UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

AUGUSTO FARIA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DA
ZEBULARINA EM MEDULOBLASTOMA**

Ribeirão Preto - SP

2016

AUGUSTO FARIA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DA
ZEBULARINA EM MEDULOBLASTOMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento
de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências, área de
concentração Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto - SP

2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Andrade, Augusto Faria

“Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em meduloblastoma”.
Ribeirão Preto, 2016.

125f. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências, área de concentração Genética.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga

1. Meduloblastoma. 2. Zebularina. 3. Epigenética. 4. DNA metiltransferases.

Apoio e Suporte Financeiro

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2011/22440-7).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 478974/2013-2).
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Augusto Faria Andrade

Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em meduloblastoma

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de concentração Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais **Rosana e Adnilson**, pelo amor incondicional.
Grandes incentivadores dos meus estudos e conselheiros.*

*Ao meu irmão **Cássio**, por todo o incentivo durante toda a
minha trajetória.*

*À minha noiva e futura esposa **Alecassandra**, por acreditar em mim, pela confiança e apoio incondicional. Muito obrigado por todo amor e carinho durante esta caminhada.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone**, meu orientador, que demonstrou confiança desde o início e me mostrou como ser um profissional ético, eficiente e humano. Sou imensamente grato pela atenção e disponibilidade durante todo o processo da minha formação.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto Scrideli** pelo apoio e pela ajuda dispensada sempre que necessário. Sua motivação durante as discussões sempre nos deu animo para continuar e buscar mais resultados.

À Dra. **Céline Gongora** pela oportunidade de estagiar no seu laboratório no INSERM – IRCM, sempre compartilhou seu conhecimento e esteve disponível. Esse período foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

À professora e amiga Dr^a **Vanessa da Silva Silveira**, exemplo de profissionalismo. Muito obrigado pelas sugestões e amizade desde meu primeiro dia na pós-graduação.

À técnica Dra. **Rosane Gomes de Paula Queiroz** pela amizade e ajuda em todas as minhas atividades no laboratório.

À técnica e amiga MSc **Veridiana Kill Suazo** por toda a ajuda com os experimentos realizados. Sempre contribuiu com uma boa vontade imensa em todas as minhas atividades no laboratório e fez dele um lugar mais alegre.

À Profa. Dr^a **Maria Sol Brassesco**, pela disponibilidade e assessoria científica.

Aos meus amigos e parceiros de bancada **Kleiton Silva Borges** e **Angel Maurício Castro Gamero**, obrigado pela paciência e ensino durante todo este tempo. Obrigado pelas discussões científicas e momentos de descontração. Vocês são exemplos de amigos e profissionais.

Ao meu amigo **Gustavo Alencastro Cruzeiro**, pelos momentos de descontração e amizade dentro e fora do laboratório.

Às meus queridos amigos de laboratório **Andrea, Caio, Camilla, Carol, Daniel, Gabi Molinari, Gabi Vieira, Guilherme, Karina, Lenisa, Marcela, Mariana, Mirella, Pamela, Régia, Rodrigo e Silvinha**. Fazem do ambiente de trabalho um local familiar. Obrigado pela torcida e pelo apoio em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria **Aide Barbosa, Sônia Scandusi e Lucimar Fernandes** pelo apoio e agradável convivência.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon e Silvia Sant'anna Consiglieri** e à secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelize Visconte**, pela atenção e ajuda.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)** pela concessão da bolsa de doutorado.

À **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)** pelo auxílio financeiro.

Aos meus **avós, tios, primos, sogros e cunhados** que sempre torceram e me deram tantos momentos de alegria.

Aos meus amigos **André, Ygor, Thiago, Pedro, Juninho e Murilo**, obrigado pela torcida e amizade de tanto tempo.

Aos amigos de Ribeirão Preto **João Paulo, Ciro, Igor e Rodrigo (Aguero)** que me ajudaram na convivência dessa nova cidade.

Aos amigos do *IRCM* **Joelle, Marianne, Toufic, Vincent e William** por toda amizade quando estava em um país novo. *Merci à tous!*

À **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

***“Se quiser ir rápido, vá só;
Se quiser ir mais longe, vamos juntos.”***

Provérbio Africano

RESUMO

Andrade, AF. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em meduloblastoma.** 2016, 125f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O meduloblastoma (MB) é um câncer do sistema nervoso central, de origem embrionária, que surge no cerebelo. É o tumor maligno cerebral mais frequente na infância e corresponde a aproximadamente 20% de todos os tumores intracranianos pediátricos. Atualmente, o tratamento é realizado com cirurgia, quimioterapia e radioterapia e está relacionado com diversos efeitos colaterais em médio e longo prazo. Diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento e progressão, entre estes, alterações nas vias de sinalização, como a *Sonic Hedgehog* (SHH) e *Wingless*. As modificações nos padrões epigenéticos, como a metilação do DNA, tem também um papel central na biologia deste tumor. Tais alterações comprometem funções básicas da célula como o controle da proliferação, sobrevivência celular e apoptose. Drogas epigenéticas como os inibidores de DNA metiltransferases (DNMTs) têm demonstrado efeitos antineoplásicos e resultados promissores para terapia do câncer. A Zebularina é um inibidor de DNMTs, que consequentemente reduz a metilação do DNA, e tem se mostrado uma importante droga antitumoral, com baixa toxicidade e atividade adjuvante à quimioterapia em tumores quimio-resistentes. Diversos estudos têm descrito seus efeitos em diferentes tipos de neoplasias, entretanto, não há relatos da sua ação em MB. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os potenciais efeitos antineoplásicos da Zebularina em quatro linhagens de MB pediátrico (DAOY, ONS-76, UW402 e UW473). Foi observado que o tratamento com a Zebularina promoveu inibição da proliferação celular e da capacidade clonogênica, aumentou o número de células apoptóticas e células na fase S do ciclo celular ($p < 0,05$). Adicionalmente, o tratamento induziu um aumento na expressão proteica de p53, p21 e Bax e uma diminuição da ciclina A, Bcl-2 e Survivina. Além disso, quando combinada com o quimioterápico vincristina agiu de modo sinérgico; e de modo antagônico quando combinada com a cisplatina. Através de análises de expressão gênica em larga escala (plataforma Agilent de *microarray*), foi encontrada diferentes vias moduladas pela droga, incluindo a dos Receptores *Toll-Like* e o aumento dos genes *SUFU* e *BATF2*. Aqui, foi encontrado que a Zebularina pode modular a ativação da via SHH, reduzindo os níveis de *SMO*, de *GLI1* e de um de seus alvos, o *PTCH1*; contudo sem alterar os níveis de *SUFU*. Confirmou-se que o gene *BATF2* é induzido pela Zebularina e possui regiões ricamente metiladas. Além disso, a baixa expressão do gene *BATF2* está associada à um pior prognóstico em MB. Todos esses dados sugerem que a Zebularina pode ser uma droga em potencial para o tratamento adjuvante do MB.

Palavras-chave: meduloblastoma, Zebularina, epigenética, DNA metiltransferases.

ABSTRACT

Andrade, AF. **Evaluation of antineoplastic effects of Zebularine in medulloblastoma.** 2016, 125f. Doctoral Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Medulloblastoma (MB) is an embryonal cerebellum tumor. It is the most common brain malignancy in children and accounts for approximately 20% of all pediatric intracranial tumors. Currently, treatment consists of surgery, chemotherapy and radiation and is associated to medium- and long-term side effects. Several factors contribute to the development and progression of MB, for instance, alterations in signaling pathways, such as Sonic Hedgehog (SHH) and Wntless. Epigenetic changes in DNA methylation patterns also play a central role in the biology of this tumor. Such changes are able to alter basic cell functions, controlling cell proliferation, survival and apoptosis. Epigenetic drugs as DNA methyltransferases (DNMTs) inhibitors have shown anticancer effects and promising results for cancer therapy. Zebularine is a low toxicity DNMTs inhibitor that induces DNA demethylation and has been reported as an important antitumor drug with adjuvant activity to chemotherapy in chemo-resistant tumors. Studies have described its effects on different types of cancer, however, there are not data concerning its action in MB. Therefore, this study aimed to analyze the potential anticancer effects of Zebularine in four pediatric MB lines (UW402, UW473, ONS-76 and DAOY). It was observed that treatment with Zebularine promoted inhibition of cell proliferation and clonogenic capacity, increased the number of apoptosis rate and cells in S phase of the cycle ($p < 0.05$). In addition, the treatment induced an increasing in the protein expression of p53, p21 and Bax and a decreasing in cyclin A, Survivin and Bcl-2. Also, when combined with the chemotherapeutic agent vincristine acted synergistically but resulted in antagonism when combined with cisplatin. Through large-scale gene expression analysis (Agilent microarray platform), it was found different pathways modulated by Zebularine, including the Toll-Like Receptors pathway and the overexpression of *SUFU* and *BATF2* genes. Zebularine was able to modulate SHH pathway activation, by reducing levels of *SMO*, *GLI1* and one of its targets, *PTCH1*, whereas there were no changes in *SUFU* levels. It was confirmed that the gene *BATF2* is induced by Zebularine and contains regions richly methylated. In addition, *BATF2* low expression is associated with a worse prognosis in MB. All these data suggest that Zebularine may be a potential drug for the adjuvant treatment of MB.

Keywords: medulloblastoma, Zebularine, epigenetics, DNA methyltransferases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão proteica de DNMT1 após tratamento com Zebularina por <i>western blotting</i> nas linhagens celulares de meduloblastoma	41
Figura 2. Zebularina inibiu a proliferação das linhagens celulares de meduloblastoma.....	42
Figura 3. Zebularina reduz a capacidade clonogênica das linhagens celulares de meduloblastoma	44
Figura 4. Expressão proteica de p53 e p21 após tratamento com Zebularina por <i>western blotting</i> nas linhagens celulares de meduloblastoma	45
Figura 5. Combinação entre a Zebularina e os quimioterápicos Cisplatina e Vincristina em linhagens de meduloblastoma.....	47
Figura 6. Zebularina induz acúmulo de células na fase S do ciclo celular nas linhagens de meduloblastoma.....	48
Figura 7. Expressão proteica da ciclina A após tratamento das linhagens celulares de meduloblastoma com Zebularina.....	49
Figura 8. A Zebularina induz apoptose nas linhagens de meduloblastoma	50
Figura 9. Expressão proteica de Bax, Bcl-2 e Survivina após tratamento com Zebularina por <i>western blotting</i> nas linhagens celulares de meduloblastoma.....	51
Figura 10. A Zebularina induziu morte celular por apoptose em cultura primária de meduloblastoma.....	52
Figura 11. Genes da via dos Receptores Toll-Like modulados pela Zebularina encontrados no ensaio de microarray	54
Figura 12. Perfil dos componentes da via SHH após o tratamento com Zebularina nas linhagens celulares de meduloblastoma	55
Figura 13. Expressão do gene <i>BATF2</i> após o tratamento com Zebularina na linhagem DAOY.....	56

Figura 14. Níveis de 5-mC em regiões dos genes <i>BATF2</i> e <i>GAPDH</i>	57
Figura 15. Perfil de expressão do gene <i>BATF2</i>	59
Figura 16. Perfil de expressão gênica do <i>BATF2</i> de acordo com as características clínicas dos pacientes portadores de meduloblastoma.....	60
Figura 17. Sobrevida Livre de Eventos de acordo com a expressão relativa do gene <i>BATF2</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> de duas regiões ricas em CG utilizadas para avaliação do nível de metilação do gene <i>BATF2</i>	38
Tabela 2. Valores de IC50 obtidos no ensaio de proliferação celular para as linhagens de meduloblastoma após o tratamento com Zebularina	43
Tabela 3. Doses necessárias para induzir 50% de inibição do crescimento celular (IC50) nas linhagens de MB, após 72 h de tratamento, com as drogas Zebularina, CIS e VCR.....	46
Tabela 4. Esquema de combinação de drogas avaliado por ensaios de proliferação celular ..	46
Tabela 5. Vias alteradas após o tratamento com a zebularina através do ensaio de <i>microarray</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-Aza-C	5-azacytidine
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CI	Índice de combinação
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpG	citossina fosfato guanina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3A	DNA metiltransferase 3a
DNMT3B	DNA metiltransferase 3b
Fa	Fração afetada
HDAC	Histona desacetilase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	iodeto de propídio
qRT-PCR	Real Time quantitative reverse transcription PCR
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
XTT	Sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
h	Horas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
rpm	Rotações por minuto

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Meduloblastoma	20
1.2 A metilação do DNA e o câncer.....	23
1.3 A metilação do DNA como alvo antitumoral	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3. Material e Métodos	30
3.1 Delineamento Experimental.....	30
3.2 Casuística e coleta das amostras	30
3.3 Linhagens Celulares e Cultura primária de MB.....	31
3.4 Preparação das drogas.....	32
3.5 Ensaios Funcionais	33
3.6 Análise da combinação entre drogas.....	34
3.7 Extração de mRNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	35
3.8 Microarray.....	36
3.9 Western blotting.....	36
3.10 Estudo do nível de metilação no gene <i>BATF2</i> nas amostras de meduloblastoma.....	37
3.11 Análise Estatística	39
4. Resultados	41
4.1 Zebularina inibe a proteína DNMT1 em linhagens de meduloblastoma.....	41
4.2 Zebularina reduz a proliferação celular e a capacidade clonogênica das linhagens de meduloblastoma	41
4.3 A Zebularina age sinergicamente com a vincristina, porém de forma antagônica com a cisplatina	45
4.4 A Zebularina induz acúmulo de células na fase S do ciclo celular nas linhagens de meduloblastoma.....	47
4.5 A Zebularina induz morte celular por apoptose em células de meduloblastoma...	49
4.6 Zebularina induz aumento no número de células apoptóticas em cultura primária de MB	52
4.7 Zebularina promove a modulação de diferentes vias de sinalização relacionadas ao câncer.....	52
5. Discussão	63
6. Conclusões.....	73
7. Referências Bibliográficas	75
8. Apêndice	88
9. Anexos.....	98

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Meduloblastoma

O meduloblastoma (MB) é um tumor maligno do sistema nervoso central (SNC) com origem no cerebelo (Huse & Holland, 2010). A maioria de suas células é indiferenciada, possuindo características de células-tronco multipotentes, contudo sinais de diferenciação podem ser encontrados (Fan & Eberhart, 2008). Apesar da exata origem celular do tumor ainda ser questionável, acredita-se que ele seja originário de células-tronco neurais precursoras presentes na camada de células granulares do cerebelo (Crawford et al., 2007), podendo variar dependendo do subgrupo molecular (Northcott et al., 2011). Na maioria dos casos de MB, o tumor apresenta-se confinado na fossa posterior, porém sua disseminação pelo eixo cranioespinal é encontrada em 11-40% dos pacientes e é um dos mais importantes marcadores de prognóstico (Rood et al., 2004).

O MB perfaz aproximadamente 20% de todos os tumores intracranianos em crianças e 40% de todos os tumores de fossa posterior pediátricos (CBTRUS, 2008), sendo considerado o tumor cerebral maligno mais comum em crianças, principalmente, do sexo masculino (Pfister et al., 2010; Hatten & Roussel, 2011). O pico de incidência ocorre em crianças de 5 a 7 anos de idade, no entanto, cerca de 25-35% dos casos de MB ocorrem em crianças menores de três anos e 10% desses casos são diagnosticados no primeiro ano de vida. Embora o MB possa acometer também adultos, sua ocorrência representa menos de 1% dos tumores do SNC nessa faixa etária (Chan et al., 2000; Crawford et al., 2007).

A estratificação de risco atual é baseada, principalmente, em aspectos clínicos como idade no momento do diagnóstico, extensão da ressecção cirúrgica, presença de disseminação e, também, a histologia do tumor. Lactentes (≤ 3 anos de idade), pacientes com tumor residual ($\geq 1,5 \text{ cm}^2$ de tamanho) após neurocirurgia e aqueles que exibem disseminação pelas leptomeninges no momento do diagnóstico são considerados de alto risco, e os demais são considerados de risco médio (Packer & Vezina, 2008). Pacientes portadores de MB, frequentemente, apresentam aumento da pressão intracraniana, acarretando cefaléia matinal, vômito, irritabilidade, ataxia, náusea e letargia (Halperin & Friedmann, 1996; Dhall, 2009).

O tratamento padrão inclui quimioterapia (comumente usa-se derivados de platina (cisplatina), agentes alquilantes (lomustina, ciclofosfamida, ifosfamida), epipodofilotoxinas (etoposídeo) e alcaloides da vinca (vincristina), entre outros), cirurgia, e dependendo da idade do paciente, a radioterapia crânio-espinal, a qual é preferencialmente utilizada para pacientes

com mais de 3 anos de idade (Crawford et al., 2007; Carlotti et al., 2008). O grande dilema deste tipo de tratamento é o risco de sequelas neurocognitivas, no crescimento e no sistema endócrino, o que levam, portanto, à busca de tratamentos que apresentem menores efeitos tóxicos ou que diminuam as doses da quimioterapia ou da radiação, já que esta causa significantes efeitos tardios (Spiegler et al., 2004; Srivastava e Nalbantoglu, 2010).

A taxa de sobrevida livre de eventos em cinco anos (SLE) para pacientes com prognóstico favorável é de aproximadamente 80% e para pacientes com prognóstico desfavorável é de aproximadamente 40% (Grill & Bhangoo, 2007; Northcott et al., 2012). Pacientes tratados exclusivamente com cirurgia e radioterapia apresentam uma taxa de sobrevida de 24-40%, ressaltando a importância da adição da quimioterapia no tratamento do MB infantil (Taylor et al., 2005).

Formas hereditárias do MB ocorrem em pacientes portadores de síndromes, como a de Gorlin, onde apresentam mutações no gene *PTCH1*, ativando a via *Sonic Hedgehog* (SHH) de maneira aberrante (Cowan et al., 1997). De modo similar, pacientes que apresentam a síndrome de Turcot exibem mutações no gene *APC* (gene que regula negativamente a β -catenina, componente chave da via *Wingless* (WNT) (Hamilton et al., 1995).

Dentre as alterações genéticas associadas ao MB, a instabilidade cromossômica é comumente encontrada, assim como nos demais tumores do sistema nervoso central (Dubuc et al., 2010). A alteração citogenética mais comum em MB é a presença do isocromossomo 17q, encontrado em aproximadamente 30-40% dos tumores (Pan et al., 2005). As regiões 1q e 10q também parecem ter um importante papel na gênese e progressão do MB, apresentando entre 20-40% de perda de heterozigossidade (Sardi et al., 2007).

A histologia do MB pode ser utilizada para inferir o prognóstico do paciente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o MB é classificado como MB clássico, desmoplásico, extensamente nodular e de grandes células/anaplásico (Louis et al., 2007). As diferentes características morfológicas têm sido relacionadas a diferenças no comportamento biológico. O subtipo histológico que apresenta o pior prognóstico é o de grandes células/anaplásico, que apresentam células tumorais com pleomorfismo nuclear, células com alta atividade mitótica e formas atípicas (Louis et al., 2007; Huse & Holland, 2010; Elisson et al., 2011).

Nos últimos anos, muitos avanços têm permitido um melhor entendimento da biologia tumoral do MB. Um desses avanços foi a concepção de uma classificação molecular dos MBs, onde atualmente podem ser classificados em quatro subgrupos, sendo eles: *Wingless* (WNT), *Sonic Hedgehog* (SHH), Grupo 3 e Grupo 4 (Northcott et al., 2011; 2012; Taylor et

al., 2012). Cada subgrupo possui características citogenéticas e perfis mutacionais/transcricionais completamente distintos, sendo também divergentes nos aspectos clínicos e de prognóstico, bem como demográficos (distribuição e incidência) (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012).

O MB do subgrupo WNT é assim classificado por possuir esta via ativada. É o tipo mais raro e tem atualmente o melhor prognóstico, onde cerca de 90% dos pacientes sobrevivem. Tumores deste tipo frequentemente acometem crianças com mais de 3 anos, com histologia clássica e raramente apresentam metástases (Kool et al., 2012). O gene com maior frequência de mutação nesse grupo é o *CTNNB1* (pertencente à via WNT), o qual promove a estabilização e a localização nuclear da proteína β -catenina (Clifford et al., 2006). Além disso, esse subgrupo frequentemente apresenta mutações no *TP53* (Lindsey et al., 2011).

O MB SHH representa um subgrupo de prognóstico intermediário, com taxas de sobrevida que variam entre 60-80% (Northcott et al., 2011). Apresenta uma distribuição bimodal, sendo mais frequente em lactentes e adultos. A histologia desmoplásica é frequente desse grupo, mas pode ocorrer também o MB clássico e de grandes células/anaplásico (Elisson et al., 2011). Mutações nos genes *PTCH1* e *SUFU*, que modulam reguladores negativos da via SHH, estão presentes neste subgrupo (Northcott et al., 2012).

Pacientes com MB do subgrupo 3, possuem o pior prognóstico dentre os quatro subgrupos, devido, talvez, a sua alta capacidade metastática (50% dos pacientes apresentam metástase no diagnóstico) e aos altos níveis de instabilidade genômica. É restrito a pacientes pediátricos e frequentemente apresenta histologia de grandes células/anaplásico. O gene *MYC* aparece frequentemente amplificado neste subgrupo (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012).

Dentre estes subgrupos moleculares, o mais comum é o MB do tipo 4, que afeta cerca de dois em cada cinco pacientes com essa neoplasia, apresentando um prognóstico semelhante ao do subgrupo SHH (Northcott et al., 2012). A histologia deste subgrupo é frequentemente clássica e metástases são encontradas em um terço dos pacientes. Tem como característica frequente a amplificação dos genes *CDK6* e *MYCN* (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012).

Com esta classificação, foi possível perceber que, o que antes era considerado um único tipo de tumor, hoje são, pelo menos, quatro doenças distintas, que exigirão abordagens terapêuticas distintas (Northcott et al., 2012). Estes achados podem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais com mecanismos de ação específicos, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes, bem como reduzir as sequelas do tratamento.

Além de alterações genéticas, o MB apresenta alterações epigenéticas que contribuem para o desenvolvimento/progressão da doença. As alterações epigenéticas são responsáveis pelo desequilíbrio celular e silenciamento gênico, principalmente quando envolve genes supressores tumorais, relacionados com o controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e metástase (Yoo & Jones, 2006).

