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

KARINA BEZERRA SALOMÃO

**Estudo da expressão dos genes *TETs* e níveis de
hidroximetilação em meduloblastoma**

Ribeirão Preto

2017

KARINA BEZERRA SALOMÃO

**Estudo da expressão dos genes *TETs* e níveis de
hidroximetilação em meduloblastoma**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga
Tone

Ribeirão Preto

2017

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

Salomão, Karina Bezerra

Estudo da expressão dos genes TETs e níveis de hidroximetilação em meduloblastoma. Ribeirão Preto, 2017.

129 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga

1. Meduloblastoma. 2. Cerebelo. 3. Genes *TETs*
4. Hidroximetilação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SALOMÃO, KB

Título: Estudo da expressão dos genes TETs e níveis de hidroximetilação em meduloblastoma.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho ao meu avô Moisés Salomão (in memoriam) por me ensinar o significado das palavras: perseverança, gratidão e amizade. Espero que esteja orgulhoso, entre os anjos.

“Se naquele instante (...) caísse na terra um habitante de Marte, havia de ficar embasbacado ao verificar que, num dia tão maravilhosamente belo e macio, de Sol tão dourado, os homens, na sua maioria, estavam metidos em escritórios, oficinas, fábricas... E se perguntasse a qualquer um deles: ‘Homem, porque trabalhas com tanta fúria durante todas as horas de Sol?’ - ouviria esta resposta singular: ‘Para ganhar a vida’. E, no entanto, a vida ali estava a oferecer-se toda numa gratuidade milagrosa. Os homens viviam tão ofuscados por desejos ambiciosos que nem sequer davam por ela”. (Olhai os Lírios do Campo – Érico Veríssimo).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e louvar a **Deus** pelo dom da vida, pela capacidade de aprender, pela força para trabalhar, estudar; e por me mostrar que com dedicação é possível realizar todos meus objetivos;

Agradeço ao meu orientador **Professor Dr. Luiz Gonzaga Tone**, por ter me aceitado em seu laboratório, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e por toda confiança em mim depositada, fatores que me ajudaram a desenvolver responsabilidade e segurança, e me proporcionaram crescimento acadêmico e profissional;

À nossa técnica **Dra. Rosane Queiroz**, pela amizade, disposição em ajudar e aconselhar, e à técnica **MSc Veridiana Kill Soares** pela amizade, apoio e ajuda no laboratório;

À **Profa. Dra. Maria Sol Brassesco** pela amizade, conselhos e auxílio científico, principalmente com a escrita de artigos;

Aos Professores **Dra. Vanessa Silveira** e **Dr. Carlos Scrideli** pela amizade, incentivo e ajuda no desenvolvimento do trabalho;

A todo pessoal do laboratório de Oncologia Pediátrica: **Augusto, Maurício, Kleiton, Daniel, Paulo, Gustavo, Julia, Mirella, Mariana, Carolina, Taciane, Camilla, Gabriela Molinari, Gabriela Vieira, Graziela, Keteryne, Verena, Régia, Ricardo, Pamela, Marcela, Rodrigo**, por tornar mais fáceis as horas mais difíceis, pelos conselhos, auxílios científicos e pessoais, por todos os cafés e almoços regados por risadas na copinha;

Às amigas **Lara Elis** e **Lenisa Geron**, por me darem suporte inclusive à distância, pela amizade e carinho;

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Panepucci** e sua equipe, principalmente aos alunos **Ildercílio** e **Sarah** e a técnica **Dra. Josiane**, pelo auxílio na área de epigenética e amizade;

Ao **Prof. Dr. Fernando Ramalho** por disponibilizar as amostras e auxílio na documentação para o comitê de ética;

Ao **Prof. Dr. Luciano Neder**, à técnica **Deise Chesca**, e ao **Dr. Fabiano Saggioro** pela colaboração com a realização e análise da técnica de imuno-histoquímica e microdissecção de amostras;

A toda equipe do **Centro Infantil Boldrini** pela disponibilização das amostras;

Ao **Dr. Miguel Branco** e sua equipe pelos conhecimentos adquiridos e contribuições para o trabalho;

A todos os funcionários da pediatria: **Lucimar, Sônia, Silvia, Ivone, Paola, Cleonice, Beth**, pela amizade, carinho e auxílio laboratorial;

À técnica **Barbara Santana** pela colaboração com a técnica de dot-blot e pela amizade;

À amiga e doutoranda **Luíza Ferreira** por ajudar na análise do sequenciamento e pela amizade;

Ao suporte fornecido pelo departamento de Genética, em especial à Secretária **Susie Nalon**, ao chefe **Prof. Dr. Wilson Araújo** e à coordenadora **Prof. Dra. Ester Silveira Ramos**, a quem também agradeço pela amizade e incentivo;

Agradeço a meus mestres e professores, desde a pré-escola até a pós-graduação, porque são responsáveis pela minha formação acadêmica e pessoal, em especial ao meu primeiro orientador **Prof. Dr. Valter Della Rosa**;

À minha família, meus pais **Mauro e Bete**, minhas irmãs **Luzia e Kathleen**, pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo e exemplo;

Aos avós maternos (**Virginia e José**) e paternos (**Irene e Moisés**) por todo carinho, atenção e cuidados;

Ao meu noivo **Isaque** pelo incentivo, compreensão, paciência e suporte, e que mesmo que signifique ficar distantes, sempre apoia minhas decisões profissionais;

Às amigas e irmãs de coração: **Aline Cristine, Isielli Barzotto e Ana Carolina**, pela amizade e incentivo;

Às amigas londrinas: **Zhoe, Jussi (e família), Camila Alves e Shirleny**, pelo apoio emocional e amizade durante meu estágio em Londres.

Aos amigos inesquecíveis do Bloco C, em especial: **Dona Mara, Marli, Alexandra, Tati Mozer, Flavinha, Filipe, Cris Libardi, Murilo, Larissa, Mariana** pelo companheirismo e motivação;

Agradeço ao suporte financeiro recebido pela agência de fomento **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, **Processo número 2013/15123-5**, pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica, que tornaram possível dedicação integral ao desenvolvimento desse trabalho, além da divulgação em eventos científicos, apoio para publicação do artigo e experiências no exterior.

RESUMO

SALOMÃO, K.B. **Estudo da expressão dos genes TETs e níveis de hidroximetilação em meduloblastoma**. 2017. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O meduloblastoma (MB) é um tumor embrionário que se origina de alterações genéticas em vias importantes para neurôgenese do cerebelo como *Sonic hedgehog* (Shh) e *Wingless* (Wnt). Alterações específicas nessas vias permitem a classificação do MB pelo perfil de expressão e mutacional em quatro subgrupos: SHH, WNT, grupo 3 e grupo 4. A ativação dessas vias pode estar relacionada à hipermetilação de reguladores negativos. A dinâmica da hidroximetilação foi descrita durante o desenvolvimento cerebelar, mas não há relatos na literatura sobre os níveis da hidroximetilação em amostras de MB. Os principais objetivos desse trabalho foram: avaliar os níveis de expressão dos genes *TETs* e *IDHs* em MB por qPCR; investigar os níveis de hidroximetilação por meio de imuno-histoquímica e *dot-blot*; avaliar mutações no éxon 4 de *IDH1* e *IDH2* por sequenciamento; analisar a metilação e hidroximetilação em genes reguladores negativos das vias SHH, WNT, NOTCH, BMP; modular a atividade dos genes *TETs* por meio do ácido ascórbico e verificar sua influência funcional e epigenética. Foi observada diminuição na expressão dos genes *TETs* e *IDHs* em amostras de MB apenas em comparação com cerebelos fetais, mas não em relação aos cerebelos não-fetais. As linhagens celulares de MB apresentaram expressão diminuída em comparação aos dois grupos controles. A classificação das amostras de MB permitiu verificar uma expressão gênica subgrupo específica. A expressão de *TET3* apresentou associação com status da doença; e maiores níveis de *IDH2* foram associados à metástase. Não foram encontradas mutações no éxon 4 de *IDH1*, ou no éxon 4 de *IDH2* em MB. Os níveis de hidroximetilação global estão diminuídos em amostras de MB e linhagens celulares em comparação aos cerebelos não-neoplásicos; porém não estão associados com características clínicas dos pacientes. Não foram encontrados níveis detectáveis de hidroximetilação nos genes estudados. Os efeitos do ácido ascórbico foram linhagem-específicos, não ocorreu aumento nos níveis de hidroximetilação, mas alterações na expressão do gene *TET3*. Em conclusão, níveis de hidroximetilação e expressão dos genes *TETs* e *IDHs* são importantes para o MB. No entanto, estudos funcionais direcionados à manipulação desses genes são necessários para elucidar suas funções nesse tumor.

Palavras-chave: Meduloblastoma; *TET*; *IDH*; Hidroximetilação

ABSTRACT

SALOMÃO, K.B. **Study of TETs genes expression and hydroxymethylation levels in medulloblastoma.** 2017. 129 p. Thesis (Doutorado) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Medulloblastoma (MB) is an embryonic tumor that originates from genetic alterations in pathways that are important to the neurogenesis of cerebellum, such as *Sonic hedgehog* (Shh) e *Wingless* (Wnt). These alterations allow us to classify MB based in expression and mutational profile in four subgroups: SHH, WNT, group 3 and group 4. The activation of these pathways could be related to hypermethylation of negative regulators. Hydroxymethylation dynamics was described during cerebellum development, but there are not reports in the literature about hydroxymethylation levels in MB samples. The main aims of this study were: to evaluate *TET* and *IDH* genes expression in MB using qPCR; to investigate hydroxymethylation levels using immunohistochemistry and dot-blot; to evaluate mutations in exon 4 of *IDH1* and *IDH2* genes through sequencing analysis; to analyze methylation and hydroxymethylation levels in genes that regulate SHH, WNT, NOTCH and BMP pathways; to modulate *TET* genes activity through ascorbic acid and verify its functional and epigenetic influence in MB cell lines. We observed a decrease in *TET* and *IDH* genes expression in MB samples compared to fetal cerebellum, but not according to non-fetal cerebellum. MB cell lines presented a decrease when compared to both control groups. The classification of MB samples allowed us to verify a subgroup-specific gene expression. *TET3* expression was associated with disease status; and higher levels of *IDH2* gene expression were associated with metastasis. We did not find mutations in exon 4 of *IDH1* and exon 4 of *IDH2* genes in MB samples. Hydroxymethylation levels were decreased in MB samples and cell lines when compared to non-neoplastic cerebellum; however, they were not associated with clinical characteristics of the patients. We did not detect hydroxymethylation levels in the studied genes. Ascorbic acid effects are cell line-specific: we did not observe increase in hydroxymethylation levels, but alterations in *TET3* gene expression. In conclusion, hydroxymethylation and expression levels of *TET* and *IDH* genes are important for MB. Though, functional assays that target these genes are required to elucidate their function in MB.

Keywords: Medulloblastoma; *TET*; *IDH*; 5-Hydroxymethylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias envolvidas no desenvolvimento do meduloblastoma.....	25
Figura 2. Estrutura das proteínas TETs.....	29
Figura 3. Processo de demetilação ativa do DNA catalisado pelas enzimas TETs..	29
Figura 4. Disponibilidade de amostras..	36
Figura 5. Fotografias de géis de agarose 2%.....	43
Figura 6. Padronização da técnica de <i>dot-blot</i> para hidroximetilação..	44
Figura 7. Curva Padrão do gene <i>DLL1</i> (A), <i>PTCH1</i> (B), e <i>DKK3</i> (C).	47
Figura 8. Fotografias de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio referente à sonicação do DNA genômico.....	48
Figura 9. Comparações dos níveis de expressão dos genes (A) . <i>TET1</i> ; (B) <i>TET2</i> ; (C) <i>TET3</i> ; (D) <i>IDH1</i> e (E) <i>IDH2</i>	55
Figura 10. Associação dos níveis de expressão de <i>TET1</i> , <i>TET3</i> e <i>IDH1</i> com os subgrupos moleculares..	56
Figura 11. Associação entre características clínicas e expressão gênica.	58
Figura 12. Curvas de sobrevida pelo tempo em meses, relacionadas à mediana da expressão relativa dos genes <i>TET1</i> (A), <i>TET2</i> (B), <i>TET3</i> (C), <i>IDH1</i> (D) e <i>IDH2</i> (E).	62
Figura 13. Alinhamento da sequência obtida na amostra C2 com relação ao éxon 4 do gene de referência <i>IDH2</i>	63
Figura 14. Membranas de <i>dot-blot</i> para estudo de hidroximetilação.	64
Figura 15. Porcentagem relativa de hidroximetilação em cerebelos controle, amostras de pacientes de meduloblastoma e linhagens celulares de MB	65
Figura 16. Curva de sobrevida pelo tempo em meses relacionado à mediana dos níveis relativos de hidroximetilação.....	66
Figura 17. Variação na intensidade de marcação de células 5-hmC positivas.....	66
Figura 18. Cerebelo Controle 10..	67
Figura 19. Quantificação da imunomarcação.	68

Figura 20. Amostra MB 52.....	68
Figura 21. Curva de sobrevida pelo tempo em meses relacionado à mediana dos níveis relativos de hidroximetilação analisados por imunohistoquímica	69
Figura 22. Enriquecimento <i>Methylcollector</i> em relação ao INPUT.	71
Figura 23. Taxa de proliferação das linhagens celulares por resazurina mediante o tratamento com ácido ascórbico nas menores doses.	73
Figura 24. Taxa de proliferação das linhagens celulares por resazurina mediante tratamento com ácido ascórbico nas maiores doses.....	73
Figura 25. Ensaio clonogênica da linhagem ONS-76 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora.....	74
Figura 26. Ensaio clonogênica da linhagem DAOY após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora.	74
Figura 27. Ensaio clonogênica da linhagem UW473 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora.	75
Figura 28. Ensaio clonogênica da linhagem UW402 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora.	75
Figura 29. qPCR para avaliar a expressão gênica após o tratamento com ácido ascórbico	76
Figura 30. Dot-blot para avaliar os níveis de 5-hmC após tratamento com ácido ascórbico.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do meduloblastoma segundo OMS (2016).....	26
Tabela 2. Dados clínicos referentes ao gênero, idade, presença de metástase, e eventos desfavoráveis (recidiva e/ou óbito) dos pacientes incluídos no estudo (N/A = não avaliado).....	36
Tabela 3. Características clínicas das amostras de cerebello não-neoplásico infantis e adultos.	40
Tabela 4. Características das amostras de cerebello não-neoplásico fetal	41
Tabela 5. Eficiência dos <i>primers</i> para estudo de metilação e hidroximetilação	47
Tabela 6. Expressão relativa dos genes <i>TETs</i> e <i>IDHs</i> nos subgrupos moleculares de MB. O valor de <i>p</i> é relativo à comparação dos subgrupos moleculares com os cerebelos controle.	57
Tabela 7. Associação entre expressão dos genes estudados e as características clínicas: idade, grau de ressecção, metástase, gênero e recidiva; valor de <i>p</i> significativo $p < 0,05$	59
Tabela 8. Sobrevida livre de eventos em cinco anos para os genes analisados, tendo como referência a mediana de expressão no grupo total de pacientes. Valor <i>p</i> significativo $p \leq 0,05$	61
Tabela 9. Associação entre porcentagem de células 5-hidroximetilcitosina positivas e as características clínicas: idade, gênero, metástase e status; valor de <i>p</i> significativo $p < 0,05$	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitros
2OG	2-oxiglutarato
5'-UTR	5'- Untranslated Region
5-caC	5-carboxilcitosina
5-fC	5-formilcitosina
5-hmC	5-hidroximetilcitosina
5-mC	5- metilcitosina
<i>ABL</i>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
BER	Base excision repair
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRAF	Serin/threonine-protein kinase B-raf
<i>CCND1</i>	<i>Ciclina D1</i>
cDNA	DNA complementar
CH ₃	Grupamento Metil
Cm ²	Centrímetros ao quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin beta-1</i>
DAB	Diaminobenzidina
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
<i>DDX3X</i>	DEAD-box helicase 3
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
DKK	Dickpof-related protein 1
<i>DLL</i>	<i>Delta Like-1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DSBH	<i>Double-stranded β-helix domain</i>
dTTP	<i>Deothymine triphosphate</i>
ESCs	<i>Embryonic Stem Cells</i>
<i>EZH2</i>	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
Fe(II)	Ferro (II)
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>GF11</i>	<i>Growth Differentiation factor 11</i>
<i>GLI</i>	<i>Gliotactin</i>
<i>GUSB</i>	<i>Beta-glucuronidase precursor</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H3K4me3	Trimetilação da lisina 4 da histone 3
HIF	Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HoxA9
HPR
IDAX
IDH
IFNG
IGF
IgG
iPSCs
JAG
Kb
KDM6A
KHz
KRAS
MB
MBD
MBEN
MgCL₂
mTOR
N/D
NBR2
ng
nm
OMS
OTX2
Pb
PBS
PCR
PTCH
PTEN
RBPJ
RNA
sFRP
SHH
SMO
SNCAIP
STAT1
SUFU
TBS
TDG
TET
TGF- β
TIMP3
TLX

Homeobox A9
Horseradish Peroxidase
Inhibition of the Dvl and Axin Complex
Isocitrate dehydrogenase
Interferon gamma
Insulin growth factor
Imunoglobulina G
induced Pluripotent Stem Cell
Zing Fing protein JAGGED
Kilobases
Lysine (K)-specific demethylase 6A
Quilohertz
Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Meduloblastoma
Metyl-CpG Binding Domain Protein
Meduloblastoma de Nodularidade Extensiva
Cloreto de Magnésio
mammalian Target of Rapamycin
Nodular/Desmoplásico
Neighbor of BRCA1 gene 2
Nanogramas
Nanômetros
Organização Mundial da Saúde
Orthodenticle homeobox 2
Pares de bases
Phosphate-buffered saline
Reação em cadeia da polimerase
Protein Patched Homolog 1
Phosphatase and Tensin Homolog
Recombinant Binding Protein Suppressor of Hairless
Ácido Ribonucléico
Secreted Frizzled-related protein 1
Sonic Hedgehog
Smoothered gene
Synphilin-1
Signal transducer and activator of transcription 1
Supressor of fused homolog
Tris-buffered saline
Thymine-DNA glycosylase
Ten-Eleven Translocation
Transformin Growth Factor Beta
Metalloproteinase inhibitor 3
Nuclear Receptor TLX

TP53
UCSC
W
WNT
XIST
 α -KG

Tumor Protein 53
University of Santa Cruz
Watt
Wingless
X Inactive specific transcript
alfa-ketoglutarate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Meduloblastoma	21
1.2 Meduloblastoma e Epigenética	26
1.3 Hidroximetilação e enzimas TETs	28
 2 OBJETIVOS.....	 32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos	32
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 34
3.1 Desenho Experimental	34
3.2 Casuística.....	34
3.3 Dados clínicos dos pacientes	35
3.4 Linhagens celulares	41
3.5 Avaliação de expressão gênica	41
3.6 Extração de DNA.....	42
3.7 Sequenciamento dos genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	42
3.8 Avaliação de hidroximetilação por <i>Dot-Blot</i>	44
3.9 Avaliação de hidroximetilação global por imuno-histoquímica (IHQ).....	45
3.10 Estudo dos níveis de hidroximetilação e metilação nos genes <i>PTCH1</i> , <i>sFPR1</i> , <i>DLL1</i> , <i>DKK3</i> , <i>BMP2</i> e <i>TIMP3</i>	46
3.10.1 Estudo das regiões promotoras e desenho de <i>primers</i>	46
3.10.2 Padronização dos <i>primers</i>	46
3.10.3 Padronização da sonicação de DNA genômico e aplicação nas amostras	48
3.10.4 Enriquecimento das amostras com kit <i>Hydroxymethylcollector</i>	48
3.10.5 Enriquecimento das amostras com kit <i>Methyltcollector Ultra</i>	49
3.10.6 PCR em tempo real para quantificação do enriquecimento	50
3.11 Ensaios Funcionais	50
3.11.1 Proliferação celular de linhagens de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico	51
3.11.2 Ensaio clonogênico	51
3.11.3 Avaliação da expressão gênica de linhagens de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico.....	51

3.11.4 Extração de DNA e avaliação dos níveis de hidroximetilação global por dot-blot das linhagens tratadas com ácido ascórbico	52
3.12 Análise estatística	52

4 RESULTADOS.....54

4.1 Comparações entre a expressão relativa dos genes <i>TETs</i> e <i>IDHs</i> nas amostras de MB, linhagens celulares de MB e cerebelos não-neoplásicos	54
4.2 Relação da expressão dos genes <i>TET1</i> , <i>TET2</i> , <i>TET3</i> , <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> com os subgrupos moleculares de meduloblastoma	56
4.3 Associação da expressão dos genes <i>TET1</i> , <i>TET2</i> , <i>TET3</i> , <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> com características clínicas dos pacientes	57
4.4 Sobrevida livre de eventos desfavoráveis em cinco anos de acordo com a expressão dos genes estudados.....	61
4.5 Sequenciamento do éxon 4 de <i>IDH1</i> e do éxon 4 de <i>IDH2</i> em amostras e linhagens celulares de meduloblastoma	63
4.6 Níveis de hidroximetilação global	63
4.6.1 Níveis de hidroximetilação global avaliados por <i>dot-blot</i>	64
4.6.2 Níveis de hidroximetilação global avaliados por imuno-histoquímica.....	66
4.7 Níveis de metilação e hidroximetilação nos genes <i>PTCH1</i> , <i>sFPR1</i> , <i>DLL1</i> , <i>DKK3</i> , <i>BMP2</i> e <i>TIMP3</i>	70
4.8 Efeitos funcionais e epigenéticos do tratamento com ácido ascórbico.....	72
4.8.1 Proliferação das linhagens celulares de meduloblastoma após tratamento com ácido ascórbico.....	72
4.8.2 Clonogenicidade das linhagens celulares de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico	74
4.8.3 Expressão de <i>TET1</i> e <i>TET3</i> após tratamento com ácido ascórbico.....	76
4.8.4 Níveis de hidroximetilação global com o tratamento com ácido ascórbico.....	77

5 DISCUSSÃO 79

5.1 Níveis de hidroximetilação e expressão dos genes <i>TETs</i> e <i>IDHs</i> associados com características clínicas em MB	79
5.2 Investigação de mutação no éxon 4 de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	85
5.3 Níveis de metilação e hidroximetilação em genes específicos relacionados às vias embrionárias relacionadas ao desenvolvimento do MB	87
5.4 Efeitos funcionais e epigenéticos do ácido ascórbico	90

6 CONCLUSÃO 94

7 REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO	110
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	110
APÊNDICE.....	112
ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA REVISTA “INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL RESEARCH”	112

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Meduloblastoma

O meduloblastoma (MB) se origina no cerebelo e representa o tumor cerebral maligno mais comum na infância; com distribuição bimodal, apresenta picos de incidência entre três e quatro anos de idade ou entre oito e nove anos de idade; e atinge com mais frequência indivíduos do sexo masculino (PACKER et al., 2010; MCNEIL, 2016). A apresentação clínica do MB compreende cefaleia, vômito, irritabilidade e letargia; que são sinais decorrentes do aumento da pressão intracraniana em consequência da hidrocefalia obstrutiva relacionada ao crescimento do tumor e compressão do quarto ventrículo (HALPERIN; FRIEDMAN, 1996).

Os pacientes são divididos de acordo com a idade, disseminação da doença e grau de ressecção do tumor. Sendo considerados de alto risco, pacientes menores de três anos, que apresentam metástase ao diagnóstico, e/ou tumor residual maior que 1,5 cm² após a cirurgia. O tratamento padrão inclui cirurgia, quimioterapia, e para pacientes maiores de três anos da idade, a radioterapia. A sobrevida livre de eventos desfavoráveis (metástase, recidiva ou óbito) em cinco anos atinge de 70-80%. No entanto, a grande maioria dos pacientes que sobrevivem sofrem com efeitos colaterais do tratamento, que a longo-prazo podem afetar o desenvolvimento neurológico, neuroendócrino e psicossocial (CRAWFORD et al., 2007; MABBOT et al., 2008; NORTHCOTT ET AL., 2012; MASSIMINO et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o MB como tumor embrionário do sistema nervoso central de grau IV, e subclassifica de acordo com uma combinação de informações histológicas tradicionais e características genéticas/moleculares. A definição histopatológica divide o MB em quatro grupos histológicos: MB clássico, desmoplásico/nodular, extensiva nodularidade e células grandes/anáplásico (LOUIS et al., 2016).

