**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria**

Análise da expressão de microRNAs em meduloblastomas

Carolina Alves Pereira Corrêa

**Ribeirão Preto- SP
2016**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

Análise da expressão de microRNAs em meduloblastomas

Carolina Alves Pereira Corrêa

Dissertação apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto- SP

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Corrêa, Carolina Alves Pereira

Análise da expressão de microRNAs em meduloblastomas.
Ribeirão Preto, 2015. 116f

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Scrideli, Carlos Alberto

1. Meduloblastoma. 2. Expressão Gênica. 3. microRNAs.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, localizado no Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Alves Pereira Corrêa

“Análise da expressão de microRNAs em meduloblastomas”

Dissertação apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Data da defesa:

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha mãe Claudia, pelo amor incondicional, por sempre acreditar em mim e por apoiar todas as minhas decisões. Obrigada pelo exemplo de mulher guerreira e por toda a dedicação para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli**, um exemplo de ser humano ético e profissional. Obrigada por me acolher no laboratório de Pediatria, pela confiança, apoio e dedicação durante a realização desse trabalho, por todos os momentos de discussão e de ensinamento, contribuindo muito para o meu crescimento acadêmico.

Ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, um exemplo de líder. Obrigada por me acolher no grupo e por sempre estar disponível, contribuindo ativamente para o meu crescimento.

Ao **Departamento de Pediatria** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e toda a equipe por todo o auxílio, apoio e suporte durante esses anos.

À **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)**, ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro.

À **Dr. Rosane**, agradeço a amizade acima de tudo. Apesar de gestora do laboratório, sempre disponível e auxiliando em todos os passos do meu trabalho, se tornou uma grande amiga. Obrigada por todas as conversas e conselhos durante essa jornada.

Ao amigo e companheiro de trabalho **Augusto faria Andrade**, por ter se tornado um exemplo de profissional para mim, por todo o apoio, ensinamento e discussões. Obrigada por participar do meu trabalho com tanta dedicação e entusiasmo.

As amigas além da bancada, **Veridiana Kill Suazo, Pamela Viani de Andrade e Lara Elis Alberici Delsin**, pelo auxílio durante o trabalho, por me ajudarem a tomar decisões e por toda a amizade e apoio durante todos os momentos. Obrigada por estarem sempre comigo!

Aos amigos, **Régia, Maurício, Kleiton e Prof. Dr. Vanessa**, agradeço por toda a disponibilidade e auxílio sempre que precisei. Me espelho em vocês na minha caminhada!

Aos amigos e companheiros do laboratório **Mirella, Lenisa, Gabriela Molinari, Gabriela Vieira, Karina, Marcela, Camilla, Mariana, Daniel, Gustavo, Paola e Prof. Dr. Maria Sol** por estarem sempre comigo durante toda a caminhada e por tornarem mais tranquilos, os dias difíceis.

À equipe de funcionários do laboratório de Pediatria do HC FMRP-USP, especialmente à **Cleonice**, por sempre estar disponível, por sempre ajudar e fazer o possível para que tudo funcione como deve, à **Tatiana, Evelise, Sônia, Lucimar, Paola, Sara, Beth**, pelo apoio, pela companhia durante o trabalho, conversas no almoço e convivência pelos corredores.

Ao amigo e Professor **Tiago Campos Pereira**, pelas ótimas oportunidades que me proporcionou durante o mestrado, pelo apoio nos dias difíceis, pelas discussões de trabalho, pelo otimismo e exemplo de profissional.

Ao meu avô **Nelson**, e à minha mãe **Claudia**, por toda a dedicação e esforço para que eu me tornasse quem eu sou e para que eu conquistasse tudo o que consegui. Muito obrigada por serem meus exemplos de vida, meu porto seguro, por nunca desistirem, por me ensinarem lições a cada dia, pelo apoio e incentivo em cada escolha que eu fiz. O amor e gratidão que eu sinto são imensos!

Aos meus tios Vera, Mario, Nelson, Fernanda; avó **Vera Lucia**; irmão **Victor**, primos **Amanda, Helena e Leonardo** e tia-avó **Regina Lúcia**, por serem minha família, meu aconchego, por me apoiarem, por sempre acreditarem em mim e pelo amor incondicional. E ao **Paulo**, pelos ensinamentos e conselhos, por todo o apoio em todos os aspectos e por ter se tornado minha família. Obrigada por serem tão maravilhosos!

Ao meu pai **Ivan**, à **Silvana** e à **Marina** por todo o apoio e incentivo de sempre.