1.2 A metilação do DNA e o câncer

O termo epigenética pode ser definido como um fenômeno que envolve modificações na estrutura da cromatina, porém, sem afetar a sequência dos nucleotídeos, sendo estas herdáveis durante a divisão celular (Momparker, 2003). Sabe-se que além de mecanismos genéticos, o processo de carcinogênese depende também de alterações nos mecanismos epigenéticos, responsáveis pela manutenção do perfil de expressão gênica nos diversos tipos celulares (Ducasse & Brown, 2006; Gallinari et al., 2007). Os mecanismos epigenéticos mais estudados são a metilação do DNA e as modificações das proteínas histonas, como acetilação, metilação e fosforilação (Bernstein et al., 2007; Ducasse & Brown, 2006).

Em geral, os tumores são epigeneticamente caracterizados pela desmetilação global do DNA e hipermetilação dos promotores gênicos (Yoo & Jones 2006; Wilson et al., 2007), bem como pelos altos níveis de expressão das histonas deacetilases (HDACs), que são acompanhadas consequentemente pela hipoacetilação das proteínas histonas (Ropero & Esteller, 2007).

A metilação do DNA está vinculada ao mecanismo de silenciamento gênico (Baylin, 2005). Esse processo envolve a adição covalente do grupo metil, que advém do doador S-adenosilmetionina, ao carbono 5' da citosina, formando 5-metilcitosina (5-mC). As citosinas metiladas correspondem a 0,75-1% do total de bases do DNA (Worm & Gulberg, 2002), podendo afetar a expressão gênica por impedir a ligação dos fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento presentes na região reguladora de seus respectivos genes.

O silenciamento de determinados genes provocados pela metilação anormal de suas regiões promotoras é uma característica observada com alta frequência em diversos tipos de neoplasias (Yoo & Jones, 2006; Brown et al., 2009). Além do silenciamento, a metilação também pode contribuir para a tumorigênese aumentando a probabilidade da ocorrência de mutações de transição C-T, como verificado com o gene supressor de tumor *TP53*, em que 50% das mutações pontuais incidem nas citosinas metiladas (Jones & Baylin, 2002).

Em geral, as citosinas adjacentes a uma guanina, conhecidos como dinucleotídeos CpGs (a letra *p* entre as bases citosina e guanina denota o grupo fosfato), são mais passíveis de serem metiladas (Bird, 2002). Estes dinucleotídeos são pouco representados ao longo do genoma e a grande maioria destes (cerca de 70-90%) encontra-se metilada (Nakao, 2001; Hellebrekers et al., 2007). Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas chamadas ilhas CpG, geralmente, presentes na região 5'UTR dos genes, especialmente nos promotores e no primeiro éxon dos genes (Robertson & Jones, 2000; Bird, 2002; Das & Singal, 2004).

A adição do grupamento metil é catalisada por um grupo de enzimas, denominadas DNA metiltransferases (DNMTs): DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Singal & Ginder, 1999). A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita, possibilitando que, durante a replicação, ocorra a propagação do padrão de metilação às fitas recém sintetizadas (Bird, 2002). As enzimas DNMT3A e a DNMT3B metilam com igual eficiência o DNA hemimetilado e não metilado e são altamente expressas em células tronco-embrionárias. Estas enzimas geralmente atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não possuíam metilação (Das & Singal, 2004). Estudos mostram a expressão aumentada dessas enzimas em células tumorais quando comparada com sua contraparte não neoplásica, até mesmo como um fator de pior prognóstico (Amara et al., 2010; Qu et al., 2013).

O estudo do perfil da metilação do DNA pode ser útil no diagnóstico precoce e para a definição do tratamento de vários tipos de tumores, pois permite distinguir entre tipos de tecidos e subtipos tumorais, auxiliando até mesmo na escolha do agente quimioterápico para o tratamento. A metilação do gene de reparo *O₆-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT)*, por exemplo, aumenta a sensibilidade dos gliomas ao tratamento com agentes alquilantes (Esteller et al., 2000). Ele encontra-se silenciado por hipermetilação em tumores, como o de cólon, pulmão, glioblastoma, entre outros (Esteller et al., 2001). Em leucemias, a metilação anormal do DNA tem sido encontrada em diversos genes. Sato et al. (2010) mostraram que genes importantes estavam hipermetilados nos diferentes estágios de *leucemia/linfoma de células T do adulto*, como *SHP1* (regulador da via JAK/STAT), *CDKN2A (p16)* (gene supressor de tumor) e *DAPK* (apoptose).

Em MB pediátricos, estudos relatam o silenciamento por hipermetilação dos genes *HIC1*, *CASP8* e *RASSF1a* (Lusher et al., 2002; Harada et al., 2002; Lindsey et al., 2004). Diede e colaboradores (2010) também avaliaram o nível de metilação em amostras de MB pediátricos comparadas com amostras de cerebelo normal. Eles identificaram a metilação de

genes envolvidos nos diferentes processos do desenvolvimento, demonstrando que o silenciamento epigenético pode contribuir para a formação dessa neoplasia, sugerindo-se o uso de agentes desmetilantes como uma estratégia em potencial na terapia do MB. Kongkham et al. (2010) relatam que os promotores dos genes *SFRP1*, *SFRP2* e *SFRP3* (família de inibidores da via WNT) estão silenciados por metilação em MB, alterando assim a proliferação celular bem como o crescimento das células. Adicionalmente, Batora et al. (2013) destacam que o perfil de metilação do DNA poderia contribuir na investigação da origem celular do MB e auxiliar em uma melhor classificação dos subgrupos, principalmente para os subgrupos 3 e 4.

Todos estes dados enfatizam a necessidade de estudos envolvendo a metilação do DNA e seu papel no MB. Como a metilação aberrante das ilhas CpG é mais frequente nas células tumorais, esta pode ser um alvo importante na terapia antitumoral (Baylin, 2005). Além disso, tratamentos que têm como alvo mecanismos epigenéticos tornam-se ferramentas interessantes, devido a possibilidade de reverter as modificações epigenéticas, ao contrário das alterações genéticas (Yoo & Jones, 2006; Hellebrekers et al., 2007).

1.3 A metilação do DNA como alvo antitumoral

Com o avanço do conhecimento sobre a importância das alterações epigenéticas no desenvolvimento do câncer, o interesse em drogas que possuem como alvo os mecanismos epigenéticos, como os análogos de citidina (inibidores de DNMTs) e os inibidores de HDACs, vem aumentando. Diversos estudos relatam o potencial antitumoral dos inibidores de DNMTs, impedindo o crescimento tumoral e restaurando a expressão de genes específicos através da inibição da metilação do DNA (Shi et al., 2003), mas poucos estudos analisam seus efeitos em células de MB ou os efeitos globais/mecanismos dessas drogas.

Os principais análogos usados no tratamento do câncer são 5-Aza-CdR e o 5-aza-dC, este último, aprovado para o tratamento da síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda pela *Food and Drug Administration* em 2004 (Fenaux et al., 2009). Patties et al., (2009) demonstraram que o pré-tratamento com 5-aza-dC aumentou o efeito da irradiação em células de MB resultando em uma redução significativa da clonogenicidade e da viabilidade celular. Mesmo sendo capazes de inibir a metilação do DNA, estes compostos apresentam-se instáveis em soluções aquosas e efeitos colaterais a longo prazo (Yoo & Jones, 2006; Derissen et al., 2014).

A Zebularina (1-[β -D'Ribofuranosil]-1,2-dihidropirimidina-2-1) é um análogo de citidina de segunda geração (Marquez et al., 2005) capaz de inibir as DNMTs, principalmente a DNMT1. Após sua incorporação ao DNA, a droga é capaz de formar ligações covalentes com as proteínas DNMTs; consequentemente promovendo a redução da metilação do DNA (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Pompéia et al., 2004). Este agente apresentou atividades antitumorais promissoras em diversos tumores, tanto em estudos *in vitro* (Cheng et al., 2004; Meador et al., 2010; Ruiz-Magaña et al., 2012, Andrade et al., 2014) como também *in vivo* (Cheng et al., 2003; Neureiter et al., 2007; Tan et al., 2013).

Herranz et al. (2006) mostraram que a Zebularina é eficaz no tratamento de linfoma tímico, promovendo hipometilação genômica global, depleção da DNMT1 e uma sobrevida maior dos camundongos sem apresentar toxicidade aguda para o organismo. A Zebularina mostra-se um promissor agente para ser administrado oralmente devido à sua grande estabilidade química em solução aquosa e baixa citotoxicidade, observadas durante experimentos *in vitro* e *in vivo*, mesmo em tratamentos à longo prazo (Cheng et al., 2003; Yoo et al., 2008; Anderson et al., 2010). Além disso, células tumorais possuem uma resposta maior em relação à Zebularina quando comparado com células não neoplásicas (Cheng et al., 2004).

Adicionalmente, a droga se mostrou eficiente em tumores que ocorrem frequentemente durante a infância, como as leucemias (Stumpel et al., 2009; Ruiz-Magaña et al., 2012; Andrade et al., 2014). Porém, seus efeitos em meduloblastoma ainda não foram relatados.

O silenciamento aberrante de certos genes pode contribuir para o desenvolvimento e progressão das neoplasias e sua reativação seria de grande interesse (Rao et al., 2007; Scott et al., 2007). Diversos estudos relatam a metilação do DNA como causa desse silenciamento, incluindo em MB (Diede et al., 2010; Kongkham et al., 2010). Além disso, pacientes portadores de MB apresentam: i) diversos efeitos colaterais causados pelo tratamento atual, ressaltando a necessidade de novas terapias; e ii) possuem um perfil de metilação gênico aberrante, o que sugere que a investigação dos efeitos de drogas que removem a metilação do DNA seria uma ferramenta promissora para este tipo de tumor, trazendo novas perspectivas para o tratamento dos MBs e informações relevantes sobre a biologia deste tumor.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial antineoplásico da Zebularina em linhagens celulares de meduloblastoma.

2.2 Específicos

- Investigar os efeitos da Zebularina nos processos de proliferação celular, capacidade clonogênica, morte e ciclo celular em linhagens celulares de MB;
- Analisar o perfil de expressão gênica em larga escala após o tratamento com a Zebularina e validar gene(s) diferencialmente expresso(s);
- Estudar os efeitos da combinação entre o inibidor Zebularina e os quimioterápicos vincristina e cisplatina.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC/FMRP-USP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Anexo I) (processos nº 10633/2012 e 14753/2014), Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (processo nº 1.75-050809) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Processo nº 9375/2003).

3.1 Delineamento Experimental

3.2 Casuística e coleta das amostras

Foram obtidas 46 amostras consecutivas de pacientes portadores de MB disponíveis no banco de tumores (9375/2003) do Laboratório de Pediatria (HC/FMRP-USP) e também provenientes do Centro Infantil Boldrini de Campinas, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Andrés Yunes.

As amostras foram coletadas em criotubos durante a ressecção cirúrgica, sendo imediatamente transferidas para o nitrogênio líquido e estocadas. Antes do processamento da amostra, foi realizada a microdissecação no laboratório do prof. Dr. Luciano Neder, do

Departamento de Patologia da FMRP-USP para retirada de tecido normal e necrótico garantindo a qualidade da amostra.

Os dados clínicos dos pacientes estão dispostos no Apêndice I. Os pacientes foram submetidos a um dos três tipos de protocolo de tratamento (Lomustine/Cisplatina/Vincristina e Radioterapia ou Carboplatina/Ifosfamida/Vincristina/Etoposídeo e Radioterapia ou outro protocolo). Das 46 amostras, 28 eram de pacientes do gênero feminino (60,7%) e 17 do gênero masculino (36,95%), com média de idade ao diagnóstico de oito anos (variação de idade de 5 meses a 26 anos). Aproximadamente 82,6% dos pacientes eram menores de 3 anos (n= 38) e 17,4% eram maiores de 3 anos (n= 8). Foram considerados de alto risco 53,3% (n=24) dos pacientes (pacientes considerados como alto risco: idade $\leq$ 3 anos, ressecção do tumor $\leq$ 1,5 cm² e estágio da doença entre M1-M4; MB de baixo risco: idade $>$ 3 anos, ressecção do tumor $>$ 1,5 cm² e estágio M0).

O grau de ressecção do tumor foi avaliado em 45 amostras do HCFMRP-USP, sendo que em 67,4% (n=31) dos pacientes apresentaram ressecção completa e 30,4% (n=14) apresentaram ressecção incompleta, característica definida pelo achado cirúrgico e exame de imagem (Ressonância Nuclear Magnética). Foi avaliada a presença de metástase ao diagnóstico, que compreende infiltração líquórica ou implante em neuroeixo, estando presente em 23,9% dos pacientes (n=11). Não foram encontradas metástases fora do SNC. As amostras foram classificadas histologicamente somente em MB desmoplásico (n=8, 17,4%) ou outros (clássico, extensamente nodular ou grandes células/anaplásico) (n=38, 82,6%). Dados relacionados aos eventos desfavoráveis (recidiva e/ou óbito) também foram avaliados, e estiveram presentes em 52,2% dos casos (n=24) (Apêndice I).

Também foram utilizadas 5 amostras de tecido cerebelar como controles, com idade variando de 17 dias a 31 anos, sendo uma amostra proveniente de paciente do sexo masculino, e quatro amostras de pacientes do sexo feminino, coletadas durante necrópsias e obtidas no Departamento de Patologia (HC/FMRP-USP), em parceria com Prof. Dr. Fernando Ramalho (Apêndice II).

3.3 Linhagens Celulares e Cultura primária de MB

Foram utilizadas as linhagens de MB pediátrico ONS-76 adquirida comercialmente através do Banco de Células do Rio de Janeiro e a linhagem DAOY pelo banco *American Type Culture Collection* (ATCC), estas últimas pertencentes ao subgrupo molecular SHH (Xu et al., 2015). Utilizou-se também as linhagens pediátricas UW402 e UW473, gentilmente

cedidas pelo Prof. Dr. Michael S. Bobola (*Department of Neurological Surgery*, Universidade de Washington, Seattle, WA). Dados sobre o perfil molecular das linhagens utilizadas neste estudo estão no Apêndice III.

Todas as linhagens utilizadas foram autenticadas através da análise do perfil de STR (*short tandem repeats*), gentilmente realizado pelo Laboratório de Investigação de Paternidade do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Simões.

As células foram mantidas em meio HAM F10 (UW402 e UW473) e RPMI-1640 (ONS-76 e DAOY) em pH 7.2–7.4 (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Na realização dos experimentos, a viabilidade e contagem celular foram determinadas utilizando o teste de exclusão do azul de Trypan.

Neste estudo também utilizamos uma cultura primária de MB. A amostra é proveniente de um paciente do sexo masculino (23 anos) que não apresentava metástases no momento do diagnóstico. O diagnóstico foi confirmado pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas (SERPAT-HC/FMRP-USP). Para o estabelecimento desta, após a coleta no centro cirúrgico do HC/FMRP-USP, a amostra tumoral foi separada mecanica e enzimaticamente com 0,5% colagenase tipo IV (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por aproximadamente 1h. Após esse tratamento, a suspensão celular foi colocada em meio de cultura HAM F10 suplementado com 10% de SBF em garrafas de 75 cm² para seu crescimento durante aproximadamente uma semana. As culturas foram então mantidas e expandidas após confluência por um número baixo de passagens (P2-P4) até a realização dos ensaios.

3.4 Preparação das drogas

Soluções estoque de 100mM de Zebularina e 108µM de vincristina (VCR) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá) foram diluídas em PBS-1X. A solução de 1,66mM de cisplatina (CIS) foi preparada em solução salina (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá). As soluções foram estocadas em alíquotas conforme recomendações dos fabricantes. As drogas foram adicionadas ao meio de cultura imediatamente antes de serem aplicadas nas células.

3.5 Ensaios Funcionais

3.5.1 Proliferação Celular

O ensaio com o kit XTT[®] (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá) é um método de determinação colorimétrico do número de células metabolicamente ativas *in vitro*, medindo a proliferação e a viabilidade celular. A clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas produz o corante formazan, que possui coloração alaranjada. Um aumento no número de células resulta no aumento da atividade global de desidrogenases mitocondriais na amostra, que é diretamente correlacionado com a quantidade de formazan produzido e com diferenças na absorbância da solução.

Para o ensaio de proliferação, as células foram semeadas em densidades iniciais de 2×10^3 em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24 h. Após este período, as células foram tratadas (Zebularina) e incubadas com os diferentes tratamentos por 24, 48, 72 e 96 h. A cada intervalo de tratamento foi adicionado meio contendo 10% de XTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. A leitura da absorbância de 450nm foi realizada utilizando o aparelho *iMark Microplate Absorbance reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos três momentos diferentes.

3.5.2 Ensaio de capacidade clonogênica

Para este ensaio, 500 células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços. Após 24 h, a droga foi adicionada em diferentes doses de tratamentos e as culturas incubadas por 72 h em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Após o tempo de tratamento, o meio foi substituído por um meio livre da droga e as culturas foram incubadas novamente a 37°C por 7-10 dias.

Para a visualização das colônias, o meio de cultura foi retirado e as placas fixadas com metanol absoluto por 15 minutos, e coradas com Giemsa (1 mL Giemsa: 30 mL de tampão fosfato 1X). As colônias foram contadas com microscópio estereoscópico (magnificação 40X), sendo consideradas somente aquelas com mais de 50 células. Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

3.5.3 Análise do ciclo celular com iodeto de propídeo

Para a realização do ensaio de avaliação do ciclo celular, 4×10^4 células foram semeadas em placas de 6 poços. Após o tratamento, as células foram removidas das placas utilizando tripsina, fixadas com etanol 70% e estocadas em freezer a -20°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo. Para esta leitura, as coletas foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS 1X (filtrado e gelado) e centrifugadas novamente a 1000 rpm por 5 minutos. Ao *pellet*, foram acrescentados 200 μL da solução iodeto de propídeo (PI) (PI 1mg/mL, RNase 50 $\mu\text{g/mL}$, NP40 0,2%) e estocadas em gelo. A avaliação das fases do ciclo celular foi realizada utilizando o Guava EasyCyte mini cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Foram analisados 5000 eventos por replicata e analisados pelo *software* Guava Cytosoft 4.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois momentos diferentes.

3.5.4 Ensaio de apoptose com anexina-V

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences Pharmingen, USA) e PI. Anexina-V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, ligando-se a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e funciona como um sinal para que os fagócitos as removam. Já a marcação positiva com PI indica que as células perderam a integridade da membrana.

Após o plaqueamento das células (4×10^4) e o tratamento por 96 h, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C , lavadas com PBS 1X gelado e depois ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmingen, USA). As células foram então coradas com 5 μL de anexina-V e 50 μL de uma solução de PI (50 μM) e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente. As células foram analisadas em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos três momentos diferentes (para as linhagens celulares) e um momento (para a cultura primária).

3.6 Análise da combinação entre drogas

Para a análise dos efeitos da combinação entre as drogas CIS, VCR e a zebularina, utilizou-se o ensaio de proliferação XTT® (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá) após 72 de tratamento com as drogas, isoladas ou não, e o *software* CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.).

O efeito dessas combinações é expresso como índice de combinação (CI). O CI é um método utilizado para quantificar o sinergismo causado pelos efeitos citotóxicos da combinação entre diferentes drogas. Este método é baseado na lei da ação das massas e no princípio do efeito-médio derivado de modelos de cinética enzimática desenvolvido por Chou and Talalay (Chou, 2006), sendo amplamente utilizado para a análise de interações entre drogas, principalmente as antineoplásicas. Com o uso do CI, sinergismo é definido como um efeito aditivo mais que o esperado, enquanto que antagonismo é definido como um efeito aditivo menos que o esperado. Sendo assim, por meio desse método, um CI igual a 1 indica um efeito aditivo, um CI maior que 1 indica antagonismo, enquanto que um CI menor que 1 indica sinergismo. Embora sinergismo e citotoxicidade possam estar relacionados, um CI indicando alto nível de sinergismo não necessariamente implica em um alto grau de citotoxicidade absoluta (i.e. alta fração afetada - Fa) (Keshelava et al., 2007).

3.7 Extração de mRNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para a extração do mRNA das linhagens celulares tratadas com diferentes doses de Zebularina por 72 h, 4×10^4 células foram plaqueadas. Posteriormente, o mRNA destas linhagens foi extraído utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen Inc, Carsdab, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. O cDNA foi sintetizado por meio do kit *High Capacity*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A qRT-PCR foi realizada utilizando o aparelho QuantStudio 12k Flex (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras de MB seguem o mesmo protocolo. As sondas TaqMan[®] para os genes *BATF2* (Hs00912737_m1), *GLII* (Hs01110766), *PTCH1* (Hs00181117), *SMO* (Hs01090242) e *SUFU* (Hs00171981), foram adquiridas pelo sistema *on-demand* da Applied Biosystems. O volume final para cada reação foi de 12 µL, sendo 4,5 µL da amostra biológica investigada (diluída 1/10), 6 µL do Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,6 µL de cada sonda estudada. Como calibrador utilizamos as linhagens sem tratamento ou o RNA de cerebelo não neoplásico, disponível comercialmente (GE Healthcare, EUA). Como controle endógeno foram utilizados os genes *GUSB* (*Beta Glucuronidase*) (4333767F) e *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) (4310809E). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.8 Microarray

Para análise de expressão gênica em larga escala, a linhagem DAOY foi tratada com a Zebularina (0 e 100 μ M por 72h). Foram utilizadas lâminas de microarrays *Whole Human Gene Expression microarrays kit* (4x44K) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), por meio da metodologia monocolor Cy3 (cianina 3). Para a amplificação, marcação e hibridação dos mRNAs das amostras com os *microarrays* foi utilizada o kit *Agilent Quik Amp Labeling* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As etapas do procedimento de *microarrays* foram realizadas no Laboratório de Hematologia no HC/FMRP-USP.

Utilizou-se 1,65 μ g de cRNA para a reação de hibridação, o qual foi incubado por 30 minutos a 60°C juntamente com 10X *Blocking Agent*, 25X *Fragmentation Buffer* e água livre de RNase/DNase para obtenção do cRNA fragmentado. Em seguida, este foi hibridizado às lâminas, as quais foram incubadas à 65°C e submetidas a 10 rotações por minuto por 17 horas. Após a lavagem e a secagem das lâminas, estas foram escaneada utilizando o *software* GenePix Pro 6.0 e um scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), seguindo recomendações do fabricante das lâminas.