O MB clássico é composto de células pequenas e relativamente uniformes com núcleo arredondado, alguns casos exibem diferenciação neuroblástica. Esse subtipo apresenta picos de incidência aos 10 e aos 20 anos de idade; está relacionado a um bom prognóstico, e representa 70% dos casos de MB. Usualmente

o MB clássico surge no vermis cerebelar (ELLISON et al., 2010; BOROWSKA; JOSWIAK, 2014; LOUIS et al., 2016).

Os subgrupos histológicos nodular/desmoplásico (N/D) e MB de extensiva nodularidade (MBEN) são agrupados como MB desmoplásico devido à similaridade histológica. Esses subgrupos são caracterizados pela presença de nódulos de células neurocíticas diferenciadas, espaços internodulares constituídos por células indiferenciadas e desmoplasia. As regiões desmoplásicas exibem células em alta proliferação, ricas em reticulina. MBEN apresentam alto número de nódulos irregulares; enquanto que N/D são distinguidos por nódulos esparsos, mas dispersos em regiões de desmoplasia (ELLISON et al., 2010; BOROWSKA; JOSWIAK, 2014; LOUIS et al., 2016).

Meduloblastoma N/D surge em duas faixas etárias: abaixo de três anos e idade adulta; enquanto que MBEN é característico em crianças mais jovens. Esses subgrupos representam 10% dos casos de MB e estão relacionados ao melhor prognóstico, no entanto tumores mais agressivos também podem estar presentes. O MB desmoplásico se origina nos hemisférios cerebelares (ELLISON et al., 2011; GESSI et al., 2012; TAYLOR et al., 2012; BOROWSKA; JOSWIAK, 2014; LOUIS et al., 2016).

Os subtipos MB de células grandes e anáplásico foram agrupados, devido à dificuldade na diferenciação histológica entre esses tumores. Nesses subtipos estão presentes células tumorais com pleomorfismo nuclear, alta atividade mitótica e formas atípicas. MB anáplásicos apresentam o pior prognóstico, representam 20% dos diagnósticos de MB, e são mais frequentes numa média de seis anos de idade (ELLISON et al., 2011; BOROWSKA; JOSWIAK, 2014; LOUIS et al., 2016).

Estudos genômicos evidenciaram que o MB apresenta a desregulação de vias de sinalização que controlam o desenvolvimento embrionário normal do cerebelo, como SHH, BMP, WNT, TGF- β e NOTCH (Figura 1); e permitiram a classificação genética e molecular do MB em quatro subgrupos moleculares: WNT (Wingless)-ativada; SHH (Sonic Hedgehog)-ativada TP53 selvagem; SHH-ativada TP53 mutante; não-WNT/não-SHH (NORTHCOTT et al., 2012; TAYLOR et al., 2012; LOUIS et al., 2016).

O subgrupo WNT apresenta ativação da via WNT. A hiperexpressão da via WNT inibe a diferenciação neuronal in vitro, mantendo as células em estado proliferativo (ROGERS et al., 2012). O subgrupo WNT se origina no IV ventrículo e

no tronco cerebral dorsal (GIBSON et al., 2010). A via WNT está relacionada a processos como proliferação, migração e diferenciação celular. A ativação da via estabiliza a proteína β -Catenina, efector-chave da via, que é translocada para o núcleo e age como co-fator transcrricional de genes alvos incluindo MYC e Ciclina D1 (*CCND1*) (HE et al., 1998; MORIN et al., 1999; TETSU; MCCORNICK, 1999).

A principal mutação somática no subgrupo WNT está no gene *CTNNB1*, que promove e estabiliza a localização nuclear da proteína β -catenina, seguida por alterações no remodelador de cromatina *DDX3X*. Apesar do balanceamento genômico característico, esse subgrupo apresenta com frequência monossomia do cromossomo 6. Tumores WNT apresentam a menor incidência entre os subgrupos, sendo igualmente distribuídos entre indivíduos do sexo feminino e masculino; e estão relacionados ao melhor prognóstico (JONES et al., 2012; KOOL et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012).

O subgrupo SHH surge em consequência da exposição prolongada à sinalização SHH, que atrasa a diferenciação terminal e aumenta a proliferação de células precursoras granulares. Eventos que podem ocorrer no lábio rômbico e na camada granular precursora do cerebelo. A via SHH é ativada quando a proteína Shh se liga ao receptor Patched (PTCH), que libera a proteína Smoothed (SMO), e permite que fatores de transcrição GLI e MYCN se liguem a genes alvos (GILBERTSON; ELLISON, 2008; MATIROSAN et al, 2016; PRITCHARD; OLSON, 2008). A via de sinalização BMP atua inibindo proliferação estimulada por SHH e induz a diferenciação neuronal normal. Tumores SHH exibem baixa expressão dos genes constituintes de BMP (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2007; AYRAULT et al., 2010; NORTHCOTT et al., 2011).

As principais mutações somáticas encontradas no subgrupo SHH estão nos genes *PTCH1* e *SUFU* que codificam supressores da via SHH. Esse subgrupo também apresenta regiões de ganho e perda cromossômica, incluindo deleções frequentes em 9q e 10q. Tumores SHH mostram uma distribuição bimodal associada à idade de desenvolvimento do MB. Uma proporção de tumores SHH apresentam amplificação de *MYCN* e *GLI2*, e mutação em *TP53*, frequentemente são associados com morfologia anáplastica, e ao pior prognóstico. Tumores SHH com o gene *TP53* selvagem estão relacionados ao subgrupo histológico desmoplásico/nodular; e se associam ao prognóstico intermediário (ELLISON et al., 2011; JONES et al., 2012; ZHUKOVA et al., 2013).

Os tumores não-WNT/não-SHH são representados pelos MB grupo 3 e 4. Esses subgrupos estão frequentemente associados com tetraploidia e instabilidade genômica, assim como com alterações em genes relacionados à modificação de cromatina (JONES et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012). Tumores pertencentes ao grupo 3 se originam a partir de células precursoras do lábio rômbo e da zona ventricular durante o desenvolvimento do cerebelo. A presença recorrente de genes receptores TGF- β sugere que essa via pode atuar como potencial condutor oncogênico nesse grupo de tumores (LIN et al., 2016; MATIROSAN et al., 2016).

Tumores do grupo 3 estão relacionados ao pior prognóstico, são mais comuns entre indivíduos do sexo masculino, e restritos à infância. Esse subgrupo está relacionado à ativação dos genes *GF11A*, *GF11B*, amplificação de *OTX2*, e altos níveis de instabilidade genômica, sendo que as alterações cromossômicas mais comuns são ganhos de 1q, 7 e 17q, e deleções de 10q, 11 e 17p. A hiperexpressão de *MYC* está relacionada a altos níveis de metástase nesses tumores (NORTHCOTT et al., 2011; JONES et al., 2012; KOOL et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2014; RAMASWAMY et al., 2013).

Tumores do grupo 4 tem origem em núcleos cerebelares imaturos, a partir da zona transitória nuclear (LIN et al., 2016). Para esse subgrupo as anormalidades genéticas não estão bem definidas; frequentemente apresentam isocromossomo 17q, amplificação de *MYCN*, duplicação de *SNCAIP*, perda de 11q. Mutações no gene que codifica a lisina demetilase KDM6A estão presentes em 11% dos pacientes, e são mutuamente exclusivas com hiperexpressão de *EZH2*. Tumores pertencentes ao Grupo 4 estão relacionados a bom prognóstico, sendo a presença de metástase um fator de alto risco (JONES et al., 2012; KOOL et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012; RAMASWAMY et al., 2016; ROBINSON et al., 2012).

A via NOTCH também está desregulada no MB, e atua inibindo a diferenciação e promovendo a proliferação. No desenvolvimento do cerebelo é expressa ao redor do quarto ventrículo e sua ativação contribui para manutenção de uma população neuronal precursora no embrião (SOLECKI et al., 2001; XU et al., 2009). Para a ativação da via canônica é necessário a interação de um ligante (*JAG1*, *JAG2*, *DLL1*, *DLL3* e *DLL4*) com receptor NOTCH 1-4 (RADTKE; RAJ, 2003). NOTCH clivado migra para o núcleo e ativa a proteína reguladora (RBPJ), que induz a expressão de genes relacionados à proliferação, sobrevivência e homeostase (NOFZIGER et al., 1999; TSIVITSE, 2010;).

A hiperexpressão de *JAG1* é uma característica comum em todos os subgrupos de MB, no entanto, altos níveis de *JAG2* foram descritos em tumores do grupo 3 com ativação de *MYC*, que são anáplasicos, agressivos e altamente invasivos. *DLL1* está hiperexpresso no grupo 4, enquanto que *DLL3* está hipoexpresso nos grupos 3 e 4 (FIASCHETTI et al., 2014).

O diagnóstico por critérios histológicos e moleculares (Tabela 1), e informações sobre a origem celular dos subgrupos de MB permitem um melhor entendimento da tumorigênese do MB e avanços na terapia desse tumor. Esses conhecimentos evidenciaram a intrínseca relação da biologia do MB com a desregulação de vias que controlam o desenvolvimento normal do cerebelo, ocasionadas por alterações genéticas (ganho e perda de função), mas que também podem ocorrer em consequência de alterações epigenéticas (KONGKHAM et al., 2010; HATTEN; RUSSEL, 2011).

Figura 1. Principais vias envolvidas no desenvolvimento do meduloblastoma. As vias de sinalização NOTCH, BMP, SHH, TGF-β e WNT estão ativas durante a neurogênese. Em condições patológicas, alterações nessas vias podem interferir no balanço entre proliferação, migração e diferenciação, contribuindo para tumorigênese (Modificado de RODINI et al., 2010).

Tabela 1. Classificação do meduloblastoma segundo OMS (2016).

Perfil Genético	Perfil Histológico	Prognóstico
WNT	Clássico	Baixo Risco
	Anáplásico (muito raro)	Clinopatologia não definida
SHH – TP53 Mutante	Clássico	Alto Risco
	Anáplásico	Alto Risco, prevalente em crianças 7-17 anos
	Desmoplásico (muito raro)	Clinopatologia não definida
SHH – TP53 selvagem	Clássico	Risco Padrão
	Anáplásico	Clinopatologia não definida
	Desmoplásico	Baixo risco em lactantes, prevalente em lactantes e adultos
	Extensiva modularidade	Baixo Risco, primeira infância
Não-WNT/não-SHH, grupo 3	Clássico	Risco Padrão
	Anáplásico	Alto Risco
Não-WNT/não-SHH, grupo 4	Clássico	Risco Padrão
	Anáplásico (raro)	Clinopatologia não definida

Tabela baseada no artigo de Loius et al., 2016

1.2 Meduloblastoma e Epigenética

O silenciamento epigenético desempenha um importante papel no desenvolvimento do MB (KONGKHAM et al., 2010). Alterações epigenéticas compreendem mudanças herdáveis na expressão gênica sem que ocorram

modificações na estrutura primária do DNA. Os mecanismos epigenéticos mais estudados são metilação do DNA, modificações de histonas e atividades de RNA não-codificadores (HAIG, 2004).

A metilação do DNA ocorre em dinucleotídeos 5'-CpG-3' e é definida pela adição de um radical metil (CH₃) no carbono 5 da citosina, formando o agrupamento 5-metilcitosina (5-mC). Esse processo é catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMT), que utilizam o composto S-Adenosil-Metionina como fonte doadora de grupo metil. Regiões ricas em CpGs são denominadas ilhas CpGs, e podem ser encontradas na região promotora, éxons, íntrons, no sítio de início da transcrição de grande parte dos genes. De maneira geral, a hipermetilação está associada com repressão da expressão gênica (BAYLIN; HERMAN, 2000; BESTOR, 2000; HERMAN; GOWHER; JELTSCH, 2004).

A hipermetilação de promotores de genes supressores tumorais foi relatada em vários tipos de câncer, e é evento frequente em MB; incluindo reguladores negativos das vias de sinalização SHH (*PTCH1-1C*; *HHID* – *Human hedgehog interacting protein*) e WNT (*sFRP* – *secreted Frizzled-related protein family*) (LINDSEY et al., 2004; LINDSEY et al., 2007; DIEDEA et al., 2010; KONGKHAM et al., 2010; BERTRAND et al., 2011; WU et al., 2012; FEIERABEND et al., 2013; LINDSEY et al., 2014). Essa desregulação nos níveis de metilação pode ser atribuída aos níveis elevados de expressão das enzimas DNMT1, DNMT3B e DNMT3B descritos em MB (PÓCZA et al., 2016). A inibição dessas enzimas por 5-azacitidina e zebularina apresentou efeitos antitumorais nas linhagens de MB, em consequência da ativação de supressores tumorais (ECKE et al., 2009; ANDRADE et al., 2016).

Os padrões de metilação também são importantes para a classificação do MB em subgrupos moleculares, uma vez que o perfil epigenético das amostras está associado ao perfil transcricional (SCHWALBE et al., 2013; HOVESTADT et al., 2014). Apesar da importância da metilação no estudo da tumorigênese e estratificação do MB, as técnicas utilizadas até o presente momento nos estudos de genes específicos não diferenciam entre 5-mC e 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (HUANG et al., 2010); existindo assim a possibilidade de resultados falsos positivos e presença de hidroximetilação em genes descritos como hipermetilados em MB. E também não há descrições relacionadas aos níveis de hidroximetilação em amostras de MB.

1.3 Hidroximetilação e enzimas TETs

A hidroximetilação é um mecanismo epigenético com papel crítico no desenvolvimento de mamíferos. A 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) influencia a estrutura e a função genômica (TAHILIANI et al., 2009). Altos níveis de 5hmC estão presentes em regiões regulatórias e ao longo de genes que estão sendo expressos, e associados com o recrutamento da maquinaria transcricional (LEIDER et al., 2013).

No cerebelo, 5-hmC se relaciona ao desenvolvimento embrionário e está presente em grandes proporções nos neurônios de Purkinje. Essa marca está relacionada às regiões genômicas, principalmente 5'-UTR e éxons. Também foram descritas regiões diferencialmente hidroximetiladas entre amostras de cerebelo fetais e adultas. (WANG et al., 2012). Foi demonstrado que a via NOTCH é controlada por hidroximetilação no desenvolvimento do cerebelo (KIM et al., 2014; TERRAGNI et al., 2014).

A conversão de 5-mC a 5-hmC é catalisada pelas enzimas TETs (ten-eleven translocation): TET1, TET2 e TET3, que constituem uma família de dioxigenases dependentes de 2-oxoglurato (2OG) e ferro (II) (Figura 2). Essas proteínas apresentam uma região catalítica na extremidade carboxi-terminal, com atividade metilcitosina dioxigenase, composta por um domínio conservado rico em cisteína (*Cys-rich*); e um domínio de cadeia dupla β -helix (double-stranded β -helix domain – DSBH), que interage com 2OG e Fe(II). Na região amino-terminal, TET1 e TET3 apresentam o domínio CXXC, que se liga a citosinas não-modificadas (TAHILIANI et al., 2009). Esse domínio não está presente em TET2; em consequência de uma inversão cromossômica durante a evolução, CXXC foi separado e deu origem ao gene *IDAX*, que regula negativamente TET2 (KO et al., 2015).

As enzimas TETs atuam no processo de demetilação ativa do DNA (Figura 3); durante o qual oxidam o grupamento metil a 5hmC, 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina. Essas bases são reconhecidas e excisadas pela enzima timina DNA glicosilase (TDG) e substituídas por uma citosina não modificada pela via de reparo por excisão de base (*base excision repair* – BER) (CORTAZAR et al., 2007; HE et al., 2011; AN et al., 2017). Independente da atividade catalítica, TET2 e TET3 estão associados à remodelação de cromatina e à marca permissiva de transcrição H3K4me3 (MARIAPPA; PATHAK; AALTEN, 2013).

Figura 2. Estrutura das proteínas TETs. A região carboxil-terminal consiste do domínio DSBH e do domínio rico em cisteína (Cys-rich). Na região amino-terminal, TET1 e TET3 apresentam o domínio CXXC, que foi separado de TET2 e está presente em IDAX (AN et al., 2017)

Figura 3. Processo de demetilação ativa do DNA catalisado pelas enzimas TETs. 5-mC= 5-metilcitosina; 5-hmC= 5-hidroximetilcitosina; 5-fC= 5-formilcitosina; 5-caC= 5-carboxilcitosina; TDG= timina DNA glicosilase; BER = base excision repair (reparo por excisão de base) (LIU et al., 2013).

Em câncer, redução na expressão dos genes *TETs* e consequente diminuição nos níveis de 5-hmC foram relatados em tumores de diferentes origens e estão relacionados ao pior prognóstico (HAFFNER et al., 2011; KUDO et al., 2012; LIAN et al., 2012; LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; FRYCZ et al., 2014; DONG et al., 2015; FENG et al., 2015; MURATA et al., 2015). Esse evento epigenético está associado ao acúmulo de metilação em promotores gênicos específicos, relacionado à progressão tumoral (WILLIAMS; CRISTENSEN; KRISTIAN, 2011; LIAN et al.,

2012; URIBES-LEWIS et al., 2015), no entanto, essa associação não foi descrita em MB.

Além da redução na expressão gênica, alterações na atividade das enzimas TETs também podem ser explicadas pela desregulação na ação das enzimas isocitrato dehidrogenase (IDH). IDHs catalisam a descarboxilação de isocitrato, produzindo α -cetoglutarato (α -KG) e CO_2 . O composto α -KG é utilizado como co-substrato pelas enzimas TETs, sendo requerido para conversão de 5-mC a 5-hmC. Em câncer, mutações de ganho de função ocorrem nos *hot-spots* éxon 4 de *IDH1* (que codifica o códon 132) e éxon 4 de *IDH2* (que codifica o códon 172); e têm como consequência a produção do composto 2-hidroxiglutarato (2-HG), um antagonista de α -KG, que inibe a conversão mediada por TET de 5-mC a 5-hmC (XU et al., 2011). Mutações em *IDH1* foram relatadas em glioma e leucemia mielóide, e a expressão de *IDH2* está diminuída em melanoma (FIGUEROA et al., 2010; YAN et al., 2010; LIAN et al., 2012).

A atividade das TETs pode ser potencializada pelo ácido ascórbico (vitamina C), tendo como consequência a produção de 5-hmC; esse mecanismo foi demonstrado em culturas de células tronco embrionárias (ESCs), fibroblasto embrionário, células tronco pluripotentes (iPSCs) e melanoma; e estimulou a demetilação do DNA de vários promotores gênicos, promovendo sua expressão (CHEN et al., 2013; DICKSON et al., 2013; MINOR et al., 2013; YIN et al., 2013; BLASCHKE et al., 2014; GUSTAFSON et al., 2015; HORE et al., 2016; NAIR; SONG; OH, 2016). Além disso, o ácido ascórbico apresentou citotoxicidade para as células tumorais (CHEN et al., 2008; DU et al., 2010; CIESLAK; CULLEN, 2015; GUSTAFSON et al., 2015).

A hidroximetilação é um mecanismo importante para o desenvolvimento cerebelar (WANG et al., 2012), e atua no controle de vias embrionárias que estão desreguladas em MB (NERI et al., 2014; TERRAGNANI et al., 2014). Os níveis globais de 5-hmC estão diminuídos e relacionados ao pior prognóstico em tumores de diferentes origens (FIGUEROA et al., 2010; YAN et al., 2010; LIAN et al., 2012; YANG et al., 2013). Assim, formulamos a hipótese de que o MB apresenta níveis reduzidos de hidroximetilação global, associados à diminuição na expressão dos genes *TETs*. Alterações nos níveis de 5-hmC também poderiam ocorrer em genes relacionados às vias de desenvolvimento. O tratamento com ácido ascórbico poderia restaurar os níveis de 5-hmC, e ocasionar citotoxicidade em linhagens de MB.

OBJETIVOS

---

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever a expressão dos genes *TETs* e *IDHs*; e níveis de hidroximetilação global e gene-específico em MB e verificar sua importância nesse tumor.

2.2 Específicos

1. Verificar a expressão dos genes *TET1*, *TET2*, *TET3*, *IDH1* e *IDH2* em amostras de pacientes com MB e associar com características clínicas dos pacientes;
2. Avaliar a presença de mutações no éxon 4 de *IDH1* e no éxon 4 de *IDH2* das amostras de pacientes com MB;
3. Investigar o nível global de hidroximetilação em amostras de pacientes portadores de MB;
4. Analisar a metilação e hidroximetilação em genes associados com as vias SHH, WNT, NOTCH, BMP em amostras de pacientes portadores de MB;
5. Modular a atividade dos genes *TETs* por meio do ácido ascórbico e verificar sua influência nos níveis de hidroximetilação e efeitos funcionais em meduloblastoma.

MATERIAL E MÉTODOS

---

3 MATERIAL E MÉTODOS

As extrações de DNA e RNA, avaliação da expressão gênica, *dot-blot*, PCRs convencionais e em tempo-real, reações de sequenciamento e ensaios funcionais foram realizados no laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP-USP). As imuno-histoquímicas foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Luciano Neder (Departamento de Patologia - FMRP-USP), e analisadas com auxílio do médico patologista Dr. Fabiano Pinto Saggiaro. O enriquecimento das amostras para verificação dos níveis de metilação e hidroximetilação gene-específicos foi realizado com apoio do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rodrigo Panepucci, no laboratório de Hematologia (HC/FMRP-USP).

3.1 Desenho Experimental

3.2 Casuística

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC/FMRP-USP (CAAE nº 37206114.1.0000.5440 – Anexo A). Foram obtidas 70 amostras de pacientes portadores de meduloblastoma, sendo 48 disponíveis no banco de tumores (9375/2003) do Laboratório de Pediatria (HC/FMRP-USP) e 22 amostras provenientes do Centro Infantil Boldrini de Campinas. Foram utilizadas

como controle 19 amostras de cerebelo não-neoplásico, sendo oito amostras de tecido cerebelar fetal, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Andrés Yunes – Centro Infantil Boldrini; seis amostras de tecido cerebelar infantil e cinco amostras de tecido cerebelar adulto obtidas no Departamento de Patologia (HC/FMRP-USP), em parceria com Prof. Dr. Fernando Ramalho.

3.3 Dados clínicos dos pacientes

Os dados clínicos dos pacientes estão dispostos na Tabela 2. Foram analisadas 70 amostras provenientes de 32 pacientes do gênero feminino (45%) e de 38 do gênero masculino (55%), com média de idade ao diagnóstico de oito anos (variação de idade de 5 meses a 26 anos). Para análise, as amostras foram classificadas em: pacientes menores de 3 anos (n= 12), considerados de alto risco; e maiores de 3 anos (n= 58).

Dados sobre o grau de ressecção macroscópica do tumor estão disponíveis com relação a 23 amostras, sendo que 17 (74%) pacientes apresentaram ressecção completa e seis (26%) apresentaram ressecção incompleta, característica definida pelo achado cirúrgico e exame de imagem (Ressonância Nuclear Magnética). Foi avaliada a presença de metástase ao diagnóstico em 69 pacientes, que compreende infiltração líquórica ou implante em neuroeixo, estando presente em 21 pacientes (30%); enquanto que 48 pacientes (70%) apresentaram apenas doença localizada. Não foram encontradas metástases fora do Sistema Nervoso Central. Dados relacionados aos eventos desfavoráveis (recidiva e/ou óbito) também foram avaliados, e estiveram presentes 35 dos casos (50%), enquanto que 34 pacientes (48,5%) não recidivaram.

As amostras de cerebelos não-neoplásicos foram divididas em infantis (n=6), com idade variando de 17 dias a 13 anos, sendo três amostras provenientes de pacientes do sexo masculino, e três amostras de pacientes do sexo feminino; e adultos (n=5), com idade variando entre 24 e 80 anos (Tabela 3). Foram analisadas amostras de tecido cerebelar não-neoplásico fetal, com idade gestacional variando de 22 a 39 semanas (Tabela 4).

Devido à quantidade insuficiente após a microdissecção, ou baixa qualidade do material, foi possível a extração de RNA para análise de expressão gênica de 47 amostras de MB e de 15 cerebelos não-neoplásicos, sendo 8 cerebelos fetais, 6

infantis e 1 adulto. Para extração de DNA, 12 amostras de MB e sete de cerebelo controle estavam disponíveis (seis infantis e um adulto); e foram submetidas à técnica de *dot-blot*, sequenciamento, e estudo de metilação e hidroximetilação gene-específico. Estavam disponíveis em blocos de parafina 37 amostras de MB e quatro cerebelos adultos não-neoplásicos, no entanto, foi possível realizar a reação de imuno-histoquímica em 31 amostras de MB e quatro cerebelos adultos (Figura 4 A e B). As tabelas 1, 2 e 3 apresentam o material disponível para cada paciente.

