UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Keteryne Rodrigues da Silva

“Investigação do papel da via TGF- β em ependimomas pediátricos”

Ribeirão Preto – SP

2021

Keteryne Rodrigues da Silva

“Investigação do papel da via TGF- β em ependimomas pediátricos”

Tese apresentada ao Departamento de Genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr Luiz Gonzaga Tone

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

Dezembro – 2021

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

Silva, Keteryne Rodrigues da

Investigação do papel da via TGF- β em ependimomas pediátricos. Ribeirão Preto, 2021.

130 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga.

1. TGF- β . 2. MiR-630. 3. Invasão celular. 4. Migração celular. 5. TEM.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Keteryne Rodrigues da Silva

“Investigação do papel da via TGF- β em ependimomas pediátricos”

Tese apresentada ao Departamento de Genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de Concentração: Genética

Data da defesa:

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP (Processo n° 2016/19799-7 e processo n° 2018/25924-4);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –FMRP/USP;

*Dedico este trabalho a minha mãe Maria das Dores Rodrigues
e meu padrasto Benedito Tadeu Gomes pelo total apoio e por sempre
acreditarem que eu conseguiria o melhor. Maketa, amo vocês!*

Agradecimentos

Desafio tão grande quanto escrever essa tese é escrever meus agradecimentos de forma sucinta. Por isso, começo agradecendo a **Deus** por me proporcionar tudo que tenho: saúde e pessoas maravilhosas ao meu redor, e por sempre olhar por mim.

Agradeço a minha mãe **Maria** e meu padrasto **Tadeu** que me proporcionaram condições para seguir meus objetivos pessoais e profissionais. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e por acreditarem em mim. Espero poder sempre orgulhar vocês e poder retribuir tudo o que vocês fazem por mim.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, que me acolheu por quatro anos, acreditou no meu potencial e confiou na minha competência. Foi um período de grande amadurecimento profissional e pessoal e ter o seu apoio foi essencial.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli** por todo o apoio científico e discussões que contribuíram muito para o desenvolvimento dessa tese.

A **Profª Drª Regia Caroline Peixoto Lira Fusco**, que me conduziu cientificamente, mas também trouxe grandes contribuições pessoais. Obrigada por todas as manhãs, tardes e noites de discussões científicas e por sempre acreditar e confiar na minha capacidade.

Ao **Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, especialmente à secretária **Susie Adriana Penha Nalon**, pelo apoio prestado durante o doutorado.

Ao **Laboratório de Pediatria e Puericultura** onde realizei meus experimentos. Em especial, à **Rosane Queiroz, Veridiana Kill Suazo de SantÁna** e **Beth Perna** pelo apoio técnico ao projeto, bem como ao carinho e boas risadas diárias.

Aos meus amigos além da bancada **Carolina Alves Pereira, Mirella Baroni Milan, Gabriela Macedo, Pablo Chagas** e **Luciana Chain Veronez**, por todo apoio durante esse trabalho. Ser amigo é interpretar olhares, entender silêncios, perdoar os erros, guardar segredos, secar lágrimas e claro, comemorar as vitórias. Obrigada por serem essas pessoas maravilhosas na minha vida. É um privilégio poder chamá-los de amigos.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular pelas discussões científicas e trocas de experiência que agregaram muito ao meu crescimento profissional e por toda troca de experiência.

À minha **Família** por ser minha segurança, minha motivação e minha inspiração. Amo cada um de vocês, perto ou longe.

A **Prof^a. Dra. Raelene Endersby** e todos meus colegas do “**Brain Tumour Research Team**” no **Telethon Kids Institute – Perth/Austrália**, que contribuíram muito para meu amadurecimento profissional durante meu BEPE. Foi uma experiência incrível.

A todos que de algum modo me apoiaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)**. Agradeço esta instituição pelo interesse no estudo, bem como CNPq, CAPES e FAEPA.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

Aldo Novak

RESUMO

Investigação do papel da via TGF- β em ependimomas pediátricos

O ependimoma (EPN) é a terceira neoplasia cerebral mais comum na infância sendo 90% dos casos localizados na região intracraniana. O ependimoma origina-se das células ependimárias que revestem o sistema ventricular e o canal da medula espinhal, e é atualmente dividido em nove subgrupos moleculares sendo, o ependimoma supratentorial RELA (ST-EPN-RELA) e o ependimoma de fossa posterior A (FP-EPN-A) os subgrupos moleculares de pior prognóstico. Os fatores prognósticos para EPN compreendem idade menor ou maior do que 3 anos (sendo menor que 3 anos pior prognóstico) e grau de ressecção tumoral. Por tratar-se de um tumor altamente invasivo, com frequente taxa de ressecção parcial, a grande maioria dos pacientes de EPN vão a óbito devido à recorrência tumoral. O atual tratamento desta neoplasia consiste em ressecção cirúrgica seguido de radiação. O uso de quimioterápicos não têm apresentado resultados satisfatórios na sobrevida desses pacientes. Dessa forma faz-se necessário a busca de novas abordagens terapêuticas que possibilitem melhora na sobrevida e qualidade de vida de pacientes de EPN. Alguns trabalhos demonstraram que EPN apresenta alterações de vias de sinalização importantes para diversos processos celulares, dentre elas, a via TGF- β . A via de sinalização TGF- β atua principalmente nos processos de migração e invasão celular em diversos tumores. Sendo assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o papel da via TGF- β em EPN visando a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos a partir de genes dessa via. Pela técnica de RNAseq, foi possível identificar o enriquecimento da via TGF- β nos subgrupos de pior prognóstico, ST-EPN-RELA e FP-EPN-A bem como, hub genes que participam ou interagem com componentes da via TGF- β . A inibição farmacológica da via TGF- β com a droga SB431542 na linhagem de ependimoma BXD-1425, apesar de ocasionar diminuição dos níveis gênicos e proteicos da via SMAD, não demonstrou ter efeito na viabilidade celular, apoptose, migração e invasão celular. Entretanto, após 24h de tratamento com SB431542, houve um aumento significativo de células na fase G1 e uma diminuição de células na fase S do ciclo celular. O hsa-miR-630 regula diversos processos celulares, dentre os quais destacam-se a migração, invasão celular e transição epitélio-mesenquimal, associado a regulação da via TGF- β em diversos tumores. Como uma possibilidade de modular a via TGF- β e regular os processos de migração e invasão celular de EPN, realizou-se a transdução da linhagem BXD-1425 com o lentivirus de

hiperexpressão do miR-630 e seu controle. A hiperexpressão do miR-630 levou a uma diminuição da viabilidade celular, aumento no número de células em apoptose, diminuição da taxa de migração e invasão celular. Além disso, ao hiperexpressar o miR-630 houve uma diminuição da expressão genica e proteica de componentes da via TGF- β /SMAD. Esses resultados indicam que o miR-630 pode estar modulando a via TGF- β e regulando os processos de invasão e migração celular de ependimoma.

Palavras-chaves: TGF- β . MiR-630. Invasão celular. Migração celular. TEM

ABSTRACT

Investigation of the role of the TGF- β pathway in pediatric ependymomas

Ependymoma (EPN) is the third most common brain tumor in pediatric patients, which 90% of cases are located in the intracranial area. The ependymoma originates from the ependymal cells that line the ventricular system and the spinal cord canal and is currently divided into nine molecular subgroups which the supratentorial ependymoma RELA (ST-EPN-RELA) and posterior fossa ependymoma A (PF-EPN-A) presenting the worst prognosis. The prognostic factors for EPN comprise age less or greater than 3 years-old (being less than 3 years-old worse prognosis) and degree of tumor resection. Because it is a highly invasive tumor, with frequent partial resection rate, the vast majority of EPN patients die due to tumor recurrence. The current treatment for EPN consists of surgical resection followed by radiation therapy. The use of chemotherapy has not shown satisfactory results on survival rate of EPN patients. Thus, it is necessary to search for new therapeutic approaches that enable improvement in the survival and quality of life of EPN patients. Some studies have shown that EPN presents alterations in important signaling pathways for several cellular processes, including the TGF- β pathway. The TGF- β signaling pathway acts mainly in the processes of cell migration and invasion in several tumors. Therefore, this study aimed to analyze the role of the TGF- β pathway in EPN aiming at the identification of possible new therapeutic targets based on genes from this signaling pathway. Through the RNAseq, it was possible to identify the enrichment of the TGF- β pathway in the subgroups with the worst prognosis, ST-EPN-RELA and PF-EPN-A as well as, hub genes that participate or interact with components of the TGF- β pathway. The pharmacological inhibition of the TGF- β pathway with the drug SB431542 in the ependymoma cell line BXD-1425, despite causing a decrease in the gene and protein levels of the SMAD pathway, has not been shown to have an effect on cell viability, apoptosis, migration and cell invasion. However, after 24h of treatment with SB431542, there was a significant increase in cells in the G1 phase and decrease in cells in the S phase of the cell cycle. Hsa-miR-630 regulates several cellular processes, among which migration, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition stand out, associated with the regulation of the TGF- β pathway in several tumors. As a possibility to modulate the TGF- β pathway and regulate the processes of migration and cellular invasion of EPN, the BXD-1425 cell line was transduced with the miR-630 hyperexpression

lentivirus and its control. The overexpression of miR-630 led to a decrease in cell viability, an increase in the number of cells undergoing apoptosis, a decrease in the rate of migration and cell invasion. In addition, when overexpressing miR-630 there was a decrease in the gene and protein expression of components of the TGF- β /SMAD pathway. These results indicate that miR-630 may be modulating the TGF- β pathway and regulating ependymoma invasion and cell migration processes.

Keywords: Ependymoma, miR-630, TGF- β , invasion, migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Subgrupos moleculares deependimoma.....	23
Figura 2: Sinalização da superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF- β).....	27
Figura 3: Transição epitélio-mesenquimal (TEM).	30
Figura 4: Ativação do processo de TEM pela via de sinalização TGF- β	31
Figura 5: Expressão dos genes <i>TGF-β1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> e <i>TGF-β2</i> em amostras controle (células endimárias), amostras tumorais primárias e recidiva de EPN.	53
Figura 6: Expressão de genes da via TGF- β associado aos parâmetros clínicos de pacientes de EPN.	54
Figura 7: Expressão de <i>TGF-β2</i> em amostras de recidiva de EPN associado A) ao grau histológico e B) ao gênero.	54
Figura 8: Curvas de Kaplan-Meier para análises de sobrevida livre de eventos (A-D) e sobrevida global (E-H) de acordo com a expressão dos genes da via TGF- β	56
Figura 9: Expressão dos genes <i>TGF-β1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> e <i>TGF-β2</i> associada aos subgrupos moleculares de EPN em amostras primárias (A-D) e amostras de recidiva (E-H).	58
Figure 10: Heatmap dos genes diferencialmente expressos nos subgrupos moleculares de EPN A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.	59
Figure 11: Análise enriquecimento de vias KEEG Pathway dos subgrupos A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.	60
Figure 12: Hub genes dos subgrupos moleculares de EPN A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.	61
Figura 13: Análise da ativação da via TGF- β em EPN. Expressão da proteína Smad3 fosforilada nas células endimárias e na linhagem BXD-1425 respectivamente.	61
Figura 14: Análise do perfil da via TGF- β na linhagem BXD-1425 após 24 horas de tratamento com a droga SB431542, na dose de 10 μ M.	62
Figura 15: Efeito do inibidor de TGF- β (SB431542) na viabilidade celular da linhagem de endimoma BXD-1425, após A) 24 horas, B) 48 hora e C) 72 horas de tratamento.	63
Figura 16: Análise do ciclo celular após tratamento da linhagem BXD-1425 com SB431542 nos tempos de A) 24, B) 48 e C) 72 horas.	63
Figura 17: Análise de apoptose após tratamento da linhagem BXD-1425 com o inibidor SB431542 nos tempos de A) 24 e B) 48 horas.	64
Figura 18: Análise de migração celular por Wound healing na linhagem de EPN, BXD-1425, após 72 horas de tratamento com inibidor de TGF- β , SB431542 na dose de 10 μ M.	64
Figura 19: Análise de invasão celular por matrigel na linhagem BXD-1425 após 24 horas de tratamento com SB431542 na dose de 10 μ M.	65
Figura 20: A) Expressão do miR-630 associado a ausência e presença de recidiva. Curvas de Kaplan-Meier para avaliar B) Taxa de sobrevida livre de evento e C) sobrevida global.	67
Figura 21: Expressão do miR-630 em amostras controle, amostras tumorais primárias e recidiva de EPN.	68
Figura 22: Gráfico da expressão relativa do miR-630 no controle e na linhagem BXD-1425 após transdução com vetor de hiperexpressão.	69

Figura 23: Análise de enriquecimento de via KEEG pathway dos genes alvos preditos e validados do miR-630.....	70
Figura 24: Validação dos genes da via TGF- β após transdução da linhagem de EPN com miR-630. A) Expressão gênica, B) Expressão proteica.....	71
Figura 25: Viabilidade celular após transdução da linhagem BXD-1424 com o miR-630	72
Figura 26: Análise do ciclo celular após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630 nos tempos de A) 24, B) 48 e C) 72 horas.....	72
Figura 27: Análise de apoptose após transdução da linhagem de EPN com miR-630.....	73
Figura 28: Análise de migração celular por wound healing após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630.	74
Figura 29: Análise de invasão celular por matrigel após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630.....	74
Figura 30: Expressão genica de genes TEM em amostras primárias de ependimoma pediátrico do banco de dados Pfister (GSE64415)	76
Figura 31: Expressão dos genes SLUG e Vimentina associado aos dados clínicos de pacientes de ependimoma do banco de dados Pfister (GSE64415).....	77
Figura 32: Perfil de expressão gênico de <i>E-caderina</i> , <i>N-caderina</i> e <i>SLUG</i> em A) Células ependimárias e BXD-1425; B) Linhagem BXD-1425 transduzida com controle e miR-630.....	78
Figura 33: HCA - Expressão proteica de E-caderina, N-caderina e Slug na linhagem BXD-1425 após transdução com controle e miR-630.	79
Figura 34: Western-blot - Expressão proteica de E-caderina, N-caderina e Slug na linhagem BXD-1425 após transdução com controle e miR-630.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas e moleculares dos pacientes portadores de EPN (n=67 amostras).	39
Tabela 2: Sondas Taqman® - Life Technologies utilizadas para análise de expressão genica e de microRNA.	40
Tabela 3: Anticorpos primários e secundários	42
Tabela 4: Análise de <i>Mann-Whitney</i> da expressão gênica dos genes da via TGF- β <i>TGF-β1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> e <i>TGF-β2</i> associado aos dados clínicos de pacientes pediátricos de ependimoma. $p < 0,05$	50
Tabela 5: Análise de <i>Mann-Whitney</i> da expressão gênica do miR-630 associado aos dados clínicos de pacientes pediátricos de ependimoma. $p < 0,05$	65
Tabela 6: Alvos preditos e validados do miR-630.....	69

Lista de Siglas e Símbolos

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CIB	Centro Infantil Boldrini (Campinas)
cm ²	Centímetro quadrado
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPN	Ependimoma
MEC	Matriz extracelular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FP ou PF	Fossa Posterior
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GUSB	Glucuronidase beta
h	Horas
HC	Hospital das Clínicas
HCA	High-content analysis
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
KEEG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
miRNA	MicroRNA

mg/ml	Miligramas por mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção
ng/mL	Nanograma por mililitro
NSM	Nenhum subgrupo molecular
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Iodeto de Propídeo
qRT-PCR	Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction
RIN	RNA integrated number
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Subependimoma
SLE	Sobrevida livre de evento
SNC	Sistema nervoso central
SO	Sobrevida global
SP	Medular / Espinhal
ST	Supratentorial
TBS-T	Tris-buffered Saline - Tween
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1. Introdução	21
1.1 Ependimoma.....	21
1.2 Via TGF- β	25
1.3 Transição epitélio-mesenquimal (TEM)	29
1.4 Justificativa e Hipótese.....	32
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. Delineamento experimental.....	36
4. Materiais e Métodos	38
4.1 Linhagem celular e condições de cultivo.....	38
4.2 Amostras de pacientes e dados clínicos.....	38
4.3 Análise da expressão genica e proteica	40
3.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	40
4.3.2 qRT-PCR	40
4.3.3 RNA-seq e análises bioinformáticas	41
4.3.4 <i>Western-blot</i>	42
4.4 Modulação da via TGF- β	43
4.4.1 Tratamento com inibidor de TGF- β , SB431542.....	43
4.4.2 Transdução da linhagem BXD-1425	43
4.5 Ensaios funcionais	43
4.5.1 Viabilidade celular.....	43
4.5.2 Ciclo celular	44
4.5.3 Apoptose.....	45
4.5.4 <i>Wound healing</i>	45
4.5.5 Invasão celular.....	46
4.6 Análise <i>in silico</i>	47
4.7 Análises estatísticas	47
5. Resultados.....	50
5.1 Perfil de expressão da via TGF- β em ependimoma	50
5.1.1 Expressão dos genes <i>TGF-β1</i> , <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> e <i>TGF-β2</i> em amostras de Ependimoma	50
5.1.2 Transcriptoma das amostras de EPN.....	58

5.2 Estudo funcional da via TGF- β na linhagem celular de EPN.....	61
5.2.1 Viabilidade celular após tratamento com inibidor de TGF- β	62
5.2.3 Ciclo Celular após tratamento com a droga SB431542	63
5.2.4 Apoptose após tratamento com a droga SB431542.....	63
5.2.5 <i>Wound healing</i> após tratamento com SB431542	64
5.2.6 Ensaio de invasão após tratamento com SB431542	65
5.3 Perfil de expressão do miR-630 em EPN e correlação com dados clínicos	65
5.4 Transdução da linhagem de EPN com miR-630.....	68
5.4.1 Confirmação da transdução do miR-630	68
5.5 Análise <i>in silico</i> miR-630	69
5.6 Validação dos alvos da via TGF- β	70
5.7 Viabilidade celular após transdução com miR-630	71
5.8 Ciclo celular após transdução com miR-630.....	72
5.9 Apoptose após transdução com miR-630	72
5.10 <i>Wound healing</i> após transdução com miR-630	73
5.11 Invasão celular pós transdução com miR-630	74
5.12 Perfil TEM.....	75
5.12.1 RNA mensageiro	75
5.12.2 Proteína	78
6. Discussão	81
7. Conclusão	89
8. Referências bibliográficas	91

Introdução

1. Introdução

1.1 Ependimoma

O Ependimoma (EPN) é um tumor primário que acomete o sistema nervoso central (SNC), cuja origem se dá nas células endimárias que revestem o sistema ventricular e o canal da medula espinhal (LEHMAN, 2008). Esta neoplasia pode ocorrer tanto no compartimento intracraniano, incluindo a região supratentorial (ST) (hemisférios cerebrais) e a região infratentorial ou fossa posterior (FP) (cerebelo e tronco cerebral), quanto ao compartimento medular incluindo os filamentos terminais (GUPTA; SALUNKE, 2017). O EPN é a terceira neoplasia do SNC mais frequente em pacientes pediátricos, representando cerca de 10% deste grupo de tumores. Dentre esses pacientes, 90% dos casos ocorrem na região intracraniana, sendo um terço localizado na região supratentorial, e dois terços na região da fossa posterior. O EPN intracraniano comporta-se de maneira mais agressiva, principalmente em crianças com idade abaixo de 3 anos (KILDAY *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2016). Em geral, os EPN são tumores localmente invasivos, apresentando assim recidivas locais frequentes. Porém, apesar de raro, a disseminação pelo SNC está associada a pior prognóstico (ZACHAROULIS *et al.*, 2010).

Atualmente, a estratificação de risco e o planejamento terapêutico dos pacientes com EPN são realizados de acordo com o diagnóstico do tumor primário, o tamanho do tumor residual após a ressecção cirúrgica e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) (GERSTNER; PAJTLER, 2018). O padrão atual de tratamento dessa neoplasia consiste na ressecção cirúrgica total, quando possível, ou parcial seguida de radiação focal (MERCHANT *et al.*, 2009). Porém, como uma parte significativa de EPN ocorre em crianças pequenas, a radioterapia não é desejável devido os efeitos prejudiciais no cérebro em desenvolvimento. Desta maneira, a quimioterapia com multiagentes tem sido administrada em um esforço para atrasar ou evitar o uso de irradiação, porém, não há evidências de benefícios na sobrevida dos pacientes (WRIGHT; GAJJAR, 2009; LIN; CHINTAGUMPALA, 2015). Mesmo diante das atuais estratégias de tratamento, a recorrência local do tumor pode ocorrer em até 50% dos casos (SOWAR *et al.*, 2006), principalmente em pacientes pediátricos, sendo as taxas de sobrevida livre de eventos (SLE) e a sobrevida global (SG) em 5 anos de 23-57% e 50-71%, respectivamente (LIN; CHINTAGUMPALA, 2015). Neste contexto, a identificação de novos alvos terapêuticos é importante para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

A classificação atual de EPN, realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica-o em três graus e quatro variantes histológicas: Subependimoma (Grau I), Ependimoma mixopapilar (grau I), Ependimoma grau II e Ependimoma anaplásico (grau III); e um grupo molecular: Ependimoma supratentorial RELA (grau II e grau III) (LOUIS *et al.*, 2016). No entanto, a classificação histológica tem se mostrado insuficiente para elaboração de um prognóstico adequado, tendo em vista a grande variação na distinção entre EPNs grau II e grau III, mesmo entre neuropatologistas experientes, bem como a presença de diversas áreas tumorais representando diferentes tipos histológicos em um mesmo paciente (ELLISON *et al.*, 2011; GODFRAIND *et al.*, 2012). Estas considerações levam ao questionamento se os critérios de classificação deveriam direcionar as estratégias terapêuticas, além de evidenciar a importância da caracterização molecular deste tumor, a fim de que decisões terapêuticas baseadas nas características moleculares possam ser exploradas (PAJTLER *et al.*, 2017).

Diversos estudos vêm demonstrando através de análises de expressão gênica, perfis de metilação e do número de cópias de DNA, que EPNs provenientes de diferentes regiões anatômicas possuem assinaturas moleculares distintas (KORSHUNOV *et al.*, 2010; WITT *et al.*, 2011; WANI *et al.*, 2012; PAJTLER *et al.*, 2015, 2018; CAVALLI *et al.*, 2018). PAJTLER *et al.* (2015) classificaram o EPN em nove subgrupos moleculares, através do perfil de metilação associado a outros aspectos como, a faixa etária, o grau histológico do tumor de acordo com a OMS e sua localização anatômica, sendo três subgrupos para cada compartimento anatômico: (I) medular (SP), (II) fossa posterior (FP) e (III) supratentorial (ST) (Figura 1). Através desta classificação foi demonstrado que esses subgrupos são geneticamente, transcricionalmente, demograficamente e clinicamente distintos.