Os valores de intensidade de sinal, referentes às hibridações das amostras de **RNA** com as sondas de cDNA presentes nas lâminas de microarranjos, foram processados pelo *software* do fabricante e o produto final dos cálculos de normalização para cada sonda (“gProcessedSignal”) foram utilizados nas análises subsequentes de expressão diferencial. O método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher et al., 2001) pareado com permutações (100) foi aplicado para a identificação dos genes diferencialmente expressos. Foram atribuídos limites mínimo de 2 *fold change* (FC) e máximo de 1% FDR (*False Discovery Rate*) com o intuito de obter resultados mais acurados e significativos.

Os genes diferencialmente expressos identificados na análise prévia foram categorizados com base nos processos biológicos, por meio do *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Os genes sem identificação foram excluídos dessa categorização.

3.9 Western blotting

Para a análise de expressão proteica, 30-60 μ g de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e

então incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (GE, Piscataway, NJ, EUA) por 1 hora a 8°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos Bax (sc-493), Bcl-2 (sc-7382), ciclina A (sc-751), DNMT1 (sc-20701), GLI1 (sc-20687), p21 (sc-6246), p53 (sc-126) e Survivina (ab-76424) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) (diluições utilizadas dos anticorpos primários estão no Apêndice IV). Os níveis da proteína GAPDH (sc-47724) foram utilizados como controle endógeno em todos os experimentos. As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico para cada anticorpo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) (1:10000 em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas 3-5 vezes (5 minutos cada) com TBS-T 1%. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do ECL™ *Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, UK) e ChemiDoc *system* (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). As membranas foram expostas entre 10 a 400 segundos e então analisadas. A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ.

3.10 Estudo do nível de metilação no gene *BATF2* nas amostras de meduloblastoma

O estudo dos níveis de metilação gene-específico nas amostras de DNA foi realizado com o *kit* MethylCollector Ultra (Active Motif, USA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. O método do kit se baseia na alta afinidade do complexo proteico MBD2/MBD3L1 pelo DNA metilado.

Foram utilizadas 11 amostras de MB e 4 amostras de cerebelo não neoplásicos para extração de DNA (Apêndices I e II) e análise dos níveis de metilação do gene *BATF2*. A extração foi realizada com o *kit Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

Os *primers* para o gene *BATF2* foram desenhados observando as recomendações do kit: regiões 5'-UTR próximo às CpG de interesse, com produto entre 100 e 150 pares de bases, e com conteúdo CG de 50%. A busca por ilhas CpGs foi realizada com auxílio da ferramenta online *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) e *Ensembl.org*. O desenho dos *primers* para estas regiões foi realizado com auxílio da ferramenta *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os *primers* desenhados foram testados *in silico* no programa UCSC *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). A Tabela 1 apresenta a sequência do pares de *primers* e as informações sobre a PCR.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* de duas regiões ricas em CG utilizadas para avaliação do nível de metilação do gene *BATF2*.

Região Gene <i>BATF2</i>	Sequência <i>Primers</i>	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Região 1</i>	F: CCACATGTAGAAACCAGCGT R: CTCGGCCTCCCAAAGTTCT	60
<i>Região 2</i>	F: CGGGAAGCAGAGTTCATGTG R: ATTCCAGGCCTGTGTAGTGG	60

3.10.1 Enriquecimento das amostras com kit *Methylcollector Ultra*

Para a coleta do DNA metilado preparou-se uma reação contendo *beads* magnéticas (10 µL), tampão de ligação (100 µL), inibidor de protease (0,5 µL), complexo de proteínas His-MBD2/MBD3L1 (10 µL) para cada amostra de DNA fragmentado (1 µg por reação). Essa reação foi incubada em rotação constante e agitação (*HulaMixer*[®], *Life Technologies*) por uma hora a 4°C. Em seguida, foram realizadas lavagens das *beads* magnéticas com tampão de ligação. Foi acrescentado o tampão de eluição (100 µL) e as amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, com auxílio de barras magnéticas. Por fim, foram acrescentados 2 µL de proteinase K a cada amostra.

3.10.2 PCR em tempo real para quantificação do enriquecimento

Para cada amostra de DNA enriquecido foi separada uma amostra *Input*, correspondente a 10% da concentração final de DNA presente no início da reação de enriquecimento, esse DNA foi diluído 20x (100 µL do volume final). As amostras enriquecidas, denominadas de IP foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação dos níveis de 5-mC, com os *primers* desenhados nas condições padronizadas. Foi utilizado como controle negativo o gene *GAPDH* (região que apresenta poucas CpGs). O enriquecimento da amostra IP com relação à amostra *Input* foi calculado pela equação:

$$2^{[(Ct \text{ Input} - 2,99) - Ct \text{ IP}]/100}$$

Onde Ct *Input* e Ct IP são os ciclos em que as amostras alcançaram o *threshold*, estabelecido como 0,1; e 2,99 é o fator de correção para a diluição. O enriquecimento relativo foi calculado dividindo o enriquecimento observado na região de interesse do gene *BATF2* pelo enriquecimento observado para o controle negativo fornecido pelo *kit* (*GAPDH*) (Oliveira et al., 2015).

3.11 Análise Estatística

Na análise estatística dos ensaios funcionais, a média dos experimentos foi comparada pelo teste *One- e Two-Way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni ou Teste-t de Student.

Para a análise da comparação da expressão do gene entre as diferentes amostras estudadas (tumores, cerebelos não neoplásicos e linhagens celulares; níveis de metilação e as características clínicas e biológicas dos pacientes, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para análise da sobrevida livre de eventos dos pacientes foram utilizadas curvas de Kaplan-Meier, em que foi considerada a mediana de cada variável como valor de corte para hipoexpressão ou hiperexpressão gênica.

Para as características clínicas e biológicas dos pacientes foram consideradas as seguintes variáveis: gênero (feminino ou masculino), idade ao diagnóstico (maiores ou menores de 3 anos), grau de ressecção do tumor (completa ou incompleta), presença ou ausência de metástase no momento do diagnóstico, ressecção tumoral completa (ressecção do tumor $> 1,5 \text{ cm}^2$) ou incompleta (ressecção do tumor $\leq 1,5 \text{ cm}^2$), MB de baixo ou alto risco, histologia (aqui somente classificados como MB desmoplásico ou outros) e evento (paciente vivo ou se foi a óbito/apresentou recidiva durante o tratamento).

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 22.0 (IBM, Armonk, Nova York, EUA), considerando os resultados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Zebularina inibe a proteína DNMT1 em linhagens de meduloblastoma

Primeiramente, realizamos a análise da expressão da proteína DNMT1, alvo direto da Zebularina, para avaliar se a droga era capaz de inibir sua expressão em células de MB. Para isso, as linhagens DAOY e ONS-76 foram incubadas com 200 e 400 μM de Zebularina por 72 h (Fig. 1). Utilizou-se estas linhagens para os ensaios proteicos visto que ambas apresentaram resposta frente ao tratamento com a droga e são modelos com mais dados disponíveis sobre suas características (como subgrupo molecular e *status* do *TP53*).

Figura 1 – Expressão proteica de DNMT1 após tratamento com Zebularina por *western blotting* nas linhagens celulares de meduloblastoma. Os níveis de expressão da proteína DNMT1 foram avaliados por *western blotting* após o tratamento por 72 h com Zebularina (200 e 400 μM) nas duas linhagens de meduloblastoma, DAOY e ONS-76. Como controle endógeno foi utilizada a proteína GAPDH (A). A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ (B).

Como observado, a expressão da proteína DNMT1 foi reduzida após o tratamento com a Zebularina em ambas as linhagens, mostrando uma completa inibição dessa proteína pela droga.

4.2 Zebularina reduz a proliferação celular e a capacidade clonogênica das linhagens de meduloblastoma

Os efeitos da Zebularina na proliferação celular das linhagens DAOY, ONS-76, UW402 e UW473 após diferentes doses de tratamentos (0-800 μM) e tempos de incubação, estão representados na Fig. 2. Observou-se uma diminuição significativa da proliferação em todas as linhagens ($p < 0.05$). As linhagens sofreram uma inibição significativa do crescimento

já a partir da dose de 50 μM , sendo tempo dependente para as linhagens DAOY e ONS-76, a partir da dose de 100 μM .

Figura 2 - Zebularina inibiu a proliferação das linhagens celulares de meduloblastoma. As linhagens celulares de meduloblastoma DAOY (A), ONS-76 (B), UW402 (C) e UW473 (D) foram cultivadas na presença de concentrações crescentes de Zebularina (0-800 μM) por 24, 48, 72 e 96 h. A proliferação celular foi quantificada pelo *kit* XTT. O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

Tempos mais longos de incubação, como o tempo de 96h, mostraram ser os mais efetivos em inibir a proliferação celular. Os efeitos do tempo na inibição da proliferação fica ainda mais evidente quando compara-se os valores que induzem 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}) entre os tempos de 72 e 96h. O IC_{50} foi determinado de acordo com o *software* CalcuSyn e estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de IC50 obtidos no ensaio de proliferação celular para as linhagens de meduloblastoma após o tratamento com Zebularina. Os valores estão representados em μM .

Tempo de incubação	DAOY	ONS-76	UW402	UW473
72h	284,4	431,1	249,7	154,6
96h	113,7	58,1	203,7	149,9

Após 96 h de incubação, a ONS-76 apresentou o valor de IC50 de 58,1 μM ; seguida pela DAOY, onde o IC50 foi de 113,7 μM ; enquanto o valor para a UW473 foi de 149,9 μM e para a UW402 de 203,7 μM . É possível observar que as linhagens respondem de maneira distinta ao tratamento e que o tempo de incubação mostra-se essencial para a diminuição da dose utilizada, principalmente nas linhagens DAOY e ONS-76.

Com o objetivo de analisar a capacidade de formar colônias após a administração da Zebularina, foi realizado o ensaio de clonogenicidade (Fig. 3). Analisou-se o número de colônias após o tratamento com as doses de 50, 100, 200 e 400 μM de Zebularina por 72 h.

A análise mostrou uma redução significativa na quantidade de colônias, quando comparado com o controle, após as diferentes doses de tratamento com a droga. A linhagem UW473 mostrou uma redução significativa somente a partir da dose de 200 μM , atingindo 80% na inibição da formação de colônias. As linhagens UW402 e DAOY tiveram uma redução significativa após o tratamento com a dose de 100 μM , atingindo em torno de 80% e 95% de redução, respectivamente. Enquanto a linhagem ONS-76 mostrou uma redução significativa já na dose de 50 μM e atingiu aproximadamente 90% de inibição após o tratamento com a dose de 400 μM . Esses dados sugerem que as células são afetadas pelo tratamento mesmo quando analisadas após a retirada da droga.

Figura 3 - Zebularina reduz a capacidade clonogênica das linhagens celulares de meduloblastoma. As células foram tratadas com diferentes concentrações de Zebularina (0-400 µM) por 72 h e cultivadas sem a droga por mais 7-10 dias para a formação das colônias. Após esse tempo, contou-se o número de colônias formadas. O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparado ao controle.

O tratamento com a Zebularina é capaz de modular diversas proteínas envolvidas na proliferação celular, entre elas a ativação da p53 e seus genes alvo (Yang et al., 2013). E para melhor caracterizar os efeitos e mecanismos da droga na proliferação celular, aqui avaliou-se a expressão proteica do p53 e seu alvo, p21. O nível de expressão da p53 na linhagem ONS-76 (selvagem para *TP53*) aumentou após o tratamento, porém sem haver a indução do p21 após o tratamento (Fig. 4). Para a linhagem DAOY, p53 mutante (Raffel et al., 1993), os níveis de p21 aumentaram após o tratamento. Todos estes dados suportam que a Zebularina possui efeitos antiproliferativos nas linhagens de MB, e induz as proteínas p53 e também a p21, porém de modo independente da p53.

Figura 4 - Expressão proteica de p53 e p21 após tratamento com Zebularina por *western blotting* nas linhagens celulares de meduloblastoma. Os níveis de expressão das proteínas p53 (A) (p53 realizada somente na linhagem ONS-76 por ser *TP53* selvagem) e p21 (B) foram avaliados por *western blotting* após o tratamento de 72 h com Zebularina (200 e 400 μ M) nas linhagens, DAOY e ONS-76. Como controle endógeno foi utilizado a proteína GAPDH. A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ.

4.3 A Zebularina age sinergicamente com a vincristina, porém de forma antagônica com a cisplatina

Adicionalmente aos efeitos da droga isolada, investigou-se a capacidade da Zebularina em sensibilizar as células para a ação de outros quimioterápicos: cisplatina (CIS) e vincristina (VCR) (ambas utilizadas no tratamento atual do MB). Primeiramente, as linhagens DAOY e ONS-76 foram incubadas com os quimioterápicos isolados por 72h para assim definir as doses para a combinação (Apêndice V). Na tabela 3 estão descritos os valores de IC₅₀ para ambas as linhagens, que foram utilizados para nos ensaios de combinação. A linhagem DAOY mostrou-se mais resistente a todas as drogas quando comparada com a ONS-76, exceto para a droga CIS, onde os valores de IC₅₀ foram similares para ambas as linhagens.

Tabela 3 - Doses necessárias para induzir 50% de inibição do crescimento celular (IC50) nas linhagens de MB, após 72 h de tratamento, com as drogas Zebularina, CIS e VCR. Os valores foram obtidos no programa CalcuSyn. Valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em quadriplicatas.

Drogas	IC50 (μM)	
	DAOY	ONS-76
Zebularina	269	149
Cisplatina	5,15	5,44
Vincristina	0,01	0,0028

Baseando-se nas doses obtidas nos ensaios com as drogas isoladas, realizou-se a combinação com diferentes doses de cada droga (Zebularina, CIS e VCR) pelo ensaio de proliferação celular. A tabela 4 mostra os esquemas utilizados na combinação de drogas aqui realizado. As drogas foram administradas simultaneamente às células e a proliferação celular foi analisada após 72h de incubação.

Tabela 4 – Esquema de combinação de drogas avaliado por ensaios de proliferação celular. Apresentam-se as concentrações (μM) das drogas CIS e VCR quando combinadas com Zebularina. Elas foram aplicadas simultaneamente nas células DAOY e ONS-76 e incubadas por 72h. Cada par de doses combinadas representa um ponto (representados por um x) nos gráficos das Fig. 5.

Combinação I	ZB [μM]	CIS [μM]
	12,5	0,375
	25	0,75
	50	1,5
	100	3
	200	6

Combinação II	ZB [μM]	VCR [nM]
	12,5	0,156
	25	0,312
	50	0,625
	100	1,25
	200	2,5

Como é possível observar na Figura 5, a maioria dos CIs obtidos da combinação entre Zebularina e VCR apresentou valores de $\text{CI} < 1$, resultando em sinergismo. Para a ONS-76 a combinação das menores doses resultou em sinergismo, enquanto para a DAOY todas as doses combinadas foram sinérgicas ou aditivas ($\text{CI} = 1$). A combinação da Zebularina com a CIS resultou somente em valores de $\text{CI} > 1$, indicando efeito antagônico, para ambas as linhagens estudadas (Fig. 5).

Figura 5 - Combinação entre a Zebularina e os quimioterápicos Cisplatina e Vincristina em linhagens de meduloblastoma. Análise de combinação das drogas Zebularina, Cisplatina (CIS) e Vincristina (VCR) segundo o método de Chou-Talalay, analisado pelo programa CalcuSyn, nas linhagens DAOY (A) e ONS-76 (B). A linha tracejada (---) define o valor de CI=1, indicando aditivismo. CIs superiores ou inferiores indicam antagonismo ou sinergismo, respectivamente. Os pontos (x) representam os valores de CI obtidos experimentalmente. As linhas contínuas representam CIs derivados dos níveis de efeito desde 0-100% de inibição da proliferação de acordo com o programa CalcuSyn.

4.4 A Zebularina induz acúmulo de células na fase S do ciclo celular nas linhagens de meduloblastoma

Diante dos resultados até aqui encontrados, realizamos o ensaio de ciclo celular para melhor entendermos o mecanismo pelo qual a Zebularina inibe a proliferação celular e a clonogenicidade em MB. Após 48 h de incubação com a droga (0-400 μ M), avaliou-se a distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo.

A linhagem DAOY apresentou um aumento significativo da porcentagem de células na fase S, aumentando de 7% para 18% na maior dose utilizada (400 μ M). A linhagem UW402 aumentou de 7% para 18% após 100 μ M e a linhagem UW473 foi de 8% no controle para 21% na dose de 200 μ M. Embora na linhagem ONS-76 também tenha havido um aumento de células em S, mais de 50% em relação ao controle, esse aumento não foi significativo (de 9% para 14%).

Figura 6 - Zebularina induz acúmulo de células na fase S do ciclo celular nas linhagens de meduloblastoma. As células foram tratadas com Zebularina (0-400 μ M) por 48 h. A porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular foram marcadas com iodo de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. A figura mostra os gráficos representando as fases do ciclo celular após o tratamento com a Zebularina de um experimento (A) e a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (B). * $p < 0,05$, comparado ao controle.

Concomitantemente, houve uma diminuição da porcentagem de células em G1 em todas as linhagens, porém essa redução foi significativa somente para as linhagens DAOY e UW473, onde a porcentagem reduziu de 63% para 46% e de 67% para 44%, respectivamente. Embora a porcentagem de células na fase G2 do ciclo celular tenha aumentado após o tratamento, para todas as linhagens, esse aumento não foi significativo.

Sendo assim, a Zebularina foi capaz de induzir acúmulo de células na fase S e reduzir a população de células em G1 do ciclo celular.

Para confirmar a distribuição do ciclo, realizou-se a avaliação da proteína ciclina A, utilizadas como indicadora de parada do ciclo para a fase S (Yoo & Park, 2012). Após a incubação com a droga (72 h), em ambas as linhagens (DAOY e ONS-76), houve uma diminuição dos níveis proteicos da ciclina A, sendo mais acentuada a redução na dose de 400 μ M (Fig. 7). Estes dados sugerem que a diminuição da ciclina A poderia induzir um acúmulo de células na fase S do ciclo celular.

Figura 7 - Expressão proteica da ciclina A após tratamento das linhagens celulares de meduloblastoma com Zebularina. Os níveis de expressão da proteína ciclina A foram avaliados por *western blotting* após o tratamento de 72 h com Zebularina (200 e 400 μ M) nas duas linhagens de meduloblastoma, DAOY e ONS-76. Como controle endógeno foi utilizada a proteína GAPDH. A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ.

4.5 A Zebularina induz morte celular por apoptose em células de meduloblastoma

Para avaliar se os efeitos antiproliferativos encontrados representavam morte celular, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas após a marcação com anexina-V. As células foram incubadas com diferentes doses de Zebularina (0-400 μ M). Após 72 h de incubação, não houve aumento significativo de morte celular (dados não mostrados), sendo assim realizamos o ensaio após 96 h de tratamento (Fig. 8).

Figura 8 – A Zebularina induz apoptose nas linhagens de meduloblastoma. Células apoptóticas marcadas com anexina-V foram identificadas por citometria de fluxo. Concentrações crescentes de Zebularina (0-400 μ M) foram incubadas por 96 h antes de serem submetidas à análise. A) Os quadrantes em azul representam as células positivas para anexina-V. As doses de Zebularina estão representadas em μ M. Gráficos correspondentes à um ensaio realizado. B) O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células positivas para anexina-V em três experimentos independentes. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

As linhagens apresentaram um aumento no número de células apoptóticas após o tratamento com a Zebularina, embora esse aumento não tenha sido significativo para a linhagem UW402 (Fig. 8). Para a linhagem ONS-76 somente a dose de 400 μM aumentou significativamente o número de células apoptóticas, e para a linhagem UW473, houve um aumento a partir da dose de 100 μM . A linhagem DAOY foi a que apresentou maior porcentagem de morte celular por apoptose, atingindo mais de 40% de células positivas para anexina-V.

Tendo em vista estes resultados, avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na morte celular, a proteína pró-apoptótica Bax e as antiapoptóticas Bcl-2 e Survivina. Após 72 h de tratamento com a Zebularina, os níveis de Bax e Bcl-2 aumentaram após a incubação na linhagem DAOY, enquanto a proteína Survivina teve o nível de expressão reduzido. Já para a linhagem ONS-76, o nível de Bax aumentou e das proteínas Bcl-2 e Survivina diminuíram em ambas as doses utilizadas (Fig. 9).

Figura 9 – Expressão proteica de Bax, Bcl-2 e Survivina após tratamento com Zebularina por *western blotting* nas linhagens celulares de meduloblastoma. Os níveis de expressão das proteínas Bax, Bcl-2 e Survivina (A) foram avaliados por *western blotting* após o tratamento de 72 h com Zebularina (200 e 400 μM) nas duas linhagens de meduloblastoma, DAOY e ONS-76. Como controle endógeno foi utilizada a proteína GAPDH. A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ (B).

4.6 Zebularina induz aumento no número de células apoptóticas em cultura primária de MB

Para ampliar a relevância dos achados mostrados anteriormente, foi testada a resposta da Zebularina em uma cultura primária de MB. Como mostrado na Fig. 10, a droga foi capaz de induzir morte celular por apoptose de forma significativa ($p < 0,05$), atingindo 10% na dose 800 μM após 96h de incubação. Estes resultados demonstram que a Zebularina foi capaz de aumentar o número de células apoptóticas também na cultura primária de MB corroborando seu potencial antineoplásico.

Figura 10 - **A Zebularina induziu morte celular por apoptose em cultura primária de meduloblastoma.** A cultura primária de MB foi cultivada na presença de diferentes concentrações de Zebularina (0-800 μM) após 96h de tratamento e avaliado a morte celular com marcação com anexina-V. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

4.7 Zebularina promove a modulação de diferentes vias de sinalização relacionadas ao câncer

Para melhor caracterizar e compreender os efeitos e mecanismos da Zebularina e visto que a zebularina foi capaz de alterar diferentes proteínas envolvidas em múltiplas vias e funções celulares, realizamos o ensaio de expressão gênica em larga escala através da técnica de microarranjo de DNA (*microarray*). Realizamos o ensaio de expressão em larga escala utilizando a linhagem DAOY devido à sua resposta e sensibilidade frente à Zebularina nos diferentes parâmetros analisados até aqui, incubando-a por 72 h com 0 e 100 μM de Zebularina.

4.7.1 Zebularina altera expressão de genes relacionados com as vias Receptores Toll-like, estresse oxidativo, HMGB1 e ERK5/MEK5.

