18/21) e 66,2% (98/148) dos genes diferencialmente expressos pelos exossomos nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente, estão relacionados à regulação biológica, sobretudo de processos metabólicos (**Figura 17**).

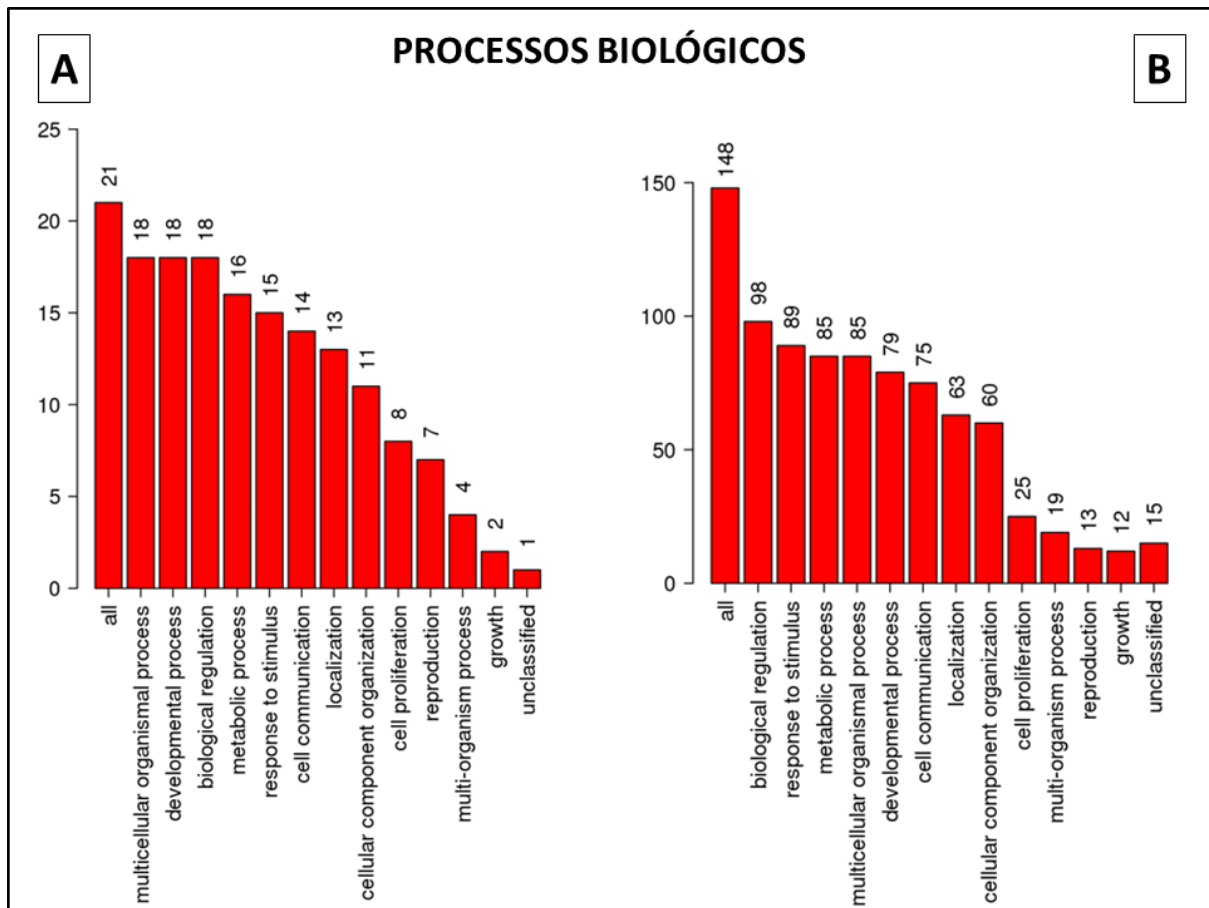


Figura 17. Análise de processos biológicos associados às funções dos genes das células de NB e GBM diferencialmente expressos pelo menos três vezes mais do que no controle após o tratamento com os Exo-CTIPDh. Os resultados demonstraram que 85,7% (18/21) (A) e 66,2% (98/148) (B) dos genes diferencialmente expressos após o tratamento com os Exo-CTIPDh estão associados a processos de desenvolvimento em organismos multicelulares, sobretudo ligados à regulação biológica em termos de resposta a estímulos nas linhagens SH-SY5Y e U251, respectivamente. Resultados obtidos através do Web Gestalt.

A partir do enriquecimento do conjunto de genes regulados negativamente foi observado que os genes na linhagem SH-SY5Y estão relacionados à gliogênese (*clusters* 1 e 2, **Figura 15**) e a regulação positiva de processos de desenvolvimento (*clusters* 1 e 2, **Figura 15**), ao passo que os genes da linhagem U251 estão envolvidos na neurogênese (*clusters* 1, 2, 3, **Figura 16**) e formação do sistema nervoso central (*clusters* 1, 2 e 3, **Figura 16**). Tendo em vista que estas vias estão diretamente associadas à progressão no NB e do GBM, foi verificada a contagem de expressão dos genes enriquecidos para estas vias nas linhagens controle e tratadas com os Exo-CTIPDh. Os resultados confirmaram que os Exo-CTIPDh são capazes de reprimir a expressão dos genes HES1, ID4, LPAR1 e RELN, na formação da glia e dos genes ATOH8, DCN, FOS, HES1, ID4, LPAR1 e RELN na regulação positiva de processos de desenvolvimento, para o NB (**Tabela 5**). Para o GBM foi possível observar a

repressão da expressão dos genes e BTG2, COL2A1, COL3A1, EPHA4, EPHA7, EPHB3 e FABP7 na via da formação do SNC e dos genes BOC, BTG2, COL3A1 e EPHA4, na via de neurogênese (**Tabela 6**). Com isto, sugere-se que os exossomos podem impedir a progressão tanto do NB, como do GBM.