Figura 4. Disponibilidade de amostras. A. Meduloblastoma; B. Cerebelos não Neoplásicos.

Tabela 2. Dados clínicos referentes ao gênero, idade, presença de metástase, e eventos desfavoráveis (recidiva e/ou óbito) dos pacientes incluídos no estudo (N/A = não avaliado).

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Grau de ressecção	Metástase	Eventos (Recidiva ou óbito)	Material Disponível
MB1	Masculino	23	Completa	Não	Sim	RNA, DNA, parafina
MB2	Masculino	7	Completa	Não	Não	RNA, DNA, parafina
MB3	Masculino	13	Completa	Não	Não	RNA, DNA, parafina
MB4	Masculino	11	Completa	Não	Sim	RNA
MB5	Feminino	16	Completa	Não	Não	RNA, DNA
MB6	Feminino	9	Completa	Sim	Não	RNA, DNA
MB7	Feminino	8	Completa	Não	Sim	RNA, DNA,

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Grau de ressecção	Metástase	Eventos (Recidiva ou óbito)	Material Disponível
						parafina
MB8	Feminino	10	Completa	Não	Não	RNA
MB9	Masculino	4	Completa	Sim	Sim	RNA, DNA
MB10	Feminino	8	Completa	Não	Sim	RNA, DNA, parafina
MB11	Masculino	20	Completa	Sim	Sim	RNA
MB12	Feminino	11	Completa	Não	Não	RNA
MB13	Masculino	3	Completa	Não	Não	RNA, parafina
MB14	Feminino	12	Incompleta	Não	Não	RNA, DNA, parafina
MB15	Masculino	17	Incompleta	Sim	Sim	RNA, parafina
MB16	Masculino	1	Incompleta	Não	Não	RNA
MB17	Masculino	12	Incompleta	Sim	Não	RNA, parafina
MB18	Masculino	2	Incompleta	Sim	Sim	RNA, DNA
MB19	Feminino	10	Incompleta	Não	Sim	RNA
MB20	Masculino	6	N/A	Sim	Sim	RNA, parafina
MB21	Masculino	7	N/A	Não	Não	RNA, DNA, parafina
MB22	Feminino	10	Completa	Sim	Sim	RNA, parafina
MB23	Masculino	10	Completa	Sim	Sim	RNA, DNA, parafina
MB24	Feminino	8	Completa	Não	Não	RNA
MB25	Feminino	12	Completa	Não	Sim	RNA, parafina
MB26	Feminino	6	N/A	Não	Sim	RNA

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Grau de ressecção	Metástase	Eventos (Recidiva ou óbito)	Material Disponível
MB27	Feminino	9	N/A	Não	Não	RNA
MB28	Masculino	9	N/A	Não	Sim	RNA
MB29	Masculino	5	N/A	Não	Sim	RNA
MB30	Feminino	14	N/A	Não	Sim	RNA
MB31	Feminino	1	N/A	Não	Não	RNA
MB32	Masculino	9	N/A	Não	Não	RNA
MB33	Feminino	6	N/A	Não	Não	RNA
MB34	Masculino	8	N/A	Não	Sim	RNA
MB35	Feminino	2	N/A	Não	Não	RNA
MB36	Feminino	8	N/A	Não	Não	RNA
MB37	Masculino	3	N/A	Não	Sim	RNA
MB38	Masculino	3	N/A	Não	Não	RNA
MB39	Masculino	7	N/A	Não	Sim	RNA
MB40	Masculino	2	N/A	Não	Sim	RNA
MB41	Masculino	7	N/A	Não	Não	RNA
MB42	Masculino	13	N/A	Não	Não	RNA
MB43	Masculino	11	N/A	Não	Sim	RNA
MB44	Feminino	16	N/A	Não	Não	RNA
MB45	Feminino	9	N/A	Sim	Não	RNA
MB46	Feminino	8	N/A	Não	Sim	RNA
MB47	Feminino	10	N/A	Não	Não	RNA
MB48	Feminino	5	N/A	Não	Não	Parafina
MB49	Feminino	4	N/A	Não	Sim	Parafina
MB50	Feminino	1	N/A	Não	Sim	Parafina
MB51	Masculino	11	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB52	Feminino	7	N/A	Sim	Sim	Parafina

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Grau de ressecção	Metástase	Eventos (Recidiva ou óbito)	Material Disponível
MB53	Feminino	14	N/A	Não	Sim	Parafina
MB54	Feminino	8	N/A	Não	Não	Parafina
MB55	Masculino	5 meses	N/A	Sim	Não	Parafina
MB56	Feminino	13	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB57	Masculino	3	N/A	Sim	Não	Parafina
MB58	Masculino	6	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB59	Masculino	6	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB60	Masculino	10	N/A	Sim	Não	Parafina
MB61	Masculino	4	N/A	Não	Não	Parafina
MB62	Masculino	23	N/A	Sim	Não	Parafina
MB63	Masculino	16	N/A	Não	Não	Parafina
MB64	Masculino	26	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB65	Masculino	7	N/A	N/A	N/A	Parafina
MB66	Feminino	18	N/A	Não	Não	Parafina
MB67	Feminino	8	N/A	Não	Sim	Parafina
MB68	Masculino	4	N/A	Sim	Sim	Parafina
MB69	Feminino	3	N/A	Não	Sim	Parafina
MB70	Masculino	8	N/A	Não	Sim	Parafina

Tabela 3. Características clínicas das amostras de cerebelo não-neoplásico infantis e adultos.

Amostra	Idade	Sexo	Diagnóstico	Material Disponível
1	17 dias	Masculino	Cardiopatia congênita complexa	RNA, DNA
2	7 anos	Masculino	Broncopneumonia supurativa bilateral	RNA, DNA
3	1 mês	Masculino	Defeito septo atrioventricular	RNA, DNA
4	6 meses	Feminino	Epidermólise Bolhosa	RNA, DNA
5	1 ano	Feminino	Infecção Intestinal Grave	RNA, DNA
6	13 anos	Feminino	Linfoma de não-hodgin alto grau	RNA, DNA
7	31 anos	Feminino	Esofagite Aguda Hemorrágica	RNA, DNA
8	80 anos	Feminino	Insuficiência Cardíaca	Parafina
9	60 anos	Masculino	Hemorragia Digestiva Alta	Parafina
10	24 anos	Feminino	Anóxia Pós-Operatória	Parafina
11	59 anos	Feminino	Edema Agudo Pulmonar	Parafina

Tabela 4. Características das amostras de cerebelo não-neoplásico fetal

Amostra	Idade Gestacional	Sexo	Diagnóstico	Material Disponível
1	37	Masculino	Agenesia Renal Bilateral	RNA
2	39	Masculino	Hidropsia	RNA
3	22	-	NM	RNA
4	31	Masculino	NM	RNA
5	36	-	NM	RNA
6	24	Masculino	NM	RNA
7	30	-	Cardiopatia	RNA
8	26	Masculino	NM	RNA

NM = sem malformação ou aneuploidia

3.4 Linhagens celulares

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares de MB pediátrico UW402 e UW473 (gentilmente cedidas pelo Dr. Michael Bobola- Seattle Children's Hospital) e as linhagens ONS-76 e DAOY (adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ). As linhagens UW402 e UW473 foram cultivadas em meio HAM F10 (Sigma, R6504), enquanto que as linhagens ONS-76 e DAOY foram cultivadas em meio RPMI (Sigma, N6635). Ambos os meios foram suplementados com 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (pH 7,2–7,4); as culturas foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. As linhagens celulares foram autenticadas por meio de marcadores STR e validadas pela checagem do perfil pela ATCC. Não foram verificadas contaminações cruzadas. Foi também realizada a classificação molecular, DAOY, UW473 e ONS-76 pertencem ao subgrupo SHH.

3.5 Avaliação de expressão gênica

A extração do RNA foi realizada com o reagente TRIZOL® (Invitrogen Inc®, Carsdab, CA, USA) a partir de aproximadamente 50 - 100 mg de amostras de pacientes portadores de MB (após microdissecção), linhagens celulares e cerebelos

controle, conforme recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*®, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica nas amostras de pacientes foi realizada utilizando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (*Taqman Gene Expression Assay*® - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para os genes *TET1*, *TET2*, *TET3*, *IDH1* selvagem e *IDH2* selvagem. Foram utilizados como controles endógenos os genes *GUSB* e *ABL*. Os experimentos foram realizados em equipamento *7500 Fast Real Time System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e a quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como amostra calibradora foi utilizado Cerebelo não-neoplásico comercial (MVP cerebellum, 540007, Agilent, EUA).

3.6 Extração de DNA

Entre as amostras disponíveis no banco de tumores, apenas 12 de MB e sete de cerebelos controle apresentavam tecidos passíveis de serem microdissecados e submetidos à extração de DNA. A extração foi realizada com o kit *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen, Valencia, CA, USA).

3.7 Sequenciamento dos genes *IDH1* e *IDH2*

A amplificação do éxon 4 de *IDH2* (que codifica o códon 172) e do foi éxon 4 de *IDH1*, que codifica o códon 132, *hot spot* de mutação em outros tumores, foi realizada em 12 amostras de DNA de MB, 2 cerebelos controle e nas linhagens celulares; utilizando os *primers* para *IDH1*: sense 5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3'; anti-sense 5'-CACATTATTGCCAACATGAC-3'; e para *IDH2*: sense 5'-CCACTATTATCTCTGTCCTC-3'; anti-sense 5'-GCTAGGCGAGGAGCTCCAGT-3'. As reações foram realizadas num volume de 25µL, contendo 100 ng de DNA, 0,25U de Taq DNA polimerase, 0.3mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 2,5µL de Buffer 10x (Invitrogen, Brasil). A reação foi desnaturada a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento na temperatura ideal para cada *primer* por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72° por 10 minutos. Os produtos de PCR foram confirmados por gel de agarose 2%.

As condições de PCR foram realizadas conforme descrito por Patnaik et al. (2012), no entanto, foi necessário ajustar as condições (temperatura de *annealing* e concentração de cloreto de magnésio), para especificar a reação. A Figura 5 mostra as reações de PCR realizadas para a padronização da reação de sequenciamento. Para *IDH2*, a temperatura de anelamento ideal obtida foi de 57°C, correspondente à banda de 250 pares de bases mais nítida no gel de agarose 2%. A quantidade ideal de cloreto de magnésio observada, correspondente a banda de 250 pares de bases foi de 0,75 µL (concentração 50mM/mL). Enquanto que, para *IDH1*, a temperatura ideal obtida foi de 58°C, correspondente à banda de 122 pares de bases mais nítida no gel de agarose 2%, e a quantidade ideal de cloreto de magnésio foi de 1,0 µL (concentração 50mM/mL).

Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados diretamente utilizando o equipamento ABI3500XL, e o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). A análise dos dados obtidos do sequenciamento foi realizada utilizando o *software* Geneious v.8.0.5 *softwares* (DRUMMOND et al., 2014).

Figura 5. Fotografias de géis de agarose 2% corado com brometo de etídio referente às PCRs para padronização de reação de sequenciamento do éxon 4 de *IDH2* e do éxon 4 de *IDH1*, após corrida eletroforética de 100V. **(A).** Testes de quantidade de Cloreto de Magnésio, MgCl₂ (0,5 e 0,75 µL, concentração 50mM/mL) e temperatura de anelamento (57°C, 58°C e 59°C) em amostras controle (cerebelo controle 1 e 2) para reação de sequenciamento de *IDH2*. A primeira linha da corrida é referente ao marcador de pares de bases. As condições escolhidas como ideais foram 0,75 µL de cloreto de magnésio e 57°C como temperatura de anelamento **(B).** As temperaturas de anelamento testadas para *IDH1* foram 57°C, 57,5°C e 58°C), sendo que a temperatura ideal (sem bandas inespecíficas, foi a de 58°C), em amostras de cerebelo controle (C 1 e C2) e meduloblastoma (MB6 e MB7). A primeira linha da corrida de cada gel é referente ao marcador de pares de bases.

3.8 Avaliação de hidroximetilação por *Dot-Blot*

O padrão de hidroximetilação global foi avaliado em amostras de DNA de pacientes portadores de MB, linhagens celulares de MB e cerebelos controle, utilizando a técnica de *dot-blot* para hidroximetilação, baseada na ligação do anticorpo anti-5-hmC (Active-motif, cat. n°. 39769, Carlsbad, California, USA). Foi realizado um primeiro teste para padronização da técnica utilizando DNA de cerebelos controle em concentrações de 100, 200 e 300 ng/μL (Figura 6A). O anticorpo anti-5-hmC foi testado em DNAs controles comerciais não-metilado, metilado e hidroximetilado (Active-motif, cat. n°55008, Carlsbad, California, USA) e apresentou reatividade apenas contra o DNA hidroximetilado (Figura 6B).

O DNA desnaturado foi disposto em uma membrana de nitrocelulose e submetido à irradiação por luz ultravioleta por 5 minutos. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em TBS-Tween 20 por uma hora e incubada com anticorpo monoclonal anti-5-hmC (1:1000) (Active-Motif) a 4°C *overnight*. Após incubação com peroxidase (HRP) conjugado com IgG *anti-rabbit* (GE Healthcare, UK) por uma hora a temperatura ambiente, a membrana foi lavada com TBS-Tween 20 por três vezes de cinco minutos. O DNA foi detectado por um sistema de análise *Western blotting*. A intensidade do *dot-blot* foi quantificada pelo software *Image-J*, (versão 1.48, NIH, Washington, USA).

Figura 6. Padronização da técnica de *dot-blot* para hidroximetilação. **(A).** Teste de concentrações (100, 200 e 300 ng/μL) utilizando cerebelos controle 2 e 5. **(B).** Teste de especificidade de anticorpo em DNAs controle não-metilado (Um), metilado (M) e hidroximetilado (Hm).

3.9 Avaliação de hidroximetilação global por imuno-histoquímica (IHQ)

Com o objetivo de aumentar o número de amostras disponíveis para o estudo dos níveis globais de hidroximetilação, foi realizado um levantamento de amostras de meduloblastoma e cerebelos controle em blocos de parafina no arquivo do Hospital das Clínicas (FMRP/USP), e nas amostras selecionadas foi realizada a reação de imuno-histoquímica (IHQ), utilizando a metodologia do kit de polímeros *Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB* (Spring, cat. N. SPD-125, California, USA), e o anticorpo primário policlonal anti-5-hmC (Active-motif, cat. n°. 39769, Carlsbad, California, USA).

Após a completa desparafinação e posterior hidratação, os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica em panela à vapor e, em seguida, resfriados em temperatura ambiente. Em seguida às três lavagens com PBS (1x), os cortes foram tratados por 30 minutos com solução 3% de H₂O₂ para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes histológicos foram novamente lavados três vezes com PBS e incubados por 20 minutos com o reagente *Protein Block* (disponível no kit). Em seguida, os cortes foram incubados por uma hora com o anticorpo primário anti-5-hmC (1:250).

Decorrido o período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com os reagentes do sistema de visualização do kit, *complement* e HPR, a temperatura ambiente por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavados três vezes com o tampão disponibilizado pelo kit. Por último, as lâminas foram incubadas durante 5 minutos com diaminobenzidina 1mg/ml (DAB, disponível no kit) dissolvida em PBS mais 2,5% de peróxido de hidrogênio.

A reação do DAB foi bloqueada com uma lavagem em PBS seguida por lavagens com água destilada. As lâminas foram então contra coradas com Hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavadas com água corrente, desidratadas com três lavagens em álcool absoluto, imersas duas vezes em xilol e montadas com Permount (MERCK, Darmstadt, DE). Todas as etapas após a recuperação antigênica foram realizadas em temperatura ambiente. A imunomarcação foi quantificada através do software Image J (Versão 1.48, (NIH, Washington, USA), pela porcentagem de células imuno positivas.

3.10 Estudo dos níveis de hidroximetilação e metilação nos genes *PTCH1*, *sFPR1*, *DLL1*, *DKK3*, *BMP2* e *TIMP3*

O estudo dos níveis de hidroximetilação e metilação gene-específico em amostras de DNA foi realizado com os kits *Hydroxymethyl Collector* (Active Motif, cat. n. 55013, Carlsbad, California, USA) e *MethylCollector Ultra* (Active Motif, cat. n. 55005, Carlsbad, California, USA), respectivamente. Como etapas anteriores ao enriquecimento foram necessários o desenho de *primers*, a padronização de qPCRs e a fragmentação do DNA genômico.

3.10.1 Estudo das regiões promotoras e desenho de *primers*

O estudo das regiões gênicas foi realizado com apoio do site *Ensembl.org*. Os *primers* foram desenhados observando as recomendações dos kits, e as descrições a respeito da localização de 5-hMC no tecido cerebelar (Wang et al., 2012); para 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* 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>). O *primer* para o gene *DKK3* foi adquirido da literatura (NERI et al., 2015).

3.10.2 Padronização dos *primers*

As amostras de DNA genômico foram diluídas em série para construção de curvas de eficiência dos *primers* com cinco pontos, nas concentrações 100 ng/μL; 10 ng/μL; 1 ng/μL; 0,1 ng/μL; 0,01 ng/μL (Figura 7). O cálculo da eficiência dos *primers* foi realizado com a fórmula: $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$, sendo o *slope* ideal aproximadamente -3,32; e $R^2 = 0,999$. A Tabela 5 apresenta os pares de *primers* e as padronizações realizadas. A curva de *melting* também foi obtida para visualização de possíveis reações inespecíficas.

Tabela 5. Eficiência dos *primers* para estudo de metilação e hidroximetilação

Gene	Primers	Temperatura de anelamento (°C)	Volume primer por reação (10 pmol/μL) μL	R ²	Slope	Porcentagem de Eficiência (%)
DLL1	F: ATCGGCTCGGGAGGAA R: CTTCGCAGGAGAGGGA	60	0,6	0,997	-3,261	102,6
PTCH1	F: CCCGTAGGCCTGTCATCTA R: ACCTTTCATGCTTGCAATTCTC	60	0,8	0,998	-3,318	100
DKK3	F: TGGCGGTAAACAGTAATGTG R: GTGGGTAGTGGAGAATCAGA	56	0,8	0,998	-3,32	99,97
BMP2	F: GGAAATAAGAGGCCAGACC R: CTCTCAAAGGAGAGATCAGC	59	0,4	0,993	-2,958	117
sFRP1	F: TAGGCAACAAGAGCGAAACT R: CGCTGTAATTAACCTCGCATTGG	60	0,4	0,975	-3,102	110,054
TIMP3	F: GGTCTTTCTCCTCTGTGCCT R: GACCTTGACTGTGCTTGGTG	60	0,6	0,994	-3,275	102

Para a reação de amplificação foram utilizados 10 μL de *SybrGreen* (Applied Biosystem, Warrington, UK), 2 μL de DNA (100 ng/μL), o volume adequado de cada par de *primers* (conforme a Tabela 5), e água livre de DNA e RNA, para alcançar um volume final de 20 μL. A ciclagem compreendeu: 1. 50°C – 2 minutos; 2. 95°C – 10 minutos; 3. 95°C – 15 segundos; 4. TM – 1 Minuto (do 2 ao 4 por 40 vezes). Curva de melting: 95°C – 15 segundos; 60°C – 30 segundos; 95°C – 15 segundos.

Figura 7. Curva Padrão do gene *DLL1* (A), *PTCH1* (B), e *DKK3* (C) mostrando os pontos de diluição em série da amostra.

3.10.3 Padronização da sonicação de DNA genômico e aplicação nas amostras

A quantidade inicial de DNA utilizada para fragmentação foi de 5µg em 300µL, conforme indicado pelos kits *Hydroxymethyl Collector* e *MethylCollector Ultra*. A fragmentação mecânica do DNA genômico foi realizada em equipamento sonicador (Sonic – Vibra Cell) sob as seguintes condições: 130 W, 20 KHz, 30% de amplitude, pulsos com duração de 30 segundos, e intervalos de 45 segundos. A quantidade de pulsos foi testada entre um e dez, tendo sido selecionada a quantidade de 8 pulsos como ideal, pois apresentou fragmentos entre 100 e 500 pares de bases, conforme demonstrado na Figura 8. O DNA genômico das amostras foi sonicado nas condições padronizadas.

Figura 8. Fotografias de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio referente à sonicação do DNA genômico da linhagem celular ONS-76, onde Mar 1kb e 100 pb são os marcadores 1 kilobase 100 pares de bases, respectivamente; (1) amostra íntegra; (2) amostra sonificada com 2 pulsos; (3) amostra sonificada com 4 pulsos; (4) amostra sonificada com 6 pulsos; (5) amostra sonificada com 8 pulsos; (6) amostra sonificada com 10 pulsos; (7) amostra sonificada com 12 pulsos.

3.10.4 Enriquecimento das amostras com kit *Hydroxymethylcollector*

O enriquecimento do DNA hidroximetilado foi realizado utilizando o kit *Hydroxymethylcollector* (Active Motif, cat n. 55013, Carlsbad, California, USA). A metodologia do kit é baseada na transferência de grupamento glicose aos resíduos 5-hidroximetilcitosina, catalisada pela enzima β -glicosiltransferase. O kit fornece DNA genômico humano fragmentado e um oligonucleotídeo *spike* DNA

hidroximetilado para o loco do gene *APC* para serem utilizados como controle positivo da reação. Como controle negativo, serão consideradas as amostras que não receberem a enzima β -glicosiltransferase.

Resumidamente, o DNA fragmentado (1 μ g por reação) foi incubado com a enzima β -glicosiltransferase (2 μ L, sendo 200U/ μ L) e o doador de UDP-glicose modificado (2,5 μ L), por uma hora a 37°C. A seguir, foi realizada a incubação com uma solução de biotina conjugada (20 μ L) por uma hora a 37°C, a qual é quimicamente atraída pela glicose modificada.

O DNA biotinilado foi purificado, e então, foi efetuada a reação de captura utilizando *beads* de estreptavidina (25 μ L de *beads* diluídas em tampão de ligação, fornecido pelo kit), incubada por uma hora em temperatura ambiente com rotação constante e agitação (*Hula-Mixer*®; *Life-Technologies*, Carlsbad, CA, USA). Após a incubação, as *beads* foram lavadas com tampão de ligação; incubadas com tampão de eluição por 30 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante transferido para um tubo novo, com auxílio de barras magnéticas. Ao final, o DNA enriquecido foi purificado.

3.10.5 Enriquecimento das amostras com kit *Methylcollector Ultra*

O DNA metilado foi enriquecido utilizando o kit *Methylcollector Ultra* (Active Motif, cat n. 55005, Carlsbad, California, USA). O método do kit se baseia na alta afinidade do complexo proteico MBD2/MBD3L1 pelo DNA metilado. O kit fornece um DNA genômico humano fragmentado para controle das reações.

De maneira sucinta, foi preparada uma reação contendo *beads* magnéticas (10 μ L), tampão de ligação (100 μ L), inibidor de protease (0,5 μ L), complexo de proteínas His-MBD2/MBD3L1 (10 μ L) para cada amostra de DNA fragmentado (1 μ g 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 μ L), 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 μ L de proteinase K a cada amostra.

3.10.6 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) e usado como controle. As amostras enriquecidas, denominadas de IP foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação dos níveis de 5-hidroximetilcitosina e 5-metilcitosina, com os *primers* desenhados nas condições padronizadas, descritas no item 4.9.2.

Com o objetivo de verificar a eficiência do enriquecimento de 5-hidroximetilcitosina, o controle de DNA genômico humano enriquecido foi submetido à PCR em tempo real com *primers* para o gene *APC*. Enquanto que para a avaliação da eficiência da reação de enriquecimento dos resíduos de 5-metilcitosina, foram utilizados como controles positivos os genes *XIST* e *NBR2* e como controle negativo o gene *GAPDH*. O enriquecimento da amostra IP com relação à amostra INPUT foi calculado pela equação:

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

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 (ln20). O enriquecimento relativo foi calculado dividindo o enriquecimento observado na região de interesse pelo enriquecimento observado para o controle negativo fornecido pelo kit (GAPDH), região que apresenta poucas CpGs.

3.11 Ensaios Funcionais

Os tratamentos com ácido ascórbico foram realizados de acordo com a literatura, com o objetivo de acentuar a atividade das TETs (DU et al., 2010; MINOR et al., 2013; VENTURELLI et al., 2014).

3.11.1 Proliferação celular de linhagens de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico

Para os ensaios de proliferação celular, foram plaqueadas 2×10^3 células em 100 μ L do meio apropriada para cada linhagem por poço, em placas de cultivo de 96 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações (1 μ M – 10 mM) da droga ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St Louis, USA – Catálogo n. A4544) diluída no meio para cultivo celular.