Os genes diferencialmente expressos (FC maior ou menor que 2) foram agrupados de acordo com suas funções biológicas utilizando-se a programa IPA. Genes relacionados a diferentes vias de sinalização, como Receptores *Toll-like*, resposta ao estresse oxidativo mediado por NRF2 (*NF-E2-related factor 2*), via HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) e a via ERK5/MEK5 (*extracellular-signal-regulated kinases*) foram significativamente alterados após o tratamento (Tabela 5). Esta análise reforça que a Zebularina age em diversas vias, modulando seus componentes, e complementa os resultados já obtidos.

Tabela 5 – Vias alteradas após o tratamento com a zebularina através do ensaio de microarray. Os genes em vermelho e verde são aqueles que estavam mais ou menos expressos, respectivamente, em relação ao controle (células que não receberam tratamento).

Vias	Valor <i>p</i>	Genes
Receptores Toll-like	6.3E-07	<i>IL1B, IL1A, TOLLIP, LY96, CD14, FOS, MAP2K3, JUN, NFKB2, TICAM1, IRAK2, TNFAIP3, UBD</i>
Resposta ao estresse oxidativo mediado por NRF2	2.18E-05	<i>ACTG2, AOX1, CREBBP, DNAJA2, DNAJB2, DNAJC3, FOS, FOSL1, HERPUD1, JUN, MAFF, MAFG, MAP2K3, PMF1, SLC35A2, SQSTM1, TXNRD1, UBE2E3</i>
HMGB1	3.23E-05	<i>CDC42, CXCL8, FOS, IL6, IL11, IL1A, IL1B, JUN, LIF, MAP2K3, NFKB2, PLAT, TNFRSF11B, VCAM1</i>
ERK5/MEK5	4.08E-05	<i>CREBBP, EGFR, FOS, FOSL1, IL6ST, LIF, MEF2D, SH2D2A, SRC, YWHAE</i>

Embora a droga tenha afetado outras vias (Tabela 5), o presente trabalho explorou somente o significado biológico desta devido ao seu nível de significância encontrado no ensaio de *microarray* e a sua possível relação com o gene *BATF2*. Treze genes envolvidos com a via TLRs foram modulados pela droga, sendo os induzidos *IL1B, IL1A, TOLLIP, LY96, CD14, FOS, MAP2K3, JUN, NFKB2, TICAM1, IRAK2, TNFAIP3* e somente o gene *UBD* foi reprimido pela droga. Na Figura 11, encontram-se os genes modulados pela Zebularina e sua relação com a via dos Receptores Toll-Like.

Figura 11 – Genes da via dos Receptores Toll-Like modulados pela Zebularina encontrados no ensaio de microarray. Utilizou-se a linhagem DAOY tratada ou não com a Zebularina (100µM por 72 h) para o ensaio de expressão gênica em larga escala. Foram utilizadas lâminas de *microarray Whole Human Gene Expression microarrays kit* (4x44K) (Agilent Technologies). Os genes diferencialmente expressos identificados nas análises foram categorizados com base nos processos biológicos, por meio do *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Na figura, gerada pelo *software*, em roxo, pode-se observar os genes modulados pela droga e sua relação com a via dos Receptores Toll-Like.

4.7.2. Zebularina afeta a expressão de membros da via molecular SHH

A via SHH tem um papel importante no desenvolvimento do MB (Northcott et al., 2011). Aproximadamente 30% dos casos de MB são caracterizados pela ativação da via SHH (Taylor et al., 2012). Em alguns casos, esta ativação pode ser atribuída à uma amplificação ou mutação de seus componentes, a proteína de membrana Patched (PTCH1), um dos reguladores negativo desta via Suppressor of Fused (SUFU), e os fatores de transcrição GLI1 e GLI2, contribuindo assim para o fenótipo tumoral. No ensaio de *microarray*, o gene *SUFU* teve sua expressão elevada após o tratamento com a dose de 100 µM de zebularina, quando comparado com o controle (em torno de 17 vezes mais expresso). Sendo assim, investigou-se

a relação entre o tratamento, o aumento do gene *SUFU*, regulador negativo da via SHH, e o impacto nos componentes desta via.

Como pode-se observar na Fig. 12, através da análise de expressão gênica por qRT-PCR, observou-se que o tratamento com a Zebularina, na linhagem DAOY, foi capaz de reduzir a expressão dos genes *GLI1*, *SMO* e *PTCH1*, porém sem alterar a expressão do gene *SUFU*. Também observou-se uma redução proteica do fator de transcrição GLI1 após a incubação com a droga (200 e 400 μ M), nas linhagens DAOY e ONS-76. Este resultado mostra que o tratamento com a Zebularina é capaz de modular a expressão de componentes da via SHH, inibindo assim sua ativação.

Figura 12 - Perfil dos componentes da via SHH após o tratamento com Zebularina nas linhagens celulares de meduloblastoma. Os níveis de expressão dos genes *GLI1*, *SMO*, *PTCH1* e *SUFU* na linhagem DAOY (A) por qRT-PCR (A). Os níveis da proteína GLI1 nas linhagens de meduloblastoma, DAOY e ONS-76 foram avaliados por *western blotting* (B). Como controle endógeno foi utilizado a proteína GAPDH. A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada utilizando *software* ImageJ. Todos os ensaios foram realizados após o tratamento por 72 h com Zebularina (100, 200 e 400 μ M). * $p < 0,05$, comparado ao controle.

4.7.3 Zebularina modula expressão do gene *BATF2* em MB

As análises de expressão em larga escala também revelaram que o tratamento com a Zebularina elevou a expressão do gene *BATF2* (*Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-Like 2*) (em torno de 80 vezes mais quando comparado com o controle). Esse aumento induzido pela droga foi também confirmado por qRT-PCR na linhagem DAOY, como demonstrado na Figura 13 (nas outras linhagens de MB, Apêndice VI). Após tratamento com 200 μ M de Zebularina por 72 h, os níveis de mRNA do gene *BATF2* foram elevados significativamente, em torno de 7 vezes, quando comparados com o controle.

Figura 13 - **Expressão do gene *BATF2* após o tratamento com Zebularina na linhagem DAOY.** Os níveis de expressão do gene *BATF2* foram quantificados, por qRT-PCR, após 72 h de tratamento com a Zebularina (100 e 200 μ M), na linhagem DAOY. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

Visto que a Zebularina inibe a metilação do DNA e foi encontrado um aumento do gene *BATF2* após a incubação com este agente, investigou-se se essa indução poderia ser devido a redução da metilação promovida pela droga e, consequentemente, a reexpressão do gene. Além disso, faltam dados que expliquem as razões pelas quais o gene encontra-se em baixo nível quando comparado com sua contraparte não neoplásica em diferentes tumores. Para isso, avaliou-se os níveis de 5-metilcitosina (5-mC) em duas regiões do gene *BATF2*, uma localizada próxima ao *Transcription Start Site* (TSS) do gene e outra que localiza-se dentro de uma ilha CpG, próxima ao primeiro éxon. Ambas as regiões possuem níveis elevados de CGs, sendo então regiões passíveis de possuírem grupamento metil.

Os níveis de 5-mC (enriquecimento) presentes nessas regiões do gene *BATF2* foram comparados com os níveis encontrados em uma região do gene *GAPDH* (região fornecida

pelo *kit* e que apresenta baixos níveis de metilação). Esses níveis foram avaliados utilizando o kit *MethylCollector Ultra*, seguida pela técnica de qPCR, em 11 amostras de MB (MB), 4 amostras de cerebelos não neoplásicos (CN) e as quatro linhagens de MB (LC).

Foi observado que a região localizada dentro da ilha CpG do gene *BATF2* possui maiores níveis de 5-mC em comparação a região do gene *GAPDH*. As amostras de MB apresentaram a maior diferença de enriquecimento (FC=111; p=0,000), seguida das linhagens (FC=98; p=0,021) e dos cerebelos não neoplásicos (FC=59,84; p=0,021). (Fig. 14A).

Figura 14 – Níveis de 5-mC em regiões dos genes *BATF2* e *GAPDH*. O enriquecimento do DNA foi realizado pelo kit *MethylCollector Ultra*. A) Comparação dos níveis de metilação das regiões do gene *BATF2* e a região do gene *GAPDH* (controle negativo para metilação) em cerebelos controle (CN); amostras de meduloblastoma (MB) e linhagens celulares (LC); B) Comparação entre os níveis de metilação das regiões do gene *BATF2* nas amostras e linhagens de MB em relação aos cerebelos controles. Os valores de enriquecimento encontrados no gene *BATF2* foram normalizados pelos valores de *GAPDH*, utilizado para minimizar possível *background* da técnica. *p<0,05; FC = *fold change*.

Similarmente, a região do *TSS* no gene *BATF2* apresentou níveis maiores de 5-mC em comparação a região do *GAPDH*, sendo um FC=3,60 para os CN (p=0,021) e FC=14,48 nas amostras de MB (p=0,001), embora os níveis sejam menores do que aqueles observados na

região da ilha CpG (Fig. 14A). Assim, estes dados sugerem que a metilação pode regular a expressão deste gene, o que vai de acordo com nossos achados de hiperexpressão do *BATF2* após o tratamento com o agente desmetilante Zebularina.

Observamos que as regiões do gene *BATF2* possuem níveis elevados de metilação nas amostras e linhagens tumorais mas também nos cerebelos não neoplásicos (Fig. 14A); por isso, comparamos os níveis de 5-mC das amostras e linhagens em relação aos cerebelos controles (Fig. 14B). Para que os valores encontrados no *GAPDH* sejam considerados e normalizados, dividiu-se os valores de enriquecimento das amostras pelos valores do *GAPDH*.

Os níveis de 5-mC na região da ilha CpG foram maiores nas amostras de MB, que apresentaram um enriquecimento médio de 94,5 em comparação aos cerebelos controle (enriquecimento médio de 48,9), contudo essa diferença não foi significativa ($p=0,186$). Os níveis de enriquecimento foram significativamente maiores somente nas linhagens celulares em relação aos cerebelos controle ($FC=2,42$, $p=0,034$). Enquanto a região do TSS, nas amostras e linhagens de MB, também apresentou um enriquecimento maior em comparação aos cerebelos controle, porém essa diferença também não foi significativa ($p=0,09$ e $p=0,773$, respectivamente) (Fig. 14B). Assim, não foram encontradas diferenças significativas para concluir que a metilação dessas regiões do gene *BATF2* é uma característica determinante quando comparamos amostras de MB e tecido não neoplásico; embora, como demonstrado anteriormente, há níveis elevados de metilação neste gene.

A baixa expressão do gene *BATF2* é associada com um pior prognóstico em diversos tipos de tumores (Su et al., 2008; Ma et al., 2011; Wang et al., 2012; Wen et al., 2014; Han et al., 2015), contudo, não foram encontradas informações sobre os níveis de expressão em MB. Adicionalmente, neste estudo, encontrou-se que este gene possui regiões ricas em 5-mC, o que poderia levar ao silenciamento gênico devido a metilação. Sendo assim, avaliou-se a expressão do gene *BATF2* e sua possível relação com características clínicas dos pacientes com MB em 46 amostras consecutivas de MB, cinco amostras de cerebelos não neoplásicos e nas quatro linhagens de MB estudadas.

O gene *BATF2* encontra-se menos expresso nas amostras de MB e nas linhagens estudadas em relação aos cerebelos não neoplásicos ($FC=1,84$ e $3,53$, respectivamente), porém essa diferença somente é significativa quando comparamos as linhagens em relação aos cerebelos não neoplásicos ($p=0,027$) (Fig. 15).

Figura 15 - **Perfil de expressão do gene *BATF2***. Níveis de expressão do gene *BATF2*, por qRT-PCR, em amostras de cerebelos não-neoplásicos (CN; N=5), amostras de pacientes portadores de MB (N=46) e linhagens (N=4). O gráfico representa a mediana da expressão. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. Significância obtida através do teste de Mann-Whitney.

Quando comparamos os níveis de expressão do *BATF2* e sua relação com as características clínicas e biológicas dos pacientes, sua baixa expressão (2,8 vezes menor) foi significativamente associada com os pacientes portadores de MB classificados como alto risco ($p=0,016$) (Fig. 16E). Pacientes que apresentaram evento desfavorável (sofreram recidiva ou foram à óbito) também apresentaram níveis reduzidos do gene *BATF2* ($p=0,042$) (Fig. 16H). Porém não houve relação com o gênero, idade ao diagnóstico, grau de ressecção do tumor, presença ou ausência de metástase no momento do diagnóstico, a recidiva e histologia (Fig. 16). Os valores das medianas e valores mínimo e máximo da expressão gênica do *BATF2* de acordo com parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes estão no Apêndice VII.

Figura 16 - Perfil de expressão gênica do *BATF2* de acordo com as características clínicas dos pacientes portadores de meduloblastoma. Relação da expressão do gene *BATF2* quanto: A) gênero; B) idade ao diagnóstico; C) grau de ressecção do tumor; D) Presença ou ausência de metástase no momento do diagnóstico; E) MB de alto ou baixo risco; F) recidiva; G) histologia e H) evento desfavorável. Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor de expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

Adicionalmente, analisou-se a possível relação entre os níveis de expressão deste gene com a sobrevida livre de eventos em 5 anos (SLE) dos pacientes. A baixa expressão do gene *BATF2* foi associada com uma menor SLE ($24,8 \pm 9,3\%$ vs. $68,5 \pm 9,9$, $p=0,003$) (Fig. 17), confirmando que a baixa expressão do gene *BATF2* está relacionada com um pior prognóstico em MB.

Figura 17 - **Sobrevida Livre de Eventos de acordo com a expressão relativa do gene *BATF2*.** Os gráficos representam a sobrevida livre de eventos em 5 anos do gene *BATF2*. A linha tracejada refere-se aos pacientes com menor expressão do gene (n=23) e a linha contínua refere-se aos pacientes com maior expressão do gene *BATF2* (n=23).

5. Discussão

Apesar do tratamento atual, aproximadamente 40% das crianças portadoras de MB terão recidiva da doença e 30% irão à óbito (Jones et al., 2012). A grande maioria dos pacientes que sobrevive sofre com efeitos colaterais a longo-prazo devido ao tratamento, que pode afetar o desenvolvimento neurológico, endócrino e psicossocial (Spiegler et al., 2004).

A identificação de mecanismos moleculares que estejam alterados no MB pode resultar em tratamentos mais eficazes e, consequentemente, com menos efeitos colaterais (Crawford et al., 2007; Mabbot et al., 2008). Entre estes mecanismos, o padrão de metilação do DNA encontra-se aberrante no MB, promovendo o silenciamento de genes chave que contribuem para seu desenvolvimento, progressão e resistência (Lindsey et al., 2004; Lindsey et al., 2007; Diede et al., 2010; Kongkham et al., 2010; Bertrand et al., 2011; Wu et al., 2012); sendo inclusive utilizado para uma melhor classificação do MB em subgrupos distintos (Schwalbe et al., 2013).

As enzimas DNMTs são as responsáveis pela adição do grupamento metil no DNA e, quando alteradas, acarretam uma hipermetilação gênica aberrante (Robertson, 2005). Com essas alterações presentes, agentes que têm como alvos estas enzimas e, consequentemente, reduzem a metilação do DNA, têm se destacado como potenciais adjuvantes no tratamento antitumoral (Dawson & Kouzarides, 2012).

A Zebularina é um inibidor de DNMTs de segunda geração; embora apresente limitações de biodisponibilidade em modelos animais (Holleran et al., 2005) ela tem apresentado resultados antitumorais promissores (Tan et al., 2013; You et al., 2013; Nakamura et al., 2015), reforçando a importância de estudos que relatem sua eficácia e mecanismos. Contudo, estes efeitos ainda não foram relatados em MB.

Diversos estudos mostraram que a Zebularina tem como alvo a inibição das DNMTs, preferencialmente a DNMT1 (Cheng et al., 2004; Tan et al., 2013). Estudos propõem que a ligação covalente que acontece entre a Zebularina (incorporada ao DNA) e as DNMTs, pode levá-las a degradação, através do sistema de ubiquitinação. Consequentemente, ocorre uma baixa atividade enzimática, o que induziria então à uma redução da metilação gênica e alteração da expressão gênica de diversos genes (Champion et al., 2010; You e Park, 2013), promovendo então os efeitos antitumorais. Nossos dados mostram que a expressão da proteína DNMT1 foi reduzida após o tratamento com a droga Zebularina (Fig. 1), o que confirma seu modo de ação também em MB.

No presente estudo, realizamos a análise da proliferação e morte celular, combinação de drogas e expressão gênica para investigar os efeitos da inibição das DNMTs pela Zebularina em quatro linhagens de MB pediátrico. Foi observado que o tratamento com a Zebularina promove a inibição da proliferação e a capacidade clonogênica; e ainda aumenta o número de células na fase S do ciclo celular e número de células apoptóticas.

Estudos que também investigaram os efeitos da Zebularina na proliferação celular, verificaram resultados semelhantes aos nossos em diferentes neoplasias. Chiam et al. (2011) relataram uma redução significativa na proliferação de células de câncer de próstata a partir das doses de 100 μ M e que a Zebularina foi capaz de inibir totalmente a proliferação na dose de 400 μ M. Dados semelhantes foram observados também em células de leucemia linfóide aguda (Andrade et al., 2014), glioblastoma (Meador et al., 2010), câncer de pulmão (You & Park, 2013), mama (Billam et al., 2010), entre outros (Dote et al., 2005; Yang et al., 2013).

Foi possível também observar que o tempo de tratamento é de grande importância para uma utilização mais eficaz da droga, fato melhor evidenciado pelos diferentes valores de IC50 (Tabela 2), onde maiores tempos de incubação requerem doses menores da droga. Isto auxilia no entendimento do modo de ação da droga e como utilizá-la de forma a evitar altas doses desnecessariamente.

A capacidade de formar colônias também foi reduzida após o tratamento com a Zebularina (Fig. 3). Em concordância com os dados encontrados neste trabalho, Billam et al. (2010) relataram que as células de câncer de mama também reduziram a capacidade clonogênica após serem tratadas com Zebularina. O mesmo foi encontrado em células de glioblastoma (Meador et al., 2010). Isso ressalta a eficácia da droga, mesmo após sua remoção, visto que ela foi capaz de inibir a formação das colônias em mais de 90%.

A proliferação celular descontrolada e a capacidade de recuperação após um determinado tratamento que visa reduzir a viabilidade dessas células constituem características marcantes em diversos tumores. Sendo assim, drogas capazes de inibir o crescimento descontrolado desses tumores merecem investigações mais amplas dos seus mecanismos. Em nosso estudo, verificamos que após o tratamento com a Zebularina houve um aumento na expressão proteica de p53 e p21 (Fig. 4). Estudos relatam níveis aumentados dessas proteínas após tratamentos com inibidores de DNMTs, inclusive a Zebularina (Deng & Zhang, 2009; You & Park, 2013).

O status do *TP53* é estabelecido como um ponto vital na supressão do crescimento em resposta à diversos fatores de estresse celular (Römer et al., 2006). Foi possível observar um aumento nos níveis de expressão da p53 após a incubação com Zebularina para a linhagem

ONS-76 (*TP53* selvagem). Esse aumento pode estar relacionado aos danos ao DNA ou ainda a diminuição da metilação do DNA induzidos pela Zebularina (Karpf et al., 2001; Hodge et al., 2005). Ainda, foi relatado por Yang et al. (2013) que a Zebularina induziria um estresse ribossômico, o que levaria à estabilização da p53, aumentando seus níveis. Quantidades elevadas dessa proteína induz a expressão de diferentes genes alvo, incluindo *p21* e *Bax*, levando então à parada do ciclo celular e apoptose (Vousden & Lu, 2002).

O p21 é um inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDKs) e desempenha um papel importante no controle da proliferação, ciclo celular, proliferação dos progenitores neurais (Kippin et al., 2005; Pechnick et al., 2008) e na resposta a danos ao DNA induzidos por drogas desmetilante (Jiemjit et al., 2008). A linhagem DAOY mostrou níveis elevados de p21 após o tratamento embora possua mutação no gene *TP53*. Portanto, acredita-se que esse aumento seja independente do *status* do *TP53* (Butz et al., 1998), e sua ativação seja devido a diferentes fatores, como a regulação por outros reguladores como *Smad*, *Sp1-3*, *BRCAl* e *STAT* (Gartel & Tyner, 1999), ao estresse genotóxico (Michieli et al., 1994) ou à ativação das vias ERK e p38 (Shen et al., 2006).

Estudos também mostraram que a inibição da proliferação induzida pela droga ocorre juntamente com a alteração de outros genes envolvidos na proliferação celular como o *p16* (Suzuki et al., 2009; Tan et al., 2013), o que também contribuiria para os efeitos antiproliferativos aqui encontrados.

Estudos apontam que a Zebularina possui a capacidade de causar parada do ciclo celular em diferentes tecidos, porém a fase na qual isso ocorre não é comum para todos. Meador et al. (2010) demonstraram que a Zebularina induziu parada em G2/M, em células de glioblastoma. Por outro lado, Ruiz-Magan et al. (2011) mostraram que em leucemia linfóide aguda T, o tratamento não alterou o ciclo celular. No presente estudo, as linhagens de MB tratadas com Zebularina por 48 h apresentaram aumento no número de células na fase S e uma queda no número de células na fase G1 do ciclo (Fig. 6). Similarmente, outros estudos mostraram que a droga induziu parada na fase S em carcinoma de pulmão e câncer cervical (You & Park, 2013; You & Park, 2012). Billam et al. (2010) relataram que a Zebularina induz uma parada do ciclo na fase S em linhagens de câncer de mama e que esta parada pode ser resultado de uma instabilidade genômica causada pela redução nos níveis de DNMT1 juntamente com a repressão da síntese de histonas, induzindo a expressão de reguladores do ciclo, como o p21, achados que corroboram nossos dados.

A exposição a agentes desmetilantes pode causar um aumento da expressão de genes associados ao ciclo celular, como *p14*, *p15* ou *p21*, e de genes relacionados à indução de

apoptose como *caspase-8* ou *Apaf-1*, silenciados por hipermetilação (Baylin, 2005; Boulton & Wainscoat, 2007; Sigalotti et al., 2007). Como consequência, estes agentes induzem parada no ciclo celular e apoptose.