Supratentorial (ST)	Fossa Posterior (FP)	Medular (SP)
Subependimoma Supratentorial (ST-SE) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: I Genoma balanceado	Subependimoma da Fossa Posterior (FP-SE) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: I Genoma balanceado	Subependimoma Medular (SP-SE) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: I Deleção 6q
Ependimoma Supratentorial YAP1 (ST-EPN-YAP1) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: II/III 11q aberrante	Ependimoma A da Fossa Posterior (FP-EPN-A) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: II/III Genoma balanceado	Ependimoma Mixopapilar da Medula Espinhal (SP-MPE) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: I Instabilidade cromossômica
Ependimoma Supratentorial RELA (ST-EPN-RELA) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: II/III 11q aberrante	Ependimoma B da Fossa Posterior (FP-EPN-B) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: II/III Instabilidade cromossômica	Ependimoma da Medula Espinhal (SP-EPN) Idade: Prognóstico: Grau Histológico: II/III Instabilidade cromossômica

Figura 1: Subgrupos moleculares de ependimoma. Criado no site BioRender.com (2021).

Dentre os nove subgrupos moleculares, o Subependimoma da Fossa Posterior (FP-SE) apresenta genoma mais estável comparado aos demais subgrupos, ocorrendo frequentemente em adultos e é o único que apresenta hiperexpressão do gene *KIT* (gene envolvido em processos de proliferação e migração celular). O Ependimoma A da Fossa Posterior (FP-EPN-A) acomete essencialmente crianças (média de idade de 3 anos) e apresenta um genoma estável com adição do cromossomo 1q, o qual está associado a um perfil tumoral mais agressivo (MENDRZYK *et al.*, 2006; KORSHUNOV *et al.*, 2010). O Ependimoma B da Fossa Posterior (FP-EPN-B) acomete adolescentes e jovens adultos (idade média de 20 anos), possui genoma mais instável, com várias perdas e ganhos cromossômicos e um prognóstico mais favorável (PAJTLER *et al.*, 2015). Trabalhos anteriores já haviam identificado a presença desses dois grupos de EPN da fossa posterior, sendo eles referidos como Grupo A (FP-EPN-A) e Grupo B (FP-EPN-B) (WITT *et al.*, 2011; WANI *et al.*, 2012). Trabalhos de KORSHUNOV *et al.* (2010), WITT *et al.* (2011), WANI *et al.* (2012) e NAGASAWA *et al.* (2013) mostraram que EPNs do grupo A apresentam alterações na expressão de genes envolvidos no ciclo celular e hiperexpressão de genes das vias de sinalização MAPK, PDGF, EGFR, TGF- β , WNT, NOTCH e SHH. Os trabalhos de WITT *et al.* (2011) e WANI *et al.* (2012) identificaram marcadores moleculares que distinguem o grupo A e o grupo B, sendo

que a expressão do gene subunidade 2 da laminina alfa (*LAMA2*) foi positiva em 94% dos tumores FP-EPN-A, enquanto que a expressão do gene neural EGFL tipo 2 (*NELL2*) foi positiva em 100% dos tumores FP-EPN-B. ARAKI *et al* (2016) descreveram o gene *TNC* como um terceiro marcador para o EPN de fossa posterior. No entanto, os estudos posteriores do PAJTLER *et al* (2018) e CAVALLI *et al* (2018) através de análises do perfil de metilação e/ou perfil de número de cópias, perfil de expressão gênica e correlação clínica, observaram uma heterogeneidade intratumoral sendo possível a estratificação em nove subtipos para FP-EPN-A (PFA-1a, PFA-1b, PFA-1c, PFA-1d, PFA-1e, PFA-1f, PFA-2a, PFA-2b e PFA-2c) e cinco subgrupos moleculares para PF-EPN-B (PFB-1, PFB-2, PFB-3, PFB-4 e PFB-5).

Atualmente, o principal fator prognóstico de EPN é o grau de ressecção tumoral completo, no qual anatomicamente, os tumores do grupo B apresentam maior facilidade de ressecção total, pois se encontram na linha média, enquanto os tumores do grupo A tendem a ocorrer lateralmente, o que dificulta sua ressecção completa. A idade também é um fator prognóstico para EPN de fossa posterior, sendo pacientes com idade menor que 3 anos de pior prognóstico comparado a pacientes com idade maior que 3 anos (AMIRIAN *et al.*, 2012; PAJTLER *et al.*, 2015). Portanto, os tumores do grupo A apresentam uma maior taxa de recorrência local, com taxas de SG e SLE em 5 anos de 50% e 20% respectivamente, enquanto o grupo B apresenta taxas de SG e SLE em 5 anos de 95% e 79% respectivamente (WITT *et al.*, 2011; PAJTLER *et al.*, 2015).

O Subependimoma Supratentorial (ST-SE) apresenta prognóstico favorável, acomete adultos e apresenta genoma estável. O Ependimoma Supratentorial YAP1 (ST-EPN-YAP1) apresenta prognóstico favorável, ocorre essencialmente em crianças (idade média 1,4 anos), apresenta alterações cromossômicas (fusões) caracterizadas pela quebra local no cromossomo 11 em torno do locus do gene yes-associado a proteína 1 (*YAP-1*) (PARKER *et al.*, 2014). Na maioria dos tumores ST-EPN-YAP1 as fusões são entre os genes *YAP-1* e *MAMLD1*. Em menor frequência, ocorrem fusões entre os genes *YAP-1* e *FAM118B*, os quais estão associados à via Hippo, que controla o crescimento e a proliferação celular (PAJTLER *et al.*, 2015). O Ependimoma Supratentorial RELA (ST-EPN-RELA) ocorre em adultos e crianças (idade média de 8 anos) e é o único que apresenta deleções do gene *CDKN2A* (gene que atua como supressor tumoral através da regulação do ciclo celular). Este grupo molecular apresenta quebra do cromossomo 11 em torno do proto-oncogene *RELA*, subunidade NF- κ B (PARKER *et al.*, 2014). A fusão entre os genes *RELA* e *C11orf95* é a variação estrutural mais frequente (70% dos ependimomas supratentoriais), e regula

positivamente a via de sinalização NF- κ B, um mediador central da inflamação (PARKER *et al.*, 2014; PIETSCH *et al.*, 2014; PAJTLER *et al.*, 2015). Trabalhos recentes demonstraram que células-tronco neurais transformadas com a fusão C11orf95-RELA são capazes de formar tumor cerebral em camundongos (PARKER *et al.*, 2014; OZAWA *et al.*, 2018). Mais recentemente, ZHU *et al.* (2020) estabeleceram que o papel do gene *RELA* no ST-EPN-RELA é estabilizar a ligação entre o DNA e a proteína de fusão, fornecendo seu domínio de ativação para conduzir a expressão dos genes alvo. Este grupo, juntamente com o FP-EPN-A, apresenta o pior prognóstico dentre todos os subgrupos moleculares de EPN, com elevados índices de recorrência local e taxas de SG e SLE em 10 anos de 50% e 20% respectivamente (PARKER *et al.*, 2014).

Os subgrupos da região medular (SP) acometem principalmente adultos, sendo os subgrupos Ependimoma Mixopapilar da Medula Espinhal (SP-MPE) e o Ependimoma da Medula Espinhal (SP-EPN) caracterizados por apresentarem perda do cromossomo 22q, o qual está associado à mutação do gene neurofibrina 2 (*NF2*) (ZHENG *et al.*, 2000; PAJTLER *et al.*, 2015).

Além da estratificação molecular, estudos vêm abordando evidências de *crosstalk* entre vias de sinalização durante a tumorigênese, e a aplicação das informações genômicas/assinaturas de expressão gênica associada aos tratamentos utilizados nos protocolos clínicos atuais (GARMAN; NEVINS; POTTI, 2007; BRECHBIEL; MILLER-MOSLIN; ADJEI, 2014; ZHU *et al.*, 2020). Uma das problemáticas que envolvem o estudo de EPN é a escassez de linhagens celulares imortalizadas e modelos animais, impedindo grandes avanços no teste de novas abordagens terapêuticas (SHU *et al.*, 2018). Dentre os subgrupos moleculares de EPN, o FP-EPN-A e ST-EPN-RELA destacam-se por apresentar os piores prognósticos, associados a altos índices de recorrência local e elevada taxa de mortalidade, principalmente em pacientes pediátricos, e necessitam de novas abordagens terapêuticas para que haja melhora tanto no seu prognóstico quanto no seu tratamento. Apesar de a extensão da ressecção tumoral ser o mais forte preditor de pior prognóstico, a heterogeneidade biológica deve ser considerada em futuros modelos pré-clínicos e terapias personalizadas.

1.2 Via TGF- β

A via de sinalização do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) está envolvida em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, adesão e migração celular, angiogênese e apoptose (RAGAZZON *et al.*, 2009; WAKEFIELD; HILL, 2013). A ativação da

via canônica ocorre a partir da ligação de uma das três isoformas do TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 ou TGF- β 3) ao receptor tipo II (TGF- β R2), que recruta e fosforila o receptor tipo I (TGF- β R1). A ativação do TGF- β R1, por sua vez, causa a fosforilação das proteínas intracelulares Smad2 e Smad3 que formam um complexo com R-Smad/Smad4. Este complexo se transloca para o núcleo, onde se liga ao DNA e a fatores de transcrição – proteínas que tem a capacidade de se ligarem simultaneamente no R-Smad e a uma sequência específica do DNA, regulando a transcrição gênica de diversos alvos (MASSAGUÉ; WOTTON, 2000; PRINCIPE *et al.*, 2014). Essas proteínas são funcionalmente expressas em alguns tipos celulares específicos, o que fornece uma base para a especificidade à resposta da via TGF- β em diferentes tipos celulares (CHEN *et al.*, 1997; HATA *et al.*, 2000). A cascata de sinalização não-canônica da via TGF- β envolve a ativação das vias MAPK/ERK, PI3K/AKT, WNT e NOTCH pela superfamília TGF- β , que por sua vez pode transduzir a sinalização das proteínas SMAD independentes (Figura 2) (MOUSTAKAS; HELDIN, 2005; ZHANG, 2009; ZHANG; YU; LEE, 2014). Além disso, a via TGF- β apresenta *crosstalks* com diversas outras vias importantes para o desenvolvimento do EPN, dentre elas WNT, Hippo, SHH e NF- κ B (TIAN; NEIL; SCHIEMANN, 2011; ATTISANO; WRANA, 2013; CASTELLONE; LAUKKANEN, 2017; KAST *et al.*, 2017; MOON *et al.*, 2017).

Figura 2: Sinalização da superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF- β). A sinalização inicia-se com oligomerização induzida pelos ligantes nos receptores de serina/treonina quinases e fosforilação das proteínas citoplasmáticas Smad2 e Smad3 para a via TGF- β /activina, ou Smad1/5/9 para a sinalização BMP. A fosforilação das Smads resulta em sua ligação com o transdutor de sinalização Smad4 e translocação deste complexo para o núcleo. Smads 6 e 7 são inibidores da via, e sua expressão é induzida pela sinalização de TGF- β /activina e BMP como parte de um loop de feedback negativo. Em certos contextos, a sinalização de TGF- β pode afetar as vias independentes de Smad, incluindo as vias ERK, SAPK/JNK e p38 MAPK. **Fonte:** Cell Signaling Technology (2003).

Estudos da expressão de TGF- β em tumores epiteliais, tais como, tumores de próstata, mama, pulmão, colo-retal, pancreático e tumores de pele (PADUA; MASSAGUÉ, 2009) levaram à descoberta de um fenômeno chamado Paradoxo do TGF- β . O TGF- β funciona tanto como supressor tumoral, inibindo o ciclo celular em tumores benignos ou em estágios iniciais, como promotor tumoral, induzindo a progressão para estágios tumorais avançados e metástase em células malignas (INMAN, 2011; WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012). Nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, a inibição da proliferação celular e a indução da apoptose pela via TGF- β se dá por diversos mecanismos tais quais, aumento dos níveis de inibidores pró-apoptóticos *Bcl* ou ciclina-dependente de quinase, ou supressão de *c-Myc*, *Id1/2* ou *survivina* (SEOANE, 2006;

HELDIN; LANDSTRÖM; MOUSTAKAS, 2009; ZELIVIANSKI *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2012). Entretanto, com a evolução do tumor, as células perdem sua resposta à atividade inibitória do TGF- β , seja devido a mutações nos mediadores da sinalização TGF- β , tais como *TGF- β R2*, *SMAD2* e *SMAD4*, ou através da regulação positiva de *MYC*, *AKT1*, *RAS/ERK1/2* (SEOANE, 2006), ou ainda, através da regulação negativa de proteínas reguladoras do ciclo celular p53, p21 e pRb (SHEAHAN *et al.*, 2007).

Apesar das evidências, a relação da via TGF- β com tumores endócrinos tem sido pouco explorada. ROOPRAI *et al* (2000) revelaram a alta expressão dos três ligantes de TGF- β em EPN, principalmente *TGF- β 1*. WANI *et al* (2012) encontraram alta expressão do gene *TGF- β 1* em amostras do grupo A (FP-EPN-A), quando comparadas com amostras do grupo B (PF-EPN-B). Além disso, PARKER *et al* (2014) demonstraram que a fusão C11ORF95-RELA presente no subgrupo molecular RELA de EPN, ativa a via NF- κ B a qual regula a transcrição de diversos genes alvos, dentre eles *SMAD7*. Além disso, a ativação da sinalização BMP foi descrita em EPNs intracranianos (NAGASAWA *et al.*, 2013).

Dentre os processos que participam da regulação da via TGF- β /Smad, encontra-se a ação de diversos microRNAs (Figura 3) (KURAKULA; GOUMANS; TEN DIJKE, 2015; JIN *et al.*, 2018). Os microRNAs são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes que atuam como reguladores da expressão gênica, os quais os conectam a diversos processos carcinogênicos, desde o início do crescimento tumoral até sua progressão e formação de metástases (CHUA; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2009). Diversos estudos relatam a importância dos microRNAs como biomarcadores para a estratificação de tumores e a descoberta de novos alvos para a terapia de câncer. Dentre eles, o hsa-miR-630 vêm sendo caracterizado por associar-se a desregulação de genes da via TGF- β , e por apresentar atividade de supressor tumoral, inibindo a progressão tumoral e metástase em diversos tumores (SONG *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016; ZHANG; WANG; XUE, 2017), além de apresentar atividade na quimio e radioresistência de tumores do SNC (GALLUZZI *et al.*, 2010; MAGEE; SHI; GAROFALO, 2015; ZHANG; WANG; XUE, 2017). A relação do miR-630 com a via TGF- β foi caracterizada por dois estudos (CHEN *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016). CHEN *et al* (2016) demonstrou a regulação do processo de transição epitélio/endotélio-mesenquimal através do eixo TGF- β -miR-630-Slug em células de carcinoma hepatocelular. SUN *et al* (2016) explorou o papel do miR-630 e o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) no câncer gástrico. Os resultados mostraram que, na presença de *TGF- β 1*

combinado com a hiperexpressão do miR-630, houve aumento de E-caderina (*CDH1*) e diminuição de marcadores mesenquimais SNAIL, SLUG, N-caderina (*CDH2*) e Vimentina. Entretanto, ainda não se sabe se há regulação do miR-630 na via TGF- β em células deependimoma e em quais processos essa regulação estaria atuando.

1.3 Transição epitélio-mesenquimal (TEM)

Ao longo da progressão tumoral, as células cancerígenas começam a responder à atividade promotora tumoral da via TGF- β , através do mecanismo conhecido como Transição epitélio-mesenquimal (TEM). A TEM é um processo bioquímico, no qual ocorre a redução de E-caderina e aumento de Vimentina e N-caderina, desencadeando o remodelamento do citoesqueleto celular e transformação do fenótipo epitelial para mesenquimal, o que favorece a invasão e metástase tumoral (KALLURI; WEINBERG, 2009). Quando em estado epitelial, as células encontram-se ancoradas firmemente na membrana basal, unidas por conexões entre os filamentos intermediários e os hemidesmossomos. Ao passo em que entram em estado mesenquimal, essas células assumem forma fusiforme, perdem junção célula-célula, invadem sua matriz extracelular basal (MEC) e migram para os tecidos subjacentes (NAWSHAD *et al*, 2005). Fatores de transcrição específicos como Snail, Slug, Zeb1/2 e Twist 1/2 são considerados os principais reguladores do processo TEM. Esses fatores de transcrição regulam negativamente a expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e regulam positivamente genes característicos de células mesenquimais como, N-caderina e Vimentina (Figura 3) (KAHLERT; JOSEPH; KRUYT, 2017).

Transição epitélio-mesenquimal

Figura 3: Transição epitélio-mesenquimal (TEM). As células epiteliais são unidas por várias moléculas de adesão celular, como claudinas e E-caderina, e ancoradas pela membrana basal que as mantêm polarizadas por meio de conexões entre os filamentos intermediários e os hemidesmossomos. Durante o processo de TEM, ocorre ativação transcricional de genes como *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST* e *ZEB1/2*, que conduzem mudanças no citoesqueleto e nas interações intercelulares. Dessa forma, as células perdem essas características epiteliais, e adquirem fenótipo mesenquimal invasivo e migratório, que permite que essas células deixem o parênquima tecidual e entrem na circulação sistêmica. Em muitos casos, os fatores envolvidos também são usados como biomarcadores para demonstrar a passagem de uma célula através de um TEM.

O mecanismo de invasão celular dos gliomas envolve ativação de vias de sinalização, processos bioquímicos e biofísicos que regulam a morfologia e os movimentos celulares através dos espaços intercelulares. Os componentes dessas vias, portanto, representam grande potencial como alvos terapêuticos e biomarcadores de prognóstico (VELÁSQUEZ *et al.*, 2019). Diversos estudos têm associado a via TGF- β como uma das principais vias a induzir TEM em diversos tipos de tumor (PIEK *et al.*, 1999; BHOWMICK *et al.*, 2001; SAIKA *et al.*, 2004; ROBERTS; TIAN *et al.*, 2006; THUAULT *et al.*, 2008; VINCENT *et al.*, 2009), sugerindo assim que a inibição da via TGF- β pode representar novas oportunidades terapêuticas contra a progressão tumoral.

Figura 4: Ativação do processo de TEM pela via de sinalização TGF-β. A ativação da via TGF-β, mediada por Smad2/3, Ras e PI3K ativam fatores de transcrição que induzem a expressão de genes que codificam fatores de transcrição indutores de TEM (GONZALEZ, MEDICI, 2014).

Uma análise mais aprofundada de EPNs anaplásicos mostrou expressão diminuída de *CDH-1* (E-caderina), que se presume resultar no crescimento e progressão do tumor por meio de junções intercelulares inadequadas e um citoesqueleto instável (HAZAN *et al.*, 2004; PALM *et al.*, 2009). MALGULWAR *et al* (2018), pela primeira vez, demonstraram a existência de um fenótipo TEM-like em EPN. A análise de expressão gênica em 96 amostras de EPN revelou uma regulação positiva significativa dos fatores de transcrição *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZEB1* e *TWIST1* quando comparado

com amostras controle, assim como regulação positiva de *CDH2* (N-caderina) e regulação negativa de *CDH1* (E-caderina). Este perfil foi mais evidente no subgrupo de pior prognóstico ST-EPN-RELA e em amostras de EPN da fossa posterior, mostrando associação significativa com a SLE desses pacientes. Esses achados demonstram que os componentes envolvidos na TEM e, possivelmente regulados pela via TGF- β , podem representar novos alvos prognósticos e terapêuticos para EPN (MALGULWAR *et al.*, 2008).

1.4 Justificativa e Hipótese

O EPN é um tumor muito heterogêneo que apresenta diferentes perfis de expressão gênica e que, recentemente, tem sido associado a padrões específicos de alterações moleculares como, expressão gênica e desregulação de vias de sinalização, apoiando a hipótese de que na verdade trata-se de um grupo de doenças relacionadas (PAJTLER *et al.*, 2015).

Considerado que alterações na via TGF- β vêm sendo associadas com a progressão tumoral de diversos tumores, e que os subgrupos moleculares EPN-RELA e PF-EPN-A apresentam os piores prognósticos, associados a altos índices de recorrência local e elevada taxa de mortalidade, principalmente em pacientes pediátricos (SHARIAT *et al.*, 2001; LANGENSKIÖLD *et al.*, 2008; PADUA; MASSAGUÉ, 2009), o presente estudo visou caracterizar a participação da via TGF- β em EPN, tornando possível assim apontar de maneira mais precisa potenciais novos alvos terapêuticos.

Sendo assim, a hipótese desse trabalho é a de que a via TGF- β regula diferentes aspectos da progressão maligna do EPN, contribuindo de maneira direta ou indireta na constituição do fenótipo tumoral dos subgrupos de pior prognóstico.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é caracterizar o papel da via TGF- β nos subgrupos de pior prognóstico de ependimoma.

2.2 Objetivos específicos

- Associar os perfis de expressão dos genes da via TGF- β com as características clínicas dos pacientes, bem como com o perfil molecular das amostras;
- Identificar genes diferencialmente expressos entre os subgrupos de EPN de pior prognóstico através de análise do transcriptoma por RNA-seq;
- Analisar a expressão genica dos possíveis alvos terapêuticos da via TGF- β nas amostras de EPN;
- Realizar a modulação funcional da via TGF- β em linhagens celulares através de vetores de expressão, RNAi ou drogas bloqueadoras de componentes da via, ou de reguladores indiretos da mesma (microRNA, por exemplo);
- Avaliar os possíveis efeitos da modulação direta/indireta da via TGF- β através de ensaios funcionais *in vitro* de proliferação celular, apoptose, migração e invasão celular.