Tabela 5. Lista de genes reprimidos associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico da linhagem SH-SY5Y diferencialmente expressos (pelo menos três vezes mais do que do controle) após o tratamento com os Exo-CTIPDh. FDR - taxa de descoberta falsa - métrica estatística que permite determinar a acurácia do enriquecimento de vias biológicas.

SH-SY5Y			
	Gene	Controle	Exo-CTIPDh
Via de gliogênese	CLU	83.83	24.67
	HES1*	30.22	7.65
	ID4*	30.10	8.46
	LPAR1*	19.63	6.00
	PTN	440.31	86.96
	RELN*	170.14	50.59
		<i>p</i> -valor = 0,00034	FDR = 0,001298
	Gene	Controle	Exo-CTIPDh
Regulação positiva de processos de desenvolvimento	ATOH8*	14.33	4.68
	CCN1	40.03	11.91
	DCN*	81.27	8.91
	EGR1	209.25	27.49
	FOS*	49.56	3.12
	HES1*	30.22	7.65
	ID4*	30.10	8.46
	LPAR1*	19.63	6.00
	PTN	440.31	86.96
	RELN*	170.14	50.59
	<i>p</i> -valor = 0,00042	FDR = 0,001289	

*Genes com expressão abaixo do limítrofe (leituras < 10).

Tabela 6. Lista de genes reprimidos associados às vias identificadas após o enriquecimento gênico da linhagem U251 diferencialmente expressos (pelo menos três vezes mais do que do controle) após o tratamento com os Exo-CTIPDh. FDR - taxa de descoberta falsa - métrica estatística que permite determinar a acurácia do enriquecimento de vias biológicas.

		U251	
Desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC)	Gene	Controle	Exo-CTIPDh
	ADGRL3	60.24	14.99
	BTG2*	50.38	7.20
	CDON	118.44	21.70
	COL2A1*	17.48	1.78
	COL3A1*	13.26	1.37
	EPHA4*	26.30	8.10
	EPHA5	52.67	16.00
	EPHA7*	20.20	5.44
	EPHB3*	21.89	4.77
FABP7*	36.00	6.09	
		<i>p</i> -valor = 0,00005	FDR = 0,000012
Neurogênese	Gene	Controle	Exo-CTIPDh
	ADGRL3	60.24	14.99
	ADGRV1	42.47	10.01
	BOC*	23.93	7.82
	BTG2*	50.38	7.20
	CDON	118.44	21.70
	CELSR2	152.69	42.21
	COL3A1*	13.26	1.37
	CTNND2	58.39	15.97
	EFHD1	78.35	15.58
EPHA4*	26.30	8.10	
		<i>p</i> -valor = 0,000021	FDR = 0,0000097

*Genes com expressão abaixo do limítrofe (leituras < 10).

5. DISCUSSÃO

Embora a incidência global das malignidades do SN seja baixa, o Brasil registra a maior taxa de incidência mundial destes tipos de cânceres. Dentre estas malignidades, o glioblastoma multiforme (GBM) representa a neoplasia maligna mais comum de cérebro na população adulta, enquanto que o neuroblastoma (NB) representa a principal causa de óbito por câncer em pacientes pediátricos, sendo responsável por até 15% dos óbitos por câncer verificados em crianças.

Apesar dos notórios avanços na biologia molecular do câncer, que tem permitido a identificação de novos alvos terapêuticos, o tratamento das malignidades do SN continua desafiando a oncologia. Isto porque, embora o GBM apresente um rápido crescimento, causa um dramático comprometimento neurológico. Além disso, se por um lado a barreira hematoencefálica (BHE) confere um importante mecanismo de defesa, impedindo que toxinas e/ou patógenos atinjam o encéfalo, por outro, a presença desta estrutura limita o *delivery* de uma miríade de drogas com ação quimioterapêutica.

Embora o NB seja uma malignidade extracraniana e, portanto, não passiva das limitações físicas impostas pela BHE, a doença se caracteriza por um amplo espectro de apresentação e desfecho clínico. Se por um lado os casos de baixo risco (verificados no início da infância) apresentam regressão espontânea ou excelente resposta terapêutica, os casos de alto risco apresentam um prognóstico ruim mesmo quando submetidos à terapia multi-modal.

Frente a este cenário, faz-se necessário buscar novas abordagens terapêuticas a fim de aumentar a sobrevivência dos pacientes com GBM ou NB, sem promover os efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos já usados no tratamento dessas malignidades que impactam negativamente na qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, a terapia *cell-free*, combinada com o promissor potencial terapêutico dos exossomos derivados de CTMs, desponta como uma possível abordagem para tratar o câncer, de modo geral. Baseado nisso, o presente estudo investigou o potencial terapêutico dos Exo-CTIPDh para o tratamento do GBM e NB. Para isso, foram analisados os transcriptomas de linhagens celulares destas neoplasias tratadas e não tratadas (controle) com os Exo-CTIPDh.

Para isso, o RNA total destas linhagens foi extraído e submetido à análise de integridade. Após confirmado que os RNAs isolados apresentaram qualidade satisfatória, foram construídas as bibliotecas de cDNA e, na sequência, estas foram submetidas ao *pair-end* RNA-Seq.

A partir dos resultados das análises de expressão diferencial dos genes controle e tratadas das linhagens SH-SY5Y e U251 foi possível determinar genes que foram regulados tanto positiva como negativamente. Somado a isso, o enriquecimento de vias mostrou que os Exo-CTIPDh foram capazes de promover a expressão de genes associados à via de TNF, apoptose e adesão celular, sobretudo por caderinas na linhagem de NB. Estes resultados trazem importantes evidências *in silico* do potencial antineoplásico dos Exo-CTIPDh. Isto porque o aumento da sinalização de TNF promove a ativação da apoptose em NB por mecanismos independente da caspase 3, justificando o aumento da sinalização da apoptose verificada pelo enriquecimento (Alvarez *et al.*, 2011).