Para confirmar nossos achados de ciclo celular, realizamos a expressão da ciclina A, já que o complexo ciclina A/cdk2 é necessária para a progressão da fase S (Pagano et al., 1992). Foi observado uma diminuição da expressão dessa ciclina, em ambas as linhagens, após o tratamento com a Zebularina (Fig. 7). No único trabalho encontrado qual fase do ciclo??? que avaliou os níveis de ciclina A após o tratamento com a droga, Yoo & Park (2012) mostram um aumento nos níveis de ciclina A, diferentemente dos nossos resultados. Eles levantam a hipótese que esse aumento tenha sido em resposta da parada do ciclo, e não sua causa. Assim, a diminuição aqui encontrada poderia ser em consequência direta da inibição das DNMTs, da regulação da ciclina A pelo p21 (Morgan, 1995) ou, ainda, a parada do ciclo na fase S pode ter levado a sua degradação. Estudos mais aprofundados dessa dinâmica são necessários, visto que, neste projeto, os níveis proteicos da ciclina A foram analisados após 72h, e não 48h como o ensaio do ciclo celular.

A indução do aumento da apoptose é um dos efeitos procurados pelo tratamento de células tumorais que utilizam a quimioterapia (Portugal et al., 2009). No nosso trabalho, foi encontrado um aumento no número de células apoptóticas após o tratamento com a Zebularina (Fig. 8). E para ampliar e validar os dados encontrados, avaliou-se também o nível de apoptose em uma cultura primária de MB, na qual droga também foi capaz de induzir um aumento de células apoptóticas (Fig. 10). Dado que culturas primárias de tecidos neoplásicos são consideradas um modelo mais representativo dos tumores *in vivo* em comparação às linhagens celulares de tumores imortalizadas (Qian et al., 2006, Borges et al., 2012), é relevante destacar o potencial efeito antitumoral da Zebularina também neste tipo de cultura de MB.

A indução da apoptose tem sido relatado em diferentes células tumorais após o uso da Zebularina (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Suzuki et al., 2007; Ruiz-Magan et al., 2011). Ruiz-Magan et al. (2011) demonstraram em células T leucêmicas *TP53* deficientes, que o tratamento com Zebularina induziu alterações mitocondriais como ativação de Bak, perda do potencial transmembrana, além da geração de espécies reativas de oxigênio.

Nossos resultados também mostram que a Zebularina alterou diferentes proteínas envolvidas na morte celular, induzindo um aumento da proteína pro-apoptótica Bax em ambas as linhagens e reduzindo o nível das proteínas antiapoptóticas Survivina (em ambas as linhagens) e Bcl-2 (somente para a ONS-76) (Fig. 9). As proteínas da família Bcl-2

(inibidores de apoptose (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-XL) e indutores de apoptose (como Bax e Bad)) são essenciais durante ativação da via intrínseca da apoptose (Cory e Adams, 2002). Estudos confirmam nosso achados. Em células de câncer pancreático, Neureiter et al. (2007) relataram que, após o tratamento com Zebularina, houve uma redução da proteína Bcl-2 e hiperexpressão de Bax. Nakamura et al. (2013) demonstraram que o tratamento reduziu o nível da proteína Bcl-2, porém sem alterar a proteína Bax. Acredita-se que um desequilíbrio na proporção entre Bax/Bcl-2 já seria suficiente para desencadear a morte celular (Billam et al., 2010; Tsagarakis et al., 2011).

A Survivina (também conhecido como *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 - BIRC5*) é um membro da família Inibidoras da Apoptose (IAP) e promove a proliferação celular e previne a apoptose (Wheatley e McNeish, 2005; Altieri, 2008). Sua hiperexpressão tem sido observada em diversos tumores pediátricos (Fangusaro et al., 2006), a qual está correlacionada com um pior prognóstico clínico, incluindo em MBs (Pizem et al., 2005; Brun et al., 2015). Sua inibição farmacológica foi eficaz em modelos *in vitro* e *in vivo* de MBs do subgrupo SHH, impedindo o crescimento das células e do tumor (Brun et al., 2015). Aqui, a Zebularina foi capaz de reduzir os níveis de Survivina para ambas as linhagens celulares de MB. A sua diminuição pode resultar no bloqueio do crescimento tumoral e indução de morte celular, corroborando os resultados anteriores aqui encontrados.

Estes dados elucidam um dos mecanismos pelos quais a Zebularina induz a morte por apoptose em MB. Embora este tipo de morte celular seja o mecanismo mais comumente induzido pela Zebularina, ensaios que avaliem outros tipos de morte devem ser realizados para que haja um aprofundamento nos mecanismos da droga.

A qualidade de vida dos pacientes com MB após o tratamento não se alterou de modo substancial durante a última década e a natureza agressiva das terapias atuais tem sido um fator limitante, uma vez que promovem sequelas neurológicas e neurocognitivas. Isto faz com que se priorize a necessidade do desenvolvimento de novas terapias menos agressivas e que sejam capazes de melhorar a sobrevida global destes pacientes (Pomeroy e Cho, 2011).

A combinação entre quimioterápicos continua a ser uma abordagem de tratamento predominante antes e após a cirurgia para as neoplasias malignas. Sendo assim, realizamos a análise de combinação da Zebularina com agentes já utilizados no tratamento de MB, tais como a vincristina (VCR - inibidor mitótico) e a cisplatina (CIS - agente alquilante). Por meio de ensaios de proliferação celular, foi possível observar que a Zebularina agiu de modo sinérgico com a VCR, e de modo antagônico quando combinada com a CIS (Fig. 5).

Considerando-se que a Zebularina é descrita como um agente capaz de promover a reexpressão de genes supressores tumorais, além de possuir uma ação preferencial em células neoplásicas (Cheng et al., 2004), o sinergismo resultante da primeira combinação (Zebularina e VCR) pode ser devido à estas mudanças promovidas pela droga. Além disso, a VCR é descrita como capaz de reduzir os níveis de proteínas antiapoptóticas em MB (Shinwari et al., 2008), o que auxiliaria em um resultado sinérgico. Assim, seria possível a redução de doses utilizadas dos quimioterápicos, resultando em novas modalidades terapêuticas que tenham uma abordagem mais eficiente e com menores efeitos colaterais para os pacientes.

Nosso estudo também revela um antagonismo quando combinado CIS e Zebularina. De maneira similar, Flis et al. (2009) mostraram efeitos antagônicos resultantes da combinação entre Zebularina e oxaliplatina (assim como a CIS, um complexo de platina) em tumor colorretal. Contrariamente aos nossos achados, Balck et al. (2005) mostraram em células de câncer de ovário resistentes à cisplatina, que a Zebularina possui a capacidade de sensibilizá-las à esta droga. Suzuki et al. (2007) também relatam uma sinergia para essa combinação e pode ser explicado pelo aumento da taxa de apoptose. Acreditamos que uma incubação mais longa poderia resultar em uma combinação mais eficaz, uma vez que a apoptose induzida pela Zebularina ocorreu somente após 96h de incubação.

Diversos estudos relatam os efeitos da combinação entre quimioterápicos e a Zebularina, porém não há dados estudando essas interações em MB. Além disso, os resultados que existem em outros tumores são conflitantes, o que sugere que os efeitos dessas combinações possam ser tecido-específico. O nível de metilação, bem como a heterogeneidade das linhagens utilizadas neste estudo, irão afetar não somente nos resultados da combinação mas também na sensibilidade/resposta das linhagens como um todo.

A via SHH tem um papel crítico no desenvolvimento do cerebelo, promovendo a proliferação dos precursores neurais granulares da camada germinal externa do cerebelo (Berman et al., 2002). Após o desenvolvimento pós-natal, a via SHH é inativada na maioria dos tecidos, contudo sua ativação constitutiva pode originar diferentes tipos de câncer, incluindo o MB (Chari & McDonnell, 2007; Singh et al., 2009; Northcott et al., 2012).

A ativação da via SHH está presente em torno de 30% de todos os casos de MBs e é caracterizado por um prognóstico intermediário, semelhante ao do grupo 4 e apresentando níveis elevados de expressão da proteína GLI1 (Ingham & McMahon, 2001; Katoh & Katoh, 2009). Para que ocorra a ativação da via, o ativador Shh se liga ao receptor transmembrana PTCH1, que libera a repressão da Smoothed (SMO). Após essa liberação, SMO induz o aumento da expressão de genes alvo no núcleo, incluindo *GLI1* e *PTCH1* (Romer & Curran,

2005). A proteína SUFU possui um papel central na inibição da via, inibindo GLI1 (Svard et al., 2006); porém quando a via está ativada, ocorre um aumento da degradação de SUFU possibilitando que GLI1 ative seus genes alvo (Yue et al., 2009).

Aqui, foi encontrado que a Zebularina pode modular a ativação desta via, reduzindo os níveis de GLI1 (mRNA e proteína) e de um de seus alvos, o *PTCH1*. Os níveis de *SMO* também foram reduzidos, contudo sem alterar os níveis de *SUFU* (Fig. 12), embora no ensaio de *microarray* ele estivesse mais expresso. Essa modulação gênica, promovida pela droga, poderia levar à inativação desta via e, conseqüentemente, inibir a expressão dos genes alvos (*ciclina D*, *Myc*, *Bcl-2*) e a proliferação celular (Shahi et al., 2010). Sabe-se que a ativação de uma via depende de vários fatores e componentes, aqui podemos citar o GLI2 e o ligante Shh (Kimura et al., 2005), que não foram analisados neste trabalho. Estudos que explorem esses mecanismos devem ser realizados, visto que a Zebularina poderia ser eficaz também em outros tumores SHH-dependentes.

Apesar dos resultados até agora relatados, pouco se sabe sobre moléculas e/ou vias oncogênicas DNMTs-dependente que poderiam ser desestabilizadas após o tratamento com este inibidor. Ainda, considerando que a Zebularina é um inibidor global de metilação, é razoável pensar que os efeitos finais observados nos ensaios correspondem a uma desregulação de múltiplas vias oncogênicas complexas. Dessa forma, a utilização de metodologias de análises globais que permitam uma melhor compreensão destas vias são de fundamental importância. A análise transcriptômica permite estudar as mudanças globais na expressão gênica de células neoplásicas, especialmente aquelas envolvidas na resposta a drogas (Fang, et al., 2008). Para isso, realizamos o ensaio de *microarray* com o tratamento da linhagem DAOY, utilizando 100µM de Zebularina por 72 h.

A análise de expressão gênica em larga escala mostrou que a via dos Receptores Toll-like (TLRs) foi a mais significativamente alterada pela Zebularina (Fig. 11). Quando ativados, os TLRs reconhecem padrões moleculares associados à agentes patogênicos distintos e desempenham um papel crítico na resposta imune inata. Eles participam da primeira linha de defesa contra patógenos invasores e desempenham um papel importante na inflamação, regulação das células imunes, sobrevivência e proliferação celular (Li et al., 2010; Reuven et al., 2014). A ativação dos TLRs pode induzir a regressão tumoral recrutando leucócitos, o que resulta em lise celular causada pelas células-T e as *natural killers* (Garay et al., 2007). Contudo, a ativação desta também está associada à carcinogênese, aumentando a sobrevivência e proliferação celular de diferentes tipos de tumores, embora seu papel na

iniciação tumoral ainda não esteja claro (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Pradere et al., 2014).

A ativação desta via induz uma resposta onde moléculas, tais como MAPKs (JNK e p38MAPK), NF- κ B e JNK são ativadas e, conseqüentemente, ocorre a indução de diversas citocinas pró-inflamatórias, levando a respostas antibacterianas e antivirais, podendo resultar em morte celular (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009, Newton & Dixit, 2012). Recentemente, Chiappinelli et al. (2015) e Roulois et al. (2015) mostraram que os efeitos antitumorais de inibidores de DNMTs são resultado de uma resposta imune, ativando os sensores de RNA de dupla fita, causando então uma resposta mediada por Interferon (IFN) tipo I e apoptose das células tumorais. Essa resposta imune ocorre juntamente com a ativação de membros da via TLRs, o que corroboraria os dados encontrados. Adicionalmente, membros da via *high mobility group box 1* (HMGB1), também encontrada modulada pela Zebularina neste estudo, são relatados como estimuladores dos TLRs (Park et al., 2004; 2006). Conseqüentemente, entender o papel desta via e as conseqüências da sua ativação (causada aqui pela Zebularina) resultará na sua correta modulação, visando a terapia antitumoral.

A análise do microarray também apontou o gene *BATF2* com níveis maiores de expressão após a incubação com a Zebularina, também confirmados por qRT-PCR na linhagem DAOY (outras linhagens Apêndice VI) (Fig. 13). Seria razoável levantar a hipótese de que o mecanismo responsável por esse aumento seria a remoção da metilação presente neste gene, induzida pelo fármaco. Mesmo com a ausência de ilhas CpG no promotor deste gene (Ma et al., 2011), relatamos a presença de duas regiões possuindo uma quantidade elevada de metilação (Fig. 14), sendo então possível que a metilação seja responsável pelo controle de expressão desse gene.

Como citado anteriormente, trabalhos mostraram que inibidores de DNMTs poderiam sensibilizar pacientes ao tratamento imunoterápico através de uma resposta induzida por IFN (Chiappinelli et al., 2015; Roulois et al., 2015). E visto que o gene *BATF2* é um gene modulado por IFN, não se descarta que sua ativação seja também devido a este tipo de resposta. Outros ensaios devem ser realizados para elucidar as causas da sua indução, embora nossos dados apontem para a metilação como causa da indução aqui encontrada.

Em nosso estudo, a baixa expressão do gene *BATF2* também foi associada à um pior prognóstico nos pacientes portadores de MB (Figs. 16 e 17). O gene *BATF2* (também conhecido como *SARI - suppressor of AP-1, regulated by IFN*) está localizado no braço longo do cromossomo 11 entre as regiões 11q12 e 11q13. Este gene é constituído de 3 éxons (Su et

al., 2008). Análises de expressão gênica identificaram este gene silenciado nos tumores, possuindo um possível papel de supressor tumoral (Su et al., 2008). A baixa expressão de *BATF2* foi associada à um pior prognóstico em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular (Ma et al., 2010), observando-se uma correlação entre a baixa expressão de *BATF2* e um maior tamanho tumoral, sugerindo que a perda deste gene poderia estar associada com a rápida expansão do tumor.

Outros estudos confirmam esta hipótese. Os baixos níveis de expressão do *BATF2* também foi relacionada com a progressão tumoral e com um pior prognóstico em pacientes portadores de tumor colorretal (Liu et al., 2015). E estudos *in vitro* observaram que a restauração da sua expressão inibiu a proliferação, migração e invasão celular e induziu a morte celular nas linhagens tumorais de colorretal. Em ensaios *in vivo*, a restauração deste gene mostrou ser capaz de reduzir o volume tumoral, reforçando a capacidade supressora tumoral deste gene (Liu et al., 2015). Estes dados estão de acordo com nossos resultados, sua baixa expressão está relacionada à uma menor sobrevida dos pacientes portadores de MB, embora sua expressão não seja significativamente menor nas amostras de MB quando comparadas as amostras não neoplásicas (somente foi significativo nas linhagens). Todos estes fatos indicam a importância de estudos futuros de modulação deste gene para melhor compreender seu papel no MB e as consequências de sua ativação (aqui, promovida pela droga).

Os dados mostrados neste projeto confirmam que a Zebularina é um potencial agente para a terapia adjuvante no tratamento do MB pediátrico. A capacidade de reverter o estado de metilação do DNA e a consequente reexpressão de genes é um cenário bastante atrativo à ser explorado. Nossos resultados permitiram entender melhor as consequências do uso de drogas desmetilantes no MB e assim traçar uma abordagem mais apropriada para a utilização desta classe de drogas. A utilização do inibidor Zebularina, combinada ou não, mostrou ter grande potencial para futuros estudos em modelo *in vivo* para meduloblastoma.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O tratamento com a Zebularina causou a inibição da proteína DNMT1 e reduziu a proliferação celular, a clonogenicidade e induziu a apoptose. Esses efeitos foram acompanhados por um acúmulo de células na fase S do ciclo celular;
- A Zebularina induziu um aumento no número de células apoptóticas em uma cultura primária de MB;
- O tratamento alterou proteínas envolvidas com a proliferação/distribuição do ciclo celular e também envolvidas na apoptose;
- A inibição das DNMTs promovida pela Zebularina foi capaz de modular a via SHH e alterar diferentes vias relacionadas com o câncer;
- A Zebularina induziu a expressão do gene *BATF2*; encontrou-se que este gene possui níveis maiores de metilação em comparação ao gene *GAPDH* e sua baixa expressão foi associada à um pior prognóstico em MB;
- A Zebularina agiu sinergicamente com a vincristina nas linhagens de MB, contudo seus efeitos foram antagônicos quando combinada com a cisplatina;
- A Zebularina pode ser considerada uma possível abordagem para o tratamento dos MBs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6276-84. doi: 10.1038/onc.2008.303.
- Amara K, Ziadi S, Hachana M, Soltani N, Korbi S, Trimeche M. DNA methyltransferase DNMT3b protein overexpression as a prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Sci*. 2010 Jul;101(7):1722-30. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01569.x. Epub 2010 Mar 19.
- Andersen JB, Factor VM, Marquardt JU, et al. An integrated genomic and epigenomic approach predicts therapeutic response to zebularine in human liver cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Oct 20;2(54):54ra77. doi: 10.1126/scitranslmed.3001338.
- Andrade AF, Borges KS, Castro-Gamero AM, et al. Zebularine induces chemosensitization to methotrexate and efficiently decreases AhR gene methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Anticancer Drugs*. 2014 Jan;25(1):72-81. doi: 10.1097/CAD.0000000000000028.
- Balch C, Yan P, Craft T, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*. 2005 Oct;4(10):1505-14.
- Batora NV, Sturm D, Jones DT, et al. Transitioning from genotypes to epigenotypes: why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience*. 2014 Apr 4;264:171-85. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.030. Epub 2013 Jul 20.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;(2 suppl. 1):S4–S11.
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*. 2002 Aug 30;297(5586):1559-61.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. *Cell*. 2007; 128: 669–681.
- Bertrand KC, Mack SC, Northcott PA, et al. PCDH10 is a candidate tumour suppressor gene in medulloblastoma. *Childs Nerv Syst*. 2011 Aug;27(8):1243-9. doi: 10.1007/s00381-011-1486-x. Epub 2011 May 20.
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr;120(3):581-92. Epub 2009 May 21.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6-21.
- Borges KS, Moreno DA, Martinelli CE Jr, et al. Spindle assembly checkpoint gene expression in childhood adrenocortical tumors (ACT): Overexpression of Aurora kinases A and B is associated with a poor prognosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Nov;60(11):1809-16. doi: 10.1002/pbc.24653. Epub 2013 Jun 20.

- Boulton J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2007;138(1):3-11.
- Brun SN, Markant SL, Esparza LA, et al. Survivin as a therapeutic target in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Oncogene*. 2015 Jul;34(29):3770-9. doi: 10.1038/onc.2014.304. Epub 2014 Sep 22.
- Butz K, Shahabuddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*. 1995 Mar 2;10(5):927-36.
- Carlotti, CGJr, Smith, C, Rutka, JT. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev*. 2008; 31(4):359-68.
- CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States (2007-2008). Primary brain tumors in the United States, Statistical Report (2000-2004), Years of Data Collected. Chicago: Author.
- Champion C, Guianvarc'h D, Sénamaud-Beaufort C, et al. Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One*. 2010 Aug 24;5(8):e12388. doi: 10.1371/journal.pone.0012388.
- Chan AW, Tarbell NJ, Black PM, et al. Adult medulloblastoma: prognostic factors and patterns of relapse. *Neurosurgery*. 2000 Sep;47(3):623-31; discussion 631-2.
- Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2007 Sep;14(5):344-52.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Mar 5;95(5):399-409.
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, et al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24:1270-1278.
- Chiam K, Centenera MM, Butler LM, Tilley WD, Bianco-Miotto T. GSTP1 DNA methylation and expression status is indicative of 5-aza-2'-deoxycytidine efficacy in human prostate cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(9):e25634. doi: 10.1371/journal.pone.0025634. Epub 2011 Sep 28.
- Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):974-86. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.011.
- Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58:621-681.
- Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, et al. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas

- associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*. 2006 Nov;5(22):2666-70. Epub 2006 Nov 15.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.
- Cowan R, Hoban P, Kelsey A, Birch JM, Gattamaneni R, Evans DG. The gene for the naevoid basal cell carcinoma syndrome acts as a tumour-suppressor gene in medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1997;76(2):141-5.
- Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol*. 2007 Dec;6(12):1073-85.
- Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4632-42.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- Deng T, Zhang Y. Possible involvement of activation of P53/P21 and demethylation of RUNX 3 in the cytotoxicity against Lovo cells induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Life Sci*. 2009 Feb 27;84(9-10):311-20. doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.015. Epub 2008 Dec 31.
- Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist*. 2013;18(5):619-24. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0465. Epub 2013 May 13.
- Dhall, G. Medulloblastoma. *J Child Neurol*. 2009; 24(11):1418-30.
- Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, et al. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):234-9. Epub 2009 Dec 4.
- Dote H, Cerna D, Burgan WE, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4571-9.
- Dubuc, AM, Northcott, PA, Mack, S, et al. The Genetics of Pediatric Brain Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2010; 10:215–223.
- Ducasse M, Brown MA. Epigenetic Aberrations and Cancer. *Molecular Cancer*. 2006; 5(60): 1-10.
- Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, et al. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 1;23(31):7951-7.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343:1350–1354.

- Esteller, M, Risques, RA, Toyota, M, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*,15, 61, 4689-92, 2001.
- Fan X, Eberhart CG. Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 10;26(17):2821-7. doi: 10.1200/JCO.2007.15.2264.
- Fang H, Wang K, Zhang J. Transcriptome and proteome analyses of drug interactions with natural products. *Curr Drug Metab.* 2008 Dec;9(10):1038-48.
- Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA. Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Jul;47(1):4-13.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009 Mar;10(3):223-32. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70003-8. Epub 2009 Feb 21.
- Flis S, Gnyszka A, Misiewicz-Krzemińska I, Splawiński J. Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205. *Cancer Cell International.* 2009;9:10. doi:10.1186/1475-2867-9-10.
- Gallinari P, Di Marco S, Jones P, et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research.* 2007; 17: 195-211.
- Garay RP, Viens P, Bauer J, et al. Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jun 1;563(1-3):1-17. Epub 2007 Feb 17.
- Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 1;246(2):280-9.
- Grill, J, Bhangoo, R. Recent development in chemotherapy of paediatric brain tumours. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19:612–615.
- Halperin EC, Friedman HS. Is there a correlation between duration of presenting symptoms and stage of medulloblastoma at the time of diagnosis? *Cancer* 1996; 78: 874–80.
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995 Mar 30;332(13):839-47.
- Han T, Wang Z, Yang Y, et al. The tumor-suppressive role of BATF2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2015 Sep;34(3):1353-60. doi: 10.3892/or.2015.4090. Epub 2015 Jun 26.
- Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res.* 2002 Oct 15;62(20):5897-901.
- Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1775(1):76-91. Epub 2006 Jul 21.