Delineamento experimental

3. Delineamento experimental

Metodologia

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagem celular e condições de cultivo

Para o presente estudo foi utilizada a linhagem celular de EPN BXD-1425, gentilmente cedida pelo Dr. Xiao-Nan Li, pesquisador do Northwestern Medicine – Feinberg School of Medicine - Chicago, USA. Esta linhagem é proveniente de xenoenxerto, realizado a partir de um paciente do sexo masculino de nove anos com EPN recidivado, classificada como ST-EPN-RELA (YU *et al.*, 2010). As células foram cultivadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Foi utilizado meio de cultivo DMEM *High* Glicose (SIGMA, Aldrich, Inc) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO, EUA), 60 mg/mL de penicilina e 100 mg/mL de streptomicina. A linhagem celular foi autenticada por meio de marcadores STR fornecidos pelo pesquisador Dr. Xiao-Nan Li. As células foram testadas com o kit MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit (cat. LT07-710, Lonza) e estão livres de micoplasma.

4.2 Amostras de pacientes e dados clínicos

Foram utilizadas 44 amostras primárias e 23 amostras de recidiva de pacientes pediátricos de EPN, provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC/FM-USP) e do Centro Infantil Boldrini - Campinas/SP (CIB). As amostras citadas se encontram armazenadas em um biorepositório no Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP vinculado ao projeto temático da FAPESP (14/20341-0) “Interação entre alvos terapêuticos emergentes e vias de desenvolvimento associadas à tumorigênese: ênfase em neoplasias da criança e do adolescente”, o qual possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP, Processo n° 15509/2016 (Anexo 1). As amostras de EPN foram classificadas pelo nosso grupo de pesquisa sendo, os tumores da região ST classificados pela identificação de fusões gênicas *C11orf95-RELA*, *YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B* pela técnica de RT-PCR seguido por sequenciamento de Sanger, como descrito em (PAJTLER *et al.*, 2015); e os tumores da FP classificados pelo perfil de expressão proteica dos marcadores LAMA2, NELL2 e TNC e pelo perfil de trimetilação da Histona H3 (WITT *et al.*, 2011; PANWALKAR *et al.*, 2017). Os dados clínicos e a classificação molecular dos pacientes utilizados neste projeto estão listados na Tabela 1. Como amostras controle foram utilizadas células endimárias coletadas durante procedimento de necropsia pelo Departamento de Necropsia sob supervisão do professor Dr. Fernando Ramalho. Amostra comercial de pool de cérebro normal (636530, SINAPSE Biotecnologia) foi utilizada como calibrador para a técnica de qRT-PCR.

Tabela 1: Características clínicas e moleculares dos pacientes portadores de EPN (n=67 amostras).

Parâmetros	Subgrupos Moleculares					
	ST-EPN- RELA (N = 9) n (%)	ST-EPN-YAP1 (N = 5) n (%)	ST-EPN- NSM (N = 16) n (%)	FP-EPN-A (N = 13) n (%)	FP-EPN- B (N = 4) n (%)	FP-EPN- NSM (N = 20) n (%)
Sexo						
Masculino	3 (33,3%)	0	10 (62,5%)	8 (61,5%)	0	10 (50%)
Feminino	6 (66,7%)	5 (100%)	6 (37,5%)	5 (38,5%)	4 (100%)	10 (50%)
Idade						
< 3 anos	2 (22,2%)	5 (100%)	3 (18,7%)	8 (61,5%)	0	7 (35%)
> 3 anos	7 (77,8%)	0	13 (81,3%)	5 (38,5%)	4 (100%)	13 (65%)
Histologia						
Grau II	4 (44,4%)	1 (20%)	3 (18,7%)	7 (53,8%)	3 (75%)	16 (80%)
Grau III	5 (55,6%)	4 (80%)	13 (81,3%)	5 (38,5%)	1 (25%)	4 (20%)
Grau de Ressecção						
Completo	5 (55,6%)	5 (100%)	10 (62,5%)	7 (53,8%)	2 (50%)	13 (65%)
Incompleto	4 (44,4%)	0	5 (31,3%)	6 (46,1%)	2 (50%)	6 (30%)
Recidiva						
Presente	7 (77,8%)	2 (40%)	9 (56,2%)	8 (61,5%)	1 (25%)	13 (65%)
Ausente	1 (11,1%)	3 (60%)	6 (37,5%)	5 (38,5%)	3 (75%)	5 (25%)
Metástase						
Presente	1 (11,1%)	0	2 (12,5%)	4 (30,8%)	0	4 (20%)
Ausente	7 (77,8%)	5 (100%)	12 (75%)	9 (69,2%)	4 (100%)	15 (75%)
Status						
Vivo	2 (22,2%)	4 (80%)	10 (62,5%)	5 (38,5%)	2 (50%)	13 (65%)
Óbito	5 (55,6%)	1 (20%)	5 (31,3%)	6 (46,1%)	2 (50%)	5 (25%)
Tratamento						
Cirurgia	3 (33,3%)	2 (40%)	1 (6,25%)	2 (15,4%)	1 (25%)	0
Cirurgia + Radioterapia	2 (22,2%)	1 (20%)	0	1 (7,7%)	2 (50%)	8 (40%)
Cirurgia + Quimioterapia	1 (11,1%)	2 (40%)	3 (18,75%)	4 (30,8%)	0	3 (15%)
Cirurgia, Quimioterapia e Radioterapia	3 (33,3%)	0	8 (50%)	4 (30,8%)	1 (25%)	5 (25%)

4.3 Análise da expressão genica e proteica

3.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total da linhagem BXD-1425 foi realizada a partir do reagente Trizol® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.) conforme instruções do fabricante, e as amostras dos pacientes bem como amostras controles foram extraídas a partir do kit de extração de RNA AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QUIAGEN, EUA). Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), e sua qualidade foi analisada através do BioAnalyzer. Para a análise da expressão genica, 500 ng/mL de RNA das amostras foram submetidos a reação de síntese de cDNA com o kit High Capacity® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Esse cDNA foi diluído 1:50 com água DEPC (0,1% dietilpirocarbonato). Para a análise da expressão do miR-630 foi realizada síntese de cDNA a partir de 100 ng/mL de RNA, diluído 1:10 com água DEPC.

4.3.2 qRT-PCR

As análises de expressão foram realizadas pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se sondas Taqman® - Life Technologies para os genes e microRNA citados na Tabela 2. Utilizou-se o equipamento QuantStudio 12K flex (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) por monitorização contínua de fluorescência de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se como genes de referência *GUSB* e *HPRT* para expressão gênica e *RNU6B* e *RNU44* para análise da expressão do miR-630. A amostra comercial de cérebro normal foi considerada como calibradora das reações. Cada amostra foi quantificada em duplicata, e a quantificação relativa da expressão foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2: Sondas Taqman® - Life Technologies utilizadas para análise de expressão genica e de microRNA.

GENE ID	Assay ID
<i>SMAD3</i>	Hs00969210_m1
<i>SMAD7</i>	Hs00998193_m1
<i>TGF-β1</i>	Hs99999918_m1
<i>TGF-βR1</i>	Hs00610320_m1
<i>TGF-βR2</i>	Hs00234253_m1
<i>GUSB</i>	Hs00939627_m1
<i>HPRT</i>	Mm03024075_m1
hsa-miR-630	479113_mir
<i>RNU6b</i>	001093
<i>RNU44</i>	001094

4.3.3 RNA-seq e análises bioinformáticas

Foram enviadas 25 amostras de EPN para serem analisadas por sequenciamento de RNA (RNAseq). Como critério de inclusão, foi considerada a integridade do RNA dessas amostras, representado pelo RIN (RNA *integrity number*), maior ou igual a 5,0. O sequenciamento foi realizado pelo Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP) sob supervisão e com a colaboração da Profa. Dra. Suely K. N. Marie.

4.3.3.1 Análises de bioinformática

Após aquisição dos dados brutos do RNA-seq, a qualidade das sequências geradas foi analisada pelas ferramentas *on-line* *FastQC* e *MultiQC*, as quais avaliam a qualidade do sequenciamento, o conteúdo de GC (guanina-citosina), o número de *reads* gerados e a porcentagem de duplicações por amostra individual e amostras compiladas, respectivamente. Desta forma, foram selecionadas para dar continuidade as análises de RNAseq apenas 10 das 25 amostras enviadas. As análises do transcriptoma de cada subgrupo molecular foram realizadas separadamente, tendo em vista que são consideradas entidades moleculares e clinicamente distintas (PAJTLER *et al.*, 2015, 2018). A análise de expressão gênica diferencial (*DEGs*) foi realizada utilizando o pacote *DESeq2* (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), e foram considerados os parâmetros *log2 Fold Change* (*logFC*) e *p* ajustado. Posteriormente, um *heatmap* foi gerado utilizando o pacote *ComplexHeatmap* (GU; EILS; SCHLESNER, 2016) no software *RStudio* aplicando a distância de *Pearson* e algoritmo *Ward.D2* de clusterização. Os genes diferencialmente expressos permitiram a construção de módulos de coexpressão, baseados no alto grau de interconexão entre os genes e no pressuposto que genes com expressão similar podem estar funcionalmente relacionados. Através das redes de coexpressão foram identificados os *hub genes*, genes que possuem o maior número de conexões e/ou interações, utilizando o módulo de conectividade medido pelo valor absoluto da correlação de *Pearson*, utilizando o pacote *CEMiTool* (RUSSO *et al.*, 2018). A representação da rede de coexpressão envolvendo os *hub genes* e genes da via TGF- β foi construída por meio da extensão denominada *GeneMania* (MONTJOJO *et al.*, 2010) na plataforma *Cytoscape* 3.7.1 (<https://cytoscape.org/>). Essas análises foram realizadas pelos bioinformatas do nosso grupo de pesquisa. Além disso, com esses genes foi realizada a análise de enriquecimento de vias pelo *KEEG pathways*, através da ferramenta online *Enrichr* (CHEN *et al.*, 2013).

4.3.4 Western-blot

Para investigar os níveis de expressão proteica na linhagem BXD-1425 pura, transduzida com o miR-630, transduzida com vetor vazio (controle) e células endoteliais, foram obtidos lisados celulares de proteínas totais a partir do reagente *RIPA Lysis and Extraction Buffer*® (Pierce Biotechnology, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, as proteínas foram quantificadas pelo método de *Bradford*, por meio do kit *BIO-RAD DCTM Protein Assay* (BIO-RAD Laboratories, Inc.), de acordo com as especificações do fabricante. Para eletroforese, foram aplicadas 60 µg de proteína desnaturada em gel de agarose e separadas por eletroforese SDS-PAGE. Ao fim da corrida, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência e incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora por 1 hora, em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário da proteína de interesse, diluído de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 3). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T 1% e incubadas com o anticorpo secundário, *anti-rabbit IgG* ou *anti-mouse* diluídos em TBS-T 1X, acrescidos do reagente *Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate* (BIO-RAD Laboratories, Inc.) (1:10000), por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do *Kit Clarity™ Western ECL Blotting Substrates* (BIO-RAD Laboratories, Inc.) no aparelho *ChemiDoc™ XRS+Image Lab™ Software* (BIO-RAD Laboratories, Inc.). Foi analisada a intensidade das bandas para a quantificação da expressão proteica através do software *ImageJ* 1.52a (NIH). A linhagem celular de câncer de mama, MCF7, foi utilizada como controle positivo e negativo para os anticorpos de E-caderina e N-caderina, respectivamente.

Tabela 3: Anticorpos primários e secundários

Anticorpo	Código	Tamanho	Diluição
Smad3 fosforilado	Ab52903	48 Kda	1:1000
E-caderina	14472	135 Kda	1:1000
N-caderina	Ab18203	140 Kda	1:1000
Slug	C1967	30 Kda	1:1000
GAPDH	sc-47724	37 Kda	1:2500

4.4 Modulação da via TGF- β

4.4.1 Tratamento com inibidor de TGF- β , SB431542

Para inibir a via de sinalização TGF- β , a linhagem celular BXD-1425 foi tratada com a droga SB431542 (Sigma), um inibidor seletivo do receptor 1 de TGF- β . A droga foi dissolvida em DMSO na concentração de 10 mM conforme recomendação do fabricante. Após o tratamento foi realizado os ensaios funcionais.

4.4.2 Transdução da linhagem BXD-1425

Para induzir a expressão do hsa-miR-630 na linhagem BXD-1425 e analisar o possível efeito deste microRNA na modulação da via TGF- β em EPN, foi realizada a transdução de partículas lentivirais com vetor de expressão hsa-miR-630 (HLMIR0861) e o controle negativo (NCLMIR001), de acordo com o protocolo *Mission Lenti miRNA* (SIGMA, Aldrich, Inc). A linhagem BXD-1425 foi plaqueada em concentração inicial de 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços contendo 100 μ L de meio de cultivo e após período de aderência, foram expostas às partículas virais do hsa-miR-630 e do controle negativo para os MOIs (*multiplicity of infection*) de 1, 3 e 10. As células foram centrifugadas por 30 minutos a 2200 rpm, sendo posteriormente incubadas à 37°C com 5% de CO₂ em estufa umidificada por 24 horas. Sabendo que o vetor lentiviral utilizado apresenta o gene de resistência à Puromicina (SIGMA-Aldrich, Inc), após as 24h de incubação, o sobrenadante foi apropriadamente descartado e foi adicionado meio com Puromicina na concentração de 1 μ g/mL, para seleção positiva das células. Ao atingir a confluência as células foram transferidas para placas de 24 poços, 12 poços, 6 poços, garrafas de 25cm³ e posteriormente, de 75cm³.

A eficiência da transdução foi confirmada por qRT-PCR. Para isso, foi extraído RNA da linhagem transduzida em três tempos diferentes, garantindo uma triplicata biológica. A dose de Puromicina foi estabelecida previamente por meio de um ensaio de viabilidade celular com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 μ g/mL em tempos de tratamento de 24, 48, 72 e 96h.

4.5 Ensaios funcionais

4.5.1 Viabilidade celular

Foram realizados ensaios de viabilidade celular com a linhagem celular transduzida com miR-630 e controle negativo (MOI 10), bem como com a linhagem tratada com a droga SB431542 e DMSO nas doses de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ M. As células foram plaqueadas em triplicata em

placas de 96 poços, na densidade de 8×10^3 células/poço e, em seguida, incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37°C. A cada intervalo de 24 horas, foi realizada a adição, no meio de cultura, de 30µL do reagente *CellTiter-Glo*® (Promega) em temperatura ambiente. As placas foram agitadas e incubadas por 10 minutos, segundo instruções do fabricante, e a leitura de luminescência foi realizada utilizando o aparelho *SpectraMax*® *L Microplate Reader*. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

A detecção é baseada na medição da quantidade de ATP de células viáveis pela reação de luciferase. Logo após a perda da integridade da membrana, as células perdem a capacidade de sintetizar o ATP e as ATPases endógenas destroem qualquer ATP remanescente. Após adição do reagente *CellTiter-Glo*® ocorre a lise das membranas celulares para liberar o ATP, inibição das ATPases endógenas.

Para o cálculo do IC₅₀ (concentração inibitória para 50% das células) da droga SB431542 foi utilizado o software *CalcuSyn* (Biosoft, Cambridge, U.K.). Para cada experimento foram utilizados os dados obtidos na viabilidade celular, através da análise da fração celular afetada após o tratamento com as diferentes doses da droga SB431542 em comparação com controle (DMSO).

4.5.2 Ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo após marcação com PI. As células tratadas com SB431542 na dose de 10 µM ou transduzidas com miR-630, foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células/poço em placas de seis poços. Os experimentos foram coletados após 24, 48 e 72 horas de tratamento (inibidor), plaqueamento (miR-630). Basicamente as células foram lavadas com PBS duas vezes, fixadas com solução de etanol a 70% e depois mantidas a -20°C overnight. As células foram centrifugadas a 400g durante 5 minutos, e o pellet resultante foi ressuspenso em PBS com RNase A (10 ng/mL) e incubado a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e foi adicionado PBS com 100 µL de iodeto de propídio (PI) a uma concentração final de 50 µg/ml para marcação das células. As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo *BD FACSCalibur*™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo software *Flow Jo*™ V10. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

4.5.3 Apoptose

Para análise da taxa de células apoptóticas, 4×10^4 de células tratadas com 10 μM de SB431542 ou transduzidas com miR-630 foram plaqueadas em placas de seis poços. Os ensaios foram realizados após 24 e 48 horas após o tratamento com inibidor ou 24, 48 e 72 horas após plaqueamento (miR-630). Após a coleta, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas com PBS gelado e depois ressuspensas em 250 μL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). Em seguida, as células foram incubadas e marcadas com 5 μL de Anexina FITC (BD Biosciences Pharmigen, USA) e 50 μL de PI a uma concentração de 50 μM . As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e foram obtidas as porcentagens das células marcadas ou não com Anexina e / ou PI. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

4.5.4 Wound healing

O ensaio de migração *in vitro* por *Wound healing* foi realizado de acordo com (LIANG; PARK; GUAN, 2007) com pequenas alterações. Para analisar o efeito da droga SB431542 no processo de migração celular, foram plaqueadas 200.000 células/poço na placa de 12 poços e mantidas em condições de cultivo. Ao atingir confluência foi criada uma zona horizontal central livre de células, em cada poço, através da retirada mecânica das células nesta região com o auxílio de uma ponteira de 200 μL . Assim que realizado este procedimento, isto é, no tempo zero, o risco central foi fotografado utilizando o *software Imaging NIS Elements v5.11*. Após 72 horas do processo de lesão mecânica, as células foram fotografadas novamente e o *software ImageJ 1.51j8* (NIH, EUA) foi utilizado para calcular a área livre de células. O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata experimental. Para as células transduzidas com miR-630 e CT, foram plaqueadas 250.000 células/poço. As células foram fotografadas no tempo 0 e após 24h do processo de lesão mecânica. O experimento foi realizado em triplicata biológica e experimental. A taxa de migração foi calculada como a distância em nanômetros migrada ao longo do tempo e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.5.5 Invasão celular

Para o ensaio de invasão celular foi adicionado 100 μ L de matriz de matrigel do kit *BD Biocoat™ Matrigel™ Matrix–24 well plate* (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA), na concentração de 4,5%, sob os insertos correspondentes a placa de 24 poços. As células transduzidas com miR-630 e CT foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^4 por inserto no topo da matriz de matrigel em meio sem SBF. Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultivo com 10% de SBF, servindo como quimioatrativo. Foram também plaqueadas 2×10^4 células que receberam tratamento com o inibidor SB431542 e DMSO. Após a incubação a 37°C por 24 horas, as células que não transpassaram a camada de matrigel ou gelatina foram removidas da parte superior do inserto com o auxílio de um *swab*. As células que invadiram foram fixadas com metanol absoluto por 15 min e coradas com uma solução de Giemsa (1%). As membranas do inserto foram então removidas, montadas em lâminas de vidro com *Entellan* (Merk®) e fotografadas ao microscópio de luz clara (magnificação de 40x) sendo contadas com o auxílio do software *ImageJ*. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental e os resultados expressos como média e desvio padrão.

4.5.6 High-content analysis (HCA)

A fim de quantificar marcadores TEM após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630, foi realizado o ensaio de HCA, no qual mudanças no fenótipo celular são medidas usando análise de imagem automatizada, através da detecção de marcadores fluorescentes, de acordo com protocolo descrito em DE SOUSA LIMA *et al* (2019). Resumidamente, em placa de 96 poços, foram plaqueadas 5×10^3 células BXD-1425 transduzidas com miR-630 e controle e incubadas por 48 horas. Após a cultura, as células foram lavadas com 100 μ L de PBS e fixadas com 50 μ L de formaldeído a 2% diluído em metanol gelado. As células foram então incubadas overnight com anticorpo E-caderina, N-caderina e Slug (Tabela 3). Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS e então incubadas com os anticorpos secundários (Tabela 3), bem como marcadores nuclear Hoechst 33342 (1 μ M, Thermo Fisher, # H1399) e CellMask®Blue citoplasmático (0,1:1000, Life Technologies, # H32720), por 45 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS e mantidos com 100 μ L de PBS. As imagens foram adquiridas com um sistema automatizado ImageXpressmicro XLS High Content Screening (Molecular Devices), usando uma objetiva 10X e os filtros de excitação/emissão para DAPI (Hoechst / CellMask Blue), FITC (DyLight488) e Texas Red (DyLight594). As análises de

imagens e dados foi realizada com os softwares de acesso aberto CellProfiler (CARPENTER *et al.*, 2006; KAMENTSKY *et al.*, 2011) e KNIME Analytics Platform (STOTER, *et al.* 2013). Os gráficos foram construídos Graphpad Prism, usando os valores de todas as regiões adquiridas dos 3 poços de réplica.

4.6 Análise *in silico*

Foi realizada uma análise de expressão gênica dos genes da via TGF- β , bem como genes associados ao processo de TEM, utilizando o banco de dados público de EPN Pfister (GSE64415) na plataforma R2: Genomics Analysis and Visualization Platform. Apenas dados de amostras pediátricas e primárias foram considerados.

A expressão do miR-630 emependimoma foi validada em um banco de dados de microarray em tumores do SNC (GSE42657). Para encontrar os alvos preditos e validados do miR-630, associados a via TGF- β , foi realizada uma análise a partir do software *miRWalk* v2.0, utilizando as bases de dados *miRanda*, *miRDB*, *miRWalk*, *RNAhybrid*, *PICTAR2*, *RNA22* e *TargetScan*, considerando-se um p-valor de 0,05 (DWEED *et al.*, 2011). Com esses genes foi realizada a análise de enriquecimento de vias pelo KEGG pathways, através da ferramenta online *Enrichr*.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos deste estudo foram gerados no programa *SPSS 20.0 for Windows* (SPSS, Chicago, IL, USA) e *GraphPad Prism® 8* (San Diego, Ca, EUA). Foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para analisar os dados de expressão gênica entre as amostras tumorais de amostras controle, de acordo com as características clínicas dos pacientes. Para análise da expressão genica entre as amostras tumorais, de acordo com os subgrupos moleculares, foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. A mediana de expressão de cada gene/miR nas amostras tumorais foi considerada como valor de corte para separar as amostras em hiperexpressas e hipoexpressas. Sendo assim, a análise da sobrevida global (com óbito como evento desfavorável) e sobrevida livre de eventos (com recidiva ou óbito como evento desfavorável) dos pacientes foi realizada a partir de análise univariada com o teste de *Log-Rank* e construídas curvas de *Kaplan-Meier*. Para todos os testes foram consideradas as variáveis: Localização Anatômica (Supratentorial ou Fossa Posterior); Idade ao diagnóstico (Maiores de 3 anos ou menores e iguais a 3 anos); Gênero (Feminino ou Masculino); Histologia (Grau II ou Grau

III); Protocolo Tratamento (Cirurgia, Cirurgia + Radioterapia, Cirurgia + Quimioterapia ou Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia); Subgrupo Molecular (ST-EPN-RELA ou ST-EPN-YAP1 ou PF-EPN-A ou PF-EPN-B ou Nenhum dos subgrupos moleculares: ST-EPN-NSM ou FP-EPN-NSM); Grau de Ressecção (Completa ou Incompleta); Metástase (Presente ou Ausente); Recidiva (Presente ou Ausente); Evento (se o paciente está vivo ou se foi à óbito/apresentou recidiva), Status da Doença (se o paciente está vivo, se foi à óbito por EPN).