Neste sentido, é sabido que a evasão à apoptose é um fenômeno molecular invariável em todas as malignidades, sendo considerado um dos *hallmarks* do câncer. De modo geral, a evasão à apoptose se deve ao acúmulo de mutações acessórias em genes supressores tumorais. Por isso, não é surpreendente que as células de NB expressem proteínas inibidoras de apoptose (PIA) (Li & Nakagawara, 2013). No entanto, foi mostrado que o silenciamento das PIAs (na linhagem SH-SY5Y - NB) promoveu o aumento da morte celular programada (Lamers & Narendran, 2013).

Logo, o aumento da expressão de genes associados à apoptose sugere que os Exo-CTIPDh podem promover a morte de células cancerígenas por mecanismos independentes da inibição da polimerização das fibras do fuso mitótico (mecanismo de ação comumente verificado na maioria dos quimioterápicos) (Dhyani *et al.*, 2022).

Somado a isso, os resultados também mostraram que os Exo-CTIPDh foram capazes de promover a expressão de genes associados à adesão celular, incluindo as caderinas, grupo de glicoproteínas envolvidas na adesão intercelular cálcio-dependente e que se encontra invariavelmente desregulada durante o processo metastático de todas as malignidades, incluindo o NB (Kaszak *et al.*, 2020).

As caderinas são glicoproteínas que participam dos processos de adesão célula-a-célula de modo cálcio-dependente. De modo geral, as células epiteliais expressam elevados níveis de E-caderina (tipo de caderina epitelial), a qual é responsável pela manutenção da adesão intercelular (Kaszak *et al.*, 2020). Porém, é sabido que durante a transição epitélio-mesênquima (TEM, processo de transdiferenciação celular verificado durante a metástase), ocorre um “*switch*” gênico, no qual a expressão de E-caderina é reprimida pelo aumento da expressão dos fatores de transcrição nuclear Snail1, Snail2 (Slug) e Twist (Gravdal *et al.*, 2007). Porém, ao mesmo tempo em que estes fatores agem como repressores da E-caderina, eles também agem como ativadores da expressão da N-caderina (tipo de caderina neuronal)

que, por possuir menor capacidade de adesão, facilita o desprendimento das células cancerígenas levando à disseminação destas células para órgãos distantes (Lammens *et al.*, 2012; He; Duan & Li, 2018). Logo, o aumento da expressão das caderinas aliado a regulação positiva da adesão celular verificado na linhagem de NB sugere que o tratamento com os Exo-CTIPDh pode impedir a disseminação de células cancerígenas e, com isso, reduzir o potencial metastático do NB. Esta ação sugere que os Exo-CTIPDh podem ser uma alternativa terapêutica, sobretudo para o tratamento de pacientes com NB de alto risco.

Por outro lado, as análises *in silico* sugerem que os Exo-CTIPDh são capazes de aumentar a ativação do metabolismo da vitamina B6 no GBM. Este resultado reforça o potencial terapêutico dos Exo-CTIPDh para o tratamento do GBM, já que a vitamina B6 medeia uma atividade antitumoral, regulando a ativação e diferenciação de células T, aumentando a proliferação de células T CD8+ (Bargiela *et al.*, 2022) que estão associadas ao aumento da sobrevivência dos pacientes (Mauldin *et al.*, 2021).

Com relação ao enriquecimento de genes regulados negativamente, os Exo-CTIPDh mostraram ser capazes de reprimir a expressão de genes associados à sinalização dependente do receptor de beta 3 (B3-AR) e do receptor de ocitocina na linhagem de NB e à sinalização de HIF-1a e à via de Wnt na linhagem de GBM. Estes resultados reforçam a ação antineoplásica dos Exo-CTIPDh. Estudos mostraram que a inibição do receptor adrenérgico beta 3 impede o crescimento do NB através da supressão da via de mTOR (Subramanian *et al.*, 2020) e da modulação do eixo SK2/S1P2 (Deng *et al.*, 2019; Bruno *et al.*, 2020), ao passo que a ativação do receptor de ocitocina promove mudanças no citoesqueleto de células de NB, aumentando a formação de filopódios que se encontram associados à migração celular verificada durante a transdiferenciação epitélio-mesênquima (TEM) (Bakos *et al.*, 2013).

Além disso, os resultados *in silico* também sugerem que os Exo-CTIPDh são capazes de reduzir no NB, a ativação do HIF-1a, fator de transcrição capaz de regular diferentes etapas do processo oncogênico, incluindo progressão, angiogênese, metástase e formação de CTCs (Påhlman & Mohlin, 2018).

O fator HIF-1a age como um sensor natural do oxigênio, encontrando-se presente no citoplasma. Entretanto, o fator é ativado quando ocorre a redução da pressão parcial de oxigênio (tal como verificado durante a progressão do câncer). Uma vez ativado, o HIF-1a é translocado para o núcleo, onde promove a expressão de receptores de glicose (GLUT), desviando o metabolismo oxidativo para o metabolismo glicolítico como fonte alternativa de obtenção de energia (ATP) - processo conhecido por efeito Warburg (Courtney *et al.*, 2015).

Desta forma, os resultados sugerem que os Exo-CTIPDh não somente são capazes de impedir a progressão do câncer e a formação de CTCs, como também é capaz de modificar o metabolismo neoplásico, fazendo destas nanovesículas importantes modificadores da história natural do NB.

Resultados semelhantes também foram observados na linhagem de GBM, onde o tratamento com os Exo-CTIPDh promoveu a regulação negativa de genes associados às vias de sinalização de PDGF e Wnt, as quais encontram-se ativadas durante a progressão e formação de células-tronco cancerígenas, contribuindo com a quimiorresistência.