- Herranz M, Martín-Caballero J, Fraga MF, et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1174-7. Epub 2005 Oct 20.
- Hodge DR, Peng B, Cherry JC, et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4673-82.
- Holleran JL, Parise RA, Joseph E, et al. Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3862-8.
- Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010 May;10(5):319-31. doi: 10.1038/nrc2818.
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059-87.
- Jiemjit A, Fandy TE, Carraway H, et al. p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene*. 2008 Jun 5;27(25):3615-23. doi: 10.1038/sj.onc.1211018. Epub 2008 Jan 28.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.
- Jones DT, Jäger N, Kool M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. 2012 Aug 2;488(7409):100-5. doi: 10.1038/nature11284.
- Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol*. 2001 Apr;59(4):751-7.
- Katoh Y, Katoh M. Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGFbeta-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals. *Int J Oncol*. 2009 Jul;35(1):187-92.
- Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, Ji L, Sposto R, Triche TJ, Reynolds CP. Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(14):1107-19.
- Kimura H, Stephen D, Joyner A, Curran T. Gli1 is important for medulloblastoma formation in Ptc1^{+/-} mice. *Oncogene*. 2005 Jun 9;24(25):4026-36.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev*. 2005 Mar 15;19(6):756-67.

- Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, et al. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*. 2010 May 20;29(20):3017-24. Epub 2010 Mar 8.
- Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2012 Apr;123(4):473-84. doi: 10.1007/s00401-012-0958-8. Epub 2012 Feb 23.
- Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*. 2010 Jan;49(1):1-9. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.010. Epub 2009 Sep 22.
- Lindsey JC, Hill RM, Megahed H, et al. TP53 mutations in favorable-risk Wnt/Wingless-subtype medulloblastomas. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):e344-6; author reply e347-8. doi: 10.1200/JCO.2010.33.8590. Epub 2011 Feb 28.
- Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, et al. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis*. 2004 May;25(5):661-8. Epub 2003 Dec 19.
- Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Gilbertson RJ, Ellison DW, Clifford SC. Epigenetic deregulation of multiple S100 gene family members by differential hypomethylation and hypermethylation events in medulloblastoma. *Br J Cancer*. 2007 Jul 16;97(2):267-74. Epub 2007 Jun 19.
- Liu Z, Yang Y, Zhou X. BATF2 in human colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2015 May;7(5):284-5.
- Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6.
- Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC. Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development. *Cancer Res*. 2002 Oct 15;62(20):5906-11.
- Ma H, Liang X, Chen Y, et al. Decreased expression of BATF2 is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 Feb 15;128(4):771-7. doi: 10.1002/ijc.25407.
- Mabbott DJ, Penkman L, Witol A, Strother D, Bouffet E. Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors. *Neuropsychology*. 2008 Mar;22(2):159-68. doi: 10.1037/0894-4105.22.2.159.
- Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, et al. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Nov;1058:246-54.

- Meador JA, Su Y, Ravanat JL, Balajee AS. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis*. 2010 Feb;31(2):184-91. Epub 2009 Nov 23.
- Meador JA, Su Y, Ravanat JL, Balajee AS. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis*. 2010 Feb;31(2):184-91. doi: 10.1093/carcin/bgp284. Epub 2009 Nov 23.
- Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*. 1994 Jul 1;54(13):3391-5.
- Momparler RL. Cancer Epigenetics. *Oncogene*. 2003; 22: 6479-6483.
- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):131-4.
- Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLoS One*. 2013;8(1):e54036. doi: 10.1371/journal.pone.0054036. Epub 2013 Jan 8.
- Nakamura K, Nakabayashi K, Htet Aung K, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0120545. doi: 10.1371/journal.pone.0120545. eCollection 2015.
- Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. 2001 Oct 31;278(1-2):25-31.
- Neureiter D, Zopf S, Leu T, et al. Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol*. 2007 Jan;42(1):103-16.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3). pii: a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
- Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol*. 2012 May 8;8(6):340-51. doi: 10.1038/nrneurol.2012.78.
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1408-14. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4324. Epub 2010 Sep 7.
- Oliveira LH, Schiavinato JL, Fráguas MS, Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 2015 Oct;106(10):1264-77. doi: 10.1111/cas.12766. Epub 2015 Sep 21.
- Packer RJ, Vezina G. Management of and prognosis with medulloblastoma: therapy at a crossroads. *Arch Neurol*. 2008 Nov;65(11):1419-24. doi: 10.1001/archneur.65.11.1419.

- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*. 1992 Mar;11(3):961-71.
- Pan E, Pellarin M, Holmes E, et al. Isochromosome 17q is a negative prognostic factor in poor-risk childhood medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 1;11(13):4733-40.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Mar;290(3):C917-24. Epub 2005 Nov 2.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7370-7. Epub 2003 Dec 4.
- Patties I, Jahns J, Hildebrandt G, et al. Additive effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and irradiation on clonogenic survival of human medulloblastoma cell lines. *Strahlenther Onkol*. 2009 May;185(5):331-8. Epub 2009 May 15.
- Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, Pourmorady J, Chesnokova V. p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 29;105(4):1358-63. doi: 10.1073/pnas.0711030105. Epub 2008 Jan 2.
- Pfister SM, Korshunov A, Kool M, et al. Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol*. 2010 Nov;120(5):553-66. Epub 2010 Sep 30.
- Pizem J, Cört A, Zdravec-Zaletel L, Popovic M. Survivin is a negative prognostic marker in medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005 Aug;31(4):422-8.
- Pomeroy SL, Cho YJ. Molecular fingerprints of medulloblastoma and their application to clinical practice. *Future Oncol*. 2011 Mar;7(3):327-9. doi: 10.2217/fon.11.15.
- Pompeia C, Hodge DR, Plass C, et al. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res*. 2004 May 15;64(10):3465-73.
- Portugal J, Bataller M, Mansilla S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. *Tumori*. 2009; 95(4): 409-21.
- Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014 Jul 3;33(27):3485-95. doi: 10.1038/onc.2013.302. Epub 2013 Aug 12.
- Qian L, Block ML, Wei SJ, et al. Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Oct;319(1):44-52. Epub 2006 Jun 28.
- Qu Y, Mu G, Wu Y, et al. Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. *Am J Clin Pathol*. 2010 Nov;134(5):826-34. doi: 10.1309/AJCPHGQ69FXDFWIL.

- Raffel C, Thomas GA, Tishler DM, Lasso S, Allen JC. Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Neurosurgery*. 1993 Aug;33(2):301-5; discussion 305-6.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jan;9(1):57-63. doi: 10.1038/nrc2541. Epub 2008 Dec 4.
- Rao SP, Rechsteiner MP, Berger C, Sigrist JA, Nadal D, Bernasconi M. Zebularine reactivates silenced E-cadherin but unlike 5-Azacytidine does not induce switching from latent to lytic Epstein-Barr virus infection in Burkitt's lymphoma Akata cells. *Mol Cancer*. 2007 Jan 10;6:3.
- Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1586-93. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.020. Epub 2014 Jan 27.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):461-7.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):597-610.
- Romer J, Curran T. Targeting medulloblastoma: Small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res*. 2005;65:4975-4978.
- Römer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J. p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2006 Oct 6;45(39):6440-60.
- Rood BR, Macdonald TJ, Packer RJ. Current treatment of medulloblastoma: recent advances and future challenges. *Semin Oncol*. 2004 Oct;31(5):666-75.
- Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*. 2007; 1: 19-25.
- Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):961-73. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.056.
- Roussel MF, Hatten ME. Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:235-82. doi: 10.1016/B978-0-12-380916-2.00008-5.
- Ruiz-Magaña MJ, Rodríguez-Vargas JM, Morales JC, Saldivia MA, Schulze-Osthoff K, Ruiz-Ruiz C. The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells. *Int J Cancer*. 2012 Mar 1;130(5):1195-207. doi: 10.1002/ijc.26107. Epub 2011 Jul 21.
- Sardi I, Cavalieri D, Massimino M. Emerging treatments and gene expression profiling in high-risk medulloblastoma. *Paediatr Drugs*. 2007;9(2):81-96.

- Sato H, Oka T, Shinnou Y, et al. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol.* 2010 Jan;176(1):402-15. doi: 10.2353/ajpath.2010.090236. Epub 2009 Dec 17.
- Schwalbe EC, Williamson D, Lindsey JC, et al. DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol.* 2013 Mar;125(3):359-71. doi: 10.1007/s00401-012-1077-2. Epub 2013 Jan 5.
- Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol.* 2007 Feb;35(2):263-73.
- Shahi MH, Afzal M, Sinha S, et al. Regulation of sonic hedgehog-GLI1 downstream target genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and their epigenetic status in medulloblastoma and astrocytoma. *BMC Cancer.* 2010 Nov 8;10:614. doi: 10.1186/1471-2407-10-614.
- Shen G, Xu C, Chen C, Hebbar V, Kong AN. p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Feb;57(3):317-27. Epub 2005 Sep 17.
- Shi B, Hsu HL, Evens AM, et al. Expression of the candidate MCT-1 oncogene in B- and T-cell lymphoid malignancies. *Blood.* 2003; 102(1):297-302.
- Shinwari Z, Manogaran PS, Alrokayan SA, Al-Hussein KA, Aboussekhra A. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21(WAF1) up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *J Neurooncol.* 2008 Apr;87(2):123-32. Epub 2007 Dec 6.
- Sigalotti L, Fratta E, Coral S, et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):330-44.
- Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4059-70.
- Singh RR, Cho-Vega JH, Davuluri Y, et al. Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2550-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1808. Epub 2009 Feb 24.
- Spiegler BJ, Bouffet E, Greenberg ML, Rutka JT, Mabbott DJ. Change in neurocognitive functioning after treatment with cranial radiation in childhood. *J Clin Oncol.* 2004 Feb 15;22(4):706-13.
- Srivastava, V.K., Nalbantoglu, J. The cellular and developmental biology of medulloblastoma: Current perspectives on experimental therapeutics. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 9(11): 843-852.
- Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, et al. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences

clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood*. 2009 Dec 24;114(27):5490-8. doi: 10.1182/blood-2009-06-227660. Epub 2009 Oct 23.

Su ZZ, Lee SG, Emdad L, et al. Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20906-11. doi: 10.1073/pnas.0807975106. Epub 2008 Dec 12.

Su ZZ, Lee SG, Emdad L, et al. Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20906-11. doi: 10.1073/pnas.0807975106. Epub 2008 Dec 12.

Suzuki M, Shinohara F, Endo M, et al. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64(2):223-32.

Suzuki M, Shinohara F, Endo M, Sugazaki M, Echigo S, Rikiishi H. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jul;64(2):223-32. doi: 10.1007/s00280-008-0833-4. Epub 2008 Oct 2.

Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, et al. Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2007;31(6):1449-56.

Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, et al. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell*. 2006;10:187-197.

Tan W, Zhou W, Yu HG, Luo HS, Shen L. The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 4;430(1):250-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.143. Epub 2012 Nov 17.

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012 Apr;123(4):465-72.

Taylor RE, Bailey CC, Robinson KJ, et al. Outcome for patients with metastatic (M2-3) medulloblastoma treated with SIOP/UKCCSG PNET-3 chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2005 Mar;41(5):727-34. Epub 2005 Jan 18.

Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, Kolios G, Kouroumalis EA. Octreotide induces caspase activation and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. 2011 Jan 21;17(3):313-21. doi: 10.3748/wjg.v17.i3.313.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5116-21. Epub 2001 Apr 17.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604.

- Wang C, Su Y, Zhang L, et al. The function of SARI in modulating epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma metastasis. *PLoS One*. 2012;7(9):e38046. doi: 10.1371/journal.pone.0038046. Epub 2012 Sep 26.
- Wen H, Chen Y, Hu Z, Mo Q, Tang J, Sun C. Decreased expression of BATF2 is significantly associated with poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2014 Jan;31(1):169-74. doi: 10.3892/or.2013.2863. Epub 2013 Nov 20.
- Wheatley SP, McNeish IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*. 2005;247:35-88.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):138-62. Epub 2006 Sep 1.
- Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*. 2002 Sep;31(8):443-9.
- Wu J, Fang J, Yang Z, Chen F, Liu J, Wang Y. Wnt inhibitory factor-1 regulates glioblastoma cell cycle and proliferation. *J Clin Neurosci*. 2012 Oct;19(10):1428-32. doi: 10.1016/j.jocn.2011.12.023. Epub 2012 Aug 14.
- Yang PM, Lin YT, Shun CT, et al. Zebularine inhibits tumorigenesis and stemness of colorectal cancer via p53-dependent endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2013 Nov 14;3:3219. doi: 10.1038/srep03219.
- Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, et al. Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008 Sep;1(4):233-40. Epub 2008 Mar 19.
- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jan;5(1):37-50.
- You BR, Park WH. Zebularine inhibits the growth of A549 lung cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Carcinog*. 2013.
- You BR, Park WH. Zebularine inhibits the growth of A549 lung cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Carcinog*. 2014 Nov;53(11):847-57. doi: 10.1002/mc.22042. Epub 2013 May 9.
- You BR, Park WH. Zebularine inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Mol Biol Rep*. 2012 Oct;39(10):9723-31. doi: 10.1007/s11033-012-1837-z. Epub 2012 Jun 21.
- Yue S, Chen Y, Cheng SY. Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*. 2009 Jan 29;28(4):492-9. doi: 10.1038/onc.2008.403. Epub 2008 Nov 10.

8. Apêndice

Apêndice I - Tabela dos parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes portadores de meduloblastoma. Amostras com sinal de (*) foram utilizadas também no ensaio de metilação. Legenda: **ID:** Identificação; **Protocolo:** 1- CCNU/ Cisplatina/ Vincristina + Radioterapia, 2- Carboplatina/ Ifosfamida/ Vincristina/ Etoposídeo + Radioterapia, 3- outros protocolos. **Sexo:** F-Feminino, M-Masculino. **Histologia:** 1- Outros (Clássicos, Extensamente Nodular ou Grandes células anaplásicas), 2- Desmoplásico. SD - sem dados disponíveis. Amostras com sinal de (*) foram utilizadas também no ensaio de metilação.

ID	Protocolo	Gênero	Idade Diagnóstico	Grau Ressecção	Metástase	Risco	Recidiva	Histologia	Evento Recidiva/Óbito	Tempo Evento (Meses)	Tempo Óbito (Meses)
100	3	F	> 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	10	10
194*	3	M	> 3anos	Incompleto	Presença	Alto	Presença	2	Recidiva/Óbito	26	26
323	3	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Presença	1	Recidiva/Óbito	29	29
426	1	M	> 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	2	Vivo	145	145
449*	1	F	> 3anos	Completo	Ausência	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	51	51
467	1	M	> 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	8	8
483*	1	F	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Ausência	1	Vivo	46	46
561	3	M	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Presença	2	Recidiva/Óbito	4	4
761*	1	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	95	95
776	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	87	87
797*	1	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	168	168
899	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Presença	1	Recidiva/Óbito	50	53
915	3	M	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	11	11
952*	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Presença	1	Recidiva/Óbito	32	32
1073	1	M	> 3anos	Completo	Ausência	Alto	Ausência	1	Vivo	103	103
1218	1	F	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	24	31
1270	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	79	79
1357*	1	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	76	76
1362*	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	75	75

ID	Protocolo	Gênero	Idade Diagnóstico	Grau Ressecção	Metástase	Risco	Recidiva	Histologia	Evento Recidiva/Óbito	Tempo Evento (Meses)	Tempo Óbito (Meses)
1474*	1	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	1	Vivo	74	74
1601*	1	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	66	66
1877*	3	M	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Presença	2	Recidiva/Óbito	0	0
2045	1	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	56	56
2113	1	M	< 3anos	Incompleto	Presença	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	16	18
2166	1	M	< 3anos	Incompleto	Presença	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	0	8
9102	3	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	1	1
64402	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	156	156
65002	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Recidiva/Óbito	6	6
67002	2	M	> 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	18	18
76002	3	F	< 3anos	Incompleto	Presença	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	5	5
79803	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	2	Vivo	144	144
35504	3	F	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	49	49
43504	2	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	0	0
8305	2	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Presença	1	Recidiva/Óbito	13	21
49405	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	53	53
44306	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	108	108
51406	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	106	106
79906	2	F	< 3anos	SD	Ausência	SD	Presença	2	Recidiva/Óbito	7	38
44507	2	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Presença	1	Vivo	57	94
73507	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	96	96
58608	3	M	> 3anos	Completo	Ausência	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	16	16
84408	2	F	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Recidiva/Óbito	48	61
31010	2	SD	< 3anos	Completo	Ausência	Baixo	Ausência	1	Vivo	24	24
6611	3	F	< 3anos	Incompleto	Ausência	Alto	Ausência	1	Recidiva/Óbito	41	41
22211	2	M	< 3anos	Incompleto	Presença	Alto	Ausência	2	Vivo	52	52

ID	Protocolo	Gênero	Idade Diagnóstico	Grau Ressecção	Metástase	Risco	Recidiva	Histologia	Evento Recidiva/Óbito	Tempo Evento (Meses)	Tempo Óbito (Meses)
31811	2	F	< 3anos	Completo	Presença	Alto	Ausência	2	Vivo	48	48

Apêndice II. Dados Clínicos dos pacientes doadores dos cerebelos não neoplásicos. Amostras com sinal de (*) foram utilizadas também no ensaio de metilação.

ID	Sexo	Idade	Causa Óbito
CC5	M	17 dias	Cardiopatía congênita complexa
CC7*	M	7 anos	Broncopneumonia supurativa bilateral
CC11	F	6 meses	Epidermólise Bolhosa
CC12*	F	1 ano	Infeccção Intestinal Grave
CC13*	F	13 anos	Linfoma Não-Hodgkin alto grau
CC15*	F	31 anos	Esofagite Aguda Hemorrágica

F-Feminino; M-Masculino.

Apêndice III. Dados citogenéticos e molecular das linhagens celulares de meduloblastoma utilizadas no presente estudo.

Linhagem	Origem	Grupo molecular	Status <i>TP53</i>	Amplificação <i>MYC</i>	Tumorigenicidade <i>in vivo</i>	Outros
UW402	Feminino/9 anos	Grupo 3 ou 4	SD	SD	Não	Isocromossomo 17q Sensível à doxorubicina
UW473	Masculino/5 anos	Grupo 3 ou 4	SD	SD	Não	Sensível metotrexato, temozolomida e cisplatina
DAOY	Desmoplásico/masculino/4 anos	SHH	Mutante	Não	Sim	Expressa MGMT
ONS-76	Clássico/feminino/2 anos	SHH	Selvagem	Não	Sim	SD

SD- sem dados

Referências

Castro-Gamero AM, Borges KS, Lira RC, et al. Chromosomal heterogeneity and instability characterize pediatric medulloblastoma cell lines and affect neoplastic phenotype. *Cytotechnology*. 2013 Oct;65(5):871-85. doi: 10.1007/s10616-012-9529-z. Epub 2013 Jan 17.

Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR. Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol Res*. 1995;7(10-11):493-503.

Xu J, Margol A, Asgharzadeh S, Erdreich-Epstein A. Pediatric brain tumor cell lines. *J Cell Biochem*. 2015 Feb;116(2):218-24. doi: 10.1002/jcb.24976.

Apêndice IV – **Diluição dos anticorpos e quantidade de proteína utilizados nos ensaios de *western blotting*.** As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários e então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico para cada anticorpo.

Anticorpo	Diluição TBS-T	Quantidade de Proteína [µg]
Bax (sc-493)	1/250	30
Bcl-2 (sc-7382)	1/200	50
Ciclina A (sc-751)	1/500	40
DNMT1 (sc-20701)	1/250	50
GLI1 (sc-20687)	1/500	40
p21 (sc-6246)	1/500	40
p53 (sc-126)	1/1000	30
Survivina (ab-76424)	1/2500	30

Apêndice V - **Análise da proliferação celular das linhagens DAOY e ONS-76 após o tratamento de 72h com cisplatina e vincristina.** As linhagens de MB foram cultivadas na presença de diferentes concentrações das drogas CIS (A) e VCR (B) e avaliado a proliferação celular pelo *kit* XTT após 72 h de incubação. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

Apêndice VI – **Expressão do gene *BATF2* após tratamento com Zebularina nas linhagens de MB ONS-76, UW402 e UW473.** Os níveis de expressão gênica de *BATF2* foram analisados por qRT-PCR após o tratamento com diferentes doses de Zebularina (0-200 μ M) após 72 h de incubação. Dados de um experimento realizado. Os gráficos mostram a expressão relativa comparado com o controle.

Apêndice VII. Tabela com valores das medianas e valores mínimo e máximo da expressão gênica do *BATF2* de acordo com parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes. Amostras de cerebello não neoplásico (CN), amostras tumorais (TU) e linhagens celulares (LC).

Parâmetros	<i>BATF2</i> Mediana (mínimo - máximo)	Valor de p
Sexo		
Masculino	0,30 (0-03,02)	0,13
Feminino	0,13 (0,03-2,25)	
Idade		
menor 3 anos	0,28 (0-3,02)	0,40
maior 3 anos	0,15 (0,08-1,35)	
Grau Ressecção		
Completo	0,31 (0,03-3,02)	0,10
Incompleto	0,13 (0-1,35)	
Metástase		
Presente	0,12 (0-3,02)	0,122
Ausente	0,30 (0,04-2,25)	
Risco		
Baixo	0,35 (0,04-2,25)	0,016
Alto	0,12 (0-3,02)	
Recidiva		
Sim	0,32 (0-2,25)	0,11
Não	0,17 (0,06-3,02)	
Histologia		
Outros	0,28 (0-3,02)	0,384
Desmoplásico	0,14 (0,061,56)	
Óbito/Recidiva		
Sim	0,40 (0,04-2,25)	0,042
Não	0,17 (0-3,02)	

9. Anexos

Anexo I – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP; processo nº 10633/2012).

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

Ribeirão Preto, 10 de outubro de 2012

Ofício nº 3537/2012
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DA ZEBULARINA EM MEDULOBLASTOMA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 355ª Reunião Ordinária realizada em 03/10/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 10633/2012.

Este Comitê segue, integralmente, a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/95 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

DR. MARCIA GUIMARAES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
AUGUSTO FARIA ANDRADE
Depto. de Genética – FMRP-USP

Campos Universitários – Monte Alegre
14049-900 – Ribeirão Preto – SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FMA-00002753/RB-00002185 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo II - Manuscrito em preparação do presente estudo.