Para análise dos ensaios funcionais foram utilizados os testes *T-Student* ou *One-way ANOVA* com pós-teste de *Bonferroni*, e considerados como significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1 Perfil de expressão da via TGF- β em ependimoma

5.1.1 Expressão dos genes *TGF- β 1*, *SMAD3*, *SMAD7* e *TGF- β 2* em amostras de Ependimoma

A fim de avaliar o perfil de expressão de componentes da via canônica de TGF- β em ependimoma, foi realizado qRT-PCR em 44 amostras de tumor primário, 23 amostras de recidiva e células ependimárias não tumorais para os genes *TGF- β 1*, *SMAD3* e *SMAD7* e 19 amostras primárias e 6 recidivas para o gene *TGF- β 2* (Tabela 4). De maneira geral, as amostras tumorais (primárias e recidivas) apresentam maior expressão de todos os genes, quando comparadas com amostras controle de células ependimárias (não significativo), como observado na figura 5.

Tabela 4: Análise de *Mann-Whitney* da expressão gênica dos genes da via TGF- β *TGF- β 1*, *SMAD3*, *SMAD7* e *TGF- β 2* associado aos dados clínicos de pacientes pediátricos de ependimoma. $p < 0,05$.

Amostras Primárias n = 44				
Parâmetros Clínicos	<i>TGF-β1</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD7</i>	<i>TGF-β2</i>
Localização Anatômica				
	0,097	0,484	0,187	0,057
Supratentorial	N = 16	N = 16	N = 16	N = 4
Fossa Posterior	N = 26	N = 26	N = 26	N = 15
Gênero				
	0,570	0,622	0,950	0,414
Masculino	N = 23	N = 23	N = 23	N = 9
Feminino	N = 19	N = 19	N = 19	N = 10
Idade				
	0,088	0,873	0,262	0,483
< 3 anos	N = 14	N = 14	N = 14	N = 6
> 3 anos	N = 28	N = 28	N = 28	N = 13
Histologia				
	0,009 *	0,752	0,294	0,804
Grau II	N = 23	N = 23	N = 23	N = 11
Grau III	N = 19	N = 19	N = 19	N = 8
Grau de Ressecção				
	0,741	0,034 *	0,153	0,230
Completo	N = 27	N = 27	N = 27	N = 15
Incompleto	N = 14	N = 14	N = 14	N = 4

Recidiva				
	0,399	0,206	0,312	0,923
Presente	N = 19	N = 19	N = 19	N = 8
Ausente	N = 20	N = 20	N = 20	N = 9
Metástase				
	0,544	0,306	0,198	0,953
Presente	N = 6	N = 6	N = 6	N = 3
Ausente	N = 34	N = 34	N = 34	N = 15
Evento				
	0,806	0,806	0,242	0,770
Nenhum	N = 13	N = 13	N = 13	N = 7
Recidiva/Óbito	N = 27	N = 27	N = 27	N = 10
Status				
	0,532	0,421	0,721	0,258
Vivo	N = 26	N = 26	N = 26	N = 13
Óbito	N = 13	N = 13	N = 13	N = 4
Sobrevida Livre de evento (SLE)	0,672	0,926	0,906	0,868
Sobrevida Global (SG)	0,491	0,607	0,800	0,734
Tratamento				
	0,848	0,399	0,721	0,402
Cirurgia	N = 8	N = 8	N = 8	N = 3
Cirurgia + Radioterapia	N = 9	N = 9	N = 9	N = 3
Cirurgia + Quimioterapia	N = 7	N = 7	N = 7	N = 3
Cirurgia, Quimioterapia e Radioterapia	N = 11	N = 11	N = 11	N = 6
Amostras de recidiva n = 23				
Parâmetros Clínicos	TGF-β1	SMAD3	SMAD7	TGF-β2
Localização Anatômica				
	0,457	0,509	0,322	0,143
Supratentorial	N = 11	N = 11	N = 11	N = 5
Fossa Posterior	N = 8	N = 8	N = 8	N = 1
Gênero				
	0,726	0,161	0,219	0,050 *
Masculino	N = 6	N = 6	N = 6	N = 3
Feminino	N = 13	N = 13	N = 13	N = 3

Idade				
	0,563	0,364	0,058	0,143
< 3 anos	N = 8	N = 8	N = 8	N = 1
> 3 anos	N = 11	N = 11	N = 11	N = 5
Histologia				
	0,964	0,390	0,113	0,050 *
Grau II	N = 7	N = 7	N = 7	N = 3
Grau III	N = 11	N = 11	N = 11	N = 3
Grau de Ressecção				
	0,310	0,354	0,270	0,248
Completo	N = 9	N = 9	N = 9	N = 2
Incompleto	N = 9	N = 9	N = 9	N = 3
Metástase				
	0,730	0,104	0,301	0,157
Presente	N = 5	N = 5	N = 5	N = 1
Ausente	N = 13	N = 13	N = 13	N = 4
Evento				
	0,153	0,102	0,307	-
Nenhum	N = 1	N = 1	N = 1	N = 0
Recidiva/Óbito	N = 16	N = 16	N = 16	N = 5
Status				
	0,126	0,480	0,480	0,655
Vivo	N = 6	N = 6	N = 6	N = 1
Óbito	N = 9	N = 9	N = 9	N = 3
Sobrevida Livre de evento (SLE)	0,274	0,785	0,391	0,695
Sobrevida Global (SG)	0,600	0,957	0,370	0,225
Tratamento				
	0,276	0,266	0,456	0,849
Cirurgia	N = 2	N = 2	N = 2	N = 1
Cirurgia + Radioterapia	N = 4	N = 4	N = 4	N = 1
Cirurgia + Quimioterapia	N = 4	N = 4	N = 4	N = 1
Cirurgia, Quimioterapia e Radioterapia	N = 6	N = 6	N = 6	N = 2

Figura 5: Expressão dos genes *TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD7* e *TGF-β2* em amostras controle (células ependimárias), amostras tumorais primárias e recidiva de EPN.

A avaliação dos tumores mostrou que as amostras primárias de EPN com grau histológico III apresentam maior expressão do *TGF-β1* quando comparadas com amostras grau II ($p=0,009$) (Figura 6), Tabela 4. Amostras de pacientes que tiveram grau de ressecção tumoral incompleto, apresentaram maior expressão do gene *SMAD3*, quando comparadas com amostras de pacientes com grau de ressecção completo ($p=0,034$) (Figura 6B), Tabela 4.

Nas amostras de recidivas, o gene *TGF-β2* teve um perfil de expressão maior em amostras grau III quando comparado com amostras grau II ($p=0,050$) (Figura 7A). O mesmo ocorreu para amostras de pacientes do sexo masculino, quando comparado com pacientes do sexo feminino ($p=0,050$) (Figura 7B), Tabela 4.

Figura 6: Expressão de genes da via TGF- β associado aos parâmetros clínicos de pacientes de EPN. A) Expressão de *TGF-β1* associado ao grau histológico e B) Expressão de *SMAD3* associado ao grau de ressecção tumoral, em amostras primárias.

Figura 7: Expressão de *TGF-β2* em amostras de recidiva de EPN associado A) ao grau histológico e B) ao gênero.

A análise da sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida global (SG) não apresentou diferenças significativas entre valores de expressão acima e abaixo da mediana para os genes estudados, o que pode ser justificado pelo número relativamente pequeno de amostras utilizadas no estudo, bem como dados clínicos incompletos para alguns pacientes (Figura 8).

Figura 8: Curvas de *Kaplan-Meier* para análises de sobrevida livre de eventos (A-D) e sobrevida global (E-H) de acordo com a expressão dos genes da via TGF- β . Teste de *Long-rank*.

Quanto a classificação molecular de EPN, observou-se que nenhum dos genes avaliados apresentou associação significativa com os subgrupos moleculares tanto em amostras primárias quanto em amostras de recidivas (Figura 9).

Figura 9: Expressão dos genes *TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD7* e *TGF-β2* associada aos subgrupos moleculares de EPN em amostras primárias (A-D) e amostras de recidiva (E-H).

A expressão dos genes *TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD7* e *TGF-β2* foi validado no banco de dados do Pfister (GSE64415) em amostras primárias de pacientes pediátricos de EPN. O gene *TGF-β2* apresentou maior expressão em pacientes menores que 3 anos ($p=0,0163$) quando comparado com pacientes maiores de 3 anos. Pacientes que apresentam maior expressão do gene *SMAD7* tem uma pior sobrevida global ($44,3\pm13,4$) quando comparado com pacientes com menor expressão ($82,1\pm11,7$) (Anexo 2).

5.1.2 Transcriptoma das amostras de EPN

Foram selecionadas 10 amostras de EPN para avaliação do perfil transcricional por RNAseq, sendo três amostras do subgrupo molecular ST-EPN-RELA, duas do subgrupo ST-EPN-YAP1 e cinco amostras do subgrupo FP-EPN-A. Apesar do número de amostras limitado, a comparação entre tumores ST-EPN-RELA e os demais (ST-EPN-YAP1 e FP-EPN-A) identificou 667 genes diferencialmente expressos (DEGs). Destes, 156 genes estão hiperexpressos e 511 hipoeexpressos (Figura 10A). Análise de enriquecimento dos genes hipoeexpressos mostrou várias vias de sinalização associadas com processos de interação intercelular e entre célula-matriz extracelular, tais como: ECM-receptor interaction; Tight junction; Focal adhesion; TGF-β (não significativo). Já o grupo de genes com alta expressão foram enriquecidos em vias de sinalização associadas com proliferação celular e tumorigênese, tais como: Wnt; Jak-STAT; Notch; PI3K-Akt (Figura 11A). A partir desse grupo de DEGs, foram identificados 13 hub genes, sendo dois genes correlacionados à via TGF-β (*ID1* e *THBS1*) (Figura 12A).

Outras análises entre subgrupos foram exploradas e, a comparação entre amostras ST-EPN-YAP1 versus subgrupos ST-EPN-RELA e FP-EPN-A apontou 180 DEGs (97 genes hiperexpressos e 83 hipoeexpressos), (Figura 10B). Não foi possível observar enriquecimento da via TGF-β, porém foram encontradas: a via dos fatores de transcrição FOXO, desregulação transcricional em câncer, sinalização cAMP e interação do receptor ECM (Figura 11B). Dentre os 12 hub genes identificados, nenhum apresenta relação com a via TGF-β (Figura 12B).

A comparação entre o grupo de amostras FP-EPN-A e os demais subgrupos (ST-EPN-RELA e ST-EPN-YAP1) apresentou um conjunto de 419 DEGs, dos quais 226 genes estão hiperexpressos e 193 genes hipoeexpressos (Figura 10C). Dentre os genes hiperexpressos destaca-

se o gene *BMP5*, ligante da família TGF- β , e entre os hipoeexpressos os genes *CDKN2B*, *INHBA*, *PITX2* e *THBS1*, também associados a via TGF- β . Esse conjunto de genes apresentaram diferentes vias enriquecidas, sendo a via TGF- β a de maior significância para o grupo de DEGs hipoeexpressos (Figura 11C). Quatorze hub genes foram identificados, dos quais três apresentaram correlação direta com genes da via TGF- β (*BPM5*, *INHBA* e *CDKN2B*) (Figura 12C).

De maneira geral, a análise de transcriptoma foi capaz de estratificar os três grupos moleculares representados. Além disso o perfil de expressão sugere que células tumorais do subgrupo ST-EPN-RELA estão associadas com processos de proliferação, invasão-metástase e potencial TEM. Já o subgrupo molecular FP-EPN-A apresenta perfil mais direcionado para a via não-canônica do TGF- β .

Figura 10: Heatmap dos genes diferencialmente expressos nos subgrupos moleculares de EPN A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.

Figura 11: Análise enriquecimento de vias *KEEG Pathway* dos subgrupos A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.

Figura 12: Hub genes dos subgrupos moleculares de EPN A) ST-EPN-RELA, B) ST-EPN-YAP1 e C) FP-EPN-A.

5.2 Estudo funcional da via TGF-β na linhagem celular de EPN

A investigação funcional da via TGF-β em EPN foi realizada com a linhagem BXD-1425, que apresenta maior expressão do gene *SMAD3* (não significativo), comparada à expressão de células endodimárias. Porém, a linhagem apresenta baixa expressão dos ligantes da via (*TGF-β1*, *TGF-β2*) e do gene inibidor da via *SMAD7*, comparado às células endodimárias (Figura 13A). Entretanto, a linhagem mostrou maiores níveis proteicos de Smad3 fosforilado comparado com as células endodimárias, sugerindo ativação da via TGF-β na linhagem, (Figura 13B).

Figura 13: Análise da ativação da via TGF-β em EPN. Expressão da proteína Smad3 fosforilada nas células endodimárias e na linhagem BXD-1425 respectivamente. kDa = kilodaltons.

Considerando o perfil de ativação da via TGF-β nas células BXD-1425, realizou-se a inibição farmacológica do receptor I de TGF-β, com a droga SB431542, a fim de avaliar o envolvimento desta via nas funções da célula tumoral de EPN. Como esperado, o tratamento com

o inibidor SB431542 (10 μ M) por 24h diminuiu a expressão de todos os genes da via canônica de TGF- β analisados (*TGF- β 1*, *TGF- β R2*, *SMAD3* e *SMAD7*), inclusive do receptor I (*TGF- β R1*) o qual é seu alvo direto (Figura 14A). A avaliação da expressão por *Western blot* confirmou o perfil observado na qRT-PCR, havendo diminuição da expressão proteica de Smad3 fosforilada, indicando inibição da via TGF- β após tratamento (Figura 14B).

Figura 14: Análise do perfil da via TGF- β na linhagem BXD-1425 após 24 horas de tratamento com a droga SB431542, na dose de 10 μ M. A) Expressão dos genes *TGF- β 1*, *TGF- β R1*, *TGF- β R2*, *SMAD3* e *SMAD7*. B) Expressão da proteína Smad3 fosforilada. kDa = kilodaltons.

5.2.1 Viabilidade celular após tratamento com inibidor de TGF- β

Funcionalmente, a inibição da via TGF- β com o inibidor SB431542 não alterou a viabilidade celular, mesmo com o aumento das doses de tratamento ao longo dos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 15). Os valores do IC₅₀ estimados através do programa CalcuSyn (CHOU, TALALAY, 1984) para o inibidor SB431542 foi de 97,29 μ M com 24 horas e 274,9 μ M com 48 horas. Não foi possível determinar o valor de IC₅₀ para 72 horas de tratamento devido à falta de efeito da droga nas três primeiras doses testadas. As células tratadas apenas com DMSO (veículo) foram utilizadas como controle negativo (viabilidade 100%).

Figura 15: Efeito do inibidor de TGF- β (SB431542) na viabilidade celular da linhagem de ependimoma BXD-1425, após A) 24 horas, B) 48 hora e C) 72 horas de tratamento. Teste *One-way* ANOVA com pós-teste de *Bonferroni*.

5.2.3 Ciclo Celular após tratamento com a droga SB431542

No tempo de 24 horas após tratamento com SB431542, é possível observar um aumento significativo de células na fase G1 e uma diminuição significativa de células na fase S (Figura 16A). O inibidor SB431542 não promoveu alteração significativa no ciclo celular nos tempos de 48 e 72 horas após tratamento (Figura 16B e 16C).

Figura 16: Análise do ciclo celular após tratamento da linhagem BXD-1425 com SB431542 nos tempos de A) 24, B) 48 e C) 72 horas.

5.2.4 Apoptose após tratamento com a droga SB431542

O efeito do inibidor SB431542 no processo de apoptose celular foi avaliado por citometria de fluxo com marcação de Anexina e PI, após 24 e 48 horas de tratamento. Não houve diferença significativa na porcentagem de células em apoptose (Anexina+), apoptose tarde (Anexina+/Pi), necrose (Pi+) e células viáveis (Anexina-/Pi-) após o tratamento com o inibidor, nos tempos analisados (Figura 17).

Figura 17: Análise de apoptose após tratamento da linhagem BXD-1425 com o inibidor SB431542 nos tempos de A) 24 e B) 48 horas.

5.2.5 Wound healing após tratamento com SB431542

O ensaio de *Wound healing* realizado após o tratamento da linhagem BXD-1425 com o inibidor de TGF- β mostrou que não houve diferença na taxa de migração dessas células comparada com células tratadas com veículo controle (DMSO) (Figura 18).

Figura 18: Análise de migração celular por *Wound healing* na linhagem de EPN, BXD-1425, após 72 horas de tratamento com inibidor de TGF- β , SB431542 na dose de 10 μ M.

5.2.6 Ensaio de invasão após tratamento com SB431542

Pelo ensaio de invasão com matrigel foi possível observar que não houve diferença na taxa de invasão celular da linhagem de EPN após o tratamento com SB431542 comparada com células tratadas com DMSO (Figura 19).

Figura 19: Análise de invasão celular por matrigel na linhagem BXD-1425 após 24 horas de tratamento com SB431542 na dose de 10 µM.

5.3 Perfil de expressão do miR-630 em EPN e correlação com dados clínicos

Para analisar a expressão do miR-630 em EPN, foram utilizadas 41 amostras de tumor primário e 18 amostras de recidiva. A expressão do miR-630 foi associada aos dados clínicos e de sobrevida dos pacientes de EPN (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de *Mann-Whitney* da expressão gênica do miR-630 associado aos dados clínicos de pacientes pediátricos de ependimoma. $p < 0,05$.

Parâmetros clínicos		miR-630	
		Amostras Primárias	Amostras de Recidiva
Localização Anatômica	Supratentorial	0,297	0,657
	Fossa Posterior		
Gênero	Feminino	0,774	0,684
	Masculino		
Idade	Menor que 3 anos	0,773	0,328
	Maior que 3 anos		
Histologia	Grau II	0,381	1,000
	Grau III		

Grau de Ressecção	Completo	0,965	0,922
	Incompleto		
Recidiva	Ausente	0,047 *	0,289
	Presente		
Metástase	Ausente	0,186	0,225
	Presente		
Evento	Nenhum	0,241	0,914
	Recidiva/Óbito		
Status	Vivo	0,256	0,386
	Morte por EPN		
Sobrevida Livre de Eventos (SLE)		0,511	0,650
Sobrevida Global (SG)		0,300	0,610
Tratamento	Cirurgia		
	Cirurgia e radioterapia	0,983	0,695
	Cirurgia e quimioterapia		
	Cirurgia, radioterapia e quimioterapia		

Pacientes que apresentam recidiva apresentou maior expressão do miR-630 quando comparado com amostras de paciente sem recidiva (Figura 20A). A análise da sobrevida global e sobrevida livre de eventos não mostrou diferença significativa entre valores de expressão acima e abaixo da mediana para o miR-630. Entretanto, nota-se que pacientes que apresentam menor expressão do miR-630 tem uma taxa de sobrevida global menor comparada aos pacientes que apresentam uma expressão maior deste microRNA: SG em 5 anos de $57,4\% \pm 13,1$ e SLE em 5 anos de $38,6\% \pm 14,1$ para os pacientes que hipoexpressão o hsa-miR-630 e SG em 5 anos de $68,2\% \pm 11,8$ e SLE em 5 anos de $31,3\% \pm 11,6$ para os pacientes que hiperexpressão o miR-630. As curvas de sobrevida para o hsa-miR-630 estão apresentadas na Figura 20A e 20B.

Figura 20: A) Expressão do miR-630 associado a ausência e presença de recidiva. Curvas de *Kaplan-Meier* para avaliar B) Taxa de sobrevivência livre de evento e C) sobrevivência global.

Ao comparar os subgrupos moleculares de EPN tanto em amostras primárias como em amostras de recidiva, não houve diferença estatística na expressão do miR-630 (Figura 21A-B). Apesar de não haver diferença estatística na expressão do miR-630 entre amostras tumorais e amostras controle, é possível observar uma baixa expressão deste microRNA em EPN, bem como na linhagem BXD-1425 (Figura 21C). A expressão do miR-630 foi validada no banco de dados de *microarray* em EPN GSE42657 e também não foi possível observar diferença significativa entre amostras tumorais de EPN e amostras controle (Figura 21D).

Figura 21: Expressão do miR-630 em amostras controle, amostras tumorais primárias e recidiva de EPN.

5.4 Transdução da linhagem de EPN com miR-630

Para analisar uma possível modulação do miR-630 na via TGF- β , e avaliar o efeito desta modulação na progressão tumoral de EPN, foi realizado a transdução da linhagem BXD-1425 a fim de hiperexpressar o miR-630. Após a confirmação da transdução, foram realizados os ensaios *in vitro*.

5.4.1 Confirmação da transdução do miR-630

Após o processo de transdução da linhagem BXD-1425 com o lentivírus carregando o vetor de expressão para o miR-630 e um vetor de expressão de controle negativo (CT), as células transduzidas foram selecionadas com Puromicina 1 $\mu\text{g/mL}$ e a confirmação da transdução foi

realizada a partir do MOI 10. O RNA dessas transduções foi extraído em três tempos diferentes e sintetizado o cDNA. Foi mensurada a expressão pela técnica de qRT-PCR visando confirmar a eficiência da transdução. As células transduzidas com o miR-630 apresentou em média uma expressão 111.475,8 maior, quando comparada com as células transduzidas com o controle negativo ($p = 0,01$) (Figura 22).

Figura 22: Gráfico da expressão relativa do miR-630 no controle e na linhagem BXD-1425 após transdução com vetor de hiperexpressão.

5.5 Análise *in silico* miR-630

Além das referências bibliográficas, foi realizada a busca de possíveis genes alvos do miR-630 relacionados a via TGF- β (Tabela 5). Para tanto, foi utilizado o site miRbase, no qual é possível visualizar alvos preditos e validados de determinado microRNA.

Tabela 6: Alvos preditos e validados do hsa-miR-630.

Gene	Validado/Predito
<i>TGF-βR2</i>	Validado
<i>SMAD2</i>	Predito
<i>SMAD6</i>	Predito
<i>SMAD9</i>	Predito

A partir desse conjunto de genes-alvo validados e preditos, foi feita uma análise de enriquecimento de via de sinalização dentre as quais, a via TGF- β encontra-se enriquecida ($p=0,002$) (Figura 23).