À **Camila**, por toda a paciência, amizade e companheirismo, por me lembrar sempre que tudo sempre da certo, por acreditar em mim, por me apoiar, por me entender. Obrigada por ser mais que uma amiga!

À **Ana Paula**, uma irmã que a vida me presenteou, obrigada por estar comigo há 25 anos, por torcer por mim, por acreditar em mim e por estar presente em todos os meus momentos!

À **Larissa e Anna**, por todo o apoio, por me ouvirem e por sempre estarem presentes, mesmo com a distância física.

Ao **Claudio, Giovana e Sebastião** por todo o apoio, conversas e conselhos, por serem companheiros e muito mais que amigos!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”

Jean Cocteau

RESUMO

ALVES PEREIRA CORRÊA, Carolina. **Análise da expressão de microRNAs em meduloblastomas**. 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: O Meduloblastoma (MB) é o tumor sólido maligno mais comum do sistema nervoso central em crianças. Corresponde a aproximadamente 20% de todos os tumores intracranianos pediátricos, surge no cerebelo e sua origem é embrionária, sendo altamente invasivo. Como tratamento padrão usa-se a ressecção cirúrgica do tumor, quimioterapia e radioterapia crânio-espinhal; porém, a taxa de sobrevida livre de eventos (SLE) em cinco anos para os pacientes de baixo risco é de aproximadamente 70% e a maioria dos pacientes que sobrevivem sofre de efeitos secundários a longo prazo. Portanto, crescem as buscas por novos tratamentos que apresentem menores efeitos colaterais ou que diminuam/eliminem a necessidade de radiação. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença, entre eles, a regulação da expressão gênica por microRNAs (miRNAs). Essas moléculas regulam diversos processos biológicos, exercendo regulação gênica negativa a nível pós-transcricional; no entanto, seu papel em MB ainda é pouco explorado. **Objetivo:** Avaliar o perfil de expressão de miRNAs diferencialmente expressos em amostras de pacientes portadores de MB e correlacionar seus níveis de expressão com características clínicas dos pacientes, assim como identificar possíveis marcadores de prognóstico. **Metodologia:** Foram selecionados 15 miRNAs a partir de dados prévios obtidos pela técnica de microarranjo. Foi realizada a expressão desses miRNAs por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e feita a comparação com as características clínicas, utilizando amostras de pacientes portadores de MB adultos e pediátricos (N=51) e amostras de cerebelos não neoplásicos fetais (N=10) e não fetais (N=7). A comparação entre os grupos foi feita por teste de Mann-Whitney e a análise de sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida global (SG) por curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank. A análise multivariada por modelo de regressão de Cox foi utilizada para avaliação dos fatores prognósticos. **Resultados:** Os miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, -491-5p, -512-3p, -539-5p estão hipoexpressos nos tumores em relação aos cerebelos fetais e não fetais; o miR-31-5p está hipoexpresso e o miR-199a-5p está hiperexpresso nos tumores em relação ao cerebelos não fetais; o miR-202-3p e o miR-650 estão hipoexpressos nos tumores em relação aos cerebelos fetais. Além disso, os

miRNAs miR-199a-5p e -329 estão hipoexpressos em pacientes menores que 3 anos, com relação aos maiores de 3 anos; os miRNAs miR-202-3p, -329, -491-4p e -512-3p estão hipoexpressos em pacientes que tiveram grau de ressecção completo do tumor, em comparação aos que tiveram grau incompleto; e os miRNAs miR-202-3p e -512-3p estão hipoexpressos em pacientes classificados como baixo risco em comparação aos classificados como alto risco. Adicionalmente, o miR-211-5p está hipoexpresso nos pacientes com menor sobrevida global e livre de eventos; e o miR-512-3p está hiperexpresso nos pacientes com menor sobrevida global e livre de eventos. Expressão do miR-211-5p foi fator prognóstico independente para SLE quando analisada com as variáveis expressão do miR-512-3p e grupo de risco por modelo de regressão de Cox. **Conclusão:** É possível observar um padrão diferencial de expressão desses miRNAs no MB, podendo ser biomarcadores importantes para esta doença. Estudos futuros serão realizados para investigar o papel desses miRNAs na progressão desse tumor.