As células tratadas foram incubadas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após 1, 4, 8, 16, 24 e 48 horas, nas menores doses; e 1, 24 e 48 horas nas maiores doses, foram adicionados 5 μ L do corante Resazurina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), na concentração de 880 μ M em 100 μ L de meio em cada poço, e a placa foi novamente incubada por mais 4 horas. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa de Elisa nos comprimentos de onda de 570 e 595 nm. A citotoxicidade celular foi calculada pela razão entre a média da absorbância de cada concentração nos diferentes tratamentos pela média da absorbância do controle.

3.11.2 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado utilizando-se placas de cultura de seis poços. Foram semeadas 300 células em cada poço, e após 24 horas, foi realizado o tratamento com ácido ascórbico nas doses de 5 mM e 10 mM. Após uma hora de tratamento, o meio foi trocado para meio sem a droga, e as células foram incubadas em estufa a 37°C por 14 dias, seguindo o tratamento realizado por Du e colaboradores (2010). Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado e foi realizada a fixação com metanol por 15 minutos, seguida pela coloração com Giemsa. As colônias foram contadas com microscópio estereoscópico (magnificação 40x), sendo consideradas somente aquelas com pelo menos 50 células.

3.11.3 Avaliação da expressão gênica de linhagens de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico

As células foram plaqueadas em placas de seis poços, e após 24 horas de incubação, foram tratadas com 5 mM e 10 mM de ácido ascórbico por uma hora e o

meio foi trocado por meio sem a droga. As células foram novamente incubadas por 24 horas, e então foi realizada a extração do RNA com TRIZOL®® (Invitrogen Inc®, Carsdab, CA, USA) conforme recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*®, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica nas linhagens celulares tratadas foi realizada utilizando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (*Taqman Gene Expression Assay*® - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para os genes *TET1* e *TET3*. Foram utilizados como controles endógenos os genes *GUSB* e *HPRT*. Os experimentos foram realizados em equipamento *7500 Fast Real Time System* (Applied Biosystems) e a quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.11.4 Extração de DNA e avaliação dos níveis de hidroximetilação global por dot-blot das linhagens tratadas com ácido ascórbico

A extração do DNA foi realizada com DNAzol® conforme recomendações do fabricante, a partir de células não tratadas e tratadas com 5mM e 10mM de ácido ascórbico por uma hora, o meio foi trocado por meio sem a droga, e as células foram incubadas por 24 horas após o tratamento. O padrão de hidroximetilação global foi avaliado utilizando a técnica de dot-blot para hidroximetilação, baseada na ligação de anticorpo anti-5hmC conforme descrito no item 3.8.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS17, os dados obtidos com relação à expressão, hidroximetilação global, metilação e hidroximetilação gene-específico foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney. A curva de sobrevida foi obtida pelo teste de Kaplan-Meier. Enquanto as correlações foram obtidas pelo teste de Spearmann. Os ensaios funcionais foram realizados em duplicatas e abrangendo no mínimo três experimentos independentes, considerando-se a média dos experimentos; as comparações foram realizadas utilizando o teste T de Student.

RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 Comparações entre a expressão relativa dos genes *TETs* e *IDHs* nas amostras de MB, linhagens celulares de MB e cerebelos não-neoplásicos

A expressão dos genes *TETs* e *IDHs* em amostras de meduloblastoma (n=47) foi comparada com a expressão de cerebelos não-neoplásicos, que foram divididos em dois grupos: fetais (n=9) e não-fetais (n=7). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. Foi verificado que a expressão relativa do gene *TET1* ($1,41 \pm 0,2$) está diminuída em amostras de meduloblastoma ($p < 0,001$) quando comparadas com cerebelo fetais ($4,81 \pm 0,88$), mas não possuem diferença significativa ($p = 0,33$) em relação aos cerebelos não-fetais ($1,59 \pm 0,33$). A expressão de *TET1* nas linhagens foi de $0,08 \pm 0,027$, com diminuição estatística significativa se comparada aos cerebelos fetais ($p = 0,007$) e aos cerebelos não-fetais ($p = 0,014$) (Figura 9A).

A expressão relativa do gene *TET2* em amostras de pacientes de meduloblastoma foi de $1,52 \pm 0,61$, sendo significativamente diminuída ($p = 0,019$) em relação aos cerebelos fetais ($2,52 \pm 0,54$); mas não apresentou diferença quando comparada com cerebelos não-fetais ($p = 0,55$). As linhagens celulares de meduloblastoma apresentaram expressão de $0,40 \pm 0,11$, uma diminuição significativa em comparação com cerebelos fetais ($p = 0,008$) e não-fetais ($p = 0,014$) (Figura 9B).

As comparações da expressão do gene *TET3* mostraram que amostras de meduloblastoma apresentaram uma expressão ($1,63 \pm 0,2$) diminuída ($p = 0,021$) em relação às amostras de cerebelo fetal ($2,80 \pm 0,43$). No entanto, cerebelos não-fetais ($2,54 \pm 0,43$) não apresentaram diferença estatística quando comparados às amostras de meduloblastoma ($p = 0,16$). As linhagens celulares, que mostraram uma média de expressão de $0,25 \pm 0,34$, apresentaram diferença significativa quando comparadas aos dois grupos controles ($p = 0,008$; $p = 0,014$) (Figura 9C).

O gene *IDH1* apresentou uma média de expressão relativa de $1,73 \pm 0,37$ em amostras de meduloblastoma, que quando comparadas com cerebelos fetais ($3,50 \pm 0,29$) está diminuída significativamente ($p < 0,001$), mas não apresentou diferença ($p = 0,082$) quando comparadas com cerebelos não-fetais ($2,13 \pm 0,44$). Enquanto que as linhagens celulares apresentaram diminuição na expressão relativa ($0,81 \pm 0,22$) quando em relação aos cerebelos fetais ($p = 0,007$) ou não-fetais ($p = 0,027$) (Figura 9D).

Os dados de expressão relativa do gene *IDH2* nos permitiram concluir que a expressão desse gene em meduloblastoma ($0,81 \pm 0,10$) está diminuída significativamente quando comparada com a expressão dos cerebelos fetais

($2,01 \pm 0,48$), com o valor de $p=0,001$; enquanto que cerebelos não-fetais não apresentaram expressão ($0,72 \pm 0,26$) diferencial das amostras de meduloblastoma ($p=0,69$). Os cerebelos fetais e não-fetais apresentaram expressão maior quando comparados com a expressão nas linhagens celulares (valor de p igual a 0,007 e 0,027 respectivamente) (Figura 9E).

Figura 9. Comparações dos níveis de expressão dos genes (A). *TET1*; (B) *TET2*; (C) *TET3*; (D) *IDH1* e (E) *IDH2*, entre cerebelos fetais (CF); cerebelos não fetais (CNF); amostras tumorais de pacientes de meduloblastoma (MB); e linhagens celulares (LC). * $p < 0,05$; FC= fold change.

4.2 Relação da expressão dos genes *TET1*, *TET2*, *TET3*, *IDH1* e *IDH2* com os subgrupos moleculares de meduloblastoma

De acordo com a disponibilidade, as amostras de MB (n= 42) foram classificadas em subgrupos moleculares, por meio de um painel de genes com assinatura específica (*TaqMan Low Density Array*), sendo 13 amostras pertencentes ao subgrupo SHH, 11 amostras pertencentes ao subgrupo WNT, 8 amostras pertencentes ao Grupo 3, e 10 amostras pertencentes aos Grupo 4.

Essa classificação foi associada com a expressão dos genes *TETs* e *IDHs* (Tabela 6), e nos permitiu verificar que amostras que apresentam a via WNT ativa apresentam uma diminuição significativa na expressão dos genes *TET1* ($p=0,004$) e *IDH1* ($p=0,013$) quando comparadas aos cerebelos não-fetais (Figura 10A e 10B, respectivamente). Enquanto que as amostras pertencentes ao subgrupo SHH apresentaram uma diminuição na expressão de *TET3* ($p=0,029$), e o grupo 4 apresentou diminuição na expressão do gene *IDH1* ($p= 0,013$), quando comparadas a esse mesmo grupo controle (Figura 10C).

Foi ainda realizada a correlação entre a expressão dos genes *TETs* e *IDHs* e genes da via WNT (*AXIN*, β -*Catenina*, *DKK3* e *GSK3B*), e foi observada uma correlação positiva entre os genes *TET1* e *B-Catenina* ($R= 0,387$; $p= 0,009$).

Figura 10. Associação dos níveis de expressão de *TET1*, *TET3* e *IDH1* com os subgrupos moleculares. * $p<0,05$; FC = fold change. NFC = cerebelo não-fetal, WNT= meduloblastoma WNT, SHH = meduloblastoma SHH. Não-SHH/Não-WNT = amostras não classificadas nesses dois subgrupos. (A). Diminuição da expressão de *TET1* em WNT. (B). Diminuição da expressão de *TET3* em SHH. (C). Diminuição da expressão de *IDH1* em SHH, WNT e Grupo4.

Tabela 6. Expressão relativa dos genes *TETs* e *IDHs* nos subgrupos moleculares de MB. O valor de *p* é relativo à comparação dos subgrupos moleculares com os cerebelos controle.

Subgrupos Moleculares	Cerebelos não-fetais Mediana (mín-máx)	WNT Mediana (mín-máx)	SHH Mediana (mín-máx)	Grupo 3 Mediana (mín-máx)	Grupo 4 Mediana (mín-máx)
Expressão de <i>TET1</i>	1,35 (1,08-2,84)	1,32 (0,12-3,26)	0,91 (0,53-1,46)	1,13 (0,12-2,37)	1,55 (0,8-2,49)
Valor de <i>p</i>		0,004	0,178	0,439	0,914
Expressão de <i>TET2</i>	1,107 (0,69-2,46)	1,7 (0,32-5,53)	1,33 (0,39-2,37)	2,24 (0,35-2,68)	1,215 (0,32-3,05)
Valor de <i>p</i>		0,291	0,874	0,606	0,910
Expressão de <i>TET3</i>	2,21 (1,30 – 4,18)	1,22 (0,19 – 2,48)	2,19 (0,81-4,22)	1,53 (0,4-3,02)	1,53 (0,43-3,59)
Valor de <i>p</i>		0,688	0,029	0,156	0,233
Expressão de <i>IDH1</i>	2,03 (1,16-3,61)	1,32 (0,37-2,15)	1,06 (0,18-2,35)	2,005 (0,66-4,28)	0,79 (0,28-2,11)
Valor de <i>p</i>		0,012	0,013	0,897	0,013
Expressão de <i>IDH2</i>	0,43 (0,28-1,7)	0,87 (0,18-3,57)	0,61 (0,3-0,89)	0,67 (0,1-1,04)	0,66 (0,18-1,46)
Valor de <i>p</i>		0,920	0,552	0,560	0,447

Teste estatístico utilizado = Mann-Whitney

4.3 Associação da expressão dos genes *TET1*, *TET2*, *TET3*, *IDH1* e *IDH2* com características clínicas dos pacientes

Ao relacionar a expressão dos genes estudados e características clínicas (idade ao diagnóstico, gênero, recidiva, grau de ressecção do tumor, presença de metástase ao diagnóstico, status do paciente) foi possível observar uma associação entre a expressão do gene *TET3* e o status da doença (Figura 11A): a expressão relativa deste gene está diminuída em pacientes que foram a óbito quando comparada com a expressão em pacientes vivos sem intercorrências ($p=0,045$). O gene *IDH2* apresentou expressão mais elevada em pacientes que apresentaram metástase ($p=0,031$) (Figura 11B). Não foi observada uma associação entre as

variáveis clínicas estudadas e os valores de expressão relativa dos genes *TET1*, *TET2* e *IDH1* (Tabela 7).

Figura 11. Associação entre características clínicas e expressão gênica. **(A).** Expressão relativa de *TET3* relacionada ao status da doença (vivo x óbito). **(B).** Expressão relativa de *IDH2* associada à presença ou ausência de metástase ao diagnóstico. * $p < 0,05$.

Tabela 7. Associação entre expressão dos genes estudados e as características clínicas: idade, grau de ressecção, metástase, gênero e recidiva; valor de p significativo $p < 0,05$.

	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>
	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)
Idade					
< 3 anos (n=5)	1,04 (0,7 – 1,52)	1,29 (0,42 – 1,73)	1,41 (0,71 – 2,92)	1,20 (0,55 – 6,01)	0,81 (0,43 – 2,04)
≥ 3 anos (n=41)	1,06 (0,09 – 7,89)	1,69 (0,32 – 6,60)	1,45 (0,15 – 4,22)	1,20 (0,18 – 15,3)	0,7 (0,095 – 3,57)
	($p=0,99$)	($p=0,316$)	($p=0,99$)	($p=0,706$)	($p=0,334$)
Gênero					
Feminino (n=18)	1,015 (0,09 – 3,26)	1,60 (0,32 – 2,24)	1,64 (0,15 – 4,22)	1,19 (0,37 – 15,3)	0,62 (0,095 – 3,57)
Masculino (n=29)	1,25 (0,12 – 7,89)	1,69 (0,32 – 6,6)	1,41 (0,40 – 3,59)	1,2 (0,18 – 4,55)	0,8 (0,10 – 2,53)
	($p=0,431$)	($p=0,965$)	($p=0,090$)	($p=0,734$)	($p=0,33$)
Recidiva					
Sim (n=16)	1,52 (0,12 – 3,26)	1,70 (0,32 – 3,02)	1,49 (0,19 – 2,86)	1,21 (0,37 – 2,55)	0,9 (0,19 – 3,57)
Não (n=30)	1,05 (0,09 – 7,89)	1,60 (0,32 – 6,6)	2,19 (0,15 – 4,22)	1,25 (0,18 – 15,3)	0,56 (0,095 – 2,53)
	($p=0,703$)	($p=0,588$)	($p=0,791$)	($p=0,954$)	($p=0,094$)
Ressecção					
Completa (n=17)	1,01 (0,61 – 3,10)	1,70 (0,47 – 3,05)	1,72 (0,65 – 4,22)	1,22 (0,54 – 4,55)	0,70 (0,30 – 1,32)
Incompleta (n=6)	1,6 (0,09 – 3,26)	1,30 (1,18 – 2,68)	1,64 (0,15 – 2,26)	1,59 (1,05 – 15,3)	1,18 (0,095 – 3,57)
	($p=0,062$)	($p=0,345$)	($p=0,516$)	($p=0,319$)	($p=0,052$)
Metástase					
Sim (n=8)	1,52 (0,54 – 2,37)	1,84 (1,29 – 3,02)	1,62 (0,65 – 2,49)	1,26 (0,91 – 4,55)	0,94 (0,63 – 1,34)
Não (n=38)	1,145 (0,09 – 7,89)	1,60 (0,32 – 6,60)	1,98 (0,15 – 4,22)	1,21 (0,18 – 15,3)	0,56 (0,095 – 3,57)
	($p=0,722$)	($p=0,123$)	($p=0,966$)	($p=0,765$)	($p=0,031$)

	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>
	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)	Mediana (mín-máx)
Status					
Vivo (n=22)	1,09 (0,09 – 7,89)	1,675 (0,39 – 6,60)	2,52 (0,15 – 4,22)	1,37 (0,18 – 15,3)	0,60 (0,095 – 2,53)
Óbito ou Recidiva (n=21)	1,52 (0,12 – 3,26)	1,3 (0,32 – 3,02)	1,35 (0,19 – 2,86)	1,2 (0,28 – 4,55)	0,80 (0,10 – 3,57)
	(<i>p</i> =0,216)	(<i>p</i> =0,258)	(<i>p</i>=0,045)	(<i>p</i> =0,306)	(<i>p</i> =0,509)

A soma final dos grupos em que os pacientes foram subdivididos para essa característica clínica não corresponde ao número total em consequência da indisponibilidade de dados clínicos de alguns pacientes. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney.

4.4 Sobrevida livre de eventos desfavoráveis em cinco anos de acordo com a expressão dos genes estudados

Foi realizada a análise da sobrevida livre de eventos desfavoráveis (recidiva ou óbito) em cinco anos dos pacientes, utilizando-se a mediana de expressão dos genes analisados como ponto de referência para hipo ou hiperexpressão, e utilizando o teste de Kaplan-Meier (Figura 12). Não foram encontradas diferenças significativas entre valores de expressão acima e abaixo da mediana para os genes estudados (Tabela 8).

Tabela 8. Sobrevida livre de eventos em cinco anos para os genes analisados, tendo como referência a mediana de expressão no grupo total de pacientes. Valor p significativo $p \leq 0,05$.

Genes estudados	Sobrevida livre de eventos 5 anos (%)	<i>P</i>
TET1 $\leq$ mediana	62,25 $\pm$ 9,65	0,950
> mediana	71,72 $\pm$ 9,0	
TET2 $\leq$ mediana	57,5 $\pm$ 11,0	0,296
> mediana	77,2 $\pm$ 13,1	
TET3 $\leq$ mediana	56,431 $\pm$ 10,4	0,370
> mediana	76,2 $\pm$ 13,3	
IDH1 $\leq$ mediana	60,01 $\pm$ 9,7	0,797
> mediana	72,1 $\pm$ 13,01	
IDH2 $\leq$ mediana	71,5 $\pm$ 11,2	0,288
> mediana	58,2 $\pm$ 12,0	

Figura 12. Curvas de sobrevida pelo tempo em meses, relacionadas à mediana da expressão relativa dos genes *TET1* (A), *TET2* (B), *TET3* (C), *IDH1* (D) e *IDH2* (E).

4.5 Sequenciamento do éxon 4 de *IDH1* e do éxon 4 de *IDH2* em amostras e linhagens celulares de meduloblastoma

Para as análises do sequenciamento dos genes *IDHs*, utilizou-se o *software Geneious 8.0*, a Figura 13 apresenta a sequência de uma das amostras analisadas. Não foram encontradas mutações no éxon 4 de *IDH1* e no éxon 4 de *IDH2* em 12 amostras de meduloblastomas, linhagens celulares de MB (DAOY, ONS-76, UW402 e UW473) e dois cerebelos não-neoplásicos estudados.

Figura 13. Alinhamento da sequência obtida na amostra C2 com relação ao éxon 4 do gene de referência *IDH2*.

4.6 Níveis de hidroximetilação global

Para avaliação dos níveis de hidroximetilação global foram utilizadas duas técnicas diferentes: *dot-blot* e imuno-histoquímica, ambas baseadas na ligação do anticorpo anti-5-hmC. O *dot-blot* foi utilizado em DNAs extraídos de 12 amostras de MB, oito amostras de cerebelos não-neoplásicos e nas quatro linhagens celulares de meduloblastoma (DAOY, ONS-76, UW402 e UW473). A reação de imuno-histoquímica foi realizada em 31 amostras de meduloblastoma e quatro de cerebelos não-fetais, fixadas em formalina 10% tamponada e processada em parafina. O *dot-blot* nos permite fazer uma análise relativa dos níveis de hidroximetilação global no DNA, enquanto que com imuno-histoquímica é possível estimar o número de células 5-hmC positivas em cada amostra, e foi utilizada para confirmar os resultados do *dot-blot*.

4.6.1 Níveis de hidroximetilação global avaliados por *dot-blot*

Os *dot-blots* foram analisados com auxílio do software *Image J*, a quantificação dos níveis de hidroximetilação foi relativa ao cerebelo controle 2, considerado controle positivo por apresentar níveis elevados de hidroximetilação, e, portanto, foi aplicado em todas as membranas. As Figuras 14 A, B e C apresentam as amostras de MB, cerebelos controle e linhagens celulares respectivamente.

Foi possível observar um aumento nos níveis de hidroximetilação em cerebelos não-neoplásicos, conforme a idade dos pacientes. As amostras de meduloblastoma apresentaram níveis de hidroximetilação global de $32 \pm 11\%$, significativamente diminuídos ($p=0,001$) em relação aos níveis de hidroximetilação dos cerebelos controle ($82 \pm 25\%$). As linhagens celulares também apresentaram diminuição significativa nos níveis de hidroximetilação quando comparadas aos cerebelos não-neoplásicos, com uma média de $26 \pm 20\%$ (Figura 15).

Figura 14. Membranas de *dot-blot* para estudo de hidroximetilação. DNAs em concentrações de 100, 50 e 25 ng/μL.. **(A)** Níveis de hidroximetilação em amostras de MB e dois cerebelos não-neoplásicos. **(B)** Níveis de hidroximetilação em cerebelos não-neoplásicos de pacientes de idades diferentes. **(C)** Níveis de hidroximetilação em cerebelos controle e linhagens celulares de meduloblastoma (DAOY, ONS-76, UW402 e UW473), DNA em concentração de 100 ng/μL.

Figura 15. Porcentagem relativa de hidroximetilação em cerebelos controle (CC), amostras de pacientes de meduloblastoma (MB) e linhagens celulares de MB (LC). O * simboliza comparações onde $p < 0,05$. FC = fold change.

Houve uma correlação positiva entre os níveis relativos de hidroximetilação global avaliados por *dot-blot* e a expressão do gene *TET1* ($R=0,5$; $p=0,03$), mas não com a expressão dos genes *TET2*, *TET3*, *IDH1* ou *IDH2*. Os níveis de hidroximetilação foram relacionados às características clínicas dos pacientes, e não houve associação entre níveis de hidroximetilação e idade ($p= 0,99$); gênero ($p= 0,917$), recidiva ($p=0,670$), metástase ($p=0,117$), grau de ressecção ($p= 0,07$) ou status da doença ($p= 0,67$).

A mediana dos níveis globais de hidroximetilação foi utilizada como ponto de referência para hipo ou hiperhidroximetilação das amostras na análise de sobrevida livre de eventos em 5 anos dos pacientes, o cálculo foi realizado utilizando o teste de Kaplan-Meier. Não foram encontradas diferenças significativas entre valores de hidroximetilação acima e abaixo da mediana ($p=0,398$), a falta de associação entre sobrevida, dados clínicos e níveis de hidroximetilação pode ser justificada pelo número reduzido de amostras ($n=12$) utilizado neste estudo (Figura 16).

Figura 16. Curva de sobrevivência pelo tempo em meses relacionado à mediana dos níveis relativos de hidroximetilação.

4.6.2 Níveis de hidroximetilação global avaliados por imuno-histoquímica

As células positivas e negativas para o anticorpo anti-5-hmC foram contadas e foi calculada a porcentagem de células marcadas, com auxílio do software *Image J*. A Figura 17 ilustra a diversidade de marcação para 5-hmC encontrada nas amostras de meduloblastoma, onde há amostras com poucas células positivas (Figura 17A); amostras com moderada quantidade de células positivas (Figura 17B); e amostras com alta porcentagem de células marcadas (Figura 17C).

Figura 17. Variação na intensidade de marcação. (A). Amostra com poucas células 5-hmC positivas. (B). Amostra com quantidade moderadas de células 5-hmC positivas. (C). Amostra com alta porcentagem de células 5-hmC positivas.

Cerebelos não-fetais foram utilizados como controle positivo, as células cerebelares são descritas na literatura como altamente hidroximetiladas (Figura 18). Células de Purkinje, células da camada molecular e da camada granular

apresentaram forte imunoexpressão nuclear de 5-hmC. As células da camada granular foram utilizadas para comparação com as células de meduloblastoma, devido a sua origem embrionária neura ectodérmica e elevada celularidade.

A porcentagem de células tumorais positivas nos meduloblastomas ($72,21 \pm 11,9\%$, $n=31$) para anti-5-hmC foi significativamente menor ($p=0,013$) que a porcentagem de células positivas para anti-5-hmC da camada granular dos cerebelos do grupo controle ($82 \pm 25\%$, $n=4$); (Figura 19).

A amostra MB52 apresenta o tecido cerebelar pareado, no qual é possível visualizar altos níveis de 5-hmC (Figura 20A), enquanto regiões de meduloblastoma exibem heterogeneidade de marcação com regiões altamente marcadas (Figura 20B); ao lado de regiões com baixa intensidade de marcação e poucas células positivas (Figura 20C).

Figura 18. Cerebelo Controle 10. (A). Coloração HE, camada molecular e camada granulosa. Célula de Purkinje na ponta da seta vermelha. (B). Marcação com anticorpo 5-hmC, camada molecular e camada granulosa. Célula de Purkinje marcada na ponta da seta vermelha. (C). Coloração HE, camada granulosa do cerebelo. (D). Marcação com anticorpo 5-hmC da camada granulosa.

Figura 19. Quantificação da imunomarcção. A. Porcentagem de células positivas para o anticorpo 5-hmC em meduloblastoma (MB), e Cerebelo Controle (CC); fold change de 1,19x ($p = 0,013$).