Figura 23: Análise de enriquecimento de via KEEG pathway dos genes alvos preditos e validados do miR-630. $p \leq 0,005$.

5.6 Validação dos alvos da via TGF- β

A fim de validar componentes da via TGF- β como alvos do miR-630, foram realizadas as técnicas de qRT-PCR e *Western blot*. É possível observar que a hiperexpressão do miR-630 na linhagem de EPN, leva a menor expressão dos genes da via TGF- β (Figura 24A). Além disso, pela técnica de *Western blot* observa-se diminuição proteica de Smad3 fosforilada, indicando assim uma possível inativação da via através da regulação deste microRNA (Figura 24B).

Figura 24: Validação dos genes da via TGF- β após transdução da linhagem de EPN com miR-630. A) Expressão gênica, B) Expressão proteica.

5.7 Viabilidade celular após transdução com miR-630

A linhagem BXD-1425 transduzida com o miR-630 e com controle negativo foi submetida ao ensaio funcional de viabilidade celular, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h. A taxa de viabilidade celular na linhagem com hiperexpressão do miR-630 foi reduzida em torno de 50% no tempo de 24 hrs e 40% no tempo de 48 hrs, apresentando uma gradual diminuição na redução da viabilidade celular de acordo com o tempo (Figura 25).

Figura 25: Viabilidade celular após transdução da linhagem BXD-1424 com o miR-630. **** $p \leq 0,0001$.

5.8 Ciclo celular após transdução com miR-630

O ciclo celular foi avaliado após a transdução das células de EPN com miR-630. A hiperexpressão do miR-630 não levou a nenhuma alteração das células ao longo das fases do ciclo celular (Figura 26).

Figura 26: Análise do ciclo celular após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630 nos tempos de A) 24, B) 48 e C) 72 horas

5.9 Apoptose após transdução com miR-630

Para avaliar o efeito da hiperexpressão do miR-630 no processo de apoptose celular, células transduzidas foram marcadas com Anexina e PI, após 24, 48 e 72 horas de plaqueamento. Pela análise do citômetro de fluxo, é possível observar um aumento de células em apoptose após hiperexpressão do miR-630 nos tempos de 24 e 72 horas (Figura 27A e 27B, respectivamente). No

tempo de 48 horas houve uma diminuição de células em necrose após hiperexpressão do miR-630 (Figura 27B) porém o inverso ocorre no tempo de 72 horas (Figura 27C). Não houve diferença significativa também na porcentagem de células em apoptose final (Anexina+/Pi+) e células viáveis (Anexina-/Pi-) nos tempos analisados.

Figura 27: Análise de apoptose após transdução da linhagem de EPN com miR-630. * $p \leq 0,01$ ** $p \leq 0,001$ *** $p \leq 0,0002$.

5.10 Wound healing após transdução com miR-630

Foi realizado o ensaio de migração *wound healing* na linhagem BXD-1425 transduzida com o miR-630 e com controle negativo, para avaliar o efeito da hiperexpressão deste microRNA na capacidade de migração de tais células (Figura 28). Pode-se observar diferença significativa entre os grupos controle negativo (CT) e miR-630 ($p=0,0001$), onde a hiperexpressão do miR-630 induziu uma diminuição na taxa de migração.

Figura 28: Análise de migração celular por *wound healing* após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630.

5.11 Invasão celular pós transdução com miR-630

A fim de avaliar o papel do miR-630 na capacidade de invasão celular de EPN, células BXD-1425 transduzidas com microRNA e CT foram plaqueadas para o ensaio de invasão por matrigel. De acordo com a Figura 29, é possível observar que a hiperexpressão do miR-630 leva a redução da taxa de invasão celular, comparada com células controle ($p=0,002$).

Figura 29: Análise de invasão celular por matrigel após transdução da linhagem BXD-1425 com miR-630.

5.12 Perfil TEM

Para avaliar o perfil de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em ependimoma e o possível papel do miR-630 e da via TGF- β neste processo, foram avaliados marcadores de células epiteliais (*E-caderina*) e de células mesenquimais (*N-caderina* e *vimentina*), bem como o fator de transcrição *Slug*, em níveis de mRNA (qRT-PCR) e proteína (HCA).

5.12.1 RNA mensageiro

Os níveis de RNA mensageiro para o marcador epitelial *E-caderina* não diferem ao comparar amostras tumorais de EPN com amostras controle (Figura 30A) de acordo com análises realizada com dados do GSE64415 ($n = 119$, somente amostras primárias e pediátricas). Já os marcadores mesenquimais, *N-caderina* ($p=0,0001$) e *vimentina* ($p=0,0001$) e o fator de transcrição *SLUG* ($p=0,001$), apresentam maior expressão em amostras tumorais quando comparadas com amostras controles (Figura 30B-D). Ao analisar o perfil de expressão desses genes de acordo com a classificação molecular de EPN, o subgrupo ST-EPN-RELA apresenta maior expressão de *E-caderina* quando comparado com o subgrupo FP-EPN-A ($p=0,001$) (Figura 30E), menor expressão de *N-caderina* comparado ao subgrupo FP-EPN-A ($p=0,001$) e FP-EPN-B ($p=0,0102$) (Figura 30F), maior expressão de *Vimentina* comparado ao subgrupo FP-EPN-B ($p=0,0461$) (Figura 30G) e maior expressão de *SLUG* comparado com o subgrupo ST-EPN-YAP1 ($p=0,009$) (Figura 30H). O subgrupo de fossa posterior A apresentam maior expressão de *Vimentina* ($p=0,0088$) e *SLUG* ($p=0,0013$) quando comparado com o subgrupo FP-EPN-B (Figura 30G-H).

Figura 30: Expressão genica de genes TEM em amostras primárias de ependimoma pediátrico do banco de dados Pfister (GSE64415). * $p \leq 0,01$ ** $p \leq 0,001$ *** $p \leq 0,0005$ **** $p \leq 0,0001$.

Em relação aos dados clínicos dos pacientes pertencentes ao banco de dados GSE64415, pacientes menores do que 3 anos de idade apresentam menor expressão de *E-caderina* quando comparado com pacientes maiores do que 3 anos ($p=0,038$) (Figura 31A). Pacientes que foram a óbito, apresentam maior expressão do gene *Vimentina* comparado com pacientes que ainda estão vivos ($p=0,008$) (Figura 31B), bem como a sobrevida global é menor para pacientes de EPN que hiperexpressão esse gene comparado com pacientes que hipoexpressam (SG em 5 anos de $42,7\% \pm 12,8$ e 100% , respectivamente) (Figura 31C). O mesmo ocorre para o gene *SLUG*, pacientes de EPN que hiperexpressão esse gene também apresentam uma pior sobrevida comparado com pacientes que hipoexpressão (SG em 5 anos de $36,1\% \pm 15,8$ e $84,4\% \pm 10,2$, respectivamente) (Figura 31D).

Figura 31: Expressão dos genes *SLUG* e *Vimentina* associado aos dados clínicos de pacientes de ependimoma do banco de dados Pfister (GSE64415).

A linhagem BXD-1425 apresenta uma menor expressão de *E-caderina* comparada com as células endimárias, porém uma maior expressão de *N-caderina* e *SLUG* (dados não significativos) (Figura 32A). Após a hiperexpressão do miR-620, as células de EPN apresentam uma menor expressão de *E-caderina*, e *N-caderina* (dados não significativos) (Figura 32B).

Figura 32: Perfil de expressão gênica de *E-caderina*, *N-caderina* e *SLUG* em A) Células endimárias e BXD-1425; B) Linhagem BXD-1425 transduzida com controle e miR-630.

5.12.2 Proteína

Apesar de não apresentar dados significativos, é possível observar através do ensaio HCA que, após a hiperexpressão do miR-630 na linhagem de EPN, há uma maior expressão de marcadores epiteliais (*E-caderina*) uma menor expressão de marcadores mesenquimais (*N-caderina*) e do fator de transcrição *Slug*, quando comparado com células transduzidas com controle (Figura 33).

Figura 33: HCA - Expressão proteica de E-caderina, N-caderina e Slug na linhagem BXD-1425 após transdução com controle e miR-630.

Além disso, através da técnica de *Western-blot*, foi avaliado o nível proteico de E-caderina, N-caderina e Slug na linhagem transduzida com miR-630 e controle. Na figura 34 é possível observar que houve uma diminuição nos níveis proteicos de N-caderina e Slug após a hiperexpressão do miR-630. Além disso, esses resultados confirmam que há pouca ou nenhuma expressão de E-caderina na linhagem BXD-1425 (Figura 34).

Figura 34: *Western-blot* - Expressão proteica de E-caderina, N-caderina e Slug na linhagem BXD-1425 após transdução com controle e miR-630.

Discussão

6. Discussão

O ependimoma apesar de ser um tumor pediátrico raro, é um tumor invasivo que apresenta uma baixa taxa de sobrevida, sobretudo quando se trata de pacientes menores de 3 anos de idade e/ou que apresentam tumores classificados molecularmente como ST-EPN-RELA e FP-EPN-A. Os protocolos de tratamento atuais não apresentam taxas de cura expressivas, o que pode ser explicado pelo fato de que o EPN é um tumor resistente a quimioterápicos (FERGUSON *et al.*, 2018). Por tratar-se de um tumor raro, há escassez de modelos *in vitro* e *in vivo* que possibilitem investigações terapêuticas específicas para este tumor (SHU *et al.*, 2018). Entretanto, a classificação molecular de EPN realizada por PAJTLER *et al* (2015) possibilitou uma melhor compreensão da heterogeneidade e especificidade deste tumor e novos estudos vêm ajudando a melhor compreender a biologia tumoral e assim, novas abordagens terapêuticas para EPN. Porém, até este momento, nenhum trabalho explorou o papel da via TGF- β em EPN.

A via TGF- β é uma via de sinalização celular importante em diversos processos celulares já descrito em diversos tipos de tumores, podendo-se comportar tanto como uma via supressora tumoral como uma via promotora tumoral (PADUA; MASSAGUÉ, 2009; RAGAZZON *et al.*, 2009; INMAN, 2011; WAKEFIELD; HILL, 2013; PRINCIPE *et al.*, 2014; ZHANG; YU; LEE, 2014). Alguns trabalhos descreveram alterações de componentes da via canônica de TGF- β em EPN. JENNINGS *et al* (1993) revelou alta expressão de *TGF- β 1* e *TGF- β 2* em culturas primárias de EPN de fossa posterior derivadas de dois pacientes pediátricos. Pela técnica de microarray, WANI *et al* (2012) demonstraram que amostras de ependimoma do Grupo 1 (atual subgrupo molecular PF-EPN-A), apresentam hiperexpressão do gene *TGF- β 1* quando comparado com o subgrupo de melhor prognóstico Grupo 2 (atual PF-EPN-B). PAJTLER *et al* (2014) demonstrou que *SMAD7* é um gene alvo da via NF- κ B em células que apresentam a fusão RELA, sendo *SMAD7* hiperexpresso no subgrupo ST-EPN-RELA. Sendo assim, o presente estudo iniciou-se com a avaliação do perfil de expressão da via canônica de TGF- β em amostras de pacientes de EPN. A expressão dos genes *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *SMAD3* e *SMAD7* não apresenta diferença significativa quando entre amostras tumorais e amostras controle. Entretanto, os genes *TGF- β 1*, *TGF- β 2* e *SMAD3* apresentam uma tendência a maior expressão em amostras de EPN quando comparado com amostras controle de células ependimárias. Ao analisar as amostras divididas de acordo com os subgrupos moleculares de EPN, também não é possível observar diferença estatística entre os subgrupos o que em parte pode ser explicado devido ao fato de que, apesar de um número amostral considerável utilizado no presente estudo, a subdivisão das amostras em subgrupos moleculares

reduz o poder estatístico das análises, uma vez que alguns subgrupos moleculares apresentam poucos exemplares. O mesmo perfil de expressão gênico aplica-se para as amostras de recidiva. Para avaliar um possível papel clínico da via TGF- β no prognóstico de pacientes com EPN, os dados de expressão genica foram associados aos parâmetros clínicos, os quais mostraram que pacientes com EPN de histologia grau III apresentam uma maior expressão de *TGF- β 1*, comparado com pacientes com EPN grau II. Também foi possível observar que pacientes com hiperexpressão do gene *SMAD3* só tiveram seu tumor parcialmente ressecados, ao passo que pacientes com ressecção completa apresentam uma menor expressão desse gene. Tumores de histologia grau III são caracterizados por serem tumores mais agressivos, e é um fator prognóstico para EPN (TIHAN *et al.*, 2008; XI *et al.*, 2019). Além disso, o grau de ressecção tumoral está altamente ligado a característica invasiva dos tumores e as taxas de sobrevida de EPN (ELLISON *et al.*, 2011). Os genes avaliados neste estudo também foram validados no banco de dados de EPN, GSE64415 (Anexo 2 – apenas dados significativos), no qual a hiperexpressão dos genes da via TGF- β também foram associados a dados de pior prognóstico de EPN (idade menor do que 3 anos) e sobrevida global. Estes dados indicam que a via TGF- β pode ser uma via promissora para alvo terapêutico de ependimomas com características mais agressivas (grau III, pacientes menores que 3 anos). Em geral, os tumores que apresentam atividade oncogênica da via TGF- β , expressam altos níveis de TGF- β , o que pode estar associado com a capacidade de TGF- β induzir sua própria expressão, gerando uma alça autócrina maligna (SEOANE, 2006). No entanto, alguns tumores podem não apresentar alterações na via de transdução de sinal de TGF- β , mesmo quando as células se tornam resistentes a resposta anti-proliferativa da via TGF- β (THOMAS *et al.*, 2005).

Os dados de RNA-seq confirmam que a via TGF- β pode ser uma via importante na biologia tumoral de EPNs de pior prognóstico. Na análise de diferencial de expressão entre os subgrupos ST-EPN-RELA, ST-EPN-YAP1 e FP-EPN-A, a via TGF- β mostrou-se enriquecida nos dois subgrupos de pior prognóstico, ST-EPN-RELA e FP-EPN-A. Além disso, a análise de *hub genes*, demonstrou que esses genes apresentam alta co-relação com a via TGF- β ou, até mesmo, fazem parte da via.

Diante da importância da via TGF- β nos processos celulares e progressão tumoral, diversas moléculas inibidoras da via TGF- β vêm sendo testadas como estratégias terapêuticas em tumores (HAU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015; ZHOU; YANG; ZHANG, 2016; PAPA *et al.*, 2017; CASCIONE *et al.*, 2018; D'CRUZ *et al.*, 2018; YADAV; SHANKAR, 2019), dentre elas o inibidor

do receptor I do TGF- β (SB431542) (HJELMELAND *et al.*, 2004; HALDER; BEAUCHAMP; DATTA, 2005; IKUSHIMA *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018; TONG *et al.*, 2019). O 4-(4-(Benzo(d)(1,3)dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl) benzamida, conhecido como SB-431542 é um inibidor da atividade quinase do receptor de ativina (ALK) - especificamente *ALK5* (TGF- β tipo I receptor, TGF- β RI), *ALK4* (ativina receptor tipo I), e *ALK7* (receptor tipo I nodal) (INMAN *et al.*, 2002). O SB431542 pode reduzir o acúmulo nuclear das proteínas Smads e assim atenuar os efeitos promotores tumorais da via TGF- β , TEM, motilidade celular, migração e invasão e inibir a proliferação celular (MATSUYAMA *et al.*, 2003; HALDER; BEAUCHAMP; DATTA, 2005; SATO *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2019). Alguns trabalhos vêm demonstrando o papel desta molécula inibidora de TGF- β em tumores do SNC (HJELMELAND *et al.*, 2004; IKUSHIMA *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2011). HJELMELAND *et al.* (2004) demonstrou que o tratamento de culturas celulares de glioma com SB431542 inibiu a proliferação e diminuiu a mobilidade celular. IKUSHIMA *et al.* (2009) demonstrou que a via TGF- β atua na manutenção de células troncos que dão início aos gliomas, através da indução da expressão de *SOX2*, e que ao tratar essas células com inibidor SB431542, elas se tornaram menos agressivas. Em adição, LU *et al.* (2011) demonstrou que a inibição do receptor tipo I de TGF- β com a molécula SB431542, reduziu a migração e invasão estimulada por *TGF- β 1* nas células de glioma. Esses trabalhos sugerem que este inibidor da atividade de *TGF- β RI* pode ser uma ferramenta promissora em novas terapias no tratamento de gliomas malignos. Neste contexto, investigou-se a atividade inibitória desta molécula (SB431542) na linhagem celular de EPN, BXD-1425. Primeiro analisou-se o efeito deste inibidor na viabilidade celular em diferentes doses baseadas na literatura (HJELMELAND *et al.*, 2004) nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento. Não foi possível observar efeito citotóxico significativo nas doses testadas, sendo os valores do IC50 estimados 77,97 μ M no tempo de 24 horas e 174,31 μ M com 48 horas de tratamento. Em tumores de estágio avançado, a inibição da via TGF- β com baixas doses do inibidor pode resultar em efeitos antiproliferativos, e efeitos pró-proliferativos em doses mais altas, dificultando assim a seleção de uma concentração apropriada (DE GRAMONT *et al.*, 2017). Porém, é possível observar pelas técnicas de qRT-PCR e *Western-blot*, que há diminuição dos componentes moleculares da via canônica de TGF- β na linhagem de EPN, mesmo quando tratada com a menor dose testada (10 μ M) em 24 horas. Também no tempo de 24 horas após tratamento com SB431542, é possível observar um aumento significativo de células na fase G1 e uma diminuição significativa de células na fase S, o que indica uma possível

parada na divisão celular dessas células. Porém nos demais tempos analisados não foi possível observar nenhuma alteração significativa no ciclo celular. Nenhuma alteração foi encontrada nas taxas de morte celular, migração e invasão celular após o tratamento das células de EPN com SB431542. A via TGF- β pode apresentar efeitos indiretos nas células tumorais e, assim, pode-se esperar que os inibidores de TGF- β exerçam apenas efeitos limitados na proliferação das células cancerígenas. Sendo assim, é provável que essas moléculas inibidoras apresentem melhor potencial em combinação com outras estratégias terapêuticas (DE GRAMONT; FAIVRE; RAYMOND, 2017).

Dentre os diversos mecanismos que podem regular a via TGF- β /Smad, encontra-se a ação de diversos microRNAs (KURAKULA; GOUMANS; TEN DIJKE, 2015; JIN *et al.*, 2018). Dentre eles, o hsa-miR-630 vem sendo caracterizado por associar-se a desregulação de genes da via TGF- β (CHEN *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016), e por apresentar alterações na sua expressão em alguns tumores, dentre eles, tumores do SNC (ZHANG; WANG; XUE, 2017). No estudo de ZHANG *et al* (2017) foi observado uma baixa expressão do miR-630 em linhagens de gliomas, principalmente após tratamento com radiação. Ao analisar o perfil de expressão do miR-630 em amostras de EPN, não foi possível observar diferença estatística entre amostras tumorais e amostras controle (célulasependimárias e substância branca). Não há diferença estatística de expressão do miR-630 entre os subgrupos moleculares de EPN, bem como, não há associação da expressão do mesmo com as taxas de sobrevida desses pacientes. Entretanto, pacientes que apresentam recidiva, têm uma maior expressão do miR-630 comparado com pacientes que não tiveram recidiva. Para avaliar quais componentes moleculares da via TGF- β seriam regulados pela modulação do miR-630, e qual o possível efeito *in vitro* desta modulação em EPN, fez-se a transdução da linhagem BXD-1425 com lentivírus miR-630 para induzir a sua hiperexpressão. Concomitantemente, foram investigados genes-alvo do miR-630 e, através do enriquecimento de vias gerado a partir desses genes-alvo, a via TGF- β mostrou-se enriquecida ($p=0,002$). Foi descrito na literatura que o gene *TGF- β R2* é um alvo validado do miR-630 (BAKHSHANDEH *et al.*, 2012) ao passo que os genes *SMAD2*, *SMAD6* e *SMAD9* são genes-alvo preditos. Sendo assim, foi realizado a transdução da linhagem de EPN para hiperexpressar o miR-630 e então analisar o perfil de expressão gênica e proteica da via TGF- β . Observou-se que houve diminuição significativa da expressão dos genes *TGF- β 1*, *TGF- β R1* e *SMAD7*, e apesar de não haver diferença significativa, diminuição da expressão dos genes *TGF-*

βR2 e *SMAD3*. Houve diminuição dos níveis de expressão proteica de Smad3 fosforilado indicando assim que o miR-630 pode estar regulando a via TGF- β em EPN.

A modulação da expressão do miR-630 vem sendo associada a diversos processos celulares, mas principalmente na migração, invasão celular e transição-epitélio-mesenquimal (CHEN et al., 2016; LI; TIAN; JIN, 2018). Sendo assim, foi analisado o possível efeito da modulação do miR-630 nos processos de viabilidade, ciclo celular, apoptose, migração e invasão celular de EPN. O ensaio de viabilidade celular mostrou que a hiperexpressão deste microRNA diminui a taxa de células viáveis em até 50% no tempo de 24 horas e aproximadamente 40% no tempo de 48 horas. Não houve alteração no ciclo celular das células de EPN após hiperexpressam do miR-630 porém, ao analisar as taxas de morte celular, foi possível observar um aumento de apoptose em células que hiperexpressam o miR-630 nos tempos de 24 e 72 horas. Esses dados sugerem que o miR-630 atua na viabilidade e morte celular de EPN. Um estudo realizado por CHEN *et al* (2016) demonstrou uma interação TGF- β -miR-630-Slug no processo de TEM em células de hepatocarcinoma. LI *et al* (2018) demonstraram que, em células de câncer gástrico, o miR-630 reduz a TEM mediada por *TGF-β1*. Diante disso, investigou-se o possível efeito da modulação do miR-630 no processo de invasão e migração celular de EPN. A hiperexpressão do miR-630 na linhagem BXD-1425 levou a uma redução significativa da taxa de migração celular dessas células, bem como uma significativa redução da taxa de invasão celular, sugerindo assim que o miR-630 atua na regulação dos processos de migração e invasão celular, podendo contribuir assim para o perfil mais agressivo de EPN.