Palavras-chave: Meduloblastoma, expressão gênica, microRNAs

ABSTRACT

ALVES PEREIRA CORRÊA, Carolina. **Analysis of microRNAs expression in medulloblastoma.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Medulloblastoma (MB) is the most common malignant solid tumor of the central nervous system in children, and it arises in the cerebellum with an embryonic origin. MB corresponds to approximately 20% of all pediatric intracranial tumors, and it is highly invasive. The standard treatment relies on tumor surgical resection, chemotherapy and craniospinal radiotherapy; however, the five years event-free survival for low-risk patients is approximately 70%, and most survival patients suffer from long-term side effects. Thus, the search for new treatments with fewer side effects or aiming to reduce/eliminate radiation is of great interest. Several factors contribute to the development and progression of this disease, among them the regulation of gene expression by microRNAs (miRNAs). These molecules regulate diverse biological processes, exerting negative regulation in gene expression at post-transcriptional level, however its role in MB is still poorly explored. **Objective:** Evaluate the profile of differentially expressed miRNAs in MB samples, correlate their expression levels with patients clinical features, and identify potential prognostic markers. **Material and methods:** 15 miRNAs were selected based on previous data obtained from a large-scale gene expression analysis using the microarray assay. It was performed their expression and compared with the clinical features of the patients by RT-qPCR. For this, it was used pediatric and adult patients samples (n=51) diagnosed with MB and non-neoplastic fetal (n=10) and non fetal (n=7) cerebellum samples. The comparison between groups was performed by Mann-Whitney test and event-free survival (EFS) analysis and overall survival (OS) by Kaplan-Meier and log-rank test. Multivariate analysis by Cox regression model was used to evaluate the prognostic factors. **Results:** The miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, -491-5p, -512-3p, -539-5p are downregulated in tumors when compared to fetal and non-fetal cerebellum; miR-31-5p is downregulated and miR-199a-5p is upregulated only in tumors compared to non-fetal cerebellum; miR-202-3p and miR-650 are downregulated in tumors only when compared to fetal cerebellum. In addition, miR-199a-5p and miR-329 are downregulated in patients under 3 years old compared to those who are higher than 3 year; miR-202-3p, miR-329, miR-491-5p and miR-512-3p are downregulated in patients who had complete tumor resection compared to those who had incomplete tumor resection; and miR-202-3p and miR-512-3p are downregulated in low risk patients compared to high risk

patients. In addition, miR-211-5p is downregulated and miR-512-3p is upregulated in patients with a poorer event-free survival and overall survival. The expression of miR-211-5p was an independent prognostic factor for EFS when analyzed with the variables miR-512-3p expression and risk group by Cox regression model **Conclusion:** It is possible to observe a differential pattern of expression of these miRNAs in MB and they may be important biomarkers for this disease. Further studies will be conducted to investigate the role of these miRNAs in the progression of this tumor.