Figura 20. Amostra MB 52. (A). Tecido cerebelar não-neoplásico, altamente marcado com 5-hmC; (B). Região do meduloblastoma com altos níveis de 5-hmC; (C). Região do meduloblastoma com poucas células 5-hmC positivas.

A porcentagem de células marcadas com anticorpo anti-5-hmC foi relacionada às características clínicas disponíveis dos pacientes, no entanto, não houveram associação com idade dos pacientes ($p=0,823$); sexo ($p=0,937$), presença de metástase ($p=0,905$); ou eventos desfavoráveis (óbito ou recidiva; $p=0,767$) (Tabela 9). Também não foram encontradas associações com sobrevida, sendo o tempo livre de eventos abaixo da mediana de 68 meses e acima da mediana de 81 meses ($p=0,561$) (Figura 21).

Foi possível realizar a correlação com expressão gênica em 12 amostras em parafina que também apresentavam RNA. A porcentagem de células 5-hmC positiva está correlacionada com a expressão do gene *IDH1* ($R=0,69$; $p=0,02$), mas não com os genes *TET1*, *TET2*, *TET3* e *IDH2*.

Tabela 9. Associação entre porcentagem de células 5-hidroximetilcitosina positivas e as características clínicas: idade, gênero, metástase e status; valor de p significativo $p < 0,05$.

% Células 5-hmC positivas Mediana (mín-máx)	
Idade	
< 3 anos (n=1)	70
≥ 3 anos (n=30)	72 (46 – 95)
	($p=0,823$)
Gênero	
Feminino (n=15)	72 (51 – 95)
Masculino (n=26)	71 (46 – 87)
	($p=0,937$)
Metástase	
Sim (n=16)	71 (54 – 95)
Não (n=15)	71 (46 – 87)
	($p=0,905$)
Status	
Vivo (n=16)*	70 (51 – 87)
Evento (n=15)**	74 (46 – 95)
	($p=0,767$)

O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney

* Vivo = sobrevida livre de eventos

**Evento = óbito ou recidiva

Figura 21. Curva de sobrevida pelo tempo em meses relacionado à mediana dos níveis relativos de hidroximetilação analisados por imunohistoquímica

4.7 Níveis de metilação e hidroximetilação nos genes *PTCH1*, *sFPR1*, *DLL1*, *DKK3*, *BMP2* e *TIMP3*

Os níveis de metilação e hidroximetilação na região promotora dos genes *PTCH1*, *sFPR1*, *DLL1*, *DKK3*, *BMP2* e *TIMP3* foram avaliados. No entanto, as regiões estudadas nesses genes não apresentaram níveis detectáveis de 5-hmC, pois apresentaram Ct indeterminados, ou seja, na ausência de fragmentos 5-hmC, não houve pareamento dos *primers* e o material não foi amplificado. Já a quantificação dos resíduos de 5-mC que foram enriquecidos nessas regiões, foi possível de ser realizada.

Para o gene *PTCH1*, as amostras de MB apresentaram um enriquecimento para 5-mC relativo ao Input de 27, estatisticamente maior em comparação com os cerebelos controle, que apresentaram um enriquecimento de 1,44, ($p=0,011$), *fold change* de 18,9 vezes. O enriquecimento também está aumentado nas linhagens celulares (104) em relação aos cerebelos controle, ($p=0,021$) *fold change* de 105 vezes (Figura 22A).

O enriquecimento de resíduos 5-mC na região promotora do gene *sFPR1* em amostras de MB foi de 15,2; enquanto que das linhagens celulares foi de 74,5; esses valores não foram estatisticamente diferentes dos cerebelos não-neoplásicos, p igual a 0,77 e 0,225, respectivamente (Figura 22B). A região promotora de *DLL1* apresentou um enriquecimento relativo de 5-mC de 2,19; não diferindo dos cerebelos, 1,59 ($p=0,99$). A média das linhagens celulares foi de 2,61, e também não apresentou diferença com relação aos cerebelos controle ($p=0,564$) (Figura 22C). As amostras de MB e linhagens celulares apresentaram enriquecimento na região promotora de *BPM2* de 1,53 e 1,54, respectivamente; não apresentando diferença estatística com relação aos cerebelos controle, (valores de p igual a 0,808; 0,773, nesta ordem), a média de enriquecimento dos cerebelos foi de 1,57 (Figura 22D).

Em amostras de MB, a região promotora do gene *DKK3* apresentou um enriquecimento 5-mC de 11,84; estatisticamente maior ($p=0,015$, *fold change* 4,87) que os cerebelos (2,43). As linhagens celulares também apresentaram uma média de enriquecimento significativamente superior aos cerebelos, 21,08 ($p=0,043$, *fold change* 8,67) (Figura 22E). O enriquecimento de 5-mC apresentou correlação negativa com a expressão desse gene nas amostras de MB ($R=-0,608$; $p=0,036$).

Para o gene *TIMP3*, as amostras de MB apresentaram enriquecimento de 5-mC de 2,39, não apresentando diferença estatística em relação aos cerebelos

controle, que apresentaram 14,9 ($p = 2,75$). As linhagens celulares apresentaram 21,78, e também não diferiram em comparação com os cerebelos controle, ($p = 0,248$) (Figura 22F).

Figura 22. Enriquecimento *Methylcollector* em relação ao INPUT dos genes (A) *PTCH1*; (B) *sFRP1*; (C) *DLL1*; (D) *BMP2*; (E) *DKK3*; (F) *TIMP3* em cerebelos controle (CC); meduloblastoma (MB) e linhagens celulares (LC). * $p < 0,05$; FC = fold change.

4.8 Efeitos funcionais e epigenéticos do tratamento com ácido ascórbico

Com o objetivo de acentuar a atividade das enzimas TETs e aumentar os níveis de hidroximetilação, as linhagens celulares de meduloblastoma foram tratadas com ácido ascórbico, e assim verificar os efeitos funcionais desses mecanismos epigenéticos em meduloblastoma. Primeiramente foi realizado o ensaio de proliferação para definir doses adequadas para os demais experimentos, seguido de clonogênica e avaliação de expressão gênica dos genes *TET1* e *TET3* e níveis globais de hidroximetilação.

4.8.1 Proliferação das linhagens celulares de meduloblastoma após tratamento com ácido ascórbico

Primeiramente, as linhagens celulares ONS-76, DAOY, UW473 e UW402 foram tratadas com as doses de 0,1; 1; 10; 100 e 1000 μ M de ácido ascórbico por 4, 8, 16, 24 e 48 horas. No entanto, não foram observadas diferenças nas taxas proliferativas nas doses e tempos estudados (Figura 23 A-D). Além disso, a linhagem UW473 apresentou um aumento significativo na proliferação ao ser tratada com uma concentração de 1000 μ M por 24 horas, mas esse resultado não foi observado no tempo de 48 horas (Figura 23C).

Doses maiores de ácido ascórbico (5, 8 e 10 mM) também foram testadas nos tempos de uma hora, 24 e 48 horas. A linhagem ONS-76 apresentou um aumento nas taxas proliferativas com a dose de 10 mM por uma hora e 24 horas, mas não se manteve no tempo 48 horas (Figura 24A). Enquanto que a linhagem DAOY apresentou uma diminuição significativa na taxa de proliferação na dose de 10mM com uma hora de tratamento, que não foi observada nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 24B).

Foi demonstrado um aumento proliferativo na linhagem UW473 com o tratamento de 10 mM de ácido ascórbico no tempo de uma hora e 24 horas. No entanto, essa linhagem apresentou uma diminuição na taxa de proliferação no tempo de 48 horas para maiores doses testadas (Figura 24C). A linhagem UW402 apresentou um aumento proliferativo ao ser tratadas com as doses de 8 e 10 mM nos tempos de uma hora e 24 horas, no entanto, houve uma diminuição na taxa de proliferação para essas mesmas doses e para dose de 5mM no tempo de 48 horas (Figura 24D).

Figura 23. Taxa de proliferação das linhagens celulares por resazurina. A. ONS-76; B. DAOY; C. UW473; D. UW402 mediante o tratamento com ácido ascórbico nas menores doses (0,1 – 1000 µM), nos tempos de 4, 8, 16, 24 e 48 horas (hs). As barras representam a média dos resultados dos experimentos realizados comparados ao controle, com seus respectivos desvios padrão. *p<0,05.

Figura 24. Taxa de proliferação das linhagens celulares por resazurina. A. ONS-76; B. DAOY; C. UW473; D. UW402 mediante o tratamento com ácido ascórbico nas maiores doses (5 – 10 mM), nos tempos de 1, 8, 16, 24 e 48 horas (hs). As barras representam a média dos resultados dos experimentos realizados comparados ao controle, com seus respectivos desvios padrão. *p<0,05.

4.8.2 Clonogenicidade das linhagens celulares de meduloblastoma tratadas com ácido ascórbico

Para o ensaio clonogênico foram utilizadas as doses de 5 e 10 mM de ácido ascórbico pelo tempo de uma hora. As linhagens ONS-76 e DAOY não formaram colônias após o tratamento com a droga (Figura 25 A e B; Figura 26 A e B), a UW402 apresentou uma redução significativa após a concentração de 10mM de droga (Figura 27 A e B); enquanto que a UW473 não sofreu qualquer alteração em sua capacidade de formação de colônias (Figura 28 A e B).

Figura 25. Ensaio clonogênico da linhagem ONS-76 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora. A. Placas coradas com giemsa após 14 dias de incubação. B. Clonogenicidade relativa ao controle. CT= controle (não tratado).

Figura 26. Ensaio clonogênico da linhagem DAOY após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora. A. Placas coradas com giemsa após 14 dias de incubação. B. Clonogenicidade relativa ao controle. CT= controle (não tratado).

Figura 27. Ensaio clonogênico da linhagem UW473 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora. A. Placas coradas com giemsa após 14 dias de incubação. B. Clonogenicidade relativa ao controle. CT= controle (não tratado).

Figura 28. Ensaio clonogênico da linhagem UW402 após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 e 10 mM por uma hora. A. Placas coradas com giemsa após 14 dias de incubação. B. Clonogenicidade relativa ao controle. CT= controle (não tratado).

4.8.3 Expressão de *TET1* e *TET3* após tratamento com ácido ascórbico

O estudo de expressão gênica foi realizado para avaliar a influência do tratamento com ácido ascórbico na expressão dos genes *TET1* e *TET3* em linhagens celulares de meduloblastoma. Devido à qualidade do RNA extraído foi possível realizar apenas a comparação entre o controle não tratado e o tratamento com 5mM de ácido ascórbico após uma hora de tratamento. O gene *TET1* apresentou uma diminuição na expressão após o tratamento nas linhagens DAOY, ONS-76 e UW402, e um aumento na linhagem UW473 (Figura 29A).

A linhagem DAOY apresentou uma pequena diminuição na expressão do gene *TET3* após o tratamento com ácido ascórbico. No entanto, foi observado um aumento na expressão desse gene nas linhagens ONS-76, UW-473 e UW-402 (Figura 29B).

Figura 29. qPCR para avaliar a expressão gênica após o tratamento com ácido ascórbico na concentração de 5 mM por uma hora. A. Expressão do gene *TET1*; B. Expressão do gene *TET3*. CT= controle; ONS= ONS-76. A expressão foi relativizada ao controle de cada linhagem.

4.8.4 Níveis de hidroximetilação global com o tratamento com ácido ascórbico

A influência do ácido ascórbico nos níveis de hidroximetilação global foi estudada por meio da técnica de dot-blot. Foi possível observar que não houveram alterações nos níveis de 5-hmC nas linhagens celulares de meduloblastoma tratadas com essa droga, com exceção da linhagem UW402, que apresentou uma diminuição nos níveis de 5-hmC na dose de 10mM de ácido ascórbico (Figura 30).

Figura 30. Dot-blot para avaliar os níveis de 5-hmC após tratamento com ácido ascórbico. A. Membrana com DNAs extraídos das linhagens celulares após o tratamento com 5 e 10 mM de ácido ascórbico por uma hora. CT= controle; 100= 100 ng/μL de DNA; 50= 50 ng/μL de DNA; 25= 25 ng/μL de DNA. B. Quantificação dos blots realizadas com o programa Image-J, e relativa ao controle de cada linhagem celular. CT= controle.

DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

5.1 Níveis de hidroximetilação e expressão dos genes *TETs* e *IDHs* associados com características clínicas em MB

Modificações epigenéticas são igualmente importantes durante o desenvolvimento do cerebelo e a tumorigênese do MB, e a atuação da metilação do DNA já foi detalhada durante esses processos (HATTEN; ROSSEL, 2011). Wang e colaboradores (2012) descreveram a dinâmica da hidroximetilação durante o desenvolvimento cerebelar. Nossos resultados confirmaram essa descrição, sendo possível observar um aumento nos níveis globais de hidroximetilação em cerebelos não-neoplásicos conforme aumenta a idade dos pacientes.

Baseando-se no perfil embrionário do MB, nós pressupomos que esse tumor apresentaria níveis de hidroximetilação semelhantes aos cerebelos menos desenvolvidos. E formulamos a hipótese de que a redução nos níveis de 5-hmC seria consequência de uma disfunção na atividade das enzimas TETs, que catalisam a conversão de 5-mC a 5-hmC (TAHILIANI et al., 2009). A perda na expressão dessas proteínas tem como consequência o acúmulo de metilação em ilhas CpGs (WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2012). Em câncer de cólon foi descrito que promotores gênicos marcados com 5-hmC resistem à hipermetilação neoplásica (URIBE-LEWIS et al., 2015). A transformação maligna induz uma redução na expressão de *TET1*, e a diminuição nos níveis de 5-hmC, sendo fenômenos comuns em câncer (HAFFNER et al., 2011; KUDO et al., 2012; LIAN et al., 2012; LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; FRYCZ et al., 2014; DONG et al., 2015; FENG et al., 2015; MURATA et al., 2015).

Conforme suposto, demonstramos uma diminuição nos níveis de 5-hmC em MB por meio de duas técnicas diferentes (*dot-blot* e imuno-histoquímica). Resultados semelhantes foram descritos em outros tumores cerebrais (astrocitomas, glioblastomas, ependimomas e meningiomas) (JIN et al., 2011; ORR et al., 2012; KRAUS et al., 2015; CHEN et al., 2016); e em tecidos tumorais de diferentes origens (HAFFNER et al., 2011; KUDO et al., 2012; LIAN et al., 2012; LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; FRYCZ et al., 2014; DONG et al., 2015; FENG et al., 2015; MURATA et al., 2015; SHI et al., 2016). Além disso, observamos uma

heterogeneidade intratumoral na marcação de 5-hmC em MB, que também foi descrita em glioblastoma (KRAUS et al., 2015).

Por meio da técnica de microscopia confocal, evidenciou-se altos níveis de 5-hmC em linhagens de MB classificadas como SHH, UW228-3 e DAOY (RAMSAWHOOK et al., 2017); diferindo dos resultados encontrados em nosso trabalho, onde observamos baixos níveis de 5-hmC nas linhagens celulares estudadas (DAOY, ONS-76, UW402, UW473) e também em amostras de pacientes; independente do subgrupo molecular. Essa divergência pode ser explicada pela utilização de técnicas diferentes, e também pelo uso de controles distintos para as comparações. Enquanto utilizamos cerebelos não-neoplásicos, Ramsawhook e colaboradores (2017) fizeram comparações com a linhagem de câncer cervical HeLa.

Além da associação com hipermetilação de supressores tumorais (URIBE-LEWIS et al., 2015; CHEN et al., 2016; KAI et al., 2016); baixos níveis de 5-hmC também estão relacionados com aumento na frequência de mutações (CpG>T) em tumores cerebrais, incluindo o MB (TOMKOVA et al., 2016). Esse evento pode ser explicado pela atuação de 5-hmC na marcação de sítios que apresentam danos no DNA. Essa marca está co-localizada com proteínas de reparo, e relacionada à promoção da estabilidade genômica (KAFFER et al., 2016). Em conjunto, essas funções justificam a correlação/associação entre a diminuição nos níveis de hidroximetilação globais com progressão do câncer e pior sobrevida dos pacientes; elucidadas através de uma meta-análise que incluiu dez estudos e 1736 amostras (CHEN et al., 2017).

No entanto, em MB não foram encontradas associações entre os níveis de hidroximetilação e características clínicas e/ou sobrevida dos pacientes. Esse resultado poderia ser explicado pelo número amostral reduzido disponível para o estudo; e é divergente de descrições em outros tumores, nos quais níveis reduzidos de 5-hmC estão associados com pior prognóstico e redução na média de sobrevida, podendo inclusive serem utilizados como biomarcador (LIAN et al., 2012; ORR et al., 2012; LIU et al., 2014; DONG et al., 2015; MURATA et al., 2015; SHI et al., 2016; TSAI et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Em gliomas, carcinoma hepatocelular e melanoma, a diminuição nos níveis de hidroximetilação também está relacionada com diversas características clínico patológicas dos pacientes como idade, graus histopatológicos, status da doença e

tamanho do tumor (LIAN et al., 2012; LIU et al., 2013; UCHIYAMA et al., 2014; SALDANHA et al., 2016; SHI et al., 2016).

Em MB, observamos que os níveis de hidroximetilação avaliados por *dot-blot* estão correlacionados com a expressão do gene *TET1*, essa correlação também foi encontrada em câncer de mama, fígado e gástrico (LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; FRYCZ et al., 2014). Estudos de expressão proteica de *TET1* em glioma e câncer de mama demonstraram que a redução de 5-hmC é mais significativa em amostras que apresentaram a expressão citoplasmática ou não expressaram *TET1* (MULLER et al., 2012; TSAI et al., 2015).

Uma correlação diferente foi encontrada por meio da IHQ em MB, onde a porcentagem de células positivas anti-5-hmC está correlacionada positivamente com a expressão do gene *IDH1*. No entanto, em MB não foram encontradas correlações entre a expressão dos genes *TET1*, *TET2*, *TET3* e *IDH2* e os níveis de 5-hmC avaliados por IHQ; assim como em leucemia mielóide aguda (LMA) (KROEZE et al., 2014). Em LMA, a perda da atividade catalítica de *TET2* está correlacionada com baixos níveis de 5-hmC (KROEZE et al., 2014). Carcinomas de células escamosas da boca e do esôfago apresentaram uma diminuição na expressão da enzima *TET2*, positivamente correlacionada com uma diminuição em 5-hmC (JAWERT et al., 2013; MURATA et al., 2015).

Reduções nos níveis de expressão dos genes *IDH2*, *TET1*, *TET2* e *TET3*, foram observadas em melanoma, mas não do gene *IDH1*. A expressão do gene *TET2* foi a mais drasticamente reduzida (LIAN et al., 2012). No subtipo mesenquimal agressivo de glioblastoma, a expressão dos três genes *TETs* está igualmente reduzida (ORR et al., 2012). Em câncer gástrico, os níveis de transcritos e proteicos de *TET1* também estão diminuídos quando comparados ao tecido normal, mas não foram encontradas diferenças com relação a *TET2* (YANG et al., 2013). Enquanto que em carcinoma de células escamosas do esôfago, apenas *TET2* apresentou redução na expressão, os níveis de *TET3* estão aumentados, e *TET1* não apresentou alterações (MURATA et al., 2015).

As linhagens celulares de MB apresentaram diminuição significativa na expressão dos genes *TETs* e *IDHs* quando comparada com cerebelos fetais e não-fetais. Ramsawhook e colaboradores (2017) descreveram níveis elevados de *TET1* em duas linhagens de meduloblastoma, e não detectaram diferenças na expressão

de *TET2* e *TET3*, divergindo dos nossos resultados, no entanto, a expressão foi relativizada à linhagem celular HeLa.

Amostras de MB apresentaram um perfil semelhante de expressão para os genes estudados (*TET1*, *TET2*, *TET3*, *IDH1* e *IDH2*) em comparações com os controles; ou seja, diminuição em comparação com cerebelos fetais, e ausência de diferenças significativas em relação aos cerebelos não-fetais. Em virtude do perfil embrionário desse tumor, esperava-se encontrar uma expressão gênica semelhante entre amostras de MB e cerebelos fetais, e diminuição na expressão quando comparadas com cerebelos não-fetais, que seriam a “contrapartida” normal para amostras de MB; pois esse tumor apresenta uma distribuição bimodal entre três e quatro anos ou oito e nove anos de idade.

A explicação para a alta expressão do gene *TET1* em amostras de cerebelos fetais poderia se basear na presença da recente descoberta isoforma *TET1*^{ALT}, que não apresenta o domínio CXXC, mas retém o domínio catalítico. As sondas *TaqMan* utilizadas em nosso trabalho são específicas para a região catalítica, presente em ambas as isoformas *TET1*^{ALT} e *TET1*^{FULL} (*Full Length* ou forma completa), portanto não as distingue. No entanto, essas isoformas são diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento do cerebelo em camundongos. *TET1*^{ALT} e *TET1*^{FULL} estão expressas em embriões, há uma diminuição da expressão de *TET1*^{FULL} em recém-nascidos; e uma pequena expressão de *TET1*^{ALT} é mantida em adultos (GOOD et al., 2017). Assim, podemos supor que os cerebelos fetais estão expressando ambas as isoformas.

Uma vez que os subgrupos moleculares de MB apresentam características genéticas, clínicas e demográficas distintas; podendo ser considerados como quatro doenças diferentes (NORTHCOTT et al., 2011; NORTHCOTT et al., 2012; TAYLOR et al., 2012); associamos a expressão dos genes *TETs* e *IDHs* com os subgrupos moleculares de MB.

A classificação permitiu verificar uma diminuição na expressão do gene *TET1* em amostras de MB WNT quando comparadas com cerebelos não-fetais. Enquanto que, o subgrupo SHH apresentou uma diminuição na expressão do gene *TET3* em comparação com cerebelos não-fetais. A expressão relativa do gene *IDH1* está diminuída nos subgrupos SHH, WNT e grupo 4. A hipoexpressão de *IDH1* pode contribuir para uma menor atividade das enzimas *TETs*, pois esse gene é responsável pela produção do cofator necessário para ação catalítica dessas

enzimas (XU et al., 2004), explicando a diminuição nos níveis de 5-hmC presente nesses subgrupos.

A hipoeexpressão de *TET1* no subgrupo WNT pode estar relacionada a ativação dessa via, uma vez que a enzima TET1 já foi descrita como supressora da via WNT em câncer de cólon. Foi demonstrado que a indução da expressão de *TET1* aumenta os níveis de expressão de *DKK* e *SFRPs*, inibidores *upstream* da via WNT, e consequentemente reduz os níveis nucleares de β -catenina. A enzima TET1 age provocando a redução de 5-mC e a elevação de 5-hmC na região promotora dos genes *DKK3* e *DKK4*, e assim aumenta a expressão desses genes (NERI et al., 2014).

No entanto, em amostras de MB, não foram verificados níveis detectáveis de 5-hmC na região promotora de *DKK3* com a técnica utilizada. Também não foram observadas correlações entre a expressão dos genes *TET1* e *DKK3*, apesar do gene *DKK3* apresentar níveis de expressão inversamente correlacionados aos níveis de metilação. A expressão do gene *TET1* foi positivamente correlacionada à expressão do gene *CTNNB1*, no entanto, como encontramos baixos níveis de *TET1* em amostras que expressam a via WNT, esperávamos a relação inversa entre esses dois genes.

A via WNT também pode ser modulada pelo gene *TET3*, ação determinante durante o desenvolvimento embrionário, pois a inibição de WNT é necessária para formação de estruturas neurais (LI et al., 2016). O gene *TET3* também atua na via SHH, no entanto, sua expressão está relacionada à ativação dessa via, uma vez que embriões deficientes em *Tet1/3* apresentaram a via SHH inibida. SHH requer modificações covalentes por colesterol para sua atividade, que estão hipoeexpressos em consequência da hipoeexpressão das *TETs* (KANG et al., 2015). No desenvolvimento neural e dos olhos de *Xenopus*, foi demonstrado que Tet3 se liga na região promotora de dois genes controladores da via SHH: *ptc-1* e *ptc-2*; e a expressão de genes reguladores é eliminada quando há diminuição na expressão de *Tet3* (XU et al., 2012). Diferente do esperado, nós demonstramos uma diminuição na expressão do gene *TET3* em amostras de MB SHH. Além das vias SHH e WNT, *TET3* interage com reguladores transcricionais e modificadores de cromatina durante a diferenciação neuronal, produzindo um contexto específico de hidroximetilação (PERERA et al., 2015).