Os complexos mecanismos moleculares da invasividade de tumores cerebrais envolvem uma série de etapas dentre elas, a modificação das propriedades de adesão celular, degradação e remodelação da matriz extracelular (MEC) por proteases, e migração das células tumorais para o novo sítio (LIOTTA; RAO; WEWER, 1986). O processo de TEM é fortemente associado a elevada capacidade invasiva das células e é um importante indutor do fenótipo de células-tronco tumorais (MANI *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado que a via TGF- β induz o processo de TEM levando a progressão tumoral através da via dependente de SMADs (BIERIE; MOSES, 2006; SONG, 2007; JI *et al.*, 2015; JOHANSSON *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2019). O trabalho de CUI *et al* (2019) demonstrou que ao regular positivamente a expressão das proteínas Twist1, Snai2 e Slug, *TGF-β1* suprime a expressão de E-caderina. A indução de TEM pela via TGF- β também tem sido descrita em células de gliomas (ZHANG; FENG; WU, 2020; ZHENG *et al.*, 2017). ROOPRAI *et al* (2000) demonstrou hiperexpressão das metaloproteinases MMP-2 e

MMP-9 após exposição das células de EPN aos ligantes TGF- β 1 e TGF- β 2. No estudo realizado por WANI *et al* (2012), as amostras pertencentes ao Grupo 1 (atual FP-EPN-A) tiveram correlação com os processos de cicatrização de feridas (*Wound healing*), inflamação, migração e adesão celular. Foi investigado o perfil de expressão de genes descritos como mesenquimais os quais apresentaram-se hiperexpressos em amostras do Grupo 1 quando comparado a amostras do Grupo 2. Este perfil também foi descrito como uma assinatura mesenquimal de glioblastomas (FREIJE *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2006; VERHAAK *et al.*, 2010). Além disso, após selecionar genes diferencialmente expressos entre pacientes com sobrevida livre de recorrência curta (SRS) e sobrevida livre de recorrência longa (LRS), o gene *TGF- β 1* estava entre os 10 hiperexpressos no Grupo 1 associado a sobrevida livre de recorrência (WANI *et al.*, 2012).

Deste modo, foi investigado o perfil de marcadores TEM em EPN e, uma possível modulação desses pelo miR-630. A análise de expressão genica realizada no banco de dados de EPN, GSE64415, mostrou que não há diferença de expressão de *E-caderina* entre amostras tumorais e controle porém, há uma maior expressão de marcadores mesenquimais, *N-caderina* e *Vimentina*, e do fator de transcrição *SLUG* em amostras de EPN, principalmente nos subgrupos de pior prognóstico ST-EPN-RELA e FP-EPN-A. A alta expressão dos marcadores mesenquimais *Vimentina* e *SLUG* também foi associada a uma pior sobrevida dos pacientes de EPN ao passo que, a baixa expressão de *E-caderina* associou-se a pacientes com idade menor do que 3 anos. XIE *et al* (2012) demonstrou a associação de Slug ao aumento da migração e invasão de células de gliomas.

A regulação epigenética através de microRNAs é um mecanismo importante na regulação de TEM de diversos tumores (BULLOCK *et al.*, 2012). Após a transdução da linhagem BXD-1425 com o miR-630, não houve diferença significativa na expressão dos marcadores TEM comparado com células controle, porém é possível observar uma menor expressão de N-caderina (genica e proteica) e Slug (proteica) após hiperexpressão do miR-630. Pelo ensaio de HCA realizado na linhagem transduzida com miR-630 e controle, foi possível observar que, há um aumento na expressão de marcadores epiteliais (E-caderina) e diminuição de marcadores mesenquimais (N-caderina) e Slug após a hiperexpressão do miR-630 (dados não significativos). O processo de TEM mediado pela clássica troca de caderinas (*cadherin switching*), não é comum em gliomas tendo em vista que tanto o tecido cerebral não neoplásico, como os gliomas, expressam N-caderina constitutivamente e raramente expressão E-caderina (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 1995;

YOKOI et al., 2007; MOTTA et al., 2008). SIEBZEHRUBL *et al* (2013) demonstrou que a invasão celular em gliomas ocorre pela indução de modificação na *N-caderina* por *ZEB1* e não por repressão de *E-caderina*, como ocorre em carcinomas, sugerindo que o processo TEM em gliomas pode ocorrer por mecanismos diferentes que não o clássico “E-N *cadherin switch*”. Entretanto, MALGULWAR *et al.*, (2018) foram os primeiros a descreverem que o perfil TEM em EPN pode ocorrer através da clássica troca E-N-caderina, associando o alto perfil de expressão de *N-caderina* ao baixo perfil de expressão de *E-caderina* em todos os subgrupos moleculares, mas principalmente aos tumores do grupo ST-EPN-RELA e de fossa posterior e a menor taxa de sobrevida.

De acordo com os achados do presente estudo, pode-se observar que há ativação da via TGF- β em ependimoma ST-EPN-RELA, que por sua vez pode ser modulada pelo miR-630 e assim regular os processos que levam a invasão e migração deste tumor, provavelmente associado ao processo de TEM não-clássico. Sendo assim, a via TGF- β pode ser um potencial alvo terapêutico para ependimoma, principalmente para pacientes que apresentam características tumorais agressivas (invasão, metástase). Entretanto, novas investigações devem ser feitas para confirmar esses achados.

Conclusão

7. Conclusão

A partir dos resultados deste estudo, conclui-se que:

- Não há diferença estatística entre a expressão dos genes *TGF-β1*, *TGF-β2*, *SMAD3* e *SMAD7* entre as amostras de ependimoma de pacientes pediátricos e amostras de células ependimárias não-neoplásicas;
- Não há diferença estatística na expressão dos genes *TGF-β1*, *TGF-β2*, *SMAD3* e *SMAD7* entre os subgrupos moleculares do compartimento intracraniano de pacientes de ependimoma pediátrico;
- Há associação da expressão dos genes *TGF-β1* e *SMAD3* com as características clínicas dos pacientes pediátricos de ependimoma: grau histológico e ressecção tumoral, respectivamente;
- O subgrupo de pior prognóstico da região supratentorial, ST-EPN-RELA, apresenta 13 *hub genes* dos quais dois apresentam correlação com a via TGF-β. O subgrupo de pior prognóstico da região da fossa posterior, FP-EPN-A apresenta o enriquecimento da via TGF-β e três *hub genes* associados a esta via;
- Há ativação da via TGF-β na linhagem de ependimoma, BXD-1425. Entretanto, a sua inibição com a droga SB431542 não teve efeito sob a viabilidade celular, apoptose, migração e invasão celular das células BXD-1425. Houve apenas um aumento significativo de células em fase G1 e uma diminuição de células em fase S após 24 horas de tratamento;
- A hiperexpressão do miR-630 promoveu a inativação da via TGF-β/Smad pela diminuição dos níveis proteicos de Smad3 fosforilado, bem como levou a uma menor expressão dos genes *TGF-βR1* e *SMAD3*;
- A hiperexpressão do miR-630 levou a redução da viabilidade celular, levou ao aumento de células em apoptose e diminuiu as taxas de invasão e migração celular na linhagem BXD-1425;

Referências bibliográficas

8. Referências bibliográficas

AMIRIAN, E. S.; ARMSTRONG, T. S.; ALDAPE, K. D.; GILBERT, M. R. et al. Predictors of survival among pediatric and adult ependymoma cases: a study using Surveillance, Epidemiology, and End Results data from 1973 to 2007. **Neuroepidemiology**, 39, n. 2, p. 116-124, 2012.

ARAKI, A.; CHOCHOLOUS, M.; GOJO, J.; DORFER, C. et al. Chromosome 1q gain and tenascin-C expression are candidate markers to define different risk groups in pediatric posterior fossa ependymoma. **Acta Neuropathol Commun**, 4, n. 1, p. 88, 08 2016.

ATTISANO, L.; WRANA, J. L. Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. **F1000Prime Rep**, 5, p. 17, 2013.

BAKHSHANDEH, B.; SOLEIMANI, M.; PAYLAKHI, S. H.; GHAEMI, N. A microRNA signature associated with chondrogenic lineage commitment. **J Genet**, 91, n. 2, p. 171-182, Aug 2012.

BAUER, J.; SPORN, J. C.; CABRAL, J.; GOMEZ, J. et al. Effects of activin and TGF β on p21 in colon cancer. **PLoS One**, 7, n. 6, p. e39381, 2012.

BHOWMICK, N. A.; GHIASSI, M.; BAKIN, A.; AAKRE, M. et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Mol Biol Cell**, 12, n. 1, p. 27-36, Jan 2001.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 7, p. 506-520, Jul 2006.

BRECHBIEL, J.; MILLER-MOSLIN, K.; ADJEI, A. A. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. **Cancer Treat Rev**, 40, n. 6, p. 750-759, Jul 2014.

BULLOCK, M. D.; SAYAN, A. E.; PACKHAM, G. K.; MIRNEZAMI, A. H. MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression. **Biol Cell**, 104, n. 1, p. 3-12, Jan 2012.

CARPENTER, A. E.; JONES, T. R.; LAMPRECHT, M. R.; CLARKE, C. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome Biol**, 7, n. 10, p. R100, 2006.

CASCIONE, M.; LEPORATTI, S.; DITURI, F.; GIANNELLI, G. Transforming Growth Factor- β Promotes Morphomechanical Effects Involved in Epithelial to Mesenchymal Transition in Living Hepatocellular Carcinoma. **Int J Mol Sci**, 20, n. 1, Dec 2018.

CASTELLONE, M. D.; LAUKKANEN, M. O. TGF-beta1, WNT, and SHH signaling in tumor progression and in fibrotic diseases. **Front Biosci (Schol Ed)**, 9, p. 31-45, 01 2017.

CAVALLI, F. M. G.; HÜBNER, J. M.; SHARMA, T.; LUU, B. et al. Heterogeneity within the PF-EPN-B ependymoma subgroup. **Acta Neuropathol**, 136, n. 2, p. 227-237, 08 2018.

CHEN, E. Y.; TAN, C. M.; KOU, Y.; DUAN, Q. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, 14, p. 128, Apr 2013.

CHEN, W. X.; ZHANG, Z. G.; DING, Z. Y.; LIANG, H. F. et al. MicroRNA-630 suppresses tumor metastasis through the TGF- β - miR-630-Slug signaling pathway and correlates inversely with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 7, n. 16, p. 22674-22686, Apr 2016.

CHEN, X.; WEISBERG, E.; FRIDMACHER, V.; WATANABE, M. et al. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. **Nature**, 389, n. 6646, p. 85-89, Sep 1997.

CHEN, Y.; MA, L.; HE, Q.; ZHANG, S. et al. TGF- β 1 expression is associated with invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma. **Biol Res**, 48, p. 26, May 2015.

CHUA, J. H.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. **Curr Opin Mol Ther**, 11, n. 2, p. 189-199, Apr 2009.

CHOU, Ting-Chao; TALALAY, Paul. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in enzyme regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984

CUI, X.; SHANG, S.; LV, X.; ZHAO, J. et al. Perspectives of small molecule inhibitors of activin receptor-like kinase in anti-tumor treatment and stem cell differentiation (Review). **Mol Med Rep**, 19, n. 6, p. 5053-5062, Jun 2019.

D'CRUZ, O. J.; QAZI, S.; HWANG, L.; NG, K. et al. Impact of targeting transforming growth factor β -2 with antisense OT-101 on the cytokine and chemokine profile in patients with advanced pancreatic cancer. **Onco Targets Ther**, 11, p. 2779-2796, 2018.

DE GRAMONT, A.; FAIVRE, S.; RAYMOND, E. Novel TGF- β inhibitors ready for prime time in onco-immunology. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 1, p. e1257453, 2017.

DE SOUZA LIMA IM, SCHIAVINATO JLDS, PAULINO LEITE SB. et al. High-content screen in human pluripotent cells identifies miRNA-regulated pathways controlling pluripotency and differentiation. **Stem Cell Res Ther**. 10(1):202,.2019

DWEEP, H.; STICHT, C.; PANDEY, P.; GRETZ, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform**, 44, n. 5, p. 839-847, Oct 2011.

ELLISON, D. W.; KOCAK, M.; FIGARELLA-BRANGER, D.; FELICE, G. et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. **J Negat Results Biomed**, 10, p. 7, May 2011.

FERGUSON, S. D.; ZHOU, S.; XIU, J.; HASHIMOTO, Y. et al. Ependymomas overexpress chemoresistance and DNA repair-related proteins. **Oncotarget**, 9, n. 8, p. 7822-7831, Jan 2018.

FIGARELLA-BRANGER, D.; LEPIDI, H.; PONCET, C.; GAMBARELLI, D. et al. Differential expression of cell adhesion molecules (CAM), neural CAM and epithelial cadherin in ependymomas and choroid plexus tumors. **Acta Neuropathol**, 89, n. 3, p. 248-257, 1995.

FREIJE, W. A.; CASTRO-VARGAS, F. E.; FANG, Z.; HORVATH, S. et al. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. **Cancer Res**, 64, n. 18, p. 6503-6510, Sep 2004.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; VITALE, I.; KEPP, O. et al. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. **Cancer Res**, 70, n. 5, p. 1793-1803, Mar 2010.

GARMAN, K. S.; NEVINS, J. R.; POTTI, A. Genomic strategies for personalized cancer therapy. **Hum Mol Genet**, 16 Spec No. 2, p. R226-232, Oct 2007.

GERSTNER, E. R.; PAJTLER, K. W. Ependymoma. *In*. **Semin Neurol**, Thieme Medical Publishers, 38, n. 1, p. 104-111, Feb 2018.

GODFRAIND, C.; KACZMARSKA, J. M.; KOCAK, M.; DALTON, J. et al. Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas. **Acta Neuropathol**, 124, n. 2, p. 247-257, Aug 2012.

GONZALEZ, D M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. **Science signaling**, v. 7, n. 344, p. re8-re8, 2014.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, 32, n. 18, p. 2847-2849, 09 2016.

GUPTA, K.; SALUNKE, P. Understanding Ependymoma Oncogenesis: an Update on Recent Molecular Advances and Current Perspectives. **Mol Neurobiol**, 54, n. 1, p. 15-21, 01 2017.

HALDER, S. K.; BEAUCHAMP, R. D.; DATTA, P. K. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. **Neoplasia**, 7, n. 5, p. 509-521, May 2005.

HATA, A.; SEOANE, J.; LAGNA, G.; MONTALVO, E. et al. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. **Cell**, 100, n. 2, p. 229-240, Jan 2000.

HAU, P.; JACHIMCZAK, P.; SCHLAIER, J.; BOGDAHN, U. TGF- β 2 signaling in high-grade gliomas. **Curr Pharm Biotechnol**, 12, n. 12, p. 2150-2157, Dec 2011.

HAZAN, R. B.; QIAO, R.; KEREN, R.; BADANO, I. et al. Cadherin switch in tumor progression. **Ann N Y Acad Sci**, 1014, p. 155-163, Apr 2004.

HELDIN, C. H.; LANDSTRÖM, M.; MOUSTAKAS, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. **Curr Opin Cell Biol**, 21, n. 2, p. 166-176, Apr 2009.

HJELMELAND, M. D.; HJELMELAND, A. B.; SATHORNSUMETEE, S.; REESE, E. D. et al. SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. **Mol Cancer Ther**, 3, n. 6, p. 737-745, Jun 2004.

IKUSHIMA, H.; TODO, T.; INO, Y.; TAKAHASHI, M. et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. **Cell Stem Cell**, 5, n. 5, p. 504-514, Nov 2009.

INMAN, G. J. Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. **Curr Opin Genet Dev**, 21, n. 1, p. 93-99, Feb 2011.

INMAN, G. J.; NICOLÁS, F. J.; CALLAHAN, J. F.; HARLING, J. D. et al. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. **Mol Pharmacol**, 62, n. 1, p. 65-74, Jul 2002.

Jennings, M. T., Kaariainen, I. T., Gold, L., Maciunas et al. TGF β 1 and TGF β 2 are potential growth regulators for medulloblastomas, primitive neuroectodermal tumors, and ependymomas: evidence in support of an autocrine hypothesis. **Human pathology**, 25(5), 464-475. 1994.

Ji, Q.; LIU, X.; HAN, Z.; ZHOU, L. et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. **BMC Cancer**, 15, p. 97, Mar 2015.

JIN, L.; YI, J.; GAO, Y.; HAN, S. et al. MiR-630 inhibits invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai), 48, n. 9, p. 810-819, Sep 2016.

JIN, W.; CHEN, F.; WANG, K.; SONG, Y. et al. miR-15a/miR-16 cluster inhibits invasion of prostate cancer cells by suppressing TGF- β signaling pathway. **Biomed Pharmacother**, 104, p. 637-644, Aug 2018.

JOHANSSON, J.; TABOR, V.; WIKELL, A.; JALKANEN, S. et al. TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. **Front Oncol**, 5, p. 3, 2015.

KAHLERT, U. D.; JOSEPH, J. V.; KRUYT, F. A. E. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. **Mol Oncol**, 11, n. 7, p. 860-877, 07 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, 119, n. 6, p. 1420-1428, Jun 2009.

KAMENSKY, L.; JONES, T. R.; FRASER, A.; BRAY, M. A. et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. **Bioinformatics**, 27, n. 8, p. 1179-1180, Apr 2011.

KAST, R. E.; SKULI, N.; KARPEL-MASSLER, G.; FROSINA, G. et al. Blocking epithelial-to-mesenchymal transition in glioblastoma with a sextet of repurposed drugs: the EIS regimen. **Oncotarget**, 8, n. 37, p. 60727-60749, Sep 2017.

KILDAY, J. P.; RAHMAN, R.; DYER, S.; RIDLEY, L. et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. **Mol Cancer Res**, 7, n. 6, p. 765-786, Jun 2009.

KORSHUNOV, A.; WITT, H.; HIELSCHER, T.; BENNER, A. et al. Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults. **J Clin Oncol**, 28, n. 19, p. 3182-3190, Jul 2010.

KURAKULA, K.; GOUMANS, M. J.; TEN DIJKE, P. Regulatory RNAs controlling vascular (dys)function by affecting TGF- β family signalling. **EXCLI J**, 14, p. 832-850, 2015.

LANGENSKIÖLD, M.; HOLMDAHL, L.; FALK, P.; ANGENETE, E. et al. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. **J Surg Oncol**, 97, n. 5, p. 409-415, Apr 2008.

LEE, C. H.; CHUNG, C. K.; OHN, J. H.; KIM, C. H. The Similarities and Differences between Intracranial and Spinal Ependymomas : A Review from a Genetic Research Perspective. **J Korean Neurosurg Soc**, 59, n. 2, p. 83-90, Mar 2016.

LEHMAN, N. L. Central nervous system tumors with ependymal features: a broadened spectrum of primarily ependymal differentiation? **J Neuropathol Exp Neurol**, 67, n. 3, p. 177-188, Mar 2008.

LI, D.; TIAN, B.; JIN, X. miR-630 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by regulating Wnt/betacatenin pathway in gastric cancer cells. **Oncol Res**, Feb 2018.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIN, F. Y.; CHINTAGUMPALA, M. Advances in Management of Pediatric Ependymomas. **Curr Oncol Rep**, 17, n. 10, p. 47, Oct 2015.

LIOTTA, L. A.; RAO, C. N.; WEWER, U. M. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. **Annu Rev Biochem**, 55, p. 1037-1057, 1986.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, 06 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, 15, n. 12, p. 550, 2014.

LU, Y.; JIANG, F.; ZHENG, X.; KATAKOWSKI, M. et al. TGF- β 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. **Oncol Rep**, 25, n. 5, p. 1329-1335, May 2011.

MAGEE, P.; SHI, L.; GAROFALO, M. Role of microRNAs in chemoresistance. **Ann Transl Med**, 3, n. 21, p. 332, Dec 2015.

MALGULWAR, P. B.; NAMBIRAJAN, A.; PATHAK, P.; RAJESHWARI, M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition-related transcription factors are up-regulated in ependymomas and correlate with a poor prognosis. **Hum Pathol**, 82, p. 149-157, 12 2018.

MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M. J.; EATON, E. N. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, 133, n. 4, p. 704-715, May 2008.

MASSAGUÉ, J.; WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **EMBO J**, 19, n. 8, p. 1745-1754, Apr 2000.

MATSUYAMA, S.; IWADATE, M.; KONDO, M.; SAITOH, M. et al. SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. **Cancer Res**, 63, n. 22, p. 7791-7798, Nov 2003.

MENDRZYK, F.; KORSHUNOV, A.; BENNER, A.; TOEDT, G. et al. Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. **Clin Cancer Res**, 12, n. 7 Pt 1, p. 2070-2079, Apr 2006.

MERCHANT, T. E.; LI, C.; XIONG, X.; KUN, L. E. et al. Conformal radiotherapy after surgery for paediatric ependymoma: a prospective study. **Lancet Oncol**, 10, n. 3, p. 258-266, Mar 2009.

MONTOJO, J.; ZUBERI, K.; RODRIGUEZ, H.; KAZI, F. et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. **Bioinformatics**, 26, n. 22, p. 2927-2928, Nov 2010.

MOON, K.; LEE, H. G.; BAEK, W. K.; LEE, Y. et al. Bortezomib inhibits proliferation, migration, and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of RPE cells. **Mol Vis**, 23, p. 1029-1038, 2017.

MOTTA, F. J.; VALERA, E. T.; LUCIO-ETEROVIC, A. K.; QUEIROZ, R. G. et al. Differential expression of E-cadherin gene in human neuroepithelial tumors. **Genet Mol Res**, 7, n. 2, p. 295-304, Apr 2008.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 16, p. 3573-3584, Aug 2005.

NAGASAWA, D. T.; TRANG, A.; CHOY, W.; SPASIC, M. et al. Genetic expression profiles of adult and pediatric ependymomas: molecular pathways, prognostic indicators, and therapeutic targets. **Clin Neurol Neurosurg**, 115, n. 4, p. 388-399, Apr 2013.

NAWSHAD, A.; LAGAMBA, D.; POLAD, A.; HAY, E. D. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. **Cells Tissues Organs**, 179, n. 1-2, p. 11-23, 2005.

OZAWA, T.; ARORA, S.; SZULZEWSKY, F.; JURIC-SEKHAR, G. et al. A De Novo Mouse Model of C11orf95-RELA Fusion-Driven Ependymoma Identifies Driver Functions in Addition to NF- κ B. **Cell Rep**, 23, n. 13, p. 3787-3797, 06 2018.

PADUA, D.; MASSAGUÉ, J. Roles of TGFbeta in metastasis. **Cell Res**, 19, n. 1, p. 89-102, Jan 2009.