Keywords: Medulloblastoma, gene expression, microRNAs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Biogênese de miRNAs..	24
Figura 2 - Heatmap mostrando expressão diferencial entre amostras de MB e tecido cerebelar não-neoplásico.....	32
Figura 3 - Heat map mostrando expressão diferencial entre amostras de MB pediátrico e adulto	34
Figura 4 - Heatmap mostrando expressão diferencial entre amostras de MB clássico e desmoplásico	36
Figura 5 - Heat map mostrando expressão diferencial entre amostras de MB pediátrico e cerebelo ...	38
Figura 6. Expressão Relativa de miRNAs..	60
Figura 7A. Expressão Relativa do miR-135a-5p entre os subtipos histológicos.	68
Figura 8A. Expressão Relativa do miR-199a-5p entre os subtipos hitológicos.	69
Figura 9A. Expressão Relativa do miR-202-3p entre os subtipos hitológicos.	70
Figura 10A. Expressão Relativa do miR-199a-5p com relação a idade ao diagnóstico.....	72
Figura 11A. Expressão Relativa do miR-329 com relação a idade ao diagnóstico.	73
Figura 12A. Expressão Relativa do miR-202-3p com relação ao grau de ressecção..	74
Figura 13A. Expressão Relativa do miR-329 com relação ao grau de ressecção.	75
Figura 14A. Expressão Relativa do miR-491-5p com relação ao grau de ressecção.	75
Figura 15A. Expressão Relativa do miR-512-3p com relação ao grau de ressecção..	76
Figura 16A. Expressão Relativa do miR-202-3p com relação ao risco.....	77
Figura 17A. Expressão Relativa do miR-512-3p com relação ao risco.....	78
Figura 18. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Protocolo de Tratamento	80
Figura 19. Curva de Sobrevida Global com relação ao Protocolo de Tratamento.	81
Figura 20. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Grau de Ressecção.	81
Figura 21. Curva de Sobrevida Global com relação ao Grau de Ressecção	82
Figura 22. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Risco.	82
Figura 23. Curva de Sobrevida Global com relação ao Risco	83
Figura 24. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação à expressão do miR-211-5p.....	84
Figura 25. Curva de Sobrevida Global com relação à expressão do miR-211-5p	84
Figura 26. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação à expressão do miR-512-3p.....	85
Figura 27. Curva de Sobrevida Global com relação à expressão do miR-512-3p	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão diferencial de miRNAs em MB versus cerebelo não neoplásico e vias preditas <i>in silico</i>	33
Tabela 2 - Expressão diferencial de miRNAs em MB adulto versus pediátrico e vias preditas <i>in silico</i>	35
Tabela 3 - Expressão diferencial de miRNAs em MB pediátrico desmoplásico versus clássico e vias preditas <i>in silico</i>	37
Tabela 4 - Expressão diferencial de miRNAs em MB pediátrico versus Cerebelo não-neoplásico e vias preditas <i>in silico</i>	39
Tabela 5 - Dados Clínicos dos Pacientes portadores de MB (continua).....	49
Tabela 6 - Dados Clínicos dos pacientes doadores dos cerebelos não-neoplásicos	51
Tabela 7 - Descrição das sondas utilizadas adquiridos da Companhia Life Technologies - Applied Biosystems	54
Tabela 8 - Relação de fold change e valores de P para cada microRNA analisados pelo teste de Mann-Whitney (continua).	62
Tabela 9 - Relação de fold change e valores de P para cada microRNA analisados pelo teste de Mann-Whitney (continua).	64
Tabela 10 - Valores de mediana, mínimo e máximo da expressão relativa dos miRNAs validados das amostras de Cerebelo Fetal Não Neoplásico (CF), Cerebelo Não Neoplásico (CB), Tumores (TU) e Linhagens celulares (LIN).....	66
Tabela 11 - Valores de mediana, mínimo e máximo da expressão relativa dos miRNAs validados das amostras de Cerebelo Fetal Não Neoplásico (CF), Cerebelo Não Neoplásico (CB), Tumores (TU) e Linhagens celulares (LIN).....	67
Tabela 12 - Sobrevida livre de eventos e Sobrevida Global entre hipoexpressos e hiperexpressos.	79
Tabela 13 - Análise multivariada por modelo de regressão de Cox utilizando-se as variáveis grupo de risco, expressão de miR-211-5p e miR-512-3p.	86
Tabela 14 - Genes preditos relacionados com os subgrupos moleculares do MB.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Cerebelo Neoplásico Não fetal
CBTRUS	Registro Central de tumor cerebral dos Estados Unidos
cDNA	DNA complementar ao RNA
CF	Cerebelo Fetal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EFS	Event-free Survival
LIN	Linhagem Celular
MB	Meduloblastoma
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
miRNA	microRNA
ncRNA	RNA não codificador de proteína
OS	Overall Survival
Pre-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	microRNA primário
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SG	Sobrevida Global
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Central
SL	Sobrevida Livre de Eventos
TU	Tumor
WNT	Wingless

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1. Meduloblastoma	19
1.2. Epigenética e microRNAs	23
1.3. microRNAs e Câncer	27
2. Resultados Prévios	29
3. Justificativa	40
4. Hipótese	42
5. Objetivos	444
5.1. Objetivos Gerais	45
5.2. Objetivos Específicos	45
6. Desenho do Estudo	466
7. Materiais e Métodos	488
7.1. Pacientes e linhagens celulares	49
7.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	53
7.3. Validação das Amostras por RT-qPCR	53
7.4. Estudo de possíveis alvos preditos e relação com vias de desenvolvimento do MB	544
8. Análises Estatísticas	555
9. Resultados	577
9.1. Expressão de microRNAs em amostras de MB	58
9.2. Análise dos níveis de expressão entre os subgrupos desmoplásico e outros	68
9.3. Análise dos níveis de expressão entre as amostras de adulto e as amostras pediátricas	711
9.4. Análise dos níveis de expressão e as características clínicas dos pacientes	711
9.5. Análise dos níveis de expressão e a Sobrevida Livre de Eventos e Global dos pacientes	7979
9.6. Estudos de possíveis genes alvos relacionados com as vias de desenvolvimento do MB	877
10. Discussão	89
11. Conclusão	1011
12. Referências Bibliográficas	1033
13. Apêndices	1100
14. Anexos	1122

1. Introdução

1.1. Meduloblastoma

O câncer é a segunda causa mais comum de morte entre crianças com idades entre 1 e 14 anos nos Estados Unidos (HOWLADER et al., 2011) e também é a segunda causa de morte em crianças entre 5 e 18 anos no Brasil (ministério da Saúde/INCA/SOBOPE, 2008). Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são o segundo tipo de câncer mais comum em crianças, depois das leucemias (HOWLADER et al., 2011). Dentre os tumores do SNC, o meduloblastoma (MB), cuja origem se dá no cerebelo, é o tumor maligno mais frequente na criança (CRAWFORD et al. 2007; HATTEN & ROUSSEL, 2011); podendo ocorrer também em adultos, porém, sua frequência nesta faixa etária é de menos de 1% entre os tumores do SNC (CRAWFORD et al., 2007).