Zebularine exerts antitumor effects and reveals *BATF2* as a poor prognostic marker in childhood medulloblastoma cells

Augusto Faria Andrade^a; Kleiton Silva Borges^b, Veridiana Kiill Suazo^b, Lenisa Geron^a, Angel Mauricio Castro-Gamero^b; Elton J.R. Vasconcelos^x, Carolina Alves^a, Karina Salomão^a, Carlos Alberto Scrideli^b, Luiz Gonzaga Tone^{a,b}.

a - Department of Genetics – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Brazil; b - Department of Pediatrics – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Brazil

Corresponding author: Augusto Faria Andrade, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14048-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fone: +55 16 3602-2651 Fax: +55 16 3602-2270 Email: augustofaria@usp.br

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Support and Financial Disclosure Declaration

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2011/22440-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 478974/2013-2). Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo is also acknowledged.

Abstract

Medulloblastoma (MB) is a central nervous system cancer, which arises in the cerebellum. It is the most common solid tumor in pediatric patients and corresponds to approximately 20% of all pediatric intracranial tumors. Treatment is currently related to significant side effects. Several factors contribute to its development and progression. Among them, alterations in signaling pathways, as well as epigenetic changes, such as DNA methylation. Such changes control basic cell functions, such as cell survival. DNA methyltransferases inhibitors have shown promising anticancer effects. Zebularine is a DNMTs inhibitor that promotes demethylation of DNA. This agent has been shown to be a relevant antitumor drug with low toxicity, showing to be a promising adjuvant in anti-cancer chemotherapy. Several studies have reported their effects on different types of tumors, however, there are no studies reporting these effects in MB. We analyzed the potential anticancer effects of zebularine in four pediatric MB cell lines (UW402, UW473, ONS-76 and DAOY). It was observed the treatment promotes inhibition of proliferation and clonogenic capacity, increases the number of apoptotic cells and cells in S phase ($p < 0.05$). In addition, treatment induced an increasing in the protein expression of p53, p21 and Bax and a decrease in cyclin A, Survivin and Bcl-2. In addition, it was evaluated its effect when combined with the drugs vincristine (VCR) and cisplatin (CIS). The combination with VCR resulted in synergism, and antagonism when combined with CIS. This study also assessed the impact of treatment on SHH pathway and in large-scale expression by microarray analysis (Agilent). Here, it was found that Zebularine can modulate the activation of the SHH, reducing levels of *SMO* and *GLII*, and one of its targets, *PTCH1*, while there were no changes in *SUFU* levels. The microarray analysis showed different pathways modulated by this drug, including Toll-Like Receptors pathway and high levels of *BATF2* gene. The low expression of this gene was associated with a worse prognosis in MB. All these data suggest that Zebularine may be a potential drug for the adjuvant treatment of MB.

Keywords: medulloblastoma, Zebularine, epigenetics, DNA methyltransferases.

Introduction

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor in children, arising in the cerebellum, and remaining a significant cause of morbidity and mortality in this group (Louis et al., 2007). Overall survival rates range from 60-80%, although long-term cancer survivors often present significant treatment-related effects (Jakacki et al., 2012; Batora et al., 2013). Recent large-scale genomic studies have described the MB heterogeneity and identified four molecular subgroups for this disease: SHH, WNT, Group 3 and Group 4 (Northcott et al., 2011; Taylor et al., 2012). These subgroups exhibit a great individual genetic profile, patient demographics, and clinical features (Northcott et al., 2012).

Although genetic profiling has progressed in MB, epigenetics still warrants further investigation. DNA methylation plays a crucial role in its development, since several genes are described silenced by promoter hypermethylation in MB, such as *CDKN2A* (Cell cycle regulator), *SPINT2* (Inhibitor of HGF/MET signaling), SFRP family (Inhibitors of WNT pathway), *PTCH1* (Negative regulator of SHH pathway) and others (Frühwald et al., 2001; Kongkham et al., 2008; Kongkham et al., 2010; Diede et al., 2010); regulating different pathways and promoting tumorigenesis (Batora et al., 2013).

In this context, DNA methyltransferases (DNMTs) inhibitors have been described as potential agents for cancer therapy, including MB, alone or in combination with chemotherapeutic drugs (Dawson and Kouzarides, 2012). Ecker et al. (2009) reported that combined treatment with the DNMTs inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (Dec) and the histone deacetylase inhibitor, valproic acid, efficiently prevented MB and rhabdomyosarcoma development, preventing Ptch-associated tumors formation. However their mechanisms and effects are not fully described.

A novel DNMT inhibitor, Zebularine, is reported to possess a great oral bioavailability, low toxicity and being highly stable. It also preferentially sensitizes neoplastic cells (Cheng et al., 2004; Chen et al., 2012). Several preclinical studies have shown zebularine as a potential therapeutic agent against leukemia, glioblastoma, breast cancer and others (Meador et al., 2010; Billam et al., 2010; Nakamura et al., 2013; Andrade et al., 2014), however its role in MB has not yet been described.

Zebularine is a cytidine analogue being able to form a tight covalent complex with DNMT proteins and reverse the hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer cells (Ben-Kasus et al., 2005), leading to cell cycle arrest and growth inhibition (Billam et al., 2010), as well as cell death (Tan et al., 2013; You et al., 2013), *in vitro* and *in vivo* (Yang et al., 2013).

In different reports, Zebularine induced the upregulation of tumor suppressor genes silenced by hypermethylation (Cheng et al., 2003) and an immune response in cancer cells (Liu et al., 2007), which is thought to contribute to its antitumor and drug sensitization effects. It also induced oxidative stress in cancer cells (You et al., 2013). Further investigation of Zebularine effects may elucidate its mechanism and contribute to its clinical use.

Our data shows that zebularine exerts antitumor effects in MB, inhibiting cell proliferation and clonogenicity, induced apoptosis and hampered cell cycle distribution, altering key cancer-related proteins. Zebularine exhibited synergism effects when combined with vincristine in MB cells. A large-scale gene expression analysis showed the drug altered different pathways involved in immune response and cell stress and revealed *BATF2* gene as a poor prognostic marker for MB. All this suggests that zebularine is likely to be effective against MB promotion and a great addition to conventional adjuvant therapy in MB treatment.

Material and methods

Cell culture conditions

The pediatric medulloblastoma cell lines DAOY and ONS-76 (subtyped belonging to MB SHH group (Xu et al., 2015) (purchased from ATCC and Banco de Células do Rio de Janeiro, respectively) were cultured in RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies) and UW402 and UW473 (kindly provided by Dr. Michael Bobola) in HAM-F10 (GIBCO, Life Technologies). Medium culture was supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/ml) (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and maintained at 37°C with 5% CO₂. All cell lines were authenticated using STR profiling. Medulloblastoma primary culture was obtained and cultivated as previously described (Borges et al., 2013). Cell counting was performed using the trypan blue exclusion test. All assays were performed at least in duplicate at three different times.

Patients and Samples

Forty-six consecutive pediatric patients with MB diagnosed were included in this study. Five non-neoplastic cerebellum samples were used as control tissues and were obtained from children who had undergone necropsy due non-cancer related deaths. The fresh tissues were immediately immersed in liquid nitrogen after surgical resection and then frozen at -80°C until total RNA was performed. Local Ethics Committees approved this study and a signed statement of informed consent was obtained (protocol numbers 9374/2003, 10633/2012 and 14753/2014).

RNA extraction and Quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR)

Total RNA was extracted from samples using the Trizol® reagent (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA (cDNA) was obtained with the High Capacity® kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA levels of gene *BATF2* (Hs00912737_m1) were measured using TaqMan® probes (Applied Biosystems) in the QuantStudio 12k Flex (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) with two internal controls, *GUSB* and *HPRT*. The expression levels in untreated cells or a non-neoplastic cerebellum were used as calibrators.

Drugs

Zebularine and Vincristine (VCR) (Sigma®) (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were diluted to 100mM and 108µM, respectively, in 1x phosphate-buffered saline. Cisplatin (CIS) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) was dissolved in saline at 1.66 mmol/L. After preparation, all stock solutions were kept at -20°C and dissolved in culture medium immediately before the experiments. The final concentration of DMSO in the mixture reached a maximum of 0.2%.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 96-well plates at 2×10^3 /well and maintained in culture for 24 h. After, cells were treated with zebularine (for 24, 48, 72 and 96h), CIS, VCR and SAHA (for 72h alone or in combination with zebularine). Cell proliferation was measured by XTT (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO, USA) assay. The absorbance of each well was determined at 450nm using an iMark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Drug-induced cytotoxic synergy was analyzed with the CalcuSyn software (Biosoft, Cambridge, U.K.).

Analysis of drug effects and interactions

DAOY and ONS-76 cell lines were treated with simultaneous drug exposure. Based on 72h of exposure to each drug alone (cisplatin, vincristine and zebularine) (Suppl. 1), the doses used for drug combination assays were chosen. The simultaneous treatment regimen involved concomitant treatment of cells with zebularine and either each drug alone. Analyses of the dose-effect relationships and the evaluation of drug interaction upon combination were

performed according to the median-effect method of Chou and Talalay (1984) using the CalcuSyn Software (Biosoft, Cambridge, UK). A combination index (CI) of 1 indicates an additive drug interaction, whereas a CI of >1 is antagonistic and a score lower than 1 is synergistic.

Colony-forming cell assay

The clonogenic capacity was evaluated according to Franken et al. (2006) protocol. Cell suspension of 5×10^2 cells/well was seeded in six-well plates. After 24h incubation, cells were treated with zebularine (50, 100, 200 and $400 \mu\text{M}$) for 72 h. After treatment time, culture medium was replaced with a drug-free medium for additional incubation of 10-15 days. Colonies were fixed with methanol and stained with Giemsa. Colonies with more than 50 cells were scored.

Apoptosis assessment by annexin V/PI staining

The assay was performed after 96h of zebularine exposure (50, 100, 200 and $400 \mu\text{M}$). Cell death by apoptosis was measured by flow cytometry, cells labeled with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences Pharmingen, USA).

Cell cycle distribution

Cells were seeded in 6-well plates at 4×10^4 /well and maintained in culture for 24h. After, cells were incubated with zebularine (100, 200 and $400 \mu\text{M}$) for 48h and then collected, fixed in 70% ethanol, stained with propidium iodide, and analyzed using a Guava personal flow cytometry system (GUAVA Instruments, Hayward, USA) according to the protocol provided by the manufacturer. Percentage of cells in G0/G1, S, and G2/M phases were scored using the GUAVA Cytosoft 4.2.1 version Software.

Microarray assay

DAOY cell line (3×10^5) was cultured in 75cm^2 flasks and treated with 0 and $100 \mu\text{M}$ for 72h. Total RNA was extracted from DAOY cells (treated and non treated) using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and DNA digestion with DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen). For RNA concentration it was used a NanoDrop® Spectrophotometer (Thermoscientific, Wilmington, DE), and RNA integrity was analyzed on the Agilent 2100 BioAnalyzer®. RNA was amplified and labeled using the Quick Amp Labeling (one color) kit® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Hybridization on microarrays and data analysis

The hybridization on microarray was done using 4x44K Agilent Whole Human Genome microarray slides version 1 (Agilent AMADID 014850). The arrays were scanned on an Agilent DNA microarray scanner and processed using the Feature Extraction Software® 10.7 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The use of this software involved automatic grid positioning, intensity extraction (signal and background) and quality control. Data were treated with GeneSpring® 11.5 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The method SAM (Significance Analysis of Microarrays) paired with permutations (100) was applied to the identification of differentially expressed genes. Lower limit of 2 FC (Fold Change) and a maximum of 1% FDR (False Discovery Rate) have been assigned in order to obtain more accurate and significant results. A minimum of 2-fold change was applied and the differentially expressed genes were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Western blotting

DAOY and ONS-76 were treated with 200 and 400µM of zebularine for 72 hours. Cells were then lysed in lysis buffer (RIPA® - Sigma, MO, USA, 10% protease and 10% phosphatase inhibitors) and stored at -80°C until use. Equal amounts of protein (20-60µg) were size-fractionated by 8-12% SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham Hybond™ ECL™, GE Healthcare) and incubated in Tris-buffered saline-0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 5% (w/v) dried non-fat milk for 1h at room temperature. After blocking, proteins were immunoblotted with antibodies for cyclin A (sc-751), p53 (sc-126), p21 (sc-6246), Bax (sc-493), Bcl-2 (sc-7382), DNMT1 (sc-20701), Survivin (ab-76424), GLI1 (sc-20687) and BATF2 (sc-130972)) and the endogenous control anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sc-47724) (1:10000 dilution for 2h at 4°C), all diluted according to manufactures instructions (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Then, incubated with appropriately peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz (sc-2005) (1:10000 dilution). The bound antibodies were detected using the ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, UK) and ChemiDoc system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way or two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, as appropriate and Student's T Test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Data analysis was carried out using the SPSS 17.0 statistical software package. Results are presented as means $\pm$ SDs.

Results

Zebularine inhibits DNMT1 protein expression and arrests cell proliferation in medulloblastoma cells

Zebularine is able to inhibit DNMT proteins by forming a tight covalent complex and decreasing its levels. In order to confirm this ability, a western blotting analysis of DNMT1 was performed (Fig. 1A). As shown in Fig. 1A, the assay confirmed the DNMT1 inhibition after 72h of zebularine treatment (200 and 400 μ M) in both cell lines, corroborating its target specificity.

Next, we performed the XTT assay after zebularine exposure to investigate the effect of this agent in MB cell proliferation. The effects of zebularine on cell proliferation of DAOY, ONS-76, UW402 and UW473 cell lines after different doses (50-800 μ M) and incubation times are shown in Fig. 1B. A significant decreasing of cell proliferation was observed in all cell lines tested, with a significant growth inhibition starting at the 50 μ M dose and the time of 96h showed to be the most effective in inhibiting cell proliferation (Fig.1B). DAOY and ONS-76 showed a time-dependent response ($p < 0.05$). The values that represent 50% of inhibition of cell growth (IC₅₀) were obtained by CalcuSyn software. After 96h of incubation, ONS-76 and DAOY cell lines had the greatest inhibition of proliferation, showing the lowest IC₅₀ values: 58.1 and 113.7 μ M, respectively, while for UW473 was 150 μ M and 203.7 μ M to UW402.

Since the results of proliferation assay are measured right after drug treatment, we also investigated the capacity to form colonies in order to analyze the long-term cell response to zebularine (10 days) (Fig. 1C). Different doses of zebularine (50, 100, 200 and 400 μ M) were incubated for 72h and then culture medium was replaced for a drug-free medium. The analysis showed a reduction in the number of colonies in the treated compared to non-treated cells. The ONS-76 cell line showed a significant reduction already at a dose of 50 μ M, reaching approximately 90% of inhibition after treatment with the dose of 400 μ M. The UW402 and DAOY cells showed a significant decrease after treatment of 100 μ M and reached around 80% and 95% reduction in the highest dose, respectively. The UW473 cell line

showed a significant reduction only after 200 μ M, reaching 80% inhibition of colony formation with the dose of 400 μ M (Fig. 1C). All these data confirm the antiproliferative effects of zebularine in MB cells.

Aiming to elucidate these findings, we analyzed if zebularine effects were due to modulation in p53 levels (Fig. 1D). The tumor suppressor TP53 is maintained at low level in unstressed cells; however, both the quantity and activity of TP53 are greatly increased in response to cell stress (Vousden and Lu, 2002). In such case, TP53 can induce the expression of different downstream genes, including p21 and Bax, to induce cell-cycle arrest, apoptosis and DNA repair (Vousden and Lu, 2002). Zebularine incubation increased p53 levels in ONS-76 cell line (wild-type *TP53*), and also the p21 levels for both cell lines (Fig. 1D).

Zebularine induces an accumulating of cells at the S phase and alters cell cycle regulatory proteins

To determine if alterations in the progression of cell cycle were responsible for the observed antiproliferative effects and cell death, cell cycle distribution analyses using propidium iodide incorporation and flow cytometry were performed (Fig. 2A). Zebularine is a nucleoside analogue, and as expected, it induced an accumulation of cells in S phase after 48h treatment (Fig. 2A) in the cell lines used, except for ONS-76 cells. Along with this accumulation, the percentage of cells in G1 phase decreased after incubation for DAOY and UW472 cells.

To elucidate these findings, we evaluated the levels cyclin A protein after 72h of zebularine treatment (200 and 400 μ M) (Fig. 2B). The drug diminished cyclin A levels in both cell lines (Fig. 2B). These findings support the previous results and clarify the mechanisms responsible for zebularine antitumor effects.

Zebularine induces an apoptosis response and alters apoptosis-associated proteins in medulloblastoma cells

To assess whether the cytotoxic effects found in the later assays also represented cell death, we evaluated the percentage of apoptotic cells after labeling with annexin-V by flow cytometry. The cells were incubated with different doses of zebularine (50-400 μ M) for 96h. The treatment induced an increasing in the number of apoptotic cells, although this increasing was not significant for UW402 cell line (Fig. 3A). The DAOY cell line presented the highest percentage of annexin-V positive cells, reaching around 45%. For UW473 cells, a significant increasing was observed starting at the dose of 100 μ M, and in ONS-76 cells, only at the highest dose (400 μ M).

To better understand the triggering of apoptosis induction, we analyzed the expression of apoptosis-related proteins, the pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Survivin, in DAOY and ONS-76 cells, after 72h of zebularine treatment (Fig. 3B). The ONS-76 cell line showed a decrease of Bcl-2 and Survivin proteins, and Bax levels increased in both doses used. For DAOY cell line, the levels of Bax and Bcl-2 increased, while Survivin levels reduced (Fig. 3B).

To endorse the relevance of the results here found, we performed the response of zebularine (also after 96h) in a primary culture of MB. As shown in Fig. 3C, zebularine was also able to significantly induce cell death by apoptosis ($p < 0.05$) in this primary culture, confirming the antitumor effects of this drug on MB cells. These data confirm that zebularine is able to induce cell death by apoptosis by promoting an imbalance of proteins responsible to induce this mechanism.

Zebularine treatment enhances chemosensitivity to vincristine but display an antagonism effect when combined with cisplatin in medulloblastoma cells

The study so far convincingly provides evidence that zebularine alone shows potential antitumor effects in MB cells. We next asked whether zebularine could act in combination with other chemotherapeutics used for the current treatment of MB: cisplatin (CIS) and vincristine (VCR) concomitantly combined with zebularine.

We first performed proliferation assays with the chemotherapeutics alone (Suppl. 1) to determine the doses for the combination analysis. Next, the combination study was performed treating the cells simultaneously with Zeb associated with a chemotherapeutic agent (CIS or VCR), using increasing doses of each (Fig. 4A). We could observe different patterns/response specific to the drug studied.

The combination of zebularine with VCR showed synergistic effects for DAOY cell line (with CI values below 1), and a synergism in the smaller doses for ONS-76 cells, as shown in the Fig. 4B. Conversely, the combination of zebularine with CIS showed antagonism effects for both cell lines, with all CI values above 1. These different combinations show that zebularine can be a potential drug for combination studies.

Zebularine alters the expression of SHH pathway members in medulloblastoma cells

MB tumors are currently subclassified according to a molecular classification based on activation of specific pathways: WNT, SHH, groups 3 and 4. MB-SHH subgroup is the most common subgroup in infants (≤ 3 years old) and adults (≥ 18 years old) and quite

heterogeneous (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012). SHH antagonists are an alternative treatment for this subgroup; however, patients show resistance to this approach (Yauch et al., 2009; Lin and Matsui, 2012). Besides, Kool et al. (2014) propose that targeting this pathway in MB-SHH using SMO antagonists will most likely give the best results in adult patients, highlighting the need for new therapies for childhood SHH-MB. Hence drugs that could inhibit this pathway show potential use for this subgroup, alone or in combination.

In this context, we evaluated the expression of different members of SHH pathway (*GLII*, *SMO*, *PTCH1* and *SUFU*) after zebularine treatment. DAOY cell line is classified belonging to the SHH subgroup (Triscott et al., 2013) and was used as a model for this. As shown in Fig. 5A, the levels of the genes *GLII*, *SMO* and *PTCH1* diminished, whereas *SUFU* levels was not altered after zebularine incubation. Since GLI1 activates the transcription of SHH targets, including oncogenes (Kenney and Rowitch, 2000; Kenney et al., 2003), we also confirmed its expression in protein level (Fig. 5B). After 72h of zebularine treatment (200 and 400 μ M), GLI1 levels decreased in a dose manner for both cell lines DAOY and ONS-76 (Fig. 5B). These data show that zebularine is able to modulate SHH pathway and its activation.

Global gene expression profile is altered in response to zebularine treatment in medulloblastoma cells

Taken that zebularine exerts several effects on cancer cells and most of them are due to alterations in DNA demethylation and consequently gene expression, we used a large-scale gene expression microarray (Agilent) to study the mRNA profile after 100 μ M zebularine, after 72h incubation (200 μ M of zebularine was also performed, but data is not shown). We selected genes with a fold change (FC) >2.0, from the SAM (Significance Analysis of Microarrays) output. This analysis revealed 844 induced and 56 repressed genes after 100 μ M of zebularine in DAOY cells (Suppl. Table 1).

To identify the biological processes associated with the genes found in the assay, differentially expressed genes were analyzed using the QIAGEN'S Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Fig. 6A). IPA analysis showed different pathways involved in zebularine response: toll-like receptor, NRF2-mediated oxidative stress response, HMGB1 signaling and ERK5 signaling. Additionally, molecules involved in cell death, survival, cellular movements, and growth/proliferation mechanism were altered.

Zebularine treatment promotes BATF2 expression in medulloblastoma

Among the genes altered by zebularine treatment, the gene *Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-Like 2 (BATF2)* was found to be highly upregulated (FC: 80). Since there is a lack of information about the role of this gene in MB, we decided to investigate it. As shown in Fig. 6, the drug was able to restore *BATF2* expression in mRNA and protein levels (Fig. 6B).

We next investigated the expression of *BATF2* in MB samples derived from patients with MB and non-neoplastic cerebellum samples (Fig. 6C and D). Examined by qRT-PCR, *BATF2* mRNA was 1.84-fold lower in tumor samples ($p=0.241$) and 3.53-fold lower in MB cell lines ($p=0.027$) when compared to non-neoplastic samples, however there was not statistic difference between tumor and non-tumor tissue (Fig. 6C).