PAJTLER, K. W.; MACK, S. C.; RAMASWAMY, V.; SMITH, C. A. et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. **Acta Neuropathol**, 133, n. 1, p. 5-12, Jan 2017.

PAJTLER, K. W.; WEN, J.; SILL, M.; LIN, T. et al. Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. **Acta Neuropathol**, 136, n. 2, p. 211-226, 08 2018.

PAJTLER, K. W.; WITT, H.; SILL, M.; JONES, D. T. et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. **Cancer Cell**, 27, n. 5, p. 728-743, May 2015.

PALM, T.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CHAPON, F.; LACROIX, C. et al. Expression profiling of ependymomas unravels localization and tumor grade-specific tumorigenesis. **Cancer**, 115, n. 17, p. 3955-3968, Sep 2009.

PANWALKAR, P.; CLARK, J.; RAMASWAMY, V.; HAWES, D. et al. Immunohistochemical analysis of H3K27me3 demonstrates global reduction in group-A childhood posterior fossa ependymoma and is a powerful predictor of outcome. **Acta Neuropathol**, 134, n. 5, p. 705-714, 11 2017.

PAPA, E.; WELLER, M.; WEISS, T.; VENTURA, E. et al. Negative control of the HGF/c-MET pathway by TGF- β : a new look at the regulation of stemness in glioblastoma. **Cell Death Dis**, 8, n. 12, p. 3210, 12 2017.

PARKER, M.; MOHANKUMAR, K. M.; PUNCHIHEWA, C.; WEINLICH, R. et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signalling in ependymoma. **Nature**, 506, n. 7489, p. 451-455, Feb 2014.

PHILLIPS, H. S.; KHARBANDA, S.; CHEN, R.; FORREST, W. F. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, 9, n. 3, p. 157-173, Mar 2006.

PIEK, E.; MOUSTAKAS, A.; KURISAKI, A.; HELDIN, C. H. et al. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. **J Cell Sci**, 112 (Pt 24), p. 4557-4568, Dec 1999.

PIETSCH, T.; WOHLERS, I.; GOSCHZIK, T.; DRESCHMANN, V. et al. Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF- κ B signaling pathway. **Acta Neuropathol**, 127, n. 4, p. 609-611, Apr 2014.

PRINCIPE, D. R.; DOLL, J. A.; BAUER, J.; JUNG, B. et al. TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 2, p. djt369, Feb 2014.

RAGAZZON, B.; CAZABAT, L.; RIZK-RABIN, M.; ASSIE, G. et al. Inactivation of the Carney complex gene 1 (protein kinase A regulatory subunit 1A) inhibits SMAD3 expression and TGF beta-stimulated apoptosis in adrenocortical cells. **Cancer Res**, 69, n. 18, p. 7278-7284, Sep 2009.

ROBERTS, A. B.; TIAN, F.; BYFIELD, S. D.; STUELTEN, C. et al. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. **Cytokine Growth Factor Rev**, 17, n. 1-2, p. 19-27, 2006 Feb-Apr 2006.

ROOPRAI, H. K.; RUCKLIDGE, G. J.; PANOU, C.; PILKINGTON, G. J. The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells. **Br J Cancer**, 82, n. 1, p. 52-55, Jan 2000.

RUSSO, P. S. T.; FERREIRA, G. R.; CARDOZO, L. E.; BÜRGER, M. C. et al. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. **BMC Bioinformatics**, 19, n. 1, p. 56, 02 2018.

SAIKA, S.; IKEDA, K.; YAMANAKA, O.; SATO, M. et al. Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. **Lab Invest**, 84, n. 10, p. 1259-1270, Oct 2004.

SATO, M.; MATSUBARA, T.; ADACHI, J.; HASHIMOTO, Y. et al. Differential Proteome Analysis Identifies TGF- β -Related Pro-Metastatic Proteins in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0126483, 2015.

SEOANE, J. Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. **Carcinogenesis**, 27, n. 11, p. 2148-2156, Nov 2006.

SHARIAT, S. F.; KIM, J. H.; ANDREWS, B.; KATTAN, M. W. et al. Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) strongly predict clinical outcome in patients with bladder carcinoma. **Cancer**, 92, n. 12, p. 2985-2992, Dec 2001.

SHEAHAN, S.; BELLAMY, C. O.; DUNBAR, D. R.; HARRISON, D. J. et al. Deficiency of G1 regulators P53, P21Cip1 and/or pRb decreases hepatocyte sensitivity to TGFbeta cell cycle arrest. **BMC Cancer**, 7, p. 215, Nov 2007.

SHU, C.; WANG, Q.; YAN, X.; WANG, J. Prognostic and microRNA profile analysis for CD44 positive expression pediatric posterior fossa ependymoma. **Clin Transl Oncol**, 20, n. 11, p. 1439-1447, Nov 2018.

SIEBZEHNRL, F. A.; SILVER, D. J.; TUGERTIMUR, B.; DELEYROLLE, L. P. et al. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. **EMBO Mol Med**, 5, n. 8, p. 1196-1212, Aug 2013.

SONG, J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. **Cell Res**, 17, n. 4, p. 289-290, Apr 2007.

SONG, Y. F.; HONG, J. F.; LIU, D. L.; LIN, Q. A. et al. miR-630 targets LMO3 to regulate cell growth and metastasis in lung cancer. **Am J Transl Res**, 7, n. 7, p. 1271-1279, 2015.

SOWAR, K.; STRAESSLE, J.; DONSON, A. M.; HANDLER, M. et al. Predicting which children are at risk for ependymoma relapse. **J Neurooncol**, 78, n. 1, p. 41-46, May 2006.

STOTER M, NIEDERLEIN A, BARSACCHI R et al. CellProfiler and KNIME: open source tools for high content screening. **Methods Mol Biol.** 986:105–122, 2013.

SUN, Y.; CAI, J.; YU, S.; CHEN, S. et al. MiR-630 Inhibits Endothelial-Mesenchymal Transition by Targeting Slug in Traumatic Heterotopic Ossification. **Sci Rep**, 6, p. 22729, Mar 2016.

TIHAN, T et al. The prognostic value of histological grading of posterior fossa ependymomas in children: a Children's Oncology Group study and a review of prognostic factors. **Modern pathology**, v. 21, n. 2, p. 165-177, 2008.

THUAULT, S.; TAN, E. J.; PEINADO, H.; CANO, A. et al. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. **J Biol Chem**, 283, n. 48, p. 33437-33446, Nov 2008.

THOMAS, Dori A.; MASSAGUÉ, Joan. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. **Cancer cell**, v. 8, n. 5, p. 369-380, 2005.

TIAN, M.; NEIL, J. R.; SCHIEMANN, W. P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. **Cell Signal**, 23, n. 6, p. 951-962, Jun 2011.

TONG, H.; YIN, H.; HOSSAIN, M. A.; WANG, Y. et al. Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF- β 1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation. **J Cell Biochem**, 120, n. 4, p. 5118-5127, 04 2019.

VELÁSQUEZ, C.; MANSOURI, S.; MORA, C.; NASSIRI, F. et al. Molecular and Clinical Insights into the Invasive Capacity of Glioblastoma Cells. **J Oncol**, 2019, p. 1740763, 2019.

VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, 17, n. 1, p. 98-110, Jan 2010.

VINCENT, T.; NEVE, E. P.; JOHNSON, J. R.; KUKALEV, A. et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol**, 11, n. 8, p. 943-950, Aug 2009.

XI, S et al. Clinical significance of the histological and molecular characteristics of ependymal tumors: a single institution case series from China. **BMC cancer**, v. 19, n. 1, p. 717, 2019.

WAKEFIELD, L. M.; HILL, C. S. Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 5, p. 328-341, May 2013.

WANG, Q.; LI, Z.; SUN, L.; CHEN, B. et al. Platelets enhance the ability of bone-marrow mesenchymal stem cells to promote cancer metastasis. **Onco Targets Ther**, 11, p. 8251-8263, 2018.

WANI, K.; ARMSTRONG, T. S.; VERA-BOLANOS, E.; RAGHUNATHAN, A. et al. A prognostic gene expression signature in infratentorial ependymoma. **Acta Neuropathol**, 123, n. 5, p. 727-738, May 2012.

WENDT, M. K.; TIAN, M.; SCHIEMANN, W. P. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 85-101, Jan 2012.

WITT, H.; MACK, S. C.; RYZHOVA, M.; BENDER, S. et al. Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. **Cancer Cell**, 20, n. 2, p. 143-157, Aug 2011.

WRIGHT, K. D.; GAJJAR, A. New chemotherapy strategies and biological agents in the treatment of childhood ependymoma. **Childs Nerv Syst**, 25, n. 10, p. 1275-1282, Oct 2009.

XIE, Y. K.; HUO, S. F.; ZHANG, G.; ZHANG, F. et al. CDA-2 induces cell differentiation through suppressing Twist/SLUG signaling via miR-124 in glioma. **J Neurooncol**, 110, n. 2, p. 179-186, Nov 2012.

YADAV, P.; SHANKAR, B. S. Radio resistance in breast cancer cells is mediated through TGF- β signalling, hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and cancer stem cells. **Biomed Pharmacother**, 111, p. 119-130, Mar 2019.

YOKOI, K.; AKIYAMA, M.; YANAGISAWA, T.; TAKAHASHI-FUJIGASAKI, J. et al. Sequential analysis of cadherin expression in a 4-year-old girl with intracranial ependymoma. **Childs Nerv Syst**, 23, n. 2, p. 237-242, Feb 2007.

YU, L.; BAXTER, P. A.; VOICU, H.; GURUSIDDAPPA, S. et al. A clinically relevant orthotopic xenograft model of ependymoma that maintains the genomic signature of the primary tumor and preserves cancer stem cells in vivo. **Neuro Oncol**, 12, n. 6, p. 580-594, Jun 2010.

ZACHAROULIS, S.; ASHLEY, S.; MORENO, L.; GENTET, J. C. et al. Treatment and outcome of children with relapsed ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis. **Childs Nerv Syst**, 26, n. 7, p. 905-911, Jul 2010.

ZELIVIANSKI, S.; COOLEY, A.; KALL, R.; JERUSS, J. S. Cyclin-dependent kinase 4-mediated phosphorylation inhibits Smad3 activity in cyclin D-overexpressing breast cancer cells. **Mol Cancer Res**, 8, n. 10, p. 1375-1387, Oct 2010.

ZHANG, G.; FENG, W.; WU, J. Down-regulation of SEPT9 inhibits glioma progression through suppressing TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Biomed Pharmacother**, 125, p. 109768, May 2020.

ZHANG, L.; WANG, C.; XUE, Z. X. Inhibition of miR-630 enhances the cell resistance to radiation by directly targeting CDC14A in human glioma. **Am J Transl Res**, 9, n. 3, p. 1255-1265, 2017.

ZHANG, Q.; YU, N.; LEE, C. Mysteries of TGF- β Paradox in Benign and Malignant Cells. **Front Oncol**, 4, p. 94, 2014.

ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell Res**, 19, n. 1, p. 128-139, Jan 2009.

ZHENG, P. P.; PANG, J. C.; HUI, A. B.; NG, H. K. Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas. **Cancer Genet Cytogenet**, 122, n. 1, p. 18-25, Oct 2000.

ZHENG, Y.; MIU, Y.; YANG, X.; ZHU, M. CCR7 Mediates TGF- β 1-Induced Human Malignant Glioma Invasion, Migration, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating MMP2/9 Through the Nuclear Factor KappaB Signaling Pathway. **DNA Cell Biol**, 36, n. 10, p. 853-861, Oct 2017.

ZHOU, C. X.; WANG, C. L.; YU, A. L.; WANG, Q. Y. et al. MiR-630 suppresses breast cancer progression by targeting metadherin. **Oncotarget**, 7, n. 2, p. 1288-1299, Jan 2016.

ZHOU, H. Q.; LIU, M. S.; DENG, T. B.; XIE, P. B. et al. The TGF- β /Smad Pathway Inhibitor SB431542 Enhances The Antitumor Effect Of Radiofrequency Ablation On Bladder Cancer Cells. **Onco Targets Ther**, 12, p. 7809-7821, 2019.

ZHOU, S. J.; LIU, F. Y.; ZHANG, A. H.; LIANG, H. F. et al. MicroRNA-199b-5p attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Br J Cancer**, 117, n. 2, p. 233-244, Jul 2017.

ZHOU, Y.; YANG, S.; ZHANG, P. Effect of Exogenous Fetuin-A on TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells. **Biomed Res Int**, 2016, p. 8462615, 2016.

ZHU, J. J.; JILLETTE, N.; LI, X. N.; CHENG, A. W. et al. Correction to: C11orf95-RELA reprograms 3D epigenome in supratentorial ependymoma. **Acta Neuropathol**, 140, n. 6, p. 961-962, Dec 2020.

Anexos

9. Anexos

9.1 Aprovação do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 04 de abril de 2017.

Ofício nº 1001/2017
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 15509/2016

Prezado Pesquisador,

O trabalho intitulado **"INTERAÇÃO ENTRE ALVOS TERAPÊUTICOS EMERGENTES E VIAS DE DESENVOLVIMENTO ASSOCIADAS À TUMORIGÊNESE: ÊNFASE EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE"** – Projeto de Pesquisa **Versão 2 – 08/03/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 447ª Reunião Ordinária realizada em 03/04/2017, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – 09/03/2017.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE
Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(018) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

9.2 Expressão da via TGF- β no banco de dados de EPN GSE64415

Expressão dos genes $TGF-\beta 2$ e $SMAD7$ associado aos dados clínicos de pacientes de ependimoma do banco de dados Pfister (GSE64415).

Apêndices

10. Apêndices

10.1 Ensaio de viabilidade celular para padronização da dose de Puromicina

A dose de Puromicina necessária para selecionar as células transduzidas com o miR-630 foi determinada pelo ensaio de viabilidade celular. Foi selecionada a dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ devido sua capacidade de reduzir as taxas de viabilidade celular com maior eficiência, atingindo um platô a partir do tempo de 48 horas.

Gráfico do ensaio de viabilidade celular na linhagem BXD-1425EPN tratada com Puromicina em gradiente de concentração (0,5 à 5 $\mu\text{g/mL}$), de 24 a 96 horas de tratamento.

10.2 Manuscrito do presente estudo

The role of miR-630 expression in pediatric ependymoma

Keteryne Rodrigues da Silva¹, Mirella Baroni Milan¹, Pablo Ferreira das Chagas¹, Carolina Alves Pereira², Luciana Chain Veronez², Graziella Ribeiro de Souza¹, Kleiton da Silva Borges³, Taciani de Almeida Magalhães³, Rosane de Paula Gomes Queiroz^{1,2}, José Andres Yunes⁴, Suely Kazue Nagahashi Marie⁵, Carlos Alberto Scridelli², Régia Caroline Peixoto-Lira Fusco⁶, Luiz Gonzaga Tone^{1,2}.

1 - Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

2 - Department of Childcare and Pediatrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

3 - Harvard Medical School, Department of Pediatrics, Boston, USA.

4 - Boldrini Children's Center, Campinas, SP, Brazil

5 - Department of Neurology, Medical School of University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

6 - Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triangulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil.

*Author correspondence:

Keteryne Rodrigues da Silva. Department of Genetics- Ribeirao Preto Medical School – FMRP - University of Sao Paulo – USP - Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Phone number: +55 16 33152651

E-mail address: keteryne@usp.br

Keywords: miR-630, ependymoma, TGF- β , epithelial-mesenchymal transition

Abstract

Ependymoma is an invasive central nervous system (CNS) tumor and its prognosis varies for pediatric patients according to the tumor anatomical location, type of treatment and pathological classification. Studies have demonstrated that microRNAs are related to the glioma tumorigenesis and treatment resistance and some of them have described microRNAs as prognostic markers for ependymoma. At this study, miR-630 expression profile was accessed in ependymoma samples,

that showed quite similar levels when compared with non-neoplastic brain samples. However in vitro, miR-630 overexpression was able to modify important cellular functions for the ST-EPN-RELA ependymoma cell line (BXD-1425EPN). Higher levels of miR-630 increased cell apoptosis and decreased cell viability, migration and invasion rates, which were associated with inhibition of the TGF- β /Smad pathway and modulation of EMT markers. This study is the first one to investigate the role of miR-630 in ependymoma and these results suggest that miR-630 may act as tumor suppressor in ependymoma cells by regulating TGF- β signaling pathway.

Introduction

Ependymomas (EPNs) are central nervous system (CNS) tumors that arise from glial cells lining the ventricular system and the medullar spinal cord (Mack et al., 2009). It is the third most common brain tumor in pediatric patients and comprises nine distinct molecular subgroups (Pajtler et al., 2017). In general, EPNs are locally invasive tumors, thus showing frequent local recurrences. However, although rare, dissemination through the CNS is associated with a worse prognosis (Zacharoulis et al., 2010). The current mainstay treatment is surgery with adjuvant radiation therapy. The prognosis varies for pediatric patients according to the tumor anatomical location, type of treatment and pathological classification, however the complete resection without residual disease has presented better clinical outcomes and higher overall survival than partial resection. Until now, there is insufficient evidence to support the use of chemotherapy (Pajtler et al., 2017).

MicroRNAs (miRNAs) are a family of short non-protein-coding RNA molecules that act as post-transcriptional regulators of gene expression. Studies have demonstrated that microRNAs are related to the glioma tumorigenesis (Guo et al., 2014; Kim et al., 2014; Wang et al., 2015) and treatment resistance (Cheng et al., 2010; Gwak et al., 2012; Guo et al., 2014) including ependymoma (Shi et al., 2015; Braoudaki et al., 2016; Margolin-Miller et al., 2017).

Among the huge families of miRNAs, hsa-miR-630 has been reported to potentially function as oncogene or tumor suppressor in several tumors (Galluzzi et al., 2010; Farhana et al., 2013; Cao et al., 2014; Chu et al., 2014a,b; Corcoran et al., 2014; Zhao et al., 2014; Song et al., 2015; Sun et al., 2016; Zhang et al., 2017; Li et al., 2018). The miR-630 is mainly described at the process of migration and invasion of several tumors also associated to the TGF- β pathway (Chen et al., 2016; Sun et al., 2016). Although some microRNAs have been described as prognostic

biomarkers for ependymoma (Costa et al.,2011; Zakrzewska et al.,2016), there is no study which describe the role of miR-630 in this tumor. Based on that, since miRNAs expression has been described to play an important role in malignancies and has emerged as a strong tool in identifying candidate genes involved in their biology, this study aimed to characterize the role of miR-630 in pediatric ependymoma tumorigenesis.

Methodology

RNA isolation and qRT-PCR

MiR-630 expression was investigated in a total of 41 primary EPN samples of pediatric patients diagnosed and treated at Ribeirão Preto Medical School - FMRP / USP, Centro Infantil Boldrini – UNICAMP or Clinical Hospital of São Paulo – USP/SP. The clinical data regarding the patients are presented in Supplementary Table 1. The RNA was isolated from frozen tissues using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was transcribed from 100 ng of RNA using High-Capacity kit (Thermo Fisher Scientific). qRT-PCR was performed in Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR System using the TaqMan probes listed on Supplementary Table 2. Relative gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak; Schmittgen, 2001). The study was approved by the Ethical Committee process number 15509/2016. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations, and informed consent was obtained from the involved patients and their legal guardians.

Cell culture and transduction

The ependymoma cell line BXD-1425EPN was gently provided by Dr. Xiao-Nan Li, a researcher at the Northwestern Medicine – Feinberg School of Medicine - Chicago, USA. BXD-1425EPN is a xenograft model isolated from a 9-year-old male patient classified as the molecular subgroup ST-EPN-RELA (Yu et al., 2010). The cells were grown in 75 cm² bottles, incubated in a humid atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. DMEM High Glucose culture medium (SIGMA, Aldrich, Inc) was used, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, USA), 60 mg/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin.

The miR-630 mimic (HLMIR0861) and negative control (NCLMIR001) were acquired from Sigma Aldrich, Inc. For the cell transduction, BXD-1425EPN cells were seeded in a 96-well

plate at a density of 1×10^4 and 24 hours later, transduction was performed, adding the lentiviruses in each well. 120 hours later, the cells were selected using Puromycin ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$) (P8833 - 25mg - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The MOI (multiplicity of infection) used for the experiments was 10 and the efficiency of miRNA hyperexpression was confirmed using RT-qPCR.

Cell Viability Assay

Viability assay was performed after transduction of BXD-1425EPN cell line with miR-630 mimic or negative control. The cells were seeded in a density of 8×10^3 cells/well in a 96-well plate and the assay was performed using CellTitle according to manufacturer's protocol (Promega). The absorbance of each well was detected at 590 nm after 24, 48 and 72 hours of incubation at 37°C .

Cell cycle Assay

The cell cycle was determined using flow cytometry BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Briefly, the transduced cells were plated in 6-well plates at a density of 3×10^4 cells/well and harvested 24, 48 and 72 hours for the detection of cells in G1, S and G2 stages using the cell cycle analysis kit (Genscript) according to the manufacturer's instructions. Finally, the number of cells in G1, S and G2 stages was analyzed using FlowJo™ Software V.10 (BD Biosciences).

Apoptosis Assay

Cells were seeded in 6-well plates in a density of 4×10^4 cells/well after being transduced with miR-630 mimic or negative control. Cells for apoptosis analysis were collected after 24, 48 and 72 hours, washed twice, and stained with FITC-Annexin V and PI, using the FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) according to the manufacturers. Apoptotic cells were analysed using a FlowJo™ Software V.10 (BD Biosciences).

Wound healing Assay

To determine cell migration, wound healing assay was performed following the protocol described at Liang et al (2007) with some modifications. The transduced cells were seeded at 250.000 cells/well were seeded in 12-well plates with complete culture medium and grown to

confluence overnight. Central wounds were made with a sterile yellow pipette tip, and the debris was washed three times with PBS and then cells were cultured. The speed of wound closure was monitored and photographed at 0 and 24 hours using the software Imaging NIS Elements v5.11. The migrated area was calculated using the software ImageJ 1.51j8 (NIH, EUA).