O Registro Central de tumor cerebral dos Estados Unidos (CBTRUS) relata que a incidência de MB em pacientes com até 19 anos de idade representa aproximadamente 16% de todos os tumores cerebrais pediátricos e 40% dos tumores cerebelares em crianças. Seus picos de incidências ocorrem entre 3 e 4 anos e entre 8 e 9 anos de idade, sua frequência é maior em crianças do sexo masculino, porém, apenas 10-15% dos MB são diagnosticados na infância (CBTRUS, 2004-2005).

A origem dessa doença está relacionada, na maioria dos casos, com mutações em genes envolvidos no processo de desenvolvimento do cerebelo durante o período embrionário, mais especificamente em genes que regulam o processo de proliferação e diferenciação das células granulares progenitoras, cuja divisão descontrolada pode causar a formação tumoral (HATTEN AND ROUSSEL, 2011). O MB aparece confinado à fossa posterior na maioria dos casos, mas também é encontrada uma disseminação pelo eixo crânio-espinhal em 11-43% dos pacientes (ROOD; MACDONALD; PACKER, 2004). Acredita-se que o tumor se origine de células-tronco neurais precursoras que estão presentes na camada de células granulares do cerebelo, podendo, contudo, variar de acordo com o subtipo molecular (CRAWFORD; MACDONALD; PACKER, 2007). A maioria de suas células é indiferenciada com características de células-tronco multipotentes (FAN; EBERHART, 2008).

Devido a localização do tumor, os pacientes apresentam vômitos, cefaléia matinal, ataxia, irritabilidade e letargia como principais sintomas (HALPERIN et al., 1996). Como tratamento padrão usa-se a ressecção cirúrgica do tumor, quimioterapia e radioterapia crânio-espinhal (utilizada preferencialmente em crianças acima de 3 anos de idade). Para isso, os pacientes são divididos em grupos baseado na idade, grau de ressecção do tumor e

disseminação da doença. E ainda assim, a taxa de sobrevida livre de eventos (SLE) em cinco anos para pacientes com prognóstico favorável é de aproximadamente 70% (GRILL & BHANGO 2007) e para pacientes com prognóstico desfavorável, para os quais o protocolo de tratamento inclui radiação seguida de altas doses de quimioterapia, a SLE é de aproximadamente 60% (GAJJAR et al., 2006). Adicionalmente, aqueles pacientes tratados apenas com cirurgia e radioterapia apresentam uma taxa de sobrevivência de 24-40%, o que mostra a importância da quimioterapia no tratamento do MB (TAYLOR et al., 2005). Porém, a maioria dos pacientes que sobrevivem atualmente após os tratamentos utilizados sofre de efeitos secundários a longo prazo, incluindo déficit no desenvolvimento neurológico, neuroendócrino e psicossocial (MABBOTT et al., 2008; SPIEGLER et al., 2004). Portanto, crescem as buscas por novos tratamentos que apresentem menores efeitos colaterais ou que diminuam/eliminem a radiação a fim de diminuir a toxicidade do tratamento (SRIVASTAVA et al., 2010).

O MB pode ser dividido em grupos, seguindo algumas classificações (LOUIS et al., 2007; NORTHCOTT et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o MB pode ser classificado de acordo com a sua histologia, como: (i) clássico, (ii) desmoplásico, (iii) extensamente nodular e (iv) de grandes células anaplásicas. Apesar dos avanços, o diagnóstico do MB ainda é feito com base nos critérios histológicos (LOUIS et al., 2007) e essas subcategorias se diferenciam umas das outras de acordo com algumas características como a morfologia e estado de proliferação e de diferenciação celular. O MB clássico é composto de células pequenas e relativamente uniformes com núcleo arredondado, apresentando o melhor prognóstico. Os subgrupos histológicos desmoplásico e extensamente nodular apresentam um prognóstico intermediário; o MB desmoplásico exibe células em alta proliferação, ricas em reticulina, com diferenciação neuronal e o MB extensamente nodular possui arquitetura lobular, células ganglionares e nódulos com diferenciação neurocítica. O subgrupo relacionado ao pior prognóstico é o de grandes células anaplásicas, que mostram características de anaplasia incluindo células tumorais com pleomorfismo nuclear, células com alta atividade mitótica e formas atípicas (ELLISON et al., 2011; LOUIS et al., 2007).