Isto porque o aumento da expressão do PDGF promove a TEM, levando a transdiferenciação para células com fenótipo tronco cancerígeno (CTCs) (Cantanhede & De Oliveira, 2017) que, por superexpressarem proteínas de resistência a múltiplas drogas, apresentam um maior efluxo de quimioterápicos, impedindo a ação farmacocinética destas drogas (Alves *et al.*, 2021). Neste sentido, também é sabido que a ativação da via de Wnt/ β -catenina promove a formação de CTCs (Lee *et al.*, 2016; Latour *et al.*, 2021; Guan; Zhang; Guo, 2020), já que o *switch* da E-caderina contribui com a translocação nuclear da β -catenina (Kim *et al.*, 2019).

Uma vez no núcleo, a β -catenina age como um fator de transcrição nuclear, promovendo a expressão e ativação de STAT3 (fator chave na formação de CTCs), ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de Akt1, MMP2 e MMP9 levando a progressão e disseminação do GBM (Lee *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

Somado a isso, os resultados da análise dos genes diferencialmente expressos cujo nível de expressão após o tratamento foi três vezes maior do que no controle, corroboraram com a concepção de que os Exo-CTIPDh conseguem modificar a expressão global de genes para ambas as linhagens estudadas (SH-SY5Y e U251). Além disso, considerando a diferença entre o número de genes diferencialmente expressos identificados e a clusterização observada tanto no NB como no GBM é factível de se pensar que a ação biológica exercida pelo tratamento com os exossomos é mais expressiva nas células de GBM que nas de NB.

No que concerne ao enriquecimento de vias para esta lista de genes mencionadas precedentemente, constatou-se o potencial de regulação de expressão gênica dos Exo-CTIPDh nos genes associados às vias de (i) gliogênese e regulação positiva de processos de desenvolvimento, para as células de neuroblastoma e (ii) neurogênese e desenvolvimento do SNC, para o glioblastoma multiforme. Desta forma os resultados sugerem que a repressão dos genes associados a estas vias poderiam inibir o surgimento das células tumorais que originam estes cânceres.

Conforme a origem dos gliomas e neuroblastomas acredita-se que as células-tronco cancerígenas contribuem para a gênese e resistência aos tratamentos destas neoplasias (Veschi; Verona & Thiele, 2019; Skjulsvik *et al.*, 2020). Devido a existência de expressão genética compartilhada com células tumorais, capacidade de autorrenovação e potencial migratório, as células-tronco Neurais (CTNs) podem ser capazes de se transformar em CTCs e iniciar a formação dessas malignidades. Também, é sabido que o nicho neurogênico pode abrigar potenciais células de origem para formação de gliomas e neuroblastomas, além disso, este próprio nicho consiste em um sistema que promove a proliferação e migração e pode, portanto, atuar na migração de células tumorais, manutenção do tumor e até recorrência (Sinnaeve; Mobley & Ihrie, 2018; Veschi; Verona & Thiele, 2019). Ademais, as células tumorais podem se aproveitar desses meios já estabelecidos, migrar até eles e com isto gerar neoplasias em outro local (Skjulsvik *et al.*, 2020).

A interação entre neurônios e a tumorigênese é bilateral, pois por um lado promove a metástase e por outro a formação de novas estruturas nervosas (Dlamini *et al.*, 2021). Segundo o Dlamini e colaboradores existe uma grande subestimação do potencial dos neurônios no crescimento e disseminação de neoplasias, tendo em vista que os efeitos da sinalização neural, fatores de crescimento nervoso e moléculas de orientação axônica na regulação do início e progressão do câncer, fazem parte do papel de processos biológicos atribuídos aos neurônios (Dlamini *et al.*, 2021).

Contudo, os resultados obtidos com relação à repressão da expressão dos genes associados às vias mencionadas precedentemente, sugerem que o tratamento com os Exo-CTIPDh poderia não apenas impedir importantes etapas do processo oncogênico como por exemplo, a progressão, transição epitélio mesênquima, metástase, formação de CTCs, se não também inibir o processo de tumorigênese como um todo. Porém, caso isto realmente ocorra, não se podem descartar possíveis eventos prejudiciais ao desenvolvimento do SN de crianças. Além disso, são necessárias análises *in vitro* e estudos pré-clínicos que permitam testar as predições encontradas no presente estudo e elucidar com uma certeza maior os potenciais mecanismos antineoplásicos associados ao tratamento dos Exo-CTIPDh.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos confirmaram a necessidade de seguir rígidos processos de boas práticas, o que inclui as análises *downstream* de controle de qualidade das bases sequenciadas, bem como do alinhamento, que neste estudo, apresentou uma cobertura de mapeamento de mais de 90% em relação ao genoma de referência. Assim, o estudo alcançou uma qualidade satisfatória tanto das amostras de RNA como do sequenciamento das mesmas, a profundidade do sequenciamento obtido foi eficaz conseguindo mais de 90% dos transcritos alinhados mapeados com regiões únicas do genoma de referência.

As análises preditivas, baseadas em RNA-Seq, trouxeram fortes evidências de que os exossomos derivados do meio condicionado de células-tronco imaturas de polpa dentária humana (Exo-CTIPDh) podem regular vias associadas à carcinogênese, promovendo aumento da adesão celular, regulação do metabolismo energético e repressão de genes/vias relacionadas à progressão do GBM e do NB. Estes resultados não somente sugerem que os Exo-CTIPDh apresentam atividade antineoplásica em função de seu conteúdo transcriptômico, como reforçam o papel do RNA-Seq como uma importante ferramenta para prever a ação antineoplásica de produtos candidatos ao tratamento do câncer.

No entanto, como prova de conceito, faz-se necessário validar os resultados do RNA-Seq, buscando investigar se as vias e ou genes a elas associados encontram-se regulados, como mostrado pelo RNA-Seq. Para isso, é crucial que a expressão dos genes diferencialmente expressos seja confirmada por meio de ensaios de imunodeteção dos produtos codificados por estes genes, bem como investigar a ação *in vivo* destas nanovesículas em modelos animais apropriados para o GBM e NB.