Invasion Assay

The invasion behavior of the BXD-1425 cells transduced with miR-630 mimic or negative control was determined using 24-well BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers (8-μm pore size polycarbonate filters; BD Biosciences). Briefly, 2×10^4 cells were seeded onto upper chambers pre-treated with 100 μL of Matrigel (4,5%). The cells were cultivated with 200 μL of serum-free media, while complete medium containing 10% FBS was added to the lower chamber. After 24 hours the noninvaded cells were removed with a cotton swab. The invaded cells were fixed in 100% methanol and then stained with crystal violet solution and counted under a microscope (DMI L; Leica Microsystems). The number of cells was calculated using the software ImageJ 1.51j8 (NIH, EUA) and the data are presented as the average number of cells attached to the bottom surface.

In silico analyses

The miR-630 expression in ependymoma was validated in a microarray database in CNS tumors (GSE42657). To find the predicted and validated miR-630 targets, associated with the TGF-β pathway, an analysis was performed using the miRWalk v2.0 software, using the miRanda, miRDB, miRWalk, RNAhybrid, PICTAR2, RNA22 and TargetScan databases, considering a p-value of 0.05 (Dweep et al., 2011). From these genes, the analysis of path enrichment was performed by KEEG pathways, through the online tool Enrichr.

Western-blot

Western blot analysis was performed in lysates from transduced cells to assess TGF-β pathway activation and TEM-related proteins levels. Proteins were extracted using radioimmunoprecipitation assay (RIPA), lysis buffer (Beyotime Biotechnology, Shanghai, P.R. China) supplemented with protease inhibitors (Roche, Guangzhou, P.R. China) and purified and quantified using the BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Appleton, WI, USA). Western blots were

established using a Bio-Rad Bis-Tris Gel system according to the manufacturer's instructions. Briefly, 60g of proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated in the primary antibodies overnight at 4°C: pSMAD3 (48 kDa, ABCAM, Ab52903, 1:1000), E-cadherin (135 kDa, Cell Signaling, 14472, 1:1000), N-cadherin (140 kDa, ABCAM, Ab18203, 1:1000), Slug (30 kDa, Cell Signaling, C1967, 1:1000) and GAPDH (37 KDa, SANTA CRUZ Biotechnology, sc-47724, 1:2500). Finally, the blots were incubated in HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibody for 1 hour at room temperature. The western-blot was revealed using the ECL Western blotting kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) according to the manufacturer's protocols. The signals were captured, and the intensity of the bands was quantified using Image Lab™ Software (Bio-Rad, Laboratories, Inc.).

Statistical Analysis

All experiments were performed with at least three independent experiments and repeated at least three times. The results of the multiple experiments were presented as mean±standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad statistical software Prism 8.0. and SPSS version 18.0 software (IBM, Chicago). The Mann-Whitney test was used for gene expression analyses. The Long-rank test was applied, and Kaplan-Meier curves were constructed to calculate the 5-years event-free (EFS) and 5-years overall (OS) survivals. $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Expression profile of miR-630 in EPN

Levels of mRNA expression of miR-630 was accessed in 41 primary ependymoma patient samples and compared among white matter and ependymal cells (Figure 1A). Besides ependymoma showed low expression of miR-630, there is no statistic difference. It was also analyzed the miR-630 expression among the molecular subgroups of ependymoma which showed no statistical difference. However, it's possible to observe a lower expression between ST-EPN-RELA which is one of the worst prognostic subgroups and ST-EPN-YAP1, one of the better prognostic subgroups (Figure 1B). Due that, miR-630 expression levels were accessed in EPN cell line BXD-1425EPN, which is an ST-EPN-RELA representative, compared with white matter and

ependymal cells (Figure 1A). The EPN cell line also shows a low miR-630 expression compared with white matter but also with no statistical difference. The miR-630 expression profile was validated in a cohort of ependymoma samples (GSE42657) and showed no statistical difference between ependymoma and control samples (Figure 1C). miR-630 expression was associated with clinical parameters of EPN patients and patients who present relapse had a higher expression of miR-630 when compared to samples from patients without relapse (Figure 1D). The other clinical parameters of EPN patients did not show significant results (Supplementary Figure 1). In resume, the results show that besides expression of miR-630 is low in EPN, there is no significant difference when compared with normal tissue.

MiR-630 decrease cell viability and increase apoptosis in EPN cells

In order to explore whether miR-630 acted in EPN cell viability and apoptosis, BXD-1425EPN cells were transduced with miR-630 mimics and employed qRT-PCR to evaluate the miR-630 expression. The miR-630 mimics transduction significantly increased the expression of miR-630 in EPN cells (Figure 2A). After that, viability assay showed that, compared with the control, the miR-630 mimic-transduction cells had a smaller viability at 24, 48 and 72 hours (Figure 2B). Wondering if the rate of apoptotic cells was affected by miR-630, it was performed the apoptosis assay. The flow cytometry analysis indicated that increased miR-630 expression markedly increases the apoptotic rates of EPN cells at 24 and 72 hours (Figure 2C). Cell cycle was accessed as well but there was no significant difference between miR-630 mimic-transduced cells and control at the time points analyzed (Supplementary Figure 2). These data suggested that overexpression of miR-630 play an important role in regulation of cellular viability and apoptosis of EPN cells.

MiR-630 inhibits EPN cells migration, invasion, and EMT in vitro

To analyze whether miR-630 acts on cellular migration and invasion of ependymoma, Wound healing and Matrigel invasion assays were performed. In contrast with control, the wounded area of cells transduced with miR-630 mimic were remarkably wider, indicating that high expression of miR-630 leads to migratory capacity inhibition of EPN cells (Figure 3A). Also, Matrigel assay showed that miR-630 mimic-transduced cells had a lower capacity of invasion

compared with control cells (Figure 3B). Due these results, it was investigated if miR-630 affected epithelial-mesenchymal transition process in EPN. Expression levels of EMT markers, E-cadherin (*CDH1*) and N-cadherin (*CDH2*), were accessed after miR-630 transduction, finding a notable reduction in mRNA and protein (Figure 3C) levels but not significative. Thus, these data suggest that miR-630 up-regulation suppressed the invasiveness capacity of EPN cells maybe affecting EMT.

MiR-630 regulates the expression of TGF- β signaling pathway

The next step was to investigate if the process by the miR-630 EMT-regulation in EPN could be associated with TGF- β pathway. TGF- β is a well-studied pathway orchestrating diverse aspects of cancer, including EMT. TargetScan showed TGF- β genes as validated and predicts targets for miR-630 as well as the enrichment pathway analyze (Figure 4A). Therefore, it was investigated whether miR-630 could modulate this signaling pathway since the previous findings suggested that miR-630 was involved in regulation of invasiveness and EMT process in EPN. The results from qRT-PCR and Western-blot (Figure 4B) assays indicates that high expression of miR-630 resulted in a significant decline of TGF- β components. In summary, these results suggested that high expression of miR-630 decrease TGF- β signaling activity, suggesting that this singling pathway can be a target for this microRNA in EPN.

Discussion

In general, microRNAs that are high-expressed in tumors contribute to oncogenesis by down-regulating tumor suppressor genes (Meng et al., 2007), whereas down-expressed microRNAs may cause increased expression of an oncogene (Mayr, Hemann and Bartel, 2007). Low expression of miR-630 was observed in gliomas cell lines, mainly after radiation therapy (Zhang et al., 2017). Previous studies demonstrated that overexpression of miR-630 inhibited invasion and metastasis process (Jin et al., 2016; Pan et al., 2019), EMT (Pan et al., 2019) and increase apoptosis (Eoh et al., 2018; Pan et al., 2019) in other tumors. However, there is no study at this moment which shows miR-630 behavior in ependymoma.

In this study it was evaluated miR-630 expression levels in 41 primary patient samples and normal tissue, ependymoma cell line (BXD-1425EPN) and in an ependymoma databases

(GSE42657). Besides there is no significant difference between normal tissues and ependymoma sample, it is possible to observe the ependymoma express miR-630 in a low level. Furthermore, it was demonstrated that miR-630 overexpression leads to cell viability suppression and promotes apoptosis.

The modulation of miR-630 expression has been associated with several cellular processes, mainly in migration, cell invasion and epithelium-mesenchymal transition (EMT). EMT process occurs when epithelial cells lose epithelial markers (E-cadherin) and transform into mesenchymal phenotype increasing expression of mesenchymal markers (N-cadherin, Vimentin) (Chafer et al., 2016). EMT is an essential step in invasion and metastasis of human tumors (Yang et al., 2008; Katsuno et al., 2013; Diepenbruck et al., 2016; Pan et al., 2019).

Therefore, the possible effect of miR-630 modulation on EPN cell invasion and migration was investigated. The overexpression of miR-630 in the BXD-1425EPN cell line led to a significant reduction of cell migration rate, as well as a significant reduction of cell invasion rate, thus suggesting that miR-630 acts in the regulation of migration processes and cell invasion, thus contributing to the more aggressive profile of EPN. We further explored whether miR-630 was involved in the regulation of EMT progress in EPN. There was no significant difference in the TEM markers expression after overexpression of miR-630 compared with control cells, however it is possible to observe a lower expression of N-cadherin (gene and protein levels) and Slug (protein level).

Some studies have associated the miR-630 expression with TGF- β pathway modulation (Chen et al., 2016; Sun et al., 2016; Li et al., 2018). Chen et al (2016) demonstrated a TGF- β -miR-630-Slug interaction in the TEM process of hepatocarcinoma cells. Li et al (2018) demonstrated that, in gastric cancer cells, miR-630 reduces TGF- β 1-mediated TEM. Therefore, the possible effect of miR-630 expression was investigated on TGF- β pathway modulation in ependymoma. The results suggested that overexpression of miR-630 directly inhibited the phosphorylation of Smad3 and mRNA level of TGF- β /Smad components.

This study was the first to investigate the miR-630 role in ependymoma. Here it was shown some evidence which indicate that miR-630 may acts as tumor suppressor in ependymoma by regulating TGF- β signaling pathway. From this, further investigations are needed to define and better understand the mechanism of miR-630-TGF- β and its role in ependymoma malignancy.

Acknowledgements

We thank Xio Nan-Li that kindly provided the BXD-1425EPN cell line for this study.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Support and financial disclosure declaration

This study was supported by grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP process number: 2016-19799-7 and 2018-25924-4).

References

- BRAOUDAKI, M.; LAMBROU, G. I.; GIANNIKOU, K.; PAPADODIMA, S. A. et al. miR-15a and miR-24-1 as putative prognostic microRNA signatures for pediatric pilocytic astrocytomas and ependymomas. *Tumour Biol*, 37, n. 7, p. 9887-9897, Jul 2016.
- CAO JX, LI SY, AN GS, MAO ZB, JIA HT; NI JH. E2F1-regulated DROSHA promotes miR-630 biosynthesis in cisplatin-exposed cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 450: 470-475. 2014.
- CHAFFER CL, SAN JUAN BP, LIM E, WEINBERG RA . EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* , 35: 645-654.2016.
- CHEN, W. X.; ZHANG, Z. G.; DING, Z. Y.; LIANG, H. F. et al. MicroRNA-630 suppresses tumor metastasis through the TGF- β - miR-630-Slug signaling pathway and correlates inversely with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7, n. 16, p. 22674-22686, Apr 2016.
- CHEN G, ZHU W, SHI D, LV L, ZHANG C, LIU P; HU W. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol Rep*; 23: 997-1003. 2010.

CHU, D.; ZHAO, Z.; LI, Y.; LI, J. et al. Increased microRNA-630 expression in gastric cancer is associated with poor overall survival. PLoS One, 9, n. 3, p. e90526, 2014a.

CHU, D.; ZHENG, J.; LI, J.; LI, Y. et al. MicroRNA-630 is a prognostic marker for patients with colorectal cancer. Tumour Biol, 35, n. 10, p. 9787-9792, Oct 2014b.

CORCORAN, C et al. miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. Molecular cancer, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

COSTA, F. F.; BISCHOF, J. M.; VANIN, E. F.; LULLA, R. R. et al. Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma. PLoS One, 6, n. 10, p. e25114, 2011.

DIEPENBRUCK, M., AND CHRISTOFORI, G. Epithelial mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? Curr. Opin. Cell Biol., 43, 713.2016.

DWEEP, H.; STICHT, C.; PANDEY, P.; GRETZ, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. J Biomed Inform, 44, n. 5, p. 839-847, Oct 2011.

EOH, Kyung Jin et al. MicroRNA-630 inhibitor sensitizes chemoresistant ovarian cancer to chemotherapy by enhancing apoptosis. Biochemical and biophysical research communications, v. 497, n. 2, p. 513-520, 2018.

FARHANA, L et al. Upregulation of miR-150* and miR-630 induces apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting IGF-1R. PloS one, v. 8, n. 5, p. e61015, 2013.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; VITALE, I.; KEPP, O. et al. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. Cancer Res, 70, n. 5, p. 1793-1803, Mar 2010.

GUO M, JIANG Z, ZHANG X, LU D, HA AD, SUN J, DU W, WU Z, HU L, KHADARIAN K, SHEN J AND LIN Z. miR-656 inhibits glioma tumorigenesis through repression of BMPR1A. *Carcinogenesis*; 35: 1698-1706.2014

GUO P, LAN J, GE J, NIE Q, GUO L, QIU Y AND MAO Q. MiR-26a enhances the radiosensitivity of glioblastoma multiforme cells through targeting of ataxia-telangiectasia mutated. *Exp Cell Res*; 320: 200-208.2014.

GWAK HS, KIM TH, JO GH, KIM YJ, KWAK HJ, KIM JH, YIN J, YOO H, LEE SH; PARK JB. Silencing of MicroRNA-21 Confers Radio-Sensitivity through Inhibition of the PI3K/AKT Pathway and Enhancing Autophagy in Malignant Glioma Cell Lines. *PLoS One*; 7: e47449. 2012.

JIN, L.; YI, J.; GAO, Y.; HAN, S. et al. MiR-630 inhibits invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48, n. 9, p. 810-819, Sep 2016.

KATSUNO, Y., LAMOUILLE, S., AND DERYNCK, R. TGF- β signaling and epithelial mesenchymal transition in cancer progression, *Curr. Opin. Oncol.*, 25, 7684.2013.

KIM J, ZHANG Y, SKALSKI M, HAYES J, KEFAS B, SCHIFF D, PUROW B, PARSONS S, LAWLER S and ABOUNADER R. microRNA-148a is a prognostic oncomiR that targets MIG6 and BIM to regulate EGFR and apoptosis in glioblastoma. *Cancer Res*; 74: 1541-1553. 2014.

LI, D.; TIAN, B.; JIN, X. miR-630 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by regulating Wnt/betacatenin pathway in gastric cancer cells. *Oncol Res*, Feb 2018.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001

MACK, S. C.; TAYLOR, M. D. The genetic and epigenetic basis of ependymoma. *Childs Nerv Syst*, 25, n. 10, p. 1195-1201, Oct 2009

MARGOLIN-MILLER, Y.; YANICHKIN, N.; SHICHRUR, K.; TOLEDANO, H. et al. Prognostic relevance of miR-124-3p and its target TP53INP1 in pediatric ependymoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 56, n. 8, p. 639-650, 08 2017.

MAYR, C; HEMANN, M T.; BARTEL, D P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, v. 315, n. 5818, p. 1576-1579, 2007.

MENG, F et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, v. 133, n. 2, p. 647-658, 2007.

PAJTLER, K. W.; MACK, S. C.; RAMASWAMY, V.; SMITH, C. A. et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathol*, 133, n. 1, p. 5-12, Jan 2017

PAN, X. M. et al. MiR-630 inhibits papillary thyroid carcinoma cell growth, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition by suppressing JAK2/STAT3 signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 23, n. 6, p. 2453-2460, 2019.

SHI, Rui et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget*, v. 6, n. 29, p. 26971, 2015.

SONG, Y. F.; HONG, J. F.; LIU, D. L.; LIN, Q. A. et al. miR-630 targets LMO3 to regulate cell growth and metastasis in lung cancer. *Am J Transl Res*, 7, n. 7, p. 1271-1279, 2015.

SUN, Y.; CAI, J.; YU, S.; CHEN, S. et al. MiR-630 Inhibits Endothelial-Mesenchymal Transition by Targeting Slug in Traumatic Heterotopic Ossification. *Sci Rep*, 6, p. 22729, Mar 2016.

YANG, J., AND WEINBERG, R. A. Epithelial mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumormetastasis, *Dev. Cell*, 14, 818829.2008.

YU, L.; BAXTER, P. A.; VOICU, H.; GURUSIDDAPPA, S. et al. A clinically relevant orthotopic xenograft model of ependymoma that maintains the genomic signature of the primary tumor and preserves cancer stem cells in vivo. *Neuro Oncol*, 12, n. 6, p. 580-594, Jun 2010.

WANG Z, WANG B, SHI Y, XU C, et al. Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. *Oncogene* ; 34: 1407-1419.2015.

ZACHAROULIS, S.; ASHLEY, S.; MORENO, L.; GENTET, J. C. et al. Treatment and outcome of children with relapsed ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis. *Childs Nerv Syst*, 26, n. 7, p. 905-911, Jul 2010.

ZAKRZEWSKA, M.; FENDLER, W.; ZAKRZEWSKI, K.; SIKORSKA, B. et al. Altered MicroRNA Expression Is Associated with Tumor Grade, Molecular Background and Outcome in Childhood Infratentorial Ependymoma. *PLoS One*, 11, n. 7, p. e0158464, 2016.

ZHANG, L.; WANG, C.; XUE, Z. X. Inhibition of miR-630 enhances the cell resistance to radiation by directly targeting CDC14A in human glioma. *Am J Transl Res*, 9, n. 3, p. 1255-1265, 2017.

ZHAO, J. J.; CHEN, P. J.; DUAN, R. Q.; LI, K. J. et al. Up-regulation of miR-630 in clear cell renal cell carcinoma is associated with lower overall survival. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, n. 6, p. 3318-3323, 2014.

Figures

Figure 1: Relative expression of miR-630 in EPN. A) miR-630 expression in white matter, non-neoplastic ependymal cells, ependymoma and cell lines of EPN (BXD-1425EPN) by qRT-PCR analysis; B) miR-630 expression in EPN according to molecular subgroups; C) In silico analysis of miR-630 expression; D) miR-630 expression associated with absence and presence of relapse.

Figure 2: A) Hyperexpression of miR-630 in EPN cell line; B) Cell viability after transduction of BXD-1425EPN cells with miR-630 mimic and control; C) Apoptotic analysis through the percentage of positive cells for annexin and/or PI.

Figure 3: A) Wound healing assay after miR-630 hyperexpression; B) Invasion (Matrigel) assay after transduction with miR-630 mimic and control; C) TEM profile – Gene and protein expression of E-cadherin (CDH1), N-cadherin (CDH2) and SLUG.

Figure 4: miR-630 target genes from TGF- β pathway. A) Pathway enrichment analysis with the genes correlated with miR-630 expression; B) Gene and protein expression of TGF- β /Smad pathway after hyperexpression of miR-630.

Supplementary data

Supplementary Table 1: Clinical data from EPN patients.

Parameters	Molecular Subgroups					
	ST-EPN- RELA (N = 4) n (%)	ST-EPN-YAP1 (N = 2) n (%)	ST-EPN- NMS (N = 9) n (%)	PF-EPN-A (N = 10) n (%)	PF-EPN-B (N = 3) n (%)	PF-EPN- NMS (N = 13) n (%)
Sex						
Male	2 (50 %)	0	6 (66.7 %)	6 (60 %)	0	5 (38.5 %)
Female	2 (50 %)	2 (100 %)	3 (33.3 %)	4 (40 %)	3 (100 %)	8 (61.5 %)
Age						
< 3 years old	1 (25 %)	2 (100%)	1 (11.1 %)	6 (60 %)	0	4 (30.8 %)
> 3 years old	3 (75 %)	0	8 (88.9 %)	4 (40 %)	3 (100 %)	9 (69.2 %)
Histology						

Grade II	3 (75 %)	0	1 (11.1 %)	6 (60 %)	2 (66.7 %)	10 (77 %)
Grade III	1 (25 %)	2 (100 %)	8 (88.9 %)	4 (40 %)	1 (33.3 %)	3 (23 %)
Resection						
Partial	0	0	6 (66.7 %)	5 (50 %)	2 (66.7 %)	3 (23%)
Total	4 (100%)	2 (100 %)	3 (33.3 %)	5 (50 %)	1 (33.3 %)	9 (69.2 %)
Relapse						
Yes	2 (50 %)	1 (50 %)	4 (44.4 %)	5 (50 %)	1 (33.3 %)	6 (46 %)
No	1 (25 %)	1 (50 %)	5 (55.6 %)	5 (50 %)	2 (66.7 %)	5 (38,5 %)
Metastasis						
Yes	1 (25 %)	0	1 (11.1 %)	2 (20 %)	3 (100 %)	1 (8 %)
No	2 (50 %)	2 (100 %)	8 (88.9 %)	8 (80 %)	0	11 (85 %)
Status						
Alive	2 (50 %)	2 (100%)	6 (66.7 %)	5 (50 %)	1 (33.3 %)	8 (61.5 %)
Death	1 (25 %)	0	3 (33.3 %)	4 (40 %)	2 (66.7 %)	4 (31 %)
Treatment						
Surgery	2 (50 %)	1 (50 %)	2 (22.2 %)	2 (20 %)	1 (33.3 %)	0
Surgery + Radiotherapy	0	0	0	1 (10 %)	1 (33.3 %)	5 (38.5 %)
Surgery + Chemotherapy	0	1 (50 %)	1 (11.1 %)	3 (30 %)	0	3 (23 %)
Surgery, Chemotherapy and Radiotherapy	2 (50 %)	0	5 (55.6 %)	2 (20 %)	1 (33.3 %)	1 (8%)

Supplementary Table 2:**Table 2:** Taqman probes used for qRT-PCR technique. ID: Identification.

GENE ID	Assay ID
<i>SMAD3</i>	Hs00969210_m1
<i>SMAD7</i>	Hs00998193_m1
<i>TGF-β1</i>	Hs99999918_m1
<i>TGF-βR1</i>	Hs00610320_m1
<i>TGF-βR2</i>	Hs00234253_m1
<i>GUSB</i>	Hs00939627_m1
<i>HPRT</i>	Mm03024075_m1
hsa-miR-630	479113_mir
<i>RNU6b</i>	001093
<i>RNU44</i>	001094

Supplementary Figure 1: Relative expression of miR-630 associated with clinical parameters of EPN patients: A) Sex; B) Age; C) Histology; D) Resection; E) Metastasis; F) Status; G) Treatment; H) Event-free survival curve; I) Overall survival curve.

Supplementary Figure 2: Cell cycle analyses of EPN cells after transduction with miR-630 mimic.