We next correlated the rate of *BATF2* expression with the clinical status of MB patients. Mann-Whitney analysis demonstrated that low *BATF2* levels is more common found in high risk patients ($p=0.016$) and its low expression is correlated with MB relapse ($p=0.042$) (Suppl. 2). However, no observed difference in *BATF2* expression regarding to age, age at diagnostic, histologic type or metastasis was found. The Kaplan–Meier survival curve determined that patients with low *BATF2* expression have shorter overall survival than those with higher expression ($p=0.003$) (Fig. 6D), indicating this gene as a novel poor prognostic marker for MB.

Discussion

In the present study, we assessed the preclinical effects of zebularine in pediatric medulloblastoma cells. Zebularine was able to produce antiproliferative effects, arresting cell growth and disrupting the clonogenic capacity of cells and cell cycle distribution; it also increased the levels of apoptotic cells. Besides, it promoted the activation of different pathways related to cancer, immune response and oxidative stress. Zebularine was able to modulate SHH pathway altering its members and GLI1 levels. The treatment also revealed the *BATF2* gene as a poor prognostic marker: low level of *BATF2* is correlated with relapse and poor prognosis for MB patients.

We observed that zebularine decreased the protein level of DNMT1 (Fig. 1A). These results were similar to those that report the depletion of DNMT1 by the drug in human hepatocellular carcinoma, bladder, breast, and cervical cancer cells (Nakamura et al., 2013; Cheng et al., 2004; Billam et al., 2010; You and Park, 2012). Since zebularine covalently binds to DNMT, leading to compositional change in DNMT1 protein, it is reasonable that they can be degraded

via a ubiquitination system, as suggested by You and Park (2012), consequently reducing its expression and DNA demethylation, which could lead to antineoplastic effects.

Our results presented the antitumor effects of zebularine, by inhibiting cell growth and colony formation (Fig. 1B and 1C). These results are in accordance with several others studies in different tumors type (Meador et al., 2010; Tan et al., 2013; Yang et al., 2013). Zebularine increased p53 protein and p21 levels. Studies have reported higher levels of p53 and p21 proteins after treatment with DNMT inhibitors, including zebularine (Deng and Zhang, 2009; You and Park, 2013). Both proteins can also be activated in case of DNA damage caused by DNA demethylation (Karpf et al., 2001), resulting in cell cycle arrest and/or apoptosis (Vousden and Lu, 2002). Yang et al. (2013) showed that zebularine incubation also results in ribosomal stress, which could lead to p53 stabilization.

Furthermore, DNA flow cytometry analysis showed zebularine provoking an accumulation of cells in S phase. Similarly, the drug induced an S phase arrest in cancer cells such as lung, cervical and breast cancer (You and Park, 2013; You and Park, 2012; Billam et al., 2010). The treatment also diminished cyclin A protein (S phase marker) after incubation. Oppositely, Yoo & Park (2012) reported an increasing of cyclin A after zebularine incubation. It is still not clear the causes of this finding, since the decreasing found here could be a direct consequence of the inhibition of DNMTs, the regulation of cyclin A by p21 (Morgan, 1995) or the cell cycle arrest in S phase may have led to its degradation, thus, further studies would be needed to elucidate this mechanism.

Our results also showed that zebularine induced apoptosis of MB cells by altering key apoptosis-related proteins (Fig. 2A). Proteins from the Bcl-2 family (apoptosis inhibitors (e.g., Bcl-2 and Bcl-XL) and apoptosis inducers (e.g., Bax and Bad) are essential for the initiation of mitochondrial deregulation during apoptosis, activating the intrinsic pathway (Cory and Adams, 2002). The Bax/Bcl-2 ratio determines the predisposition of cells to death signals and might be an essential element in a cell fate. Bcl-2 protein acts as a suppressor of apoptosis by preventing the release of apoptogenic proteins, such as cytochrome c. While Bax acts in opposition, facilitating the release of these mitochondrial apoptogenic factors (Billam et al., 2010; Tsagarakis et al., 2011). We found that Bax protein levels were higher after zebularine treatment for both cell lines studied, although Bcl-2 protein levels were upregulated for DAOY cells, which induced an increasing in the Bax/Bcl-2 ratio and resulted in apoptosis.

Survivin (also known as baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 - BIRC5) is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) family and promotes cell proliferation and

prevents apoptosis (Wheatley and McNeish, 2005; Altieri, 2008). Besides, it is overexpressed in multiple pediatric cancers (Fangusaro et al., 2006), and correlated with poor clinical outcome, including in MBs (Pizem et al., 2005; Brun et al., 2015). And its pharmacologic inhibition arrests SHH-driven MB growth, *in vitro* and *in vivo* (Brun et al., 2015). Here, zebularine was able to reduce Survivin levels for both MB cell lines. Its decreasing could result in cell growth blocking and death, corroborating the findings displayed here.

Despite evidences indicate that demethylating agents might increase effects of classic chemotherapeutics, their use for solid tumors still needs to be further evaluated. Therefore, besides the effects of zebularine alone, we performed the combination with chemotherapeutics agents used for MB treatment, VCR and CIS.

We found a synergism effect when combining zebularine and VCR. This synergism can be attributed to several mechanisms, such as the decreasing of anti-apoptotic proteins induced by VCR in MB (Shinwari et al., 2008), which could be potentialized by zebularine. But also, to the fact that zebularine is able reactivate silenced tumor suppressor genes, responsible for controlling cell growth and apoptosis, and consequently improve the efficacy of anticancer therapy with chemotherapeutic agents.

We also found an antagonism effect when combining zebularine and CIS. Differently from our results, Suzuki et al. (2007) reported a synergism for this combination in oral squamous cell carcinoma and that this synergism could be due to the enhancement of apoptosis stimulated by the combination. So, we believe that greater doses of both agents and mainly a longer incubation might result in a more effective combination, since the zebularine only induced apoptosis after 96h of incubation (exposure of combination assays was 72h) (data not shown).

The SHH pathway has a critical role in the development of cerebellum (Berman et al., 2002). After postnatal development, SHH pathway is downregulated in most tissues, and its constitutive activation seems to originate different cancer types, including MB (Chari and McDonnell, 2007; Singh et al., 2009; Northcott et al., 2012). SHH pathway activation displays high levels of GLI1 expression (Ingham and McMahon, 2001; Katoh and Katoh, 2009) and represents ~30% of all human MB cases, presenting intermediate prognosis, similar to group 4 (Taylor et al., 2012).

Here, we show that zebularine could regulate this pathway and inhibit its activation by reducing GLI-1 without altering SUFU levels (Shahi et al., 2010). Antagonists for this pathway can potentiate the treatment of this MB subgroup or for SHH-activated cancers as well.

As expected, we could observe multiple alterations in response to zebularine treatment; therefore, a large-scale gene expression was performed in order to better identify these changes. The drug significantly altered members from the Toll-like receptor signaling. Toll-like receptors (TLRs) demonstrate a crucial role in recognizing pathogen-associated patterns and its modulation has been associated to carcinogenesis (Pradere et al., 2014). When TLRs are triggered, a cascade is initiated and molecules such as p38MAPK, NF- κ B and JNK are activated and consequently, an induction of several pro-inflammatory cytokines is seen, leading to antibacterial and antiviral responses (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009, Newton and Dixit, 2012).

To the best of our knowledge, this is the first report to show the preclinical efficacy of zebularine and to demonstrate the level of *BATF2* gene in pediatric medulloblastoma cancer cells and *BATF2* modulation using a demethylation agent. We found *BATF2* upregulated after zebularine incubation and its low expression a marker of poor prognosis for MB patients. We first hypothesized that the enhancement of this gene could be due to promoter methylation induced by the drug, however, the lack of CpG islands in the promoter of the *BATF2* gene leads to the low possibility of such mechanism in the gene inactivation (Ma et al., 2011) and its higher levels after demethylation.

BATF2 is a type I interferon (IFN)-stimulated gene (ISG) and a novel tumor suppressor gene. Its overexpression inhibited growth and induced apoptosis in cancer cells, but not in normal cells (Su et al., 2008), also, its expression progressively decreased with tumor progression and correlates with poor colorectal cancer patient prognosis (Liu et al., 2015). Since IFN β modulates *BATF2* gene, we also hypothesize that this gene was upregulated after zebularine treatment due to an activation of interferon pathway triggered by TLRs activation, which could explain the Toll-like receptor signaling activation found in our microarray assay.

In a noteworthy publication, Roulois et al. (2015) and Chiappinelli et al. (2015) showed that DNA-demethylating agents targets cancer cells inducing a viral response and interferon pathway activation, via endogenous retroviruses. In this context, zebularine treatment could stimulate ISG, such as *BATF2* and also be a potential agent for the immunotherapy combination. Further studies should be conducted to better understand this response.

Our data clearly show that inhibition of DNMTs using zebularine induces antitumor effects on pediatric medulloblastoma cancer cells. Zebularine is, therefore, an attractive agent for medulloblastoma adjuvant treatment.

Acknowledgments

We would like to thank Patrícia Vianna Bonini Palma, Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo, Daiane Fernanda dos Santos, Blood Center - USP, and Prof. Dr. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Department of Genetics, Ribeirão Preto, Brazil, for their assistance with the flow cytometry.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6276-84. doi: 10.1038/onc.2008.303.
- Andrade, A. F., Borges, K. S., Castro-Gamero, A. M., Silveira, V. S., Suazo, V. K., Oliveira, J. C., ... Tone, L. G. (2013). Zebularine induces chemosensitization to methotrexate and efficiently decreases AhR gene methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Anti-Cancer Drugs*, 1–10. <http://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000028>
- Batora, N. V., Sturm, D., Jones, D. T. W., Kool, M., Pfister, S. M., & Northcott, P. a. (2013). Transitioning from genotypes to epigenotypes: Why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience*. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.030>
- Ben-Kasus, T., Ben-Zvi, Z., Marquez, V. E., Kelley, J. A., & Agbaria, R. (2005). Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 70(1), 121–33. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.010>
- Berman DM1, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*. 2002 Aug 30;297(5586):1559-61.
- Billam, M., Sobolewski, M. D., & Davidson, N. E. (2010). Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(3), 581–92. <http://doi.org/10.1007/s10549-009-0420-3>
- Borges KS, Moreno DA, Martinelli CE Jr, et al. Spindle assembly checkpoint gene expression in childhood adrenocortical tumors (ACT): Overexpression of Aurora kinases A and B is associated with a poor prognosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Nov;60(11):1809-16. doi: 10.1002/pbc.24653. Epub 2013 Jun 20.
- Brun SN, Markant SL, Esparza LA, et al. Survivin as a therapeutic target in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Oncogene*. 2015 Jul;34(29):3770-9. doi: 10.1038/onc.2014.304. Epub 2014 Sep 22.
- Chari NS1, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2007 Sep;14(5):344-52.

Chen M1, Shabashvili D, Nawab A, et al. DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Feb;11(2):370-82. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0458. Epub 2011 Dec 27.

Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Mar 5;95(5):399-409.

Cheng, J. C., Yoo, C. B., Weisenberger, D. J., Chuang, J., Wozniak, C., Liang, G., ... Jones, P. a. (2004). Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*, 6(2), 151–8. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.023>

Chiappinelli, K. B., Strissel, P. L., Desrichard, A., Li, H., Henke, C., Akman, B., ... Strick, R. (2015). Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*, 162(5), 974–986. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.011>

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose–effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27–55.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.

Dawson MA1, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.

Deng T, Zhang Y. Possible involvement of activation of P53/P21 and demethylation of RUNX 3 in the cytotoxicity against Lovo cells induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Life Sci*. 2009 Feb 27;84(9-10):311-20. doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.015. Epub 2008 Dec 31.

Diede SJ1, Guenthoer J, Geng LN, et al. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):234-9. doi: 10.1073/pnas.0907606106. Epub 2009 Dec 4.

Ecke I, Petry F, Rosenberger A, et al. Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxycytidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice. *Cancer Res*. 2009 Feb 1;69(3):887-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0946. Epub 2009 Jan 20.

Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA. Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Jul;47(1):4-13.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.

Frühwald MC, O'Dorisio MS, Dai Z, et al. Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas--implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene*. 2001 Aug 16;20(36):5033-42.

Hoffman WH1, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3247-57. Epub 2001 Nov 19.

Ingham PW1, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059-87.

Jakacki RI, Burger PC, Zhou T et al (2012) Outcome of children with metastatic medulloblastoma treated with carboplatin during craniospinal radiotherapy: a Children's Oncology Group Phase I/II Study. *J Clin Oncol* 30(21):2648–2653. doi:10.1200/jco.2011.40.2792

Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol*. 2001 Apr;59(4):751-7.

Katoh Y, Katoh M. Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGFbeta-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals. *Int J Oncol*. 2009 Jul;35(1):187-92.

Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):9055-67.

Kenney AM1, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*. 2003 Jan;130(1):15-28.

Kongkham PN1, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*. 2010 May 20;29(20):3017-24. doi: 10.1038/onc.2010.32. Epub 2010 Mar 8.

Kongkham PN1, Northcott PA, Ra YS, et al. An epigenetic genome-wide screen identifies SPINT2 as a novel tumor suppressor gene in pediatric medulloblastoma. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9945-53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2169.

Kool M, Jones DT, Jäger N, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothened inhibition. *Cancer Cell*. 2014 Mar 17;25(3):393-405. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.004.

Kool, M., Jones, D. T. W., Jäger, N., Northcott, P. a., Pugh, T. J., Hovestadt, V., ... Pfister, S. M. (2014). Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothened inhibition. *Cancer Cell*, 25(3), 393–405. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.004>

Lin TL, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *Onco Targets Ther*. 2012;5:47-58. doi: 10.2147/OTT.S21957. Epub 2012 Mar 9.

Liu H1, Xue ZT, Sjögren HO, Salford LG, Widegren B. Low dose Zebularine treatment enhances immunogenicity of tumor cells. *Cancer Lett.* 2007 Nov 8;257(1):107-15. Epub 2007 Sep 4.

Liu, Z., Wei, P., Yang, Y., Cui, W., Cao, B., Tan, C., ... Zhou, X. (2015). BATF2 Deficiency Promotes Progression in Human Colorectal Cancer via Activation of HGF/MET Signaling: A Potential Rationale for Combining MET Inhibitors with IFNs. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1752–1763. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1564>

Livak KJ1, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (2007) WHO classification of tumours of the central nervous system. IARC Press, Lyon

Ma, H., Liang, X., Chen, Y., Pan, K., Sun, J., Wang, H., ... Xia, J. (2011). Decreased expression of BATF2 is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 128(4), 771–777. <http://doi.org/10.1002/ijc.25407>

Meador, J. a, Su, Y., Ravanat, J.-L., & Balajee, A. S. (2010). DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis*, 31(2), 184–91. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgp284>

Nakamura, K., Aizawa, K., Nakabayashi, K., Kato, N., Yamauchi, J., Hata, K., & Tanoue, A. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitor Zebularine Inhibits Human Hepatic Carcinoma Cells Proliferation and Induces Apoptosis. *PLoS ONE*, 8(1), e54036. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054036>

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Mar 1;4(3). pii: a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.

Northcott PA1, Jones DT, Kool M, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer.* 2012 Dec;12(12):818-34. doi: 10.1038/nrc3410.

Northcott PA1, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 10;29(11):1408-14. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4324. Epub 2010 Sep 7.

Pizem J, Cört A, Zdravec-Zaletel L, Popovic M. Survivin is a negative prognostic marker in medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005 Aug;31(4):422-8.

Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene.* 2014 Jul 3;33(27):3485-95. doi: 10.1038/onc.2013.302. Epub 2013 Aug 12.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jan;9(1):57-63. doi: 10.1038/nrc2541. Epub 2008 Dec 4.

Roulois, D., Loo Yau, H., Singhania, R., Wang, Y., Danesh, A., Shen, S. Y., ... De Carvalho, D. D. (2015). DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral

Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*, 162(5), 961–973. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.056>

Shahi, M. H., Afzal, M., Sinha, S., Eberhart, C. G., Rey, J. a, Fan, X., & Castresana, J. S. (2010). Regulation of sonic hedgehog-GLI1 downstream target genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and their epigenetic status in medulloblastoma and astrocytoma. *BMC Cancer*, 10, 614. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-10-614>

Shinwari Z1, Manogaran PS, Alrokayan SA, Al-Hussein KA, Aboussekhra A. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21(WAF1) up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *J Neurooncol*. 2008 Apr;87(2):123-32. Epub 2007 Dec 6.

Singh RR, Cho-Vega JH, Davuluri Y, et al. Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2550-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1808. Epub 2009 Feb 24.

Su, Z., Lee, S.-G., Emdad, L., Lebdeva, I. V, Gupta, P., Valerie, K., ... Fisher, P. B. (2008). Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20906–20911. <http://doi.org/10.1073/pnas.0807975106>

Suzuki, M., Shinohara, F., Nishimura, K., Echigo, S., & Rikiishi, H. (2007). Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 31(6), 1449–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982671>

Tan, W., Zhou, W., Yu, H., Luo, H.-S., & Shen, L. (2013). The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 250–5. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.143>

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012 Apr;123(4):465-72. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z. Epub 2011 Dec 2.

Triscott, J., Lee, C., Foster, C., Manoranjan, B., Pambid, M. R., Berns, R., ... Dunn, S. E. (2013). Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. *Cancer Research*, 73(22), 6734–44. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4331>

Vousden KH1, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604.

Wheatley SP, McNeish IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*. 2005;247:35-88.

Yang, P.-M., Lin, Y.-T., Shun, C.-T., Lin, S.-H., Wei, T.-T., Chuang, S.-H., ... Chen, C.-C. (2013). Zebularine inhibits tumorigenesis and stemness of colorectal cancer via p53-

dependent endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports*, 3, 3219. <http://doi.org/10.1038/srep03219>

Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*. 2009 Oct 23;326(5952):572-4. doi: 10.1126/science.1179386. Epub 2009 Sep 2.

You, B. R., & Park, W. H. (2012). Zebularine inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 39(10), 9723–31. <http://doi.org/10.1007/s11033-012-1837-z>

You, B. R., & Park, W. H. (2013). Zebularine-induced apoptosis in Calu-6 lung cancer cells is influenced by ROS and GSH level changes. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(2), 1145–53. <http://doi.org/10.1007/s13277-013-0656-8>

Figures

Figure 1 - Zebularine inhibits DNMT1 protein and promotes antiproliferative effects in MB cells. DAOY and ONS-76 cells were treated with increasing concentrations of zebularine for 72h. Cells were collected, lysed, and subjected to western blotting analysis with (A) DNMT1 and (D) p53 (TP53) and p21 (CDKN1) specific antibodies. GAPDH was used as a loading control. (B) Cell proliferation diminished after zebularine treatment in MB cells, measured by XTT after 24, 48, 72 and 96h of treatment. (C) Colony formation after 72h treatment with zebularine increasing doses. *P<0.05.

Figure 2 - Zebularine alters the cell cycle of medulloblastoma cell lines and cell cycle related proteins. A) A significant S phase accumulation was observed after zebularine treatment. Concomitantly, a decrease in G1 phase was also observed in MB cells. * $P < 0.05$. B) The drug induced a decreasing in cyclin A protein level. DAOY and ONS-76 cells were treated with increasing concentrations of zebularine for 72h. Cells were collected, lysed, and subjected to western blotting analysis with cyclin A specific antibodies. GAPDH was used as a loading control.

Figure 3 – Zebularine induces cell death by apoptosis in MB. Cell death induced by zebularine treatment in MB cells after 96h in MB cells (A) and primary culture (C). Apoptosis analysis was carried out by flow cytometry. The percentage of annexin V-positive cells is shown. B) Zebularine altered proteins that trigger apoptosis in MB cells. DAOY and ONS-76 cells were treated with increasing concentrations of zebularine for 72h. Cells were

collected, lysed, and subjected to western blotting analysis with Bax, Bcl-2 and Survivin specific antibodies. GAPDH was used as a loading control. *P<0.05.

Figure 4 - Zebularine combined with anticancer drugs acts in synergism with vincristine, but shows antagonism with cisplatin in medulloblastoma cells. A) Different doses of zebularine, VCR and CIS used in combination assay. The drugs were added in simultaneous exposure for 72h. B) CI values resulted from combination. The line across the CI value of 1 indicates additivity; CIs above and below indicate antagonism and synergism, respectively. Crosses represent the CIs of the actual data points and continuous lines represent computer-derived CIs at effect levels ranging from 10-100% inhibition of clonal growth according with Calcsyn software.

Figure 5 – Zebularine deregulates gene expression of SHH pathway in MB cell lines. DAOY cells were treated for 72h with 100 and 200µM of zebularine. **A)** The level of expression of *GLI1*, *SMO*, *PTCH1* and *SUFU* was assessed by qRT-PCR and is reported as the ratio between the target genes and two reference genes (GUS and HPRT) to correct for variation in the amounts of RNA. Cells treated with vehicle alone (CTRL) collected at the same treatment times were used as calibrators. Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments. *P<0.05. **B)** DAOY and ONS-76 cells were treated with increasing concentrations of zebularine for 72h. Cells were collected, lysed, and subjected to western blotting analysis with GLI1 specific antibody. GAPDH was used as a loading control.

Figure 6 – Zebularine alters cancer-related pathways and reveals *BATF2* as a prognostic marker in medulloblastoma. Microarray analysis was carried out in Agilent platform. DAOY cells were treated for 72h with 100 μ M of zebularine. **A)** Pathways deregulated by zebularine in microarray assay. **B)** DAOY cells were treated for 72h with 100 and 200 μ M of zebularine. The level of expression of *BATF2* was assessed by qRT-PCR and is reported as the ratio between the target genes and two reference genes (GUS and HPRT) to correct for variation in the amounts of RNA. Cells treated with vehicle alone (CTRL) collected at the same treatment times were used as calibrators. Data are shown as mean $\pm$ SE of three independent experiments. * $P < 0.05$. **C)** The level of expression of *BATF2* was measured by qRT-PCR in MB samples (patients). *BATF2* levels were also measured in non-neoplastic cerebellums (NC) and MB cell lines (MB lines). **D)** *BATF2* low expression predicts worse prognosis in MB.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1 - Exposure of MB cells, DAOY and ONS-76, to CIS (A) and VCR (B) after 72h incubation, measured by XTT assay. C) Values that represent 50% of inhibition (IC50) used in the combination assays.

Supplementary Figure 2 - *BATF2* expression with the clinical status of MB patients. Mann-Whitney analysis demonstrated that low *BATF2* levels is more common found in high risk patients ($p=0.016$) and its low expression is correlated with MB relapse ($p=0.042$) (Suppl. 2).