7. REFERÊNCIAS

Abedi, A. A. *et al.* A Prognostic Model for Glioblastoma Patients Treated With Standard Therapy Based on a Prospective Cohort of Consecutive Non-Selected Patients From a Single Institution. *Front. Oncol.* (2021).

Airoidi, I. *et al.* Low-dose interferon- γ -producing human neuroblastoma cells show reduced proliferation and delayed tumorigenicity. *British Journal of Cancer.* 90(11), 2210-2218. (2004).

Akca, H. *et al.* Erratum to Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NF κ B pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer,* 73(3), 302-309. (2016).

Aldape, K. *et al.* Challenges to curing primary brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol.* 16(8), 509- 520. DOI: 10.1038/s41571-019-0177-5. (2019).

Alvarez, S. *et al.* TNF- α contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT. *PlosOne.* (2011).

Alves, A. L. V. Gomes, I. N. F. Carloni, A. C. *et al.* Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Res Ther* 12, 206 (2021).

American Cancer Society. Disponível em URL: <<https://www.cancer.org/es.html>> Consultado em: 16/03/2022 (2022).

An, O., Dall’Olio, G. M., Mourikis, T. P., Ciccarelli, F. D. NCG 5.0: Updates of a manually curated repository of cancer genes and associated properties from cancer mutational screenings. *Nucleic Acids Res* 44, D992–D999 (2016).

Anders, S., Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106 (2010).

Anders, S., Pyl, P. T., Huber, W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169 (2015).

Araldi, R. P., D’Amelio, F., Vigerelli, H., de Melo, T. C., Kerkis, I. Stem cell-derived exosomes as therapeutic approach for neurodegenerative Disorders: From biology to biotechnology. *Cells* 9, 2663 (2020).

Babraham Bioinformatics. FastQC. Babraham Institute. American Cancer Society. (2022). Disponível em URL: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>> Consultado em: 31/10/2022.

Balaguer, J., Castel, V. Neuroblastoma. *Anales de Pediatría Continuada.* Vol. 6(5), 276-283. DOI: 10.1016/S1696-2818(08)74880-7. (2008).

Bakos, j. *et al.* Oxytocin Receptor Ligands Induce Changes in Cytoskeleton in Neuroblastoma Cells. *J Mol Neurosci;* 50, 462–468 (2013).

Bargiela, D. et al. Vitamin B6 Metabolism Determines T Cell Anti-Tumor Responses. *Front. Immunol. Sec. Molecular Innate Immunity*. (2022).

Blau H. M., Brazelton T. R., Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 105(7), 829-41. (2001).

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120 (2014).

Boyle, E. I. *et al.* GO: TermFinder - Open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* 20, 3710–3715 (2004).

Bruno, G. *et al.* β 3-adrenoreceptor blockade reduces tumor growth and increases neuronal differentiation in neuroblastoma via SK2/S1P2 modulation. *Oncogene* 39, 368-384. (2020).

Cantanhede, I. G., de Oliveira, J. R. M. PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Sci Rep* 7, 15271 (2017).

Cassoni, P. *et al.* Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Journal International of Cancer*. Vol. 77(5), 695-700. (1998).

Coenye, T. Do results obtained with RNA-sequencing require independent verification? *Biofilm* vol. 3. (2021).

Conesa, A. *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 17, 1–19 (2016).

Courtney, R., Ngo, D. C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S. M., Karagiannis, T. C. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep. Apr*; 42(4), 841-51. (2015).

Da Costa, V. R. *et al.* Exosomes in the tumor microenvironment: From biology to clinical applications. *Cells* 10, 2617 (2021).

De Bernardi, B., Mosseri, V., Rubie, H. *et al.* Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *Br J Cancer*. 2008;99(7), 1027-1033. doi:10.1038/sj.bjc.6604640. (2008).

Declèves, X. *et al.* Role of ABC Transporters in the Chemoresistance of Human Gliomas. *Current Cancer Drug Targets*, 6(5), 433–445. (2006).

Deng, J. *et al.* Targeting β 3-adrenergic receptor signaling inhibits neuroblastoma cell growth via suppressing the mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 514(2) , 295-300. (2019).

Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21 (2013).

Dobin, A., Gingeras, T. R. Mapping RNA-seq reads with STAR. *Curr. Protoc. Bioinform* 51(1), 11-14. DOI: 10.1002/0471250953.bi1114s51. (2015).

Domènech, M. et al. Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(22),12608. (2021).

Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F.C., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., Baan, C.C., Dahlke, M.H., Hoogdijn, M.J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front. Immunol.* 3, 297. (2012).

Evangelista, A., Soares, M. B. P. & Villarreal, C. F. Cell-free therapy: A neuroregenerative approach to sensory neuropathy? *Neural Regen. Res.* 14, 1383–1384 (2019).

Duffield, J. S., Park, K. M., Hsiao, L. L., Kelley, V. R. Scadden, D. T. Ichimura, T. Bonventre, J. V. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J. Clin. Investig.* 115, 1743–1755. (2005).

Gagnon, K. T., Corey, D. R. Argonaute and the Nuclear RNAs: New Pathways for RNA-Mediated Control of Gene Expression. *Mary ann Liebert, Inc.* Vol. 22, (1), 3-16. DOI: 10.1089/nat.2011.0330. (2012).

Giardine, B. *et al.* Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Research*, 15(10), 1451–1455. doi:10.1101/gr.4086505. (2005).

GLOBOCAN. GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Global Cancer Statistics*. (2020).

Gomzikova, M. O., Rizvanov, A. A. Current trends in regenerative medicine: From cell to cell-free therapy. *Bionanoscience* 7, 240–245 (2017).