Nos últimos anos uma classificação molecular do MB também foi sugerida, sendo então descritos quatro subgrupos moleculares que se diferenciam quanto à expressão de genes específicos e quanto à ativação de vias de desenvolvimento específicas, são elas: (i) *Wingless* (WNT), (ii) *SonicHedgehog* (SHH), (iii) Grupo 3 e (iv) Grupo 4 (NORTHCOTT et al., 2011). Cada um desses grupos se diferencia por possuir características citogenéticas e perfis

mutacionais e transcripcionais completamente distintos, sendo também divergentes nos aspectos demográficos (distribuição e incidência), clínico e no prognóstico (Kool et al. 2012; Northcott et al. 2012a; Northcott et al. 2012b).

O subgrupo WNT é o mais raro e o que apresenta melhor prognóstico, sua distribuição é maior no sexo masculino e os pacientes apresentam uma taxa de sobrevida superior a 90% (ELLISON et al., 2011; GAJJAR et al., 2006). Sua classificação histológica o coloca no grupo dos MBs clássicos, raramente podendo ser de grandes células anaplásicas, o que é um paradoxo, já que esse subtipo histológico apresenta pior prognóstico. Raramente apresenta metástase e ocorre em pacientes com idade superior a 3 anos (THOMPSON et al., 2006). O gene com maior frequência de mutação nesse grupo é o *CTNNB1* (Northcott et al. 2012a).

O subgrupo SHH possui um prognóstico intermediário e sobrevida geral que varia de 60 a 80% (KOOL et al., 2012). Pode ocorrer em crianças e em adultos, sendo que a maioria dos casos é observada em indivíduos acima de 18 anos. Possui histologia desmoplásica em crianças menores, porém pode também apresentar histologia de células grandes anaplásicas e clássica. Os genes que frequentemente aparecem mutados nesse grupo são *PTCH1*, *SMO* e *SUFU* (NORTHCOTT et al. 2012a).

O MB do subgrupo Grupo 3, atualmente, possui o pior prognóstico. É mais comum em indivíduos do sexo masculino, é restrito a pacientes pediátricos e frequentemente apresenta histologia de grandes células anaplásicas, podendo apresentar histologia clássica também. Aproximadamente 50% dos MBs Grupo 3 apresentam metástases. Nesse grupo o gene *MYC* aparece frequentemente amplificado (NORTHCOTT et al. 2011; NORTHCOTT et al. 2012a).

O Grupo 4 é o mais frequente, correspondendo a 40% de todos os casos de MB. Os pacientes possuem um prognóstico intermediário, porém os adultos possuem um prognóstico levemente pior (KOOL et al., 2012). Há uma frequência três vezes maior de casos em indivíduos do gênero masculino do que no feminino. Sua histologia é clássica, podendo ser de grandes células anaplásicas e são encontradas metástases em 1 a cada 3 pacientes. Tem como característica a frequente amplificação do gene *CDK6* (NORTHCOTT et al. 2012a).

A partir dessa classificação, uma melhor estratificação e caracterização molecular dos pacientes portadores de MB e o uso de terapias moleculares personalizadas poderá melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes; visto que apenas a classificação histológica não está sendo suficiente, já que os 4 subgrupos moleculares podem apresentar os mesmos subtipos histológicos, mesmo apresentando prognósticos tão variados (TAYLOR et al., 2012). Estudos de MB descrevem diversas mutações gênicas, tanto em células germinativas, quanto

nas somáticas. Além disso, foi observada uma correlação entre a quantidade de mutações e a idade dos pacientes, o que sugere que MBs diagnosticados em pacientes pediátricos possuem menos mutações, que são necessárias para o seu desenvolvimento; e sua ocorrência poderia estar relacionada à desregulação em eventos epigenéticos (PUGH et al., 2013).

1.2. Epigenética e microRNAs

Sabe-se que além de mecanismos genéticos, o processo de carcinogênese depende também de alterações nos mecanismos epigenéticos, responsáveis pela manutenção do perfil de expressão gênica nos diversos tipos celulares (DUCASSE; BROWN, 2006; GALLINARI et al., 2007). Dessa forma, além de apresentar mutações genéticas, o MB apresenta alterações epigenéticas, que são responsáveis pelo desequilíbrio celular e pela mudança na expressão de genes importantes, contribuindo para a progressão da neoplasia (BROWN et al., 2009; YOO; CHENG; JONES, 2004).