Em MB, foi elucidada uma associação significativa entre expressão do gene *TET3* e status da doença; pacientes que foram a óbito (n=21) apresentaram uma menor expressão desse gene quando comparados com pacientes que sobreviveram (n=22). Em câncer de mama, altos níveis de *TET3* também foram associados ao melhor prognóstico, juntamente com *TET2*; mas não foram encontradas associações com outras características (YANG et al., 2015). A associação de *TET3* com o melhor prognóstico pode estar relacionada com sua atuação na inibição de células-tronco tumorais e tumorigênese, que se dá pela repressão do gene *TLX*, essencial para renovação de células-tronco, conforme demonstrado em glioblastoma (CUI et al., 2015); e também por meio da inibição da transição epitélio mesenquimal, por meio da repressão da via TGF- β , descrita em câncer ovariano (YE et al., 2016).

A expressão relativa dos genes *TET1* e *TET2* não foram associadas com as variáveis clínicas estudadas. Divergindo das associações encontradas em câncer gástrico, pois a expressão da proteína TET1 está relacionada às características clínicas como idade, gênero, localização e tamanho do tumor, invasão, metástase, grau histológico e óbito em consequência do tumor (FRYCZ et al., 2014). Em câncer de próstata, a expressão de *TET1* está negativamente associada com a progressão da metástase, essa relação foi evidenciada por meio do *knockdown* de *TET1* em modelo xenográfico de câncer de próstata, que diminuiu os níveis de 5-hmC, facilitou a migração e invasão das células, e aumentou a proliferação celular (HSU et al., 2012).

O gene *IDH2* apresentou uma média de expressão mais alta em pacientes que apresentaram metástase ao diagnóstico; o gene *IDH1* não apresentou associações com o prognóstico dos pacientes. Esse resultado diverge das associações em carcinoma hepatocelular, onde expressão de *IDH2* está relacionada ao melhor prognóstico dos pacientes (LIU et al., 2014). No entanto, a atuação de *IDH1* selvagem em glioblastoma pode explicar o resultado em MB, pois esse gene promoveu o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro* (CALVERT et al., 2017).

No trabalho aqui apresentado, não foram encontradas relações entre a expressão dos genes *TETs* e *IDHs* e a sobrevida dos pacientes portadores de MB; divergindo dos achados em glioblastoma, onde foi descrita uma associação entre níveis baixos de expressão de *TET1* e *TET3* e menor sobrevida dos pacientes (ORR et al., 2012). Em câncer de mama, a diminuição na expressão de *TET1* foi associada aos estágios avançados do tumor e menor sobrevida (HSU et al., 2012). Em MB, a

associação da expressão gênica com a classificação molecular poderia ajudar a entender a importância desses genes na clínica dos pacientes.

A relação entre diminuição da expressão dos genes *TETs* e pior prognóstico é explicada por ensaios *in vitro*, que evidenciaram que a redução de *TET1* aumenta a capacidade de invasão e migração das células em diversos tumores (HSU et al., 2012; KEY et al., 2016; ZHOU et al., 2017). Em câncer de mama e próstata, o papel de *TET1* na supressão da invasão está relacionado à sua atividade de inibição da metilação e ativação da expressão dos genes *TIMP2* e/ou *TIMP3*, inibidores de metaloproteinases de matriz (MMPs), proteínas reguladoras da invasão celular e da transição epitélio-mesenquimal (HSU et al., 2012). Em MB, foi demonstrado que a alta expressão de MMP está relacionada com menor sobrevida dos pacientes (OZEN et al., 2004); e nesse tumor a metilação de *TIMP3* é frequente (MUHLISCH et al., 2007).

Assim, podemos supor que apesar da expressão dos genes *TETs* não se relacionarem à sobrevida dos pacientes em MB, esses genes podem atuar controlando alvos que apresentam valor prognóstico nesse tumor, e em vias que são importantes para a tumorigênese.

No entanto, no presente trabalho, não foram encontrados níveis detectáveis de 5-hmC na região promotora do gene *TIMP3* em MB; e não houve diferença na comparação entre os níveis de 5-mC entre cerebelos controle e amostras de pacientes ou linhagens celulares de MB, divergindo dos resultados encontrados por Muhlich e colaboradores (2007).

Com base nos resultados encontrados é possível observar que os níveis de hidroximetilação global estão diminuídos em MB. No entanto, a expressão dos genes *TETs* e *IDHs* apresentaram diminuição em MB apenas quando comparadas com cerebelos fetais. A classificação molecular demonstrou expressão específica desses genes dentro dos subgrupos em relação aos cerebelos não-fetais.

5.2 Investigação de mutação no éxon 4 de *IDH1* e *IDH2*

Outro mecanismo relacionado à redução dos níveis globais de hidroximetilação em câncer são as mutações no éxon 4 do gene *IDH1* e no éxon 4 do gene *IDH2*. As enzimas *IDH1* e *IDH2* são responsáveis pela redução de NADP a NADPH e pela descarboxilação oxidativa de isocitrato à alfa-cetoglutarato (α -KG). As

mutações mais comuns em tumores cerebrais afetam R132 de *IDH1* ou R140 e R172 de *IDH2*, apresentando como consequência a produção do oncometabólito 2-hidroxiglutarato (2HG), que interfere na atividade das enzimas TETs e contribui para transformação maligna. Em *IDH1/2*, as mutações são heterozigotas, ou seja, há a retenção de um alelo selvagem, demonstrando a necessidade da expressão dos genes *IDH1/2* para manutenção do metabolismo celular (XU et al., 2011; DANG et al., 2009; WARD et al., 2010).

Mutações em *IDH1* e *IDH2* são frequentes em leucemia mieloide aguda (LMA) e estão associadas ao perfil de hipermetilação global do DNA e específica em promotores gênicos. Mutações *IDH1/2* em LMA são heterozigotas e mutuamente exclusivas com mutações em *TET2*. Níveis aumentados de 2HG induzidos pelas formas mutantes de *IDH* contribuem para transformação maligna por interferir no ciclo normal de metilação de demetilação do DNA através da inibição de enzimas dependentes de α -KG, como a *TET2* (FIGUEROA et al., 2010).

Ensaios *in vivo* demonstraram que a expressão constitutiva de *IDH1* mutante em células de medula óssea, em combinação com *HoxA9* induz doença proliferativa mieloide, acentua a proliferação celular por meio da repressão de inibidores de quinases dependentes de cíclicas e inibe a diferenciação celular. A inibição farmacológica de 2HG inibe células leucêmicas, assim o mutante *IDH* é um alvo terapêutico interessante em LMA (CHATURVEDI et al., 2013).

Assim como em LMA; a mutação em *IDH2* também é um evento frequente em osteossarcoma, (LIU et al., 2013). Além disso, Fathi e colaboradores (2014) descreveram a mutação *IDH1* em adenocarcinoma de mama. Enquanto que em melanoma, mutações nos genes *IDH1* ou *IDH2* apresentaram uma frequência de 10% (quatro mutantes em 49 casos analisados). Ensaios *in vivo* demonstraram que mutantes *IDH1* apresentam vantagens de crescimento e que essa mutação contribui para metástase, através do controle de genes relacionados à regulação transcricional do crescimento (SHIBATA et al., 2011).

Mutações em *IDH2* definem um subgrupo característico em pacientes com linfoma angioimunoblástico de células T; casos com essa mutação apresentam uma assinatura de expressão gênica caracterizada pela hipoexpressão de genes associados à diferenciação de células T_{H1} (exemplos: *STAT1* e *IFNG*), com recorrente hipermetilação de genes envolvidos com a linfomagenese (WANG et al., 2015).

Em glioblastomas, mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* são frequentes (YAN et al., 2010; BALSS et al., 2008); e recentemente foram incluídas na classificação desse tumor pela Organização Mundial da Saúde (LOUIS et al., 2016). Uma meta-análise realizada em estudos publicados elucidou que a mutação em *IDH1* está associada com melhora na sobrevida de pacientes portadores de glioblastoma (CHENG et al., 2013). A melhora no prognóstico pode ser explicada por um estudo *in vitro* realizado por Wang e colaboradores (2014) onde células de glioma, portadoras de mutação em *IDH1*, se tornaram mais sensíveis à quimioterapia e apresentaram taxas diminuídas de proliferação e de invasão.

Em MB, o éxon 4 de *IDH1* e o éxon 4 de *IDH2* foram sequenciados em 12 amostras e em quatro linhagens celulares, e não foram encontradas mutações. Por outro lado, um relato de caso verificou a presença da mutação em *IDH1*, CGT>AGT, pR132S, em um meduloblastoma proveniente de uma paciente adulta, o tumor foi classificado histologicamente como clássico, e molecularmente como pertencente ao grupo SHH (SNUDERL et al., 2014).

Yan e colaboradores (2010) sequenciaram 55 amostras de meduloblastoma e também não encontraram mutações nos genes *IDH1* ou *IDH2*, mas essas mutações foram frequentes em astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas. Balss e colaboradores (2008) estudaram o gene *IDH1* em 58 casos de meduloblastomas, e não foram verificadas mutações, mas outros tumores cerebrais apresentaram essa mutação. Assim, podemos concluir que apesar de as mutações nos éxon 4 de *IDH1* e *IDH2* serem comuns em tumores cerebrais, as mesmas não são eventos frequentes em MB.

5.3 Níveis de metilação e hidroximetilação em genes específicos relacionados às vias embrionárias relacionadas ao desenvolvimento do MB

As vias de sinalização importantes para a maturação do córtex cerebelar que estão desreguladas em MB incluem vias estimuladoras do crescimento como *Sonic hedgehog* (Shh), *Wingless* (Wnt), Notch, *insulin growth factor* (IGF)/*phosphatase and tensin homolog* (PTEN)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR), e vias que suprimem o crescimento como *Bone Morphogenic Protein* (Bmp) e *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Revisão em Hatten; Rossel, 2011). Genes controladores dessas vias foram descritos como regulados pelas enzimas TETs e/ou metilação e

hidroximetilação em diferentes tipos de tecidos (XU et al., 2013; KIM et al., 2014; NERI et al., 2014; TERRAGNI et al., 2014; KANG et al., 2015). Sendo assim, supomos que genes importantes nessas vias poderiam estar sendo regulados por 5-mC e 5-hmC também em MB.

Foram selecionados genes previamente descritos como controlados por metilação integrantes das vias WNT (*sFRP1* e *DKK3*); SHH (*PTCH1* e *BMP2*) e NOTCH (*DLL1*). No entanto, com a técnica utilizada, não foi possível detectar níveis de 5-hmC nesses genes. Xu e colaboradores (2012) também não obtiveram sucesso no estudo de níveis de 5-hmC gene-específicos utilizando o kit hMeDIP-Seq. Esses resultados podem ser consequência da limitação dessa técnica para detectar níveis baixos de 5-hmC na região promotora. Já a quantificação dos níveis de 5-mC foi realizada com sucesso nos genes propostos em MB, e comparados com cerebelos não-fetais.

Dentro da via WNT, foram estudados os genes inibidores *DKK3* e *SFRP1*. Os níveis de 5-mC na região promotora de *DKK3* foram maiores em amostras de MB e linhagens celulares do que em cerebelos controle (Fold Change de 4,87 e 8,67, respectivamente), e inversamente correlacionados com a expressão do gene, no entanto, não estão relacionados aos subgrupos. Duas amostras de MB apresentaram níveis de enriquecimento em relação ao INPUT maior do que 50, e a linhagem celular UW402 apresentou enriquecimento de 89. Os resultados encontrados diferem da descrição de Valdora e colaboradores (2013), que não encontraram metilação na região promotora de *DKK3* em MB, e descreveram que o silenciamento desse gene se dá por marcas repressivas de histonas.

O gene *sFRP1*, integrante da família *secreted frizzled related protein* (*sFRP1*, *sFRP2* e *sFRP3*), foi descrito como altamente expresso em cerebelo normal, e silenciado por metilação em MB, o que contribui para sinalização WNT excessiva na doença. A indução da expressão de *sFRP1* em modelo xenográfico de MB contribuiu para limitar o crescimento tumoral e prolongar a sobrevida do camundongo (KONGKHAM et al., 2010). No presente trabalho, foi levantada a hipótese que os níveis de 5-hmC estariam diminuídos na região promotora de *sFRP1* em amostras de MB quando comparadas com cerebelos não-neoplásicos. No entanto, não foram identificados níveis de 5-hmC mensuráveis pela técnica utilizada; e na literatura, não há descrições a respeito do controle da expressão de *sFRP1* por hidroximetilação.

Além disso, as amostras estudadas também não apresentaram diferenças no enriquecimento de 5-mC nessa região quando comparadas aos cerebelos controle.

Nossos resultados não estão em acordo com as descrições de Kongkham e colaboradores (2010) para o gene *sFRP1* em MB, o que pode ser explicado pela utilização de técnicas diferentes. No trabalho aqui apresentado, foi utilizada a técnica do kit Methylcollector Ultra, que se baseia na reação afinidade do complexo proteico MBD2/MBD3L1 pelo DNA metilado seguida por qPCR, e permite estudar uma área limitada na região promotora; enquanto que Kongkham e colaboradores (2010) utilizaram sequenciamento de bisulfito de sódio, que possibilita estudar a região de forma mais ampla, no entanto, não distingue 5-mC e 5-hmC.

Dentro da via SHH, avaliamos os níveis de 5-hmC e 5-mC na região promotora de *PTCH1* em MB. A inativação do regulador *PTCH1* em MB pode ocorrer por mutação (RAFFEL et al., 1997), ou por hipermetilação da região promotora (DIEDEA et al., 2010). Diferente do que esperávamos, a base 5-hmC não foi detectada em *PTCH1*. No entanto, com relação aos níveis de 5-mC, as amostras de MB apresentaram níveis de enriquecimento maiores do que os cerebelos controle (FC= 18,9x), assim como as linhagens celulares (FC=123,5x), confirmando os resultados de Diedea e colaboradores (2010).

Neste trabalho também foram avaliados os níveis de metilação e hidroximetilação na região promotora do gene *BMP2*, regulador negativo da via SHH (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2010). Não verificamos metilação diferencial entre MB e cerebelos controle nesse gene. Também não identificamos hidroximetilação nessa região. Resultados que diferem do esperado, pois o silenciamento do gene *BMP2* por hipermetilação da região promotora foi descrito em rabdomiosarcoma (WOLF; HAGL; KAPPLEN, 2014); e em câncer de mama, onde também está associado com resistência ao tratamento (DU et al., 2014).

Outra via desregulada em MB é a via de sinalização NOTCH (FIASCHETTI et al., 2014). Não observamos níveis de metilação diferencial nesse gene entre amostras de MB e linhagens celulares quando comparadas com cerebelos não-neoplásicos, e não encontramos 5-hmC na região promotora do gene *DLL1* em MB ou cerebelos. No entanto, em linhagens musculares esqueléticas e cardíacas, foi demonstrada a participação de metilação e hidroximetilação diferencial no controle de genes pertencentes à sinalização da via NOTCH, além de altos níveis de 5-hmC na região diferencialmente metilada de *NOTCH1* no músculo esquelético e cerebelo

(TERRAGNI et al., 2014). Além disso, os genes *NOTCH1* e *DLL1* apresentaram enriquecimento de 5-hmC no corpo gênico durante a diferenciação neuronal de células-tronco embrionárias (KIM et al., 2014).

Não foram encontrados níveis de 5-hmC nos genes *DKK3* e *sFRP1* (via WNT), *PTCH1* (via SHH), *BPM2* (regulador da via SHH) e *DLL1* (ligante de NOTCH), detectáveis pela técnica utilizada. No entanto, os genes *DKK3* e *PTCH1* apresentaram metilação diferencial entre MB e cerebelos não-neoplásicos. Assim, estudos mais aprofundados dessas regiões são necessários, com um número amostral maior e técnicas mais acuradas, para confirmar a importância dos níveis de hidroximetilação e metilação nesses genes.

5.4 Efeitos funcionais e epigenéticos do ácido ascórbico

Resultados do presente projeto mostraram uma relação entre expressão dos genes *TETs*, níveis de hidroximetilação e meduloblastoma. Diversos estudos demonstraram que a restauração dos níveis de 5-hmC inibe o crescimento tumoral e o potencial invasivo de tumores (LIAN et al., 2012; ZHOU et al., 2017). Assim, poderíamos propor uma estratégia terapêutica baseada na vitamina C como co-fator para enzima TET (THOMSOM; MEEHAM, 2016). A vitamina C ou ácido ascórbico é um micronutriente conhecido por sua atividade anti-escorbuto em humanos e apresenta função de co-fator para numerosas enzimas biossintéticas. Adicionalmente, esse composto também pode ser utilizado como antioxidante (PADAYATTI et al., 2003).

Na literatura foi relatada a atuação do ácido ascórbico na atividade de enzimas TETs (CHEN et al., 2013; DICKSON et al., 2013; MINOR et al., 2013; YIN et al., 2013; BLASCHKE et al., 2014; GUSTAFSON et al., 2015); e também seus efeitos antitumorigênicos (CHEN et al., 2005; DU et al., 2010; CIESLAK; CULLEN, 2015; GUSTAFSON et al., 2015). Portanto, esse composto foi utilizado com o objetivo de entender a importância funcional da atividade das TETs também em MB.

A atuação antineoplásica do ácido ascórbico em MB foi testada por meio dos ensaios de proliferação celular e clonogenicidade. Para as menores doses (0,1 - 1000µM), o composto não apresentou atividade antiproliferativa. E ainda, foi observado um aumento na proliferação de linhagens ONS-76, UW473, UW402 quando tratadas por 24 horas com a dose de 10mM.

Somente em altas doses (8 e 10 mM) e por um período de tempo maior (48 horas), foi possível averiguar uma diminuição significativa na taxa de proliferação para as linhagens UW402 e UW473. A linhagem DAOY tratada por uma hora com 10 mM de ácido ascórbico apresentou uma diminuição na proliferação, o que não se manteve nos tempos de 24 e 48 horas. No ensaio clonogênico, as linhagens DAOY e ONS-76 perderam a capacidade de formação de colônias após tratamento por uma hora com ácido ascórbico nas concentrações de 5 e 10 mM, enquanto que as linhagens UW473 e UW402 se mostraram mais resistentes.

Podemos concluir que apenas em altas doses, e num tempo prolongado de tratamento, o ácido ascórbico pode ter efeitos citotóxicos e inibidores de formação de colônias em MB, de maneira particular em cada linhagem celular. Em melanoma, assim como em nossos achados, baixas doses de vitamina C (0,05-0,1mM) também não afetaram a proliferação celular, foram necessárias concentrações de 0,5 a 2 mM para causar toxicidade nas células. No entanto, uma dose de 0,1 mM de vitamina C foi capaz de inibir a migração e o crescimento independente de ancoragem (GUSTAFSON et al., 2015). No câncer pancreático, o ácido ascórbico diminuiu a viabilidade celular em altas doses (5 e 10 mM), num tratamento de apenas uma hora. A clonogênica também diminuiu de maneira dose-dependente (DU et al., 2010), corroborando nossos resultados.

Esses efeitos poderiam ser explicados pela atuação do ácido ascórbico no aumento dos níveis de hidroximetilação, e consequentemente na atividade das enzimas TETs. No entanto esse aumento nos níveis de 5-hmC poderia não estar relacionado à expressão dos genes TETs, como demonstrado em cultura de fibroblasto embrionário (DICKSON et al., 2013; MINOR et al., 2013).

Em nosso estudo, a expressão dos genes *TETs* variou de acordo com as linhagens. Ocorreu um aumento de *TET1* e *TET3* na linhagem UW473 e um aumento de expressão de *TET3* na linhagem UW402; que poderia explicar a diminuição da capacidade proliferativa dessas duas linhagens em altas doses de ácido ascórbico. Entretanto, não foi observado aumento nos níveis de 5-hmC mediante o tratamento nas linhagens de MB, diferindo de resultados da literatura (GUSTAFSON et al., 2015).

Uma vez que a modulação dos níveis de 5-hmC é pelo ácido ascórbico ocorre rapidamente (tratamentos de uma hora); sugere-se que a síntese das proteínas TETs não é necessária, mas o acúmulo intracelular de ascorbato é suficiente para

acentuar a atividade das enzimas TETs (MINOR et al., 2013). Yin e colaboradores (2013) e também Blaschke e colaboradores (2014) propõem que o ácido ascórbico estaria agindo como um co-fator para as enzimas TETs.

As enzimas TETs são Fe^{2+} e oxoglutarato dependentes que convertem citosina metilada (5mC) em 5hmC e outros derivados oxidados (TAHILIANI et al., 2009). Hore e colaboradores (2016) comprovaram que o ácido ascórbico age na atividade catalítica das TETs não como um co-fator, mas através da reciclagem de ferro, reduzindo Fe^{3+} a Fe^{2+} , e explicando assim o aumento na atividade dessas enzimas e nos níveis de 5-hmC nas células tratadas com vitamina C.

Nossos achados nas linhagens DAOY e ONS-76 não explicaram a perda drástica na capacidade proliferativa dessas linhagens. Porém, o ácido ascórbico pode apresentar outros efeitos genéticos e epigenéticos, como demonstrado em melanoma, onde o tratamento com esse composto hiperexpressou 32 microRNAs envolvidos em supressão tumoral, inibiu DNA metiltransferases e histonas deacetilases (VENTURELLI et al., 2014).

Em câncer de colón, a vitamina C causou apoptose seletivamente em células *KRAS* e *BRAF* mutantes (YUN et al., 2015). O ácido ascórbico pode também agir como co-fator para hidrolases que suprimem HIF-1, atuando assim na supressão de hipóxia em linhagens celulares de carcinoma de pulmão, colorretal e melanoma (CAMPBELL et al., 2016). Sendo assim, os efeitos funcionais do ácido ascórbico nas linhagens de MB, apesar de não relacionados às alterações nos níveis de 5-hmC, podem estar associados à expressão do gene *TET3*, ou a outros mecanismos controlados por esse composto. No entanto, estudos direcionados para modulação específica dos genes *TETs* forneceriam uma compreensão melhor da importância desses genes em MB.

CONCLUSÃO

---

6 CONCLUSÃO

1. Foi observada diminuição na expressão dos genes *TETs* e *IDHs* em amostras de MB em comparação com cerebelos fetais, mas não em relação aos cerebelos não-fetais. As linhagens celulares de MB apresentaram expressão diminuída em comparação com os dois grupos controles. A classificação das amostras de MB permitiu verificar uma expressão subgrupo específica. Diminuição na expressão de *TET3* apresentou associação com status da doença; e maiores níveis de *IDH2* foram associados à metástase. No entanto, não foram encontradas outras relações entre expressão gênica e características clínicas ou sobrevida dos pacientes;
2. Não foram encontradas mutações no éxon 4 de *IDH1*, ou no éxon 4 de *IDH2* em MB.
3. Os níveis de hidroximetilação global estão diminuídos em amostras de MB e linhagens celulares em comparação aos cerebelos não-neoplásicos; porém não estão associados com características clínicas dos pacientes;
4. Não foram encontrados níveis de 5-hmC nos genes *DKK3* e *sFRP1* (via WNT), *PTCH1* (via SHH), *BPM2* (regulador da via SHH) e *DLL1* (ligante de NOTCH), detectáveis pela técnica utilizada. Os genes *DKK3* e *PTCH1* apresentaram metilação diferencial entre MB e cerebelos não-neoplásicos.
5. Os efeitos do ácido ascórbico em MB foram linhagens específicos, sendo significativos apenas em doses altas. Esse composto não atuou aumentando os níveis de 5-hmC, diferente do esperado, mas alterações na expressão do gene *TET3* ocorreram em decorrência do tratamento.

Em conclusão, níveis de hidroximetilação e expressão dos genes *TETs* e *IDHs* parecem ser importantes para o MB. No entanto, estudos funcionais direcionados à manipulação desses genes são necessários para elucidar suas funções nesse tumor.

REFERÊNCIAS

---

7 REFERÊNCIAS

ALVAREZ-RODRIGUEZ, R.; et al. Bone Morphogenetic protein 2 opposes Shh mediated proliferation in cerebellar granule through a TIEG-1 based regulation of Nmyc. **The Journal of Biological Chemistry**, 51, p. 37170-80, 2007.

AN, J.; RAO, A.; KO, M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, e323, 2017.

ANDRADE, A. F. et al The DNA methyltransferase inhibitor zebularine exerts antitumor effects and reveals BATF2 as a poor prognostic marker for childhood medulloblastoma **Investigational New Drugs**, v. 35, p.26-36, 2017.

AYRAULT, O; et al. Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. **Cancer Research**, v. 70, p. 5618–27, 2010.