Goswami, K., Sanan-Mishra, N. RNA-seq for revealing the function of the transcriptome. *Bioinformatics Methods and applications*. Academic Press, chapter 7, 105-129. (2022).

Grant, G. R. *et al.* Comparative analysis of RNA-Seq alignment algorithms and the RNA-Seq unified mapper (RUM). *Bioinformatics* 27, 2518–2528 (2011).

Gravdal, K. Halvorsen, O. J. Haukaas S. A. Akslen L. A. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*; 13 (23), 7003–7011. (2007).

Griss, J. *et al.* ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. *Molecular and Cellular Proteomics* 19, 2115–2124 (2020).

Guan, R., Zhang, X., Guo, M. Glioblastoma stem cells and Wnt signaling pathway: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Chin Neurosurg JI* 6, 25 (2020).

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J.-H. Revisão do Isolamento, Caracterização, Função Biológica e Abordagens Terapêuticas Múltiplas de Exossomos. *Cells*, 8, 307. (2019).

Haider, K. H., Aramini, B. Miracring the injured heart with stem cell derived exosomes: An emerging strategy of cell free therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 11(1), 23. (2020).

Han, C. *et al.* Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells. *Stem Cells Int* 2016. DOI: 10.1155/2016/7653489. (2016).

Haraszti, R. A. Miller, R. Stoppato, M. Sere, Y. Y. Coles, A. Didiot, M.C. Wollacott, R. Sapp, E. Dubuke, M.L. Li, X. *et al.* Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity. *Mol. Ther.* 26, 2838–2847. (2018).

Heck, J. E. *et al.* The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 23(2), 125–143. doi:10.1111/j.1365-3016.2008.00983.x. (2009).

He, K., Duan, G., Li, Y. Dehydroeffusol inhibits viability and epithelial-mesenchymal transition through the Hedgehog and Akt/mTOR signaling pathways in neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology.* Vol. 829(15), 93-101. (2018).

Hernández, P. R., Dorticós, E. B. Medicina regenerativa. Células madre embrionárias y adultas. *Rev Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* Vol. 20.(3). (2004).

Herrero, J. *et al.* Ensembl comparative genomics resources. Database : The Journal of Biological Databases and Curation, 2016, bav096. (2016).

Honda, M., Ohshima, H. Biological characteristics of dental pulp stem cells and their potential use in regenerative medicine. *Journal of Oral Biosciences.* Vol. 64, 26-36. (2022).

Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA,* 8(1), e1364. (2016).

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer do Sistema Nervoso Central. INCA - Ministério da Saúde. (2022).

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer do Sistema Nervoso Central. Rio de Janeiro: INCA. 120p. (2019). Disponível em URL: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Consultado em: 22/11/2022.

Jana, A. *et al.* NFκB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget.* Pág. 37377-37393. (2017).

Joo, H. S. Suh, J. H. Lee, J. H. Bang, E. S.; Lee, J. M. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 727. (2020).

Jorgovanovic *et al.*, Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research* 8. Nro. 49. (2020).

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., Tanabe, M. KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res* 49, D545–D551 (2021).
- Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Niewiadomska, Z., Dworecka-Kaszak, B. Ngosa Toka, F., Jurka, P. Papel das caderinas no câncer — uma revisão. *Int. J. Mol. ciência*, 21 , 7624. (2020).
- Kerkis, I. *et al.* Advances in Cellular and Cell-Free Therapy Medicinal Products for Huntington Disease Treatment. From Pathophysiology to Treatment of Huntington's Disease. DOI: 10.5772/intechopen.102539. (2022).
- Khang, T. F. & Lau, C. Y. Getting the most out of RNA-seq data analysis. *PeerJ* 2015. (2015).
- Kim, S. H. *et al.* Serine/threonine kinase MLK4 determines mesenchymal identity in glioma stem cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell*, pág. 201-213. (2016).
- Kim, W. K. Kwon, Y. Jang, M. *et al.* β -catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Sci Rep* 9, 18440 (2019).
- Kleihues, P., Burger, P. C., Scheithauer, B. W. The New WHO Classification of Brain Tumours. *Brain Pathology* 3, 255-268. (1993).
- Kleihues P., Cavenee W. K., editors. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon: IARC Press. (2000).
- Kosvira, A., Ntzioni, E. & Chouvarda, I. Network analysis with biological data of cancer patients: A scoping review. *Journal of Biomedical Informatics* vol. 120. (2021).
- Kukurba, K. R. & Montgomery, S. B. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, pdb.top084970 (2015).
- Kumar, P., Kandoi, S., Misra, R., Vijayalakshmi, S., Rajagopal, K., Verma, R.S. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 46, 1–9. (2019).
- Lamarre, S. *et al.* Optimization of an RNA-Seq differential gene expression analysis depending on biological replicate number and library size. *Front Plant Sci* 9, (2018).
- Lamers, F., Narendran, A., Pathways of Intrinsic Apoptosis in Neuroblastoma: Targets for Therapeutics and New Drug Development. In (Ed.), Neuroblastoma. IntechOpen. (2013).
- Lammens, T. *et al.* N-Cadherin in Neuroblastoma Disease: Expression and Clinical Significance. *Plosone*. (2012).
- Latour, M. *et al.* WNT Signaling as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *International Journal of Molecular Science*. Vol. 22, 8428. (2021).