Epigenética é o processo pelo qual ocorre a regulação da expressão gênica sem que haja modificações nas sequências do DNA, ou seja, células que compartilham o mesmo ambiente, possuindo o mesmo genoma, podem apresentar características diferentes (Momparker, 2003). Os processos epigenéticos são herdados através de divisões mitóticas, para que as células-filhas adquiram a informação, e devem ser reversíveis, para que a expressão gênica possa ser alterada (COSTA, 2008). Os mecanismos epigenéticos mais estudados são: metilação do DNA, modificação de histonas e ação dos RNAs não codificantes (ESTELLER, 2008).

Os RNAs não codificantes (ncRNA) mostram-se de fundamental importância para que um organismo tenha uma fisiologia e um desenvolvimento normal, e alterações nesses elementos estão relacionadas com o desenvolvimento de certas doenças, entre elas o câncer (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009). Como representantes desse grupo pode-se destacar uma classe de pequenos ncRNAs, chamados microRNAs (miRNAs) que regulam a expressão de outros genes através da hibridização com seus transcritos correspondentes (SEVIGNANI et al., 2006).

Os miRNAs apresentam de 18-22 nucleotídeos e são transcritos como partes de moléculas de RNA maiores. No núcleo, a RNA polimerase II gera os miRNAs primários (pri-miRNAs), que apresentam uma estrutura de *stem-loop*. Em seguida, uma ribonuclease, DROSHA, origina os miRNAs precursores (pre-miRNAs) (CULLEN, 2004; KIM; KIM, 2007), que são transportados para o citoplasma com o auxílio de uma proteína chamada Exportina-5. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela DICER, e ocorre a liberação do duplex de miRNA. Esse duplex forma um complexo denominado RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA) (MACRAE; ZHOU; DOUDNA, 2007), que auxilia na seleção das fitas, ou seja, uma delas é degradada e a outra segue como fita guia. Esta pode então se ligar a mRNAs alvos específicos através da complementaridade de bases

nucleotídicas, principalmente nas regiões 3' UTR (*untranslated regions*). Essa complementaridade pode ser total, ocasionando desestabilização do mRNA-alvo ou parcial, ocorrendo inibição da tradução; portanto, a ação dos miRNAs está relacionada com silenciamento gênico pós-transcricional (SEVIGNANI et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1- Biogênese de miRNAs. Os miRNAs são transcritos como partes de moléculas de RNA maiores. No núcleo, estas moléculas maiores dão origem aos miRNAs primários (pri-miRNA), através da ação da RNA polimerase II, os quais têm a estrutura de um *stem-loop*, ou seja, um tronco (*stem*), um terminal em forma de alça (*loop*) e segmentos de fita simples (braços) de RNA, sendo um braço 5' e o outro 3'; em seguida, uma ribonuclease específica, chamada DROSHA, dá origem aos miRNAs precursores (pré-miRNA), os quais perdem os dois braços. Estes pre-miRNA são transportados para o citoplasma através de uma enzima chamada exportina e uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é clivado por outra ribonuclease, chamada DICER, próximo a alça para liberação do duplex de miRNA (MACRAE; ZHOU; DOUDNA, 2007). Esse duplex, juntamente com algumas proteínas, forma um complexo denominado RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA). Ocorre uma seleção da fita guia, a qual pode então se ligar a mRNAs alvos específicos através da complementaridade de bases nucleotídicas, principalmente nas regiões 3' UTR (*untranslated regions*); complementaridade essa que pode ser total ou parcial, mas suficiente para ocorrer pareamento. Após isso, ou os processos de tradução são inibidos ou ocorre uma desestabilização do mRNA-alvo; sendo assim, os mRNA-alvos não podem ser traduzidos em suas respectivas proteínas (Adaptado de Esquela-Kerscher & Slack 2006).