BALSS, J.; et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol**, v.116, p.597–602, 2008.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genetics**, v.6, 168-74. 2000

BERTRAND, K.C.; et al. PCDH10 is a candidate tumour suppressor gene in medulloblastoma. *Childs Nerv Syst*, v.27, p.1243–9, 2011.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferase of mammals. **Human Molecular Genetics**, v.9, p.2395-402, 2000.

BLASCHKE, K.; et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation in ESCs to promote a blastocyst-like state. **Nature**, v.500(7461), p.222–226, 2014.

BLEEKER, F.E.; et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. **Human mutation**, v.30(1), p.7–11, 2009.

BOROWSKA, A.; JÓŹWIAK, J. Medulloblastoma: Molecular pathways and histopathological classification. **Archives of Medical Science**, v.12(3), p.659–666, 2016.

CALVERT, A. E.; et al. Cancer-Associated IDH1 Promotes Growth and Resistance to Targeted Therapies in the Absence of Mutation. **Cell Reports**, v. 19(9), p.1858–1873, 2017.

CAMPBELL, E. J.; et al. Pharmacokinetic and anti-cancer properties of high dose ascorbate in solid tumours of ascorbate-dependent mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 451–462, 2016.

CIESLAK, J.A.; CULLEN, J.J. Treatment of pancreatic cancer with pharmacological ascorbate. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16(9), p. 759-770, 2015.

CHAN, A.W.; et al. Adult medulloblastoma: prognostic factors and patterns of relapse. **Neurosurgery**, v.(47), p.623-631. 2000.

CHATURVEDI, A.; CRUZ, M. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. **Blood**, v.122(16), p.2877-2887. 2013.

CHEN, Q.; et al (2005). Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102(38), p.13604–13609, 2005.

CHEN, K.; et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. **Cell Research**, v.26(1), p.103–118, 2016.

CHEN, J.; et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. **Nature Genetics**, v.45(12), p.1504–1509, 2013.

CHEN, Z.; et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with cancer progression and poor survival: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v.8(1), p.1944–1952, 2017.

CHENG, HB; et al. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v.34(6), p.3555–9, 2013

CORTAZAR, D.; et al. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. **Nature**, v.470 (7334), p. 419–423, 2011.

CRAWFORD, J.R.; MACDONALD, T.J.; PACKER, R.J. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. **Neurology The Lancet**, v.(6), p.1073-1085, 2007

CUI, Q., et al. Downregulation of TLX induces TET3 expression and inhibits glioblastoma stem cell self-renewal and tumorigenesis. **Nature Communications**, v.7, p.10637, 2016.

DANG, L.; et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. **Nature**, v.462, p.739–744, 2009.

DICKSON, K.M.; et al. Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2013; v. 439(4), p.522–527.

DIEDEA, S.; et al. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p234-239, 2010.

DONG, Z.-R.; et al., Role of 5-hydroxymethylcytosine level in diagnosis and prognosis prediction of intrahepatic cholangiocarcinoma. **Tumor Biology**, v.4, p.2763-2771, 2014.

DU, M.; et al. Aberrant promoter methylation inhibits bone morphogenetic protein 2 expression and contributes to drug resistance in breast cancer. **Molecular Medicine Reports**, v.2, p.1051-1055, 2014.

ECKE, I.; et al. Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxyctidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice. **Cancer Research**, v.69(3), p.887–895, 2009.

ELLISON, D.W.; et al. Medulloblastoma, clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non SHH/WNT molecular subgroups. **Acta Neuropathologica**, v.121, p.381-396, 2011.

FATHI, A.; SADRZADEH, H.; COMANDER, A. Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1) Mutation in Breast Adenocarcinoma Is Associated With Elevated Levels of Serum and Urine 2-Hydroxyglutarate. **Oncologist**; v.19(6), p.602-607, 2014.

FEIERABEND, D.; et al. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification and its impact on clinical findings in medulloblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v.116(2), p.213–220, 2014.

FENG, J.; et al. TET1 mediated diferente transcriptional regulation in prostate cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.(8), p.203-211. 2015.

FIASCHETTI, G.; et al. NOTCH ligands JAG1 and JAG2 as critical pro-survival factor in childhood medulloblastoma. **Acta Neuropathologica Communications**, v.2, p.39. 2014.

FIGUEROA, M.E.; et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. **Cancer cell**, v.18(6), p.553–567, 2010.

FRYCZ, B.A.; et al. Decreased expression of ten-eleven translocation 1 protein is associated with some clinicopathological features in gastric cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.68(2), p.209–212. 2014.

GESSI, M.; et al. P53 expression predicts dismal outcome for medulloblastoma patients with metastatic disease. **Journal of Neuro-Oncology**, v.106(1), p.135–141, 2012.

GILBERTSON, R.J.; ELLISON, D.W. The origins of medulloblastoma subtypes. **Annual Review of Pathology**, v.3, p.341–365, 2008.

GIBSON, P., et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. **Nature**, v. 468(7327), p.1095–1099, 2011.

GOOD, C. R., et al. A novel isoform of TET1 that lacks a CXXC domain is overexpressed in cancer. **Nucleic Acids Research**, p. 1–13, 2017.

GUSTAFSON, C. B., et al. Epigenetic reprogramming of melanoma cells by vitamin C treatment. **Clinical Epigenetics**, v.7, p. 51, 2015.

HAFFNER, M.C.; et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. **Oncotarget**, 2011, v.2, p.627–637, 2011.

HAIG, D. The (dual) origin of epigenetics. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.69, p.67-70, 2004.

HALPERIN, E.C.; FRIEDMAN, H.S. Is there a correlation between duration of presenting symptoms and stage of medulloblastoma at the time of diagnosis? **Cancer**, v.8, p.874-880, 1996.

HATTEN, M.; ROUSSEL, M.F. Development and cancer of the cerebellum. **Cell Press**, v.34, p.134-142, 2011.

HE, Y.F., et al.,. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v.333(6047), p.1303–1307, 2011.

HORE, T. A., et al. Retinol and ascorbate drive erasure of epigenetic memory and enhance reprogramming to naïve pluripotency by complementary mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 2016086792016, 2016.

HOVESTADT, V., et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. **Nature**, v.510(7506), p.537–541, 2014.

HE, T.C.; et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science**, v.281, p.1509–1512, 1998.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.2571-2587, 2004.

HSU, C.-H., et al. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Cell Reports**, v.2(3), p.568–579, 2012.

HUANG, Y.; et al. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. **PLoS one**, v.5(1), p.e8888, 2010.

JAWERT, F.; HASSEUS, B. Loss of 5-Hydroxymethylcytosine and TET2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Research**, v.33, p.4325–4328. 2013.

JIN, S.J.; JIANG, Y.; QIU, R. 5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. **Cancer Research**, v.71(24), p.7360–7365, 2011.

JONES, D. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488, p.100-105, 2012.

KAFER, G. R.; et al. 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability **Cell Reports**, p. 1–10, 2016.

KAI, M.; et al. TET1 depletion induces aberrant CpG methylation in colorectal cancer cells. **PLoS ONE**, v. 11, p.12, 2016.

KANG, J., et al (2015). Simultaneous deletion of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet3 increases transcriptome variability in early embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112(31), p. E4236–E4245, 2015.

KENNEY, A.M.; COLE, M.D.; ROWITCH, D.H. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferating in developing cerebellar granule progenitor neuron precursors. **Development**, v.130, p.15-28. 2003.

KIM M, et al. Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage. **Human Molecular Genetics**, v.23, p.657- 67, 2014.

KO, M.; et al. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. **Immunological Reviews**, v.263(1), p.6–21, 2015.

KONGKHAM, P.N.; et al. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. **Oncogene**, v.29, p.3017-3024, 2010.

KOOL M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: na internacional meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3 and Group 4 medulloblastomas. **Acta Neuropathologica**, v.123, p.473-484, 2012.

KRAUS, T.F.J.; et al. (2012). Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), the “sixth base,” are associated with anaplasia in human brain tumors. **International Journal of Cancer**, v.7, p.1577–1590, 2012.

KRAUS, T.F.J; et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and intratumoral heterogeneity as an epigenetic hallmark of glioblastoma, **Tumor Biology**, v. 36, p. 11, 2015.

KUDO, Y.; et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. **Cancer Science**, v.103(4), p.670–676, 2012.

KROEZE, L. et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. **Blood**, v.124(7), p.1110-1118, 2014.

Li, X.; et al. Tet proteins influence the balance between neuroectodermal and mesodermal fate choice by inhibiting Wnt signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113(51), p.E8267–E8276, 2016.

LIAN CG, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. **Cell**, v.6, p.1135–1146, 2012.

LIN, C. Y.; et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. **Nature**, p.530, 2016.

LINDSEY, J.C.; et al. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. **Carcinogenesis**, v.5, p.661–668, 2004.

LINDSEY, J.C.; et al. Epigenetic deregulation of multiple S100 gene family members by differential hypomethylation and hypermethylation events in medulloblastoma. **British Journal of Cancer**, v.97, p.267–274, 2007.

LINDSEY, J. C.; et al. TERT promoter mutation and aberrant hypermethylation are associated with elevated expression in medulloblastoma and characterise the majority of non-infant SHH subgroup tumours. **Acta Neuropathologica**, v.127(2), p.307–309, 2014.

LIU, C.; et al. Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1. **PloS One**, v.8(5), p.e62828, 2013.

LIU, S.; et al. Quantitative assessment of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine in cellular and tissue DNA. **Nucleic Acids Research**, v.41(13), p.6421–6429, 2013.

LIU, X.; et al. Isocitrate dehydrogenase 2 mutation is a frequent event in osteosarcoma detected by a multi-specific monoclonal antibody MsMab-1. **Cancer Medicine**, v.2(6), p.803–14, 2013.

LIU, W.-R.; et al. High expression of 5-hydroxymethylcytosine and isocitrate dehydrogenase 2 is associated with favorable prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.33(1), p.32, 2014

LOUIS DN, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v.114, p.97-109, 2007.

LOUIS, D. N.; et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v.131(6), p.803–820, 2016.

MABBOT DJ, et al. Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors. **Neuropsychology**, v.22, p.159-68, 2008.

MASSIMINO, M.; et al. Childhood medulloblastoma. **Critical Reviews/Hematology**, v.105, p.35-51, 2016.

MARIAPPA, D.; PATHAK, S.; VAN AALTEN, D. M. F. A sweet TET-à-tête-synergy of TET proteins and O-GlcNAc transferase in transcription. **The EMBO Journal**, v.32(5), p.612–613, 2013.

MARTIROSIAN, V., et al. Medulloblastoma initiation and spread: Where neurodevelopment, microenvironment and cancer cross pathways. **Journal of Neuroscience Research**, p.1511–1519, 2016.

MURATA, A.; et al. TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma, **Oncotarget**, v.6, p. 23372-23382, 2015.

NAIR, V.S.; SONG, M.H.; OH, K.I. Vitamin C facilitates demethylation of the Foxp3 enhancer in a Tet-dependent manner. **The Journal of Immunology**, v.196(5), p.2119-31, 2016.

MINOR EA, COURT BL, JUAN I, et al. Acorbate induces Ten-eleven translocation (Tet) Methylcytosine Dioxigenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.13669-13674. 2013.

MORIN, P.J. Beta-catenin signaling and cancer. **Bioessays**, v.21, p.1021–1030, 1999.

MÜHLISCH, J.; et al. (2007). Frequent but borderline methylation of p16 (INK4a) and TIMP3 in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses. **Journal of Neuro-Oncology**, v.83(1), p.17–29, 2007.

MÜLLER T; et al. Nuclear exclusion of TET1 is associated with loss of 5-hydroxymethylcytosine in IDH1 wild-type gliomas. **The American Journal of Pathology**, v.181(2), p.675–683, 2012.

MURATA, A.; et al., Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.6, p.23372-23382, 2015.

MURUGAN AK, BOJDANI E, XING M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation in thyroid cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.3, p.555-559, 2010.

NAKAO, M. Epigenetics: interation of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v.278, p.25-31, 2001.

NERI, F.; et al. (2014). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. **Oncogene**, p.1–9, 2014.

NOFZIGER, D.; et al. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. **Development**, v.126, p.1689-702, 1999.

NORTHCOTT, P.A., et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, p.1408-1414, 2011.

NORTHCOTT, P.A.; et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. **Nature Reviews**, v.12, p.818-834, 2012.

ORR B, et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. **PloS One**, v.27, p.e41036, 2012.

OZEN, O.; et al. Expression of Metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.4746 – 4753, 2004.

PACKER, R.J., et al. Medulloblastoma: Clinical and biologic aspects. **Neuro Oncology**, v.1, p.232-250, 1999.

PACKER, R.J. Risk stratification of medulloblastoma: a paradigm for future childhood brain tumor management strategies. **Curr Neurol Neurosci**, v.11, p.124-126, 2010.

PADAYATTI, S.J.; et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. **The Journal of the American College of Nutrition**, v.22, p.18-35, 2003.

PATNAIK, M.M.; et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients. **Leukemia**. v.26(1), p.101–105, 2012.

PERERA, A., et al. TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression. **Cell Reports**, v.11(2), p.283–294, 2015.

PÓCZA, T.; et al. High expression of DNA methyltransferases in primary human medulloblastoma. **Folia Neuropathologica**, v. 2(1), p. 105–113, 2016.

PRITCHAN, J.; OLSON, J. Methylation of the Patched-1 gene in a panel of primary medulloblastomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.1, p.47-50, 2008.

RADTKE F, RAJ K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.756-767, 2003.

RAFFEL, C.; et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. **Cancer Research**, v.57, p.842-845, 1997.

RAMSAWHOOK, A.; et al. Medulloblastoma and ependymoma cells display increased levels of 5-carboxylcytosine and elevated TET1 expression. **Clinical Epigenetics**, 9(1), 18, 2017.

RAMASWAMY, V.; et al (2013). Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: An integrated clinical and molecular analysis. **The Lancet Oncology**, v.14(12), p.1200–1207, 2013.

ROBINSON, G.; et al. (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. **Nature**, v.488, p.43-48, 2012.

RODINI, C. O.; et al. Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.68(6), p.947–952, 2010.

ROGERS, H. a; et al. WNT/ β -catenin pathway activation in Myc immortalised cerebellar progenitor cells inhibits neuronal differentiation and generates tumours resembling medulloblastoma. **British Journal of Cancer**, 107(7), 1144–52, 2012.

Saldanha, G.; et al. 5-Hydroxymethylcytosine is an independent predictor of survival in malignant melanoma. **Modern Pathology**, v.30(1), p.60–68, 2017.

SCHWALBE, E.C.; et al (2013). DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. **Acta Neuropathologica**, v.125(3), p.359–371, 2013.

SHI, X.; et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an independent unfavorable prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, v. 11(4), p.1–12, 2016.

Shibata, T.; et al. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. **The American Journal of Pathology**, v.178(3), p.1395–402, 2011.

SMOLL, N.R.; DRUMMOND, K.J. The incidence of medulloblastomas and primitive tumours in adults and children. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.19, p1541–1544.

SNUDERL, M.; et al. (2014). Deep Sequencing Identifies IDH1 R132S Mutation in Adult Medulloblastoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v.32, p.1–5, 2014.

SOLECKI DJ, et al. Activated Notch2 signalling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursor by maintaining proliferation neuron. **Neuron**, v.4, p.557-568, 2001.

TAHILIANI, M.; et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v.324, p.930-935, 2009.

TAYLOR, M.D. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta Neuropathologica**, v.123, p.465-547, 2012.

TERRAGNI, J.; et al. Notch signaling genes: myogenic DNA hypomethylation and 5-hydroxymethylcytosine. **Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society**; v.9(6), p.842–50, 2014.

THOMSON, J. P.; MEEHAN, R. R. The application of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine studies in cancer research. **Epigenomics**, v.9(1), p.77–91, 2017.

TOMKOVA, M., et al. 5-hydroxymethylcytosine marks regions with reduced mutation frequency in human DNA. **eLife**, 2016.

TSAI, K.-W.; et al. Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype. **Breast Cancer Res Treat**, v.153, p219-234, 2015.

TSIVITSE S. Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v.6, p.268-281, 2010.

TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature**, v.398, p.422–426, 1999.

UCHIYAMA, R.; et al. 5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. **Journal of Dermatological Science**, v.73(2), p.161–3, 2014.

URIBES-LEWIS, S.; et al. 5-hydroxymethylcytosine marks promoters in colon that resist DNA hypermethylation in cancer. **Genome Biology**, v.16, p.69-84.

VALDORA, F.; et al. Epigenetic Silencing of DKK3 in Medulloblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.7429-7505, 2013.

VENTURELLI, S., et al. Epigenetic impacts of ascorbate on human metastatic melanoma cells. **Frontiers in Oncology**, v.4, p.227, 2014.

XU, P., et al. Differential expression of notch family members in astrocytomas and medulloblastomas. **Pathology and Oncology Research**, v.15(4), p.703–710, 2009.

XU Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell**, v.19, p.17-30, 2011.

XU, Y.; et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for xenopus eye and neural development. **Cell**, v.151(4), p.1200–1213, 2012.

YAN, H.; et al. *IDH1* and *IDH2* in gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.8, p.765–773, 2010.

YANG, H.; et al. Tumor development is associated with decreased of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. **Oncogene**, v.32, p.663-669, 2013.

YANG, Q.; et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is an independent poor prognostic factor in gastric cancer patients. **Journal of Biomedical Nanotechnology** v.9(9), p.1607–1616, 2013.

YANG, L.; et al. Reduced Expression of TET1, TET2, TET3 and TDG mRNAs Are Associated with Poor Prognosis of Patients with Early Breast Cancer. **Plos One**, v.10, p.7, 2015.

YE, Z.; et al. TET3 inhibits TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-30d precursor gene in ovarian cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.35, p.72, 2016.

YIN, R., et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. **Journal of the American Chemical Society**, v135(28), p.10396–403, 2013.

YUN, J.; et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. **Science**, v.350(6266), p.1391–1396, 2015.

WARD, P.S.; et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. **Cancer Cell**, v.17, p.225–234, 2010.

WANG, C.; et al. IDH^{R172} mutations define a inique subgroups of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Blood**, v.126, p. 1741-52, 2015.

WANG, T.; et al. Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopment genes in the developing human cerebellum. **Human Molecular Genetics**, v.21, p.5500-5510, 2012.

WANG, J.-B.; et al. IDH1 Overexpression Induced Chemotherapy Resistance and IDH1 Mutation Enhanced Chemotherapy Sensitivity in Glioma Cells in Vitro and in Vivo. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15(1), p.427–432, 2014.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **EMBO reports**, v.1, p.28–35, 2012.

WOLF S, HAGL B, KAPPLER R. Identification of BMP2 as an epigenetically silenced growth inhibitor in rhabdomyosarcoma. **Molecular Medicine Reports**, v.44, p.1727-1735, 2014.

WU J, et al. Wnt inhibitory factor-1 regulates glioblastoma cell cycle and proliferation. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.19, p.1428–1432, 2012.

ZHOU, Z., et al. Loss of TET1 facilitates DLD1 colon cancer cell migration via H3K27me3-mediated down-regulation of E-cadherin. **Journal of Cellular Physiology**, 2017.

ZHUKOVA, N.; et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. **Journal of Clinical Oncology** : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 31(23), 2927–2935, 2013

ANEXO

ANEXO

Aprovação do Comitê de ética

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

Ribeirão Preto, 28 de outubro de 2014

Ofício nº 4007/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14753/2014

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES TETs E NÍVEIS DE HIDROXIMETILAÇÃO EM MEDULOBLASTOMA” – Versão 1 de 08/10/2014**, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 1 de 08/10/2014; biorrepositório e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico Versão 1 de 08/10/2014.**

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

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

Ilustríssimos Senhores
KARINA BEZERRA SALOMÃO
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE
Depto. de Puericultura e Pediatria

APÊNDICE

APÊNDICE

Artigo científico submetido para revista “International Journal of Clinical Research”

Reduced hydroxymethylation characterizes medulloblastoma while TET and IDH genes are differentially expressed within molecular subgroups

Karina Bezerra Salomão^{1,2}; Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro^{1,2}; Daniel Antunes Moreno²; Lenisa Geron^{1,2}; Fernando Ramalho³; Luciano Neder Serafini³; Fabiano Pinto Saggioro³; Rosane Gomes de Paula Queiroz^{1,2}; Maria Sol Brassesco⁵; Simone dos Santos Aguiar⁶; José Andres Yunes⁶; Izilda Cardinalli⁶; Silvia Regina Brandalise⁶; Carlos Alberto Scrideli^{1,2}; Luiz Gonzaga Tone^{1,2}

¹Department of Pediatrics, ²Department of Genetics, ³Department of Pathology, ⁴*Ribeirão Preto School of Medicine*, ⁵*Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900, Bandeirantes Avenue, Post Code 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

⁶*Boldrini Center of Children, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.*

Address for correspondence:

Karina Bezerra Salomão

Department of Genetics

Ribeirão Preto School of Medicine

University of São Paulo - USP

3900, Bandeirantes Avenue, Post Code 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 16 3602 2651

E-mail: karina_slm@hotmail.com

INTRODUCTION

Medulloblastoma (MB) is the most common cerebral tumour in childhood. It presents a peak of incidence between 5 and 10 years of age, and it has a 5-year event free survival rate of 70–80%. Nevertheless, the majority of patients who survive suffer from treatment side effects [1-6]. This embryonic cerebellar tumour originates from genetic alterations in pathways that control the neurogenesis of neuronal progenitor cells and granule neuronal precursors [7]. Alterations in specific developmental pathways allowed the classification of MB according to gene expression and mutational levels into 4 subgroups: SHH (Sonic Hedgehog), WNT (Wingless), group 3 and group 4. [7-9].

In addition, epigenetic silencing plays an important role in the development of this tumour [10]. Increased DNA methylation at CpG islands is a common event during tumourigenesis, which may, in part, be attributed to altered DNA methyltransferase (DNMTs) activity [11] and/or to the loss of the ten-eleven translocation (TET1, TET2 and TET3) enzymes responsible for the catalysis of 5-methylcytosine (5mC) into 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), an intermediate step of active DNA demethylation [12, 13].

The loss of global hydroxymethylation as a consequence of altered TETs is a common event during malignant transformation irrespective of tissue origin [14-22]. Moreover, alterations in their function could be associated with the dysregulated activity of the isocitrate dehydrogenase enzymes (IDH1 and IDH2), which appear decreased in melanoma and are frequently reported as mutated in glioma and myeloid leukaemia [16, 23-25].

Thus, considering the embryonal characteristics of medulloblastoma and the differential dynamics of hydroxymethylation during normal cerebellum development [26], our study aimed to study the levels of this epigenetic marker in this tumour.

METHODS

Patients and tumour samples

A total of 70 medulloblastoma patient samples were obtained at two Brazilian institutions: the Clinical Hospital from the Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (HC/FMRP-USP), and the Boldrini Center of Children in Campinas, Sao Paulo state. Medulloblastoma samples were microdissected at the Pathology Department (FMRP-USP). The control group consisted of 19 non-neoplastic cerebellum samples.

Eight were foetal (Boldrini Center of Children), and eleven were non-foetal (Pathology Department – HC/FMRP-USP). Due to material insufficiency or poor quality after microdissection, from 70 samples, it was possible to extract RNA from 47 MB and 15 cerebellum samples, while DNA extraction was possible to perform on only 12 MB and seven non-neoplastic cerebellum samples (dot-blot and sequencing). Thirty-seven samples were embedded in paraffin blocks and subsequently used in an immunohistochemistry assay.

Thirty-two patients were female, and thirty-eight were male. The average age at diagnosis was 8 years (ranging from 5 months to 26 years). The 5-year overall survival for high-risk patients (children aged less than 3 years of age, tumour residue > 1.5 cm² after surgery or disseminated disease) was 35%; for the low-risk group (defined as children older than 3 years of age at diagnosis with totally resected, non-disseminated MB) was 62%. Patients were subjected to three different treatment protocols that included radical surgical resection, craniospinal radiotherapy (for children older than 3 years) and chemotherapy at the discretion of each centre.

Samples from HC/FMRP-USP (n= 25) were further classified into molecular subgroups. PCR-array was performed using TaqMan Low-density-Array of Taylor's Code Set in cDNAs [8]. Five genes from the Notch pathway and 3 reference genes for endogenous control (TBP, HPRT and GUSB) were also included. A pool of normal cerebellum cDNA was used as calibrator. For expression analysis the $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used [27]. A complete-linkage heatmap was generated using the Expression Suite® software (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The subgroup assignment and statistical analysis was performed by unsupervised hierarchical clustering followed by Pearson's correlation and Benjamin Hochberg post-test for false discoveries.