- Lee, Y. *et al.* WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory Investigation*. Vol. 96, 137-150. (2016).
- Li, H., Yang, C., Shi, Y., Zhao, L. Exosomes derived from siRNA against GRP78 modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells suppress Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *J. Nanobiotechnol.* 16, 103. (2018).
- Li, Y., Nakagawara, A. Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma. *Cells Jun*; 2(2), 432-459. (2013).
- Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930 (2014).
- Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res* 47, (2019).
- Liu, H-W. *et al.* The Disruption of the β -Catenin/TCF-1/STAT3 Signaling Axis by 4-Acetylanthroquinol B Inhibits the Tumorigenesis and Cancer Stem-Cell-Like Properties of Glioblastoma Cells, In Vitro and In Vivo. *Cancers*, 10, 491. (2018).
- Liu, S.-L. Sun, P. Li, Y. Liu, S.-S. Lu, Y. Exosomes as critical mediators of cell-to-cell communication in cancer pathogenesis and their potential clinical application. *Transl. Cancer Res.* 8, 298–311. (2019).
- Lou, G. Song, X. Yang, F. Wu, S. Wang, J. Chen, Z. Liu, Y. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* 8, 122. (2015).
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Svheithauer, B. W., Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2), 97-109. (2007).
- Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1. (2016).
- Love, M. I. Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550 (2014).
- Louis, D. N. *et al.* The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 23(8), 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. (2021).
- Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., Weaver, A. M. Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell Biol.* 27, 172–188 (2017).

- Maheshwari, R. *et al.* Recent advances in exosome-based nanovehicles as RNA interference therapeutic carriers. *Nanomedicine* 12, 2653–2675 (2017).
- Martens, M. *et al.* WikiPathways: Connecting communities. *Nucleic Acids Res* 49, D613–D621 (2021).
- Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17, 10 (2011).
- Mauldin, I. S. *et al.* Proliferating CD8+ T Cell Infiltrates Are Associated with Improved Survival in Glioblastoma. *Cells*, 10, 3378. (2021).
- Mayo Clinic. Enfermedades e afecções: Glioblastoma descrição geral. Mayo Clinic.org. 2020. Disponível em URL: <<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/glioblastoma/cdc-20350148>> Consultado em: 28/12/2022.
- McInnes, L., Healy, J., Melville, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. (2018).
- Merico, D., Isserlin, R., Stueker, O., Emili, A., Bader, G. D. Enrichment map: A network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 5, (2010).
- Nakada, M. *et al.*, Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers*. Vol. 3(3), 3242-3278. (2011).
- Nennig, S. E., Schank, J. R. The role of NFκB in drug addiction: beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism Oxford*. 52(2), 172-179. (2017).
- NCI. National Cancer Institute: Neuroblastoma. (2022) Disponível em URL: <<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/neuroblastoma>> Consultado em: 22/11/2022.
- Noch, E. K., Ramakrishna, R., Magge, R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg* 116, 505-517. (2018).
- Nunes, J. L. *et al.* Clinical and Epidemiological Characteristics and Survival Outcomes of Children with Neuroblastoma: 21 Years of Experience at the Instituto de Oncologia Pediátrica, in São Paulo, Brazil. *Ver Paul Pediatr*. 36(3), 254-260. DOI: 10.1590/1984-0462/2018;36;3;00007. (2018).
- Ohgaki, H., Kleihues, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. (2013).
- Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology*. DOI:10.1093/neuonc/noab200. (2021).
- Påhlman, S., Mohlin, S. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in neuroblastoma. *Cell Tissue Res* 372, 269–275 (2018).

- Parnell, L. D. *et al.* BioStar: An Online Question & Answer Resource for the Bioinformatics Community. *PLoS Comput Biol* 7(10), e1002216. (2011).
- Phan, J. *et al.* Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy. *J. Extracell. Vesicles* 7, (2018).
- Pierce *et al.*, Effects of Oxytocin Analogs on Neurite Outgrowth and Cellular Signaling in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. *The FASEB Journal* Vol. 35 (S1). (2021).
- Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science*. *Science* vol.284 (5411), 143-147. (1999).
- Popescu, A. M, *et al.* Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*. Vol. 8(7), 7825-7837. (2015).
- Puchta, M., Boczkowska, M., Groszyk, J. Low RIN Value for RNA-Seq Library Construction from Long-Term Stored Seeds: A Case Study of Barley Seeds. *Genes*; 11(10), 1190. (2020).
- Pullan, J. E. *et al.* Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Mol. Pharm.* 16, 1789–1798 (2019).
- Putri, G. H., Anders, S., Pyl, P. T., Pimanda, J. E. & Zanini, F. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics* 38, 2943–2945 (2022).
- Qiu, Y. *et al.* Antitumor activity of cabazitaxel and msc-trail derived extracellular vesicles in drugresistant oral squamous cell carcinoma. *Cancer Manag. Res.* 12, 10809–10820 (2020).
- Quinn, T. P., Crowley, T. M., Richardson, M. F. Benchmarking differential expression analysis tools for RNA-Seq: Normalization-based vs. log-ratio transformation-based methods. *BMC Bioinformatics* 19, 274 (2018).
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E. H., Bongso, A., Sim. E. K. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 75, 775-779. (2003).
- Reid *et al.* Interferon-gamma dependent infiltration of human T cells into neuroblastoma tumors in vivo. *Clin Cancer Res.* 15(21), 6602-6608. (2009).
- Robinson, M. D., Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 11, R25 (2010).
- Rosenberger, L., Ezquer, M., Lillo-Vera, F., Pedraza, P. L., Ortúzar, M. I., González, P. L., Figueroa-Valdés, A. I., Cuenca, J., Ezquer, F., Khoury, M. *et al.* Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 9, 663. (2019).
- Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M., Melo, S. A. The biology of cancer exosomes: Insights and new perspectives. *Cancer Res.* 77, 6480–6488 (2017).
- Sathyanarayanan, A., Manda, S., Poojary, M., Nagaraj, S. H. Exome Sequencing Data Analysis. *Reference Module in Life Sciences*. (2018).

- Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7, 3 (2006).
- Schriml, L. M. *et al.* Disease ontology: A backbone for disease semantic integration. *Nucleic Acids Res* 40 (D1), D940-946. (2012).
- Seo, Y. J., Cho, W. H., Kang, D. W., Cha, S. H. Extraneural metastasis of glioblastoma multiforme presenting as an unusual neck mass. *J Korean Neurosurg Soc.* 51(3), 147-50. doi: 10.3340/jkns.2012.51.3.147. (2012).
- Sha, Y., Phan, J. H. & Wang, M. D. Effect of Low-Expression Gene Filtering on Detection of Differentially Expressed Genes in RNA-Seq Data. 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). 6461-6464. (2015).
- Sheng, Q. *et al.* Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. *Briefings in Functional Genomics*, v. 16, n. 4, p. 194–204, (2017).
- Sinnaeve, J., Mobley, B. C., Ihrle, R. A. Space Invaders: Brain Tumor Exploitation of the Stem Cell Niche. *Am J Pathol.* Jan;188(1), 29-38. (2018).
- Skjulsvik, A. J., Bø, H. K., Jakola, A. S *et al.* Is the anatomical distribution of low-grade gliomas linked to regions of gliogenesis?. *J Neurooncol* 147, 147–157 (2020).
- Smith, V., Foster, J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children* 2018, 5(9), 114. doi: 10.3390/children5090114. (2018).
- Song, Y. S., Lee, H. J.; Doo, S. H.; Lee, S. J.; Lim, I.; Chang, K.-T.; Kim, S.U. Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction. *Cell Transpl.* 21, 1641–1650. (2012).
- Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545–15550 (2005).
- Subramanian, K. *et al.* Correction of Niemann-Pick type C1 trafficking and activity with the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 295(23), 8017-8035. (2020).
- Stark, R., Grzelak, M. & Hadfield, J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet* 20, 631–656 (2019).
- Stewart, B. W. Wild, C. P. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. Lyon. (2014).
- Stupnikov, A. *et al.* Robustness of differential gene expression analysis of RNA-seq. *Comput Struct Biotechnol J* 19, 3470–3481 (2021).

- Takahashi, M., Li, T. S., Suzuki, R., Kobayashi, T., Ito, H., Ikeda, Y., Matsuzaki, M., Hamano, K. As citocinas produzidas pelas células da medula óssea podem contribuir para a melhora funcional do coração infartado, protegendo os cardiomiócitos da lesão isquêmica. *Sou. J. Fisiol. Circ. Fisiol.* 291 , H886–H893. (2006).
- Tarazona, S. *et al.* NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBnet.journal*, v. 17, n. B, p. 18. (2012).
- Tarazona, S. *et al.* Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* 43, (2015).
- Tarazona, S. *et al.* Differential Expression in RNA-seq. Bioconductor Open Source Software For Bioinformatics. (2016). Disponível em URL: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/NOISeq/inst/doc/NOISeq.pdf> Consultado em: 17/11/2022.
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111 (2009).
- Trevisan, P. *et al.* Clinical and Molecular Characterization of Adult Glioblastomas in Southern Brazil. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Vol. 78, 4, 297-304. (2019).
- Ulitsky, I. Interactions between short and long noncoding RNAs. *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies. (2018).
- Veschi, V., Verona, F., Thiele, C. J. Cancer Stem Cells and Neuroblastoma: Characteristics and Therapeutic Targeting Options. *Front Endocrinol (Lausanne)*. (2019).
- Von Schulze, A. Deng, F. A review on exosome-based cancer therapy. *J. Cancer Metastasis Treat.* 6, 42 (2020).
- Wang, K. *et al.* MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. *Nucleic Acids Res* 38, e178–e178 (2010).
- Warlet, F. S. *et al.* Neuroblastoma Infantil: Características clínicas, tratamento e prognóstico. *Acta Médica*. Vol., 39(2), 259-268. (2018).
- Watson, J. D., Crick, F. H. The Structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18(0), 123–131. (1953).
- Wienke, J. *et al.* The immune landscape of neuroblastoma: Challenges and opportunities for novel therapeutic strategies in pediatric oncology. *Eur J Cancer*. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.11.014. (2021).
- Williams, C. R., Baccarella, A., Parrish, J. Z. & Kim, C. C. Trimming of sequence reads alters RNA-Seq gene expression estimates. *BMC Bioinformatics* 17, 1-13. (2016).
- Wilson, T. A., Karajannis, M. A., Harter, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5, 64. DOI:10.4103/2152-7806.132138. (2014).

- Witwer, K. W. *et al.* Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J. Extracell. Vesicles* 8(1). (2019).
- Wu, T. D., Reeder, J., Lawrence, M., Becker, G. & Brauer, M. J. GMAP and GSNAP for genomic sequence alignment: Enhancements to speed, accuracy, and functionality. in 283–334. (2016).
- Xie, C., Jauhari, S. & Mora, A. Popularity and performance of bioinformatics software: the case of gene set analysis. *BMC Bioinformatics* 22. (2021).
- Yuan, Z., Kolluri, K. K. Gowers, K. H. C., Janes, S. M. TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *J. Extracell. Vesicles*, 6(1), 1265291. (2017).
- Zanders, E. D., Svensson, F., Bailey, D. S. Therapy for glioblastoma: is it working?. *Drug Discovery Today*, S1359644618301880–. doi:10.1016/j.drudis.2019.03.008. (2019).
- Zhao, X. *et al.* Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomed. Pharmacother.* 128, 110237. (2020).
- Zhao, Y. *et al.* TPM, FPKM, or normalized counts? A comparative study of quantification measures for the analysis of RNA-seq data from the NCI patient-derived models repository. *J Transl Med* 19, 269. (2021).
- Zhou, J. Tan, X. Tan, Y. Li, Q. Ma, J. Wang, G. Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes in Cancer Progression, Metastasis and Drug Delivery: A Comprehensive Review. *J. Cancer*, 9, 3129–3137. (2018).
- Zhou, Q., Su, X., Jing, G., Chen, S. Ning, K. RNA-QC-chain: comprehensive and fast quality control for RNA-Seq data. *BMC Genomics* 19, 144. (2018).
- Zülch, K. J. Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva. (1979).