Cell lines

Childhood MB cell lines UW402 and UW473 were generously provided by Dr. Michael Bobola from the Seattle Children's Hospital, and ONS-76 and DAOY were acquired from Cell Bank BCRJ/UFRJ. UW473 is from a 5-year-old male, ONS-76 is from a 2-year-old female, and DAOY is from a 4-year-old male. Cell lines UW402 and UW473 were cultured in HAM F10 medium, whereas ONS-76 and DAOY in RPMI1640. Both media were supplemented with 100 mg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 10% foetal bovine serum (pH 7.2-7.4). Cultures were kept in a humid atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Cell lines were classified according to molecular subtype, and DAOY, UW473 and ONS-76 were the SHH subgroup. The MB cell lines were authenticated through STR markers and validated by checking the profile provided by ATCC. No cross-contaminations were detected.

Gene expression

RNA extraction was performed using the TRIZOL® (Invitrogen Inc®, Carlsbad, CA, USA) reagent from approximately 50–100 mg of post-microdissection MB samples, cell lines and control cerebellum samples, following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using the *High Capacity*® kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Gene expression analysis of patients was performed using quantitative real-time PCR (TaqMan probes– Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for *TET1* (Hs00286756_m1), *TET2* (Hs00325999_m1), *TET3* (Hs00379125_m1), *IDH1* (Hs00271858_m1) and *IDH2* (Hs00158033_m1) genes. *GUSB* and *HPRT* genes were used as endogenous controls. The 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) instrument was used. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was performed to determine relative gene expression [27].

IDH1 and *IDH2* sequencing

DNA extraction was performed using the commercial kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, CA, USA). *IDH2* exon 4 that encodes codon 172 and *IDH1* exon 4 that encodes codon 132, both mutational hotspots, were amplified in 12 DNA samples from MB cases, 2 from control cerebellum and in the four cell lines. Primers and reaction conditions have been previously determined [27]. PCR products were sequenced in the ABI3500XL platform using the Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Data analysis was performed using Geneious v.8.0.5 software [29].

Hydroxymethylation evaluation by dot-blot

The global hydroxymethylation level was determined in DNA samples from MB patients, control cerebellum, and MB cell lines by dot-blot. This technique consists of an antibody reaction against 5-hmC (Active-motif, cat. n°. 39769, Carlsbad, California, USA). Denatured DNA was deposited in a positively charged nitrocellulose membrane submitted to UV radiation. The membrane was blocked with 5% milk solution in TBS-Tween 20 and subsequently incubated with anti-5-hmC antibodies (1:1000; active-motif) at 4°C overnight. After the incubation period, the membrane was incubated with peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG for 1 hour at room temperature and then washed in TBS-Tween solution. A chemiluminescence western blotting system was used to detect the marked DNA. Dot-Blot intensity was quantified by the software ImageJ version 1.48 (NIH, Washington, USA).

Global hydroxymethylation evaluation by immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) reactions were performed using the polymer-based methodology kit Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring, cat. N. SPD-125, California, USA) and the primary antibody anti-5-hmC (Active-motif, cat. n°. 39769). Briefly, after deparaffinization and rehydration, histological sections were submitted to antigen retrieval. Next, histological sections were treated with 3% H₂O₂ solution for 30 minutes to block endogenous peroxidase activity. Histological sections were incubated with Protein Block and subsequently with anti-5-hmC antibody.

HPR and complement were the visualization methods provided by the commercial kit. The slides were incubated in 1 mg/mL diaminobenzidine (DAB) in PBS solution supplemented with 2.5% hydrogen peroxide. Harris's hematoxylin was used as a counter-stain, and slides were mounted with Permount (MERCK, Darmstadt, DE). Immunostaining was analysed according to the number of marked cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS17 software (SPSS Inc. Chicago, USA). Comparisons between groups and association with clinical features for gene expression and global hydroxymethylation were performed using Mann-Whitney U-test. Prognostic values of variables were estimated with the multivariate Cox proportional Hazard Method. The event-free survival curve was obtained using a Kaplan-Meier curve and log rank test. Correlations were evaluated by Spearman's test.

RESULTS

Global hydroxymethylation levels were decreased in MB samples compared to non-neoplastic cerebellum samples

The immunohistochemistry technique was applied to histological sections. In non-foetal cerebella, Purkinje cells, molecular layer cells and granular layer cells showed strong nuclear immunoexpression of 5-hmC (Figure 1A). The percentage of anti-5-hmC-positive tumour cells in medulloblastoma (n=31) was significantly reduced compared to the percentage of positive cells in the granular layer of control cerebella (n=4) (Figure 1B); medulloblastoma average: 72.21±11.9% *versus* average of non-neoplastic cerebella: 82±25% ($p=0.013$). The 5-hmC levels in MB varied considerably between samples (Figure 1C); nonetheless, we did not find associations

between hydroxymethylation levels and clinical characteristics of patients. There was no association with age ($p = 0.99$), gender ($p = 0.917$), recurrence ($p = 0.670$), metastasis ($p = 0.117$), degree of resection ($p = 0.07$) or disease status ($p = 0.67$). Additionally, there were no significant differences between hydroxymethylation and survival ($p = 0.398$).

The reduced hydroxymethylation levels in MB were subsequently confirmed by dot-blot. This technique was applied to genomic DNA from samples from 12 MB patients, eight non-foetal cerebella and MB cell lines (Figure 1D-F). Medulloblastoma samples presented a significantly decreased ($p = 0.001$, fold change = 2.65) mean global hydroxymethylation ($32 \pm 11\%$) compared to control cerebella ($82 \pm 25\%$) (Figure 1G). Nonetheless, in accordance with the immunohistochemistry staining, there were no associations between hydroxymethylation levels and clinical characteristics of patients. MB cell lines also showed significant decreases ($p = 0.012$, fold change = 3.37) in the hydroxymethylation levels compared to controls, with a mean of $26 \pm 20\%$ (Figures 1G).

***TETs* expression levels are decreased in MB samples, and *TET1* expression is correlated with 5-hmC levels**

Expression patterns of *TET1*, *TET2*, and *TET3* in MB samples ($n = 47$) were compared to non-neoplastic cerebella samples divided into two groups: foetal ($n = 9$) and non-foetal ($n = 7$). All studied genes showed significantly ($p < 0.05$) reduced relative expression in MB compared to foetal cerebellum but not to non-foetal counterparts ($p > 0.05$). The average of expression of these genes in MB cell lines was also decreased when compared to both control groups (Figure 2A-2C).

Interestingly, a positive correlation between relative hydroxymethylation levels (evaluated by dot-blot) and *TET1* expression was observed ($R = 0.5$; $p = 0.03$) (Figure 2D). *TET3* expression was associated with disease status and was reduced in samples from patients with unfavourable events, relapse or death ($p = 0.045$, data not shown); however, this gene expression was not associated with event free survival (EFS, $p = 0.370$; long-rank test), and it was not an independent prognostic factor ($p = 0.357$; Hazard Ratio = 0.670; Confidence interval = 0.286-1.571). There were no associations between *TET1* and *TET3* expression and clinical characteristics or event free survival of patients (long-rank test).

***IDH1* and *IDH2* mutations were not present in MB samples, although their expression levels were reduced**

Exon 4 mutations were not detected in either *IDH1* or *IDH2* (mutation hotspots) in any of the 12 medulloblastoma samples, MB cell lines or in the two non-neoplastic cerebella studied. Nonetheless, a

significantly decreased ($p < 0.001$) relative expression of *IDH1* (1.73 ± 0.37) was observed in 47 patients with medulloblastoma compared to eight foetal cerebellum samples (3.50 ± 0.29), although there were no differences ($p = 0.082$) when compared to six non-foetal cerebellum samples (2.13 ± 0.44). Cell lines, on the other hand, showed decreased *IDH1* relative expression (0.81 ± 0.22) when compared to foetal ($p = 0.007$) or non-foetal cerebella ($p = 0.027$); Figure 3A).

The relative expression data from *IDH2* allowed us to conclude that the expression of this gene in medulloblastoma samples (0.81 ± 0.10) was significantly reduced compared to the expression in foetal cerebella (2.01 ± 0.48), with $p=0.001$. While cerebella from non-foetal samples showed no differences in *IDH2* expression (0.72 ± 0.26) compared to medulloblastoma ($p = 0.69$). Foetal and non-foetal cerebella showed higher *IDH2* expression when compared to *IDH2* expression in cell lines ($p=0.007$ and $p=0.027$, respectively; Figure 3B). There were no associations between *IDH1* expression and clinical characteristics or event free survival of patients (long-rank test). *IDH2* expression was associated with the presence of metastasis (Figure 3C), but this gene did not harbour prognostic power by multivariate analysis ($p= 0.782$; Hazard Ratio= 1.109; Confidence Interval = 0.533-2.308), and its expression was not associated with event free survival (EFS, $p= 0.288$; long-rank test).

***TET1* and *IDH* genes were differentially expressed in MB molecular subgroups**

Previous PCR-array based Taylor's Code Set allowed the classification of MB samples into 3 groups: WNT ($n=8$) subgroup, SHH ($n=6$), and a non-WNT/non-SHH subgroup ($n=11$). We observed that WNT samples presented a decrease in *TET1* ($p= 0.05$; Figure 3D) and *IDH1* gene expression ($p= 0.02$; Figure 3E). In contrast, SHH samples presented a higher expression of the *IDH2* gene ($p= 0.037$; Figure 3F) compared to the cerebellum samples. However, these results need to be viewed with caution due to the small number of cases analysed.

DISCUSSION

Epigenetic modifications are equally important during cerebellum development and for MB initiation [7]. The role of DNA methylation is well known during neurodevelopment and neural tumourigenesis. Wang and colleagues [26] described the hydroxymethylation dynamics during cerebellar development and demonstrated that 5-hmC levels are higher in adult cerebella compared to foetal counterparts [26]. Nevertheless, there are no

reports in the literature about this mechanism in MB samples. The present study is the first to simultaneously investigate the expression of TET genes and global hydroxymethylation levels in MB primary samples.

Loss of 5-hmC is a common event in tumours of different origins including brain tumours (astrocytoma, glioblastoma, ependymoma and meningioma) [14-22, 30-32]. Although the exact contribution of this mechanism to tumourigenesis remains to be elucidated, experimental data demonstrated that malignant transformation induces downregulation of *TET1* and loss of 5-hmC [15]. Moreover, reduced levels of 5-hmC are associated with poor prognosis, and it is suitable as a biomarker [17, 20, 22, 31-33].

Herein, we show that 5-hmC levels are diminished in MB in comparison to a non-neoplastic cerebellum, as demonstrated by dot-blot and immunohistochemistry data. However, we did not find any association between hydroxymethylation levels and the clinical data of MB patients.

Reduced hydroxymethylation levels are commonly associated with mutations in *IDH* genes [25, 34]. *IDH1* and *IDH2* enzymes are responsible for reducing NADP into NADPH and for performing the oxidative decarboxylation of isocitrate into alpha-ketoglutarate (α -KG), which is a co-factor for TET1 function. The most common mutations in brain tumours affect R132 in *IDH1* or R140 and R172 in *IDH2*, which negatively affect the enzymatic capacity of these proteins and result in the production of the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2HG). Production of 2HG interferes with the activity of TET enzymes because it competes with α -KG and contributes to malignant transformation [23, 34-38]. However, these mutations were not found in MB samples in our study nor in other reports on childhood MB [25, 34].

Despite extensive sequencing efforts, *IDH1* and *IDH2* mutations in other human solid tumours have been reported only sporadically, suggesting that they are predominantly a feature of glioma and acute myeloid leukaemia [37]. Nonetheless, *IDH1* and *IDH2* mutants generally show haploinsufficiency [38]. Consequently, the alteration of dosage may also affect the phenotype. Moreover, despite the association between reduced expression of IDH and 5-hmC levels being elusive, Lian et al., [16] described an increase of this epigenetic marker when the *IDH2* gene was re-introduced in a zebrafish melanoma model. In line with that study, our results showed diminished levels of both genes mRNA and, importantly, differential expression in dissimilar MB molecular-subgroups (low *IDH1* in WNT and high *IDH2* in SHH).

In addition, our results show reduced expression of *TET1*, *TET2* and *TET3* in MB samples compared to foetal cerebella. However, no associations between any of the studied genes and survival time of MB patients were found. Using the Mann-Whitney test, we found a significant association between *TET3* and disease status. Patients who have relapsed or died (n= 21) presented with reduced *TET3* expression compared to patients who

survived the disease (n= 22). Decreased *TET3* expression could explain the hypermethylation of tumour suppressors and negative regulators of signalling pathways that stimulate proliferation in MB, hence promoting tumour aggressiveness once this gene catalyses 5-hmC groups of gene promoters during neural differentiation [43]. It was demonstrated that 5-hmC accumulation marks genes that resist neoplastic hypermethylation [44]. However, this gene was not confirmed as an independent prognostic factor in MB.

Interestingly, when we divided MB samples into molecular subgroups, reduced expression of *TET1* in the WNT group became apparent. The WNT subgroup also presented decreased *IDH1* expression, a feature that can also interfere with TET activity [23, 35-38]. Lower expression of *TET1* in the WNT subgroup could explain the activation of the WNT pathway in this subtype, since TET1 was described as a suppressor of this pathway in colon cancer [39]. The induction of *TET1* expression in that tumour results in increased expression of *DKK3*, *DKK4* and *SFRPs* genes, which are upstream inhibitors of the WNT pathway, resulting in reduction of β -catenin levels [39]. Interestingly, the *SFRP1* gene was described as silenced by hypermethylation in MB [10].

In addition to the association with the WNT subtype, expression of *TET1* was also positively correlated with hydroxymethylation levels, as revealed by dot-blot. Such correlations were also observed in breast, liver, and gastric cancer [17 – 19]. TET1 protein expression studies in glioma and breast cancer demonstrated that reduction of 5-hmC is more significant in samples that present TET1 cytoplasmic expression or no expression [33, 40].

The data presented in this study allowed us to withdraw the conclusion that global hydroxymethylation levels and *TET* and *IDH* gene expression might contribute to MB development and/or maintenance, although this hypothesis should be confirmed by further functional studies.

ETHICAL APPROVAL AND INFORMED CONSENT

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This research was submitted to and approved by the HC/FMRP-USP Research Ethics Committee (CAAE nº 37206114.1.0000.5440). All samples were obtained after receiving informed consent from all individual participants included in the study.

REFERENCES

1. Chan AW, Tarbell NJ, Black PM et al (2000) Adult medulloblastoma: prognostic factors and patterns of relapse. *Neurosurgery* 47:623-631.
2. Crawford JR, Macdonald TJ, Packer RJ (2007) Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Neurology The Lancet* 6:1073-85.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
4. Packer RJ, Cogen P, Vezina G et al (1999). Medulloblastoma: Clinical and biologic aspects. *Neuro Oncol* 1:232-250.
5. Smoll NR, Drummond KJ (2012). The incidence of medulloblastomas and primitive tumours in adults and children. *J Clin Neurosci* 19:1541-4.
6. Mabbot DJ, Penkman L, Witol A et al (2008). Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors. *Neuropsychology*. 22:159-68.
7. Hatten M, Roussel MF (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Cell Press* 34:134-42.
8. Northcott PA, Jones D, Kool M et al (2012). Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev* 12:818-34.
9. Taylor MD (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465-47.
10. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE et al (2010). The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene* 29:3017-24.
11. Pócza T, Krenács T, Turányi E et al (2016). High expression of DNA methyltransferase in primary human medulloblastoma. *Folia Neuropathol*:54(2):105-13.
12. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y et al (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930-935.
13. Willians K, Christensen J, Helin K (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO reports* 1:28-35.
14. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK et al (2011) Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* 2:627-637.
15. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K et al (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 103(4):670-6.
16. Lian CG, Xu Y, Ceol C et al (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 6:1135-46.
17. Liu C, Liu L, Chen X et al (2013). Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1. *PloS One* 8(5):e62828.
18. Yang H, Liu Y, Bai F et al (2013). Tumor development is associated with decreased of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32:663-669.

19. Frycz BA, Murawa D, Borejsza-Wysocki M et al (2014) Decreased expression of ten-eleven translocation 1 protein is associated with some clinicopathological features in gastric cancer. *Biomed Pharmacother* 68:209–12.
20. Dong Z-R, Zhang C, Cai J-B et al (2014) Role of 5-hydroxymethylcytosine level in diagnosis and prognosis prediction of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Tumor Biol.* 4:2763-71.
21. Feng J, Wang Q, Guanguei L et al (2015) TET1 mediated diferente transcriptional regulation in prostate cancer. *Inter J Clin Exp Med.* 8:203-11.
22. Murata A, Baba Y, Ishimoto T et al (2015). Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 6:23372-82.
23. Xu Y, Yang H, Liu Y et al (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarato-dependente dioxygenases. *Cancer Cell* 19:17-30.
24. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C et al (2010) Leukemia IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 6:553-567. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015. Epub 2010 Dec 9.
25. Yan H, Parsons W, Jin G et al (2010). IDH1 and IDH2 in gliomas. *NIH Public Access* 8:765–773.
26. Wang T, Pan Q, Lin L, et al (2012). Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopment genes in the developing human cerebellum. *Hum Mol Genet* 21:5500-10.
27. Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3(6):1101-8. PubMed PMID: 18546601.
28. Patnaik MM, Hanson C, Hodnefield JM et al (2012). Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients. *Leukemia* 26(1):101–5.
29. Drummond, A.J., Kears, M., Heled, J et al (2014) Geneious v8.0.5. Available from <http://www.geneious.com>.
30. Jin SJ, Jiang Y, Qiu, R (2011) 5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res* 71(24):7360–65.
31. Orr B, Haffner MC, Nelson WG et al (2012). Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PloS One.* 7:e41036.
32. Kraus TFJ, Globisch D, Wagner M et al (2012). Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), the “sixth base,” are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int J Cancer* 7:1577–90.
33. Tsai K-W, Li G-C, Chen C-H et al (2015). Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype. *Breast Cancer Res Treat* 153:219-34.
34. Balss J, Meyer J, Mueller W, et al (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116:597–602. doi: 10.1007/s00401-008-0455-2. Epub 2008 Nov 5.
35. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17:225–234.
36. Dang L, White DW, Gross S et al (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462:739–44.
37. Prensner JR, Chinnaiyan AM (2011). Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nature Medicine* 17:291-293.

38. Yen KE, Birringer MA, Su SM, Fantin VR (2010). Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 49:6409-6417.
39. Neri F, Dettori D, Incarnato D, et al (2014). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene* 32:4168-4176. doi: 10.1038/onc.2014.356. Epub 2014 Nov 3.
40. Müller T, Gessi M, Waha A et al (2012). Nuclear exclusion of TET1 is associated with loss of 5-hydroxymethylcytosine in IDH1 wild-type gliomas. *Am J Pathol* 181(2):675–83.
41. Hsu C-H, Peng K-L, Kang M-L et al (2012). TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Reports* 2(3):568–79.
42. Yang Z, Jiang W, Liu F et al (2015). A novel electrochemical immunosensor for 5-hydroxymethylcytosine quantitative detection in genomic DNA of breast cancer tissue. *Chem Commun (Camb)* 51(78):14671-14673.
43. Perera A, Eisen D, Wagner M et al (2015). TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression. *Cell Reports*, 283–294.
44. Uribe-Lewis S, Stark R, Carroll T, et al (2015). 5-hydroxymethylcytosine marks promoters in colon that resist DNA hypermethylation in cancer. *Genome Biology* 16:69-84.

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 2013/15125-3). 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.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. Levels of 5-hmC in medulloblastoma and cerebellum samples. A. Detection of 5-hmC levels using immunohistochemistry (IHC) in non-foetal cerebellum (NFC) samples. B. Detection of 5-hmC levels using IHQ in medulloblastoma samples. C. Percentage of 5-hmC-positive cells obtained by IHQ in medulloblastoma (MB, n= 31) samples compared to non-foetal cerebellum (NFC, n= 4) samples; p=0.013. D. Detection of 5-hmC levels using dot-blot in medulloblastoma (MB) samples, n=12; E. Detection of 5-hmC levels using dot-blot in non-foetal cerebellum (NFC; d= days; m= months; y= years) samples, n= 8. F. Relative 5-hmC levels in NFC; MB and CL. A significant difference was noted between NFC and MB (p=0.001) and CL (p= 0.012).

Figure 2. Relative expression of *TET* genes. MB= medulloblastoma samples, n=47; FC= foetal cerebellum, n=9; NFC= non-foetal cerebellum, n=7; CL= medulloblastoma cell line, n=4; A. *TET1* gene expression was reduced in MB compared to FC (p=0.001) but not NFC samples (p=0.33). Cells lines presented a reduction in *TET1* expression when compared to FC (p=0.007) and NFC samples (p=0.014). B. *TET2* expression presented a decrease in MB in relation to FC (p=0.019) but not NFC (p= 0.55), while this gene had lower expression in CL

when compared to FC ($p=0.008$) and NFC ($p=0.014$) samples. C. MB samples exhibited reduced of *TET3* expression when compared to FC ($p=0.021$) but not NFC samples ($p=0.16$), and CL presented a reduction in *TET3* expression when compared to FC ($p=0.008$) and NFC samples ($p=0.014$). (FC= fold change; $*p\leq 0.05$). D. A positive correlation was found between *TET1* expression and hydroxymethylation levels, $\rho=0.03$, Spearman Correlation.

Figure 3. A-C. Expression of *IDH1* and *IDH2* genes in MB medulloblastoma samples, $n=47$; FC= foetal cerebellum, $n=9$; NFC= non-foetal cerebellum, $n=7$; CL= medulloblastoma cell lines, $n=4$. A. *IDH1* expression is reduced in MB samples when compared to FC ($p=0.001$) but not NFC samples ($p=0.082$), but this gene expression was reduced in CL when compared to FC ($p=0.007$) and NFC samples ($p=0.027$). B. MB samples presented a reduction in *IDH2* expression when compared to FC ($p=0.001$) but not NFC samples ($p=0.69$), while CL presented a decrease in this gene expression relative to FC ($p=0.007$) and NFC samples ($p=0.027$). C. Association between *IDH2* expression and the presence of metastasis but there was no prognostic value ($p=0.782$; Hazard Ratio= 1.109). With metastasis = patients who presented metastasis at diagnosis, $n=6$; without metastasis= patients who did not present metastasis at diagnosis, $n=36$. ($*=p\leq 0.05$; FC= fold change). D-E. Relative gene expression for molecular classification; NFC= non-foetal cerebellum, $n=6$; WNT = WNT subgroup, $n=8$; SHH= subgroup SHH, $n=6$; Non-SHH/Non-WNT= MB samples not classified in these molecular subgroups, $n=10$. D. Decreased *TET1* expression in WNT samples when compared to NFC samples. ($p=0.05$). E. Decreased of *IDH1* expression in WNT samples when compared to NFC samples ($p=0.02$). F. Increased *IDH2* gene expression in the SHH subgroup relative to NFC samples ($p=0.037$).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Reduced hydroxymethylation characterizes medulloblastoma while TET and IDH genes are differentially expressed within molecular subgroups

Authors:

Karina Bezerra Salomão; Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro; Daniel Antunes Moreno; Lenisa Geron; Fernando Ramalho; Luciano Neder Serafini; Fabiano Pinto Saggioro; Rosane Gomes de Paula Queiroz; Maria Sol Brassesco; Simone dos Santos Aguiar; José Andres Yunes; Izilda Cardinali, Silvia Regina Brandalise; Carlos Alberto Scrideli; Luiz Gonzaga Tone

Date Issued:

March 23, 2017

Certificate Verification Key:

95A1-444F-CD5D-D137-CF63

This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
14040-900 – Ribeirão Preto – SP – Fone (16) -32062651

Prof. Osamu Ogawa
Editor-in-chief
International Journal of Clinical Oncology

Ribeirão Preto, June 18th 2017

Dear Dr. Ogawa

On this occasion, we aimed to study the to investigate hydroxymethylation profiles in medulloblastoma (MB) samples, to evaluate mutations at *IDH1* and *IDH2* genes by sequencing and the expression levels of *TET* and *IDH* genes in MB samples.

Our results show that 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) global levels are reduced in MB in comparison to non-neoplastic cerebellum, and a decreased of *TETs* genes expression in MB when compared to fetal cerebellum. While molecular MB subgroups presented differential expression of *TET* and *IDH* genes. To this moment, there is no information about 5-hmC levels in MB samples.

We declare that all authors contributed significantly and hope the manuscript is suitable for publishing in your journal.

Sincerely,

Karina Bezerra Salomão
Department of Genetics, FMRP-USP