Os microRNAs apresentam nomenclaturas específicas, apresentando um prefixo que diz respeito à espécie à que ele pertence (hsa-miR-X para os humanos, por exemplo). Para se referir aos microRNAs maduros, utilizamos a letra R maiúscula (miR); para se referir aos pre-microRNAs, utilizamos a letra r minúscula (mir); essas duas formas são seguidas de um hífen e um número de identificação, por exemplo, miR-X e mir-X, respectivamente (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE; AMBROS, 2001). Além disso, adiciona-se após o número de identificação, a nomenclatura “3p” e “5p”, que diz respeito à fita 3’ e a fita 5’, respectivamente, para que seja possível identificar de qual fita do duplex aquele miRNA se originou. No entanto, essa identificação é mais atual, pois os primeiros miRNAs eram nomeados de forma diferente, ou seja, quando o miRNA era originado da fita 5’, ele não recebia nenhuma identificação após o número (por exemplo, miR-X), e quando ele era originado da fita 3’ ele recebia um asterisco (por exemplo, miR-X*). Alguns pre-miRNAs apresentam várias cópias parálogas no genoma e quando esses pre-miRNAs originam miRNAs maduros com sequências idênticas, utilizamos um número para diferenciá-los, por exemplo, miR-X-1, miR-X-2, miR-X-3. Porém, alguns pre-miRNAs originam miRNAs maduro com sequências não idênticas, mas muito parecidas, sendo, portanto sequências homólogas e nesses casos utilizamos letras minúsculas para diferenciá-los, por exemplo, miR-Xa, miR-Xb, miR-Xc (LAGOS-QUINTANA et al., 2001).

Sabe-se que a maioria dos genes humanos que codificam proteínas, contem pelo menos um sítio de ligação aos miRNAs e levando isso em consideração, pode-se afirmar que a maioria desses genes pode estar sob o controle dessas pequenas moléculas (FRIEDMAN et al., 2009). Segundo a última versão do miRBase (junho de 2014) um banco de dados com informações sobre a sequência e possíveis alvos de miRNAs, existem atualmente um total de 28.645 miRNAs em diferentes espécies, sendo 1.881 descritos em humanos (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Os primeiros dois miRNAs, lin-4 e let-7, foram descobertos em um nematóide, *Caenorhabditis elegans*, e mostraram desempenhar um papel importante no desenvolvimento larval desse organismo (LEE, 1993; REINHART et al., 2000). Desde então, milhares de miRNAs foram encontrados em animais, plantas e vírus, e muitos desses miRNAs de animais foram identificados como conservados evolutivamente (PANG et al., 2009). Dessa forma, muitas evidências mostram que essas moléculas funcionam como reguladores-chave em vários processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação celular, apoptose e desenvolvimento. Portanto, é possível afirmar que a biogênese e a função dos miRNAs devem

ser bem reguladas e a sua desregulação está associada com o desenvolvimento de doenças como o câncer (CALIN; CROCE, 2006; LUJAMBIO, 2012) e essa desregulação tem sido descrita em muitas doenças neurológicas estudadas, incluindo o MB (ESTELLER, 2011).

1.3. microRNAs e Câncer

A primeira evidência que relaciona os miRNAs com neoplasias humanas foi descrita em 2002, em estudos de leucemia linfóide aguda (CALIN et al., 2002). Em seguida foi realizada a primeira pesquisa sistemática para correlacionar loci de miRNAs e regiões genômicas conhecidamente associadas ao câncer (CALIN et al., 2004). Evidenciou-se que 50% dos miRNAs estudados estavam presentes em regiões ligadas ao câncer de pulmão, de mama, de ovário, cólon, gástrico, leucemias e linfomas, entre outros (SEVIGNANI et al., 2006). A partir disso, muitos estudos começaram a ser realizados para se avaliar os níveis de expressão dos miRNAs em tecidos tumorais em comparação com tecidos não tumorais (LIU et al., 2004; LU et al., 2005), sendo encontrados níveis anormais de miRNAs em quase todos os tipos tumorais avaliados (LU et al., 2005; VOLINIA et al., 2006).

Após a primeira descrição de expressão anormal de miRNAs em glioblastomas (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005), o número de estudos descrevendo a desregulação e a função de miRNAs em tumores cerebrais tem crescido (PANG et al., 2009); porém, são mais recentes os relatos da correlação entre os miRNAs e MB, sendo que poucos estudos têm focado sobre o papel dos miRNAs na patogênese desse tumor (TURNER et al., 2010; ZHI et al., 2013).

As evidências que mostram o papel dos miRNAs em MB surgiram em 2008 (PIERSON et al., 2008), em um estudo relatando que a expressão do miR-124 estava diminuída em linhagens celulares e amostras de pacientes com MB em comparação com cerebelos normais. Ainda nesse estudo foi possível identificar que a quinase dependente de ciclina6 (CDK6) seria um possível alvo deste miRNA (PIERSON et al., 2008); CDK6 é um membro da família das serinas-treoninas quinases e está envolvida no controle do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2005). Outro estudo sugere que a baixa expressão do miR-125b, miR-326 e do miR-324-5p em MB está relacionada com a regulação da via de sinalização SHH através de possíveis alvos, como *GLI1* e *SMO*, que estão com expressão aumentada nesses tumores e que são genes ativadores dessa via de sinalização (FERRETTI et al., 2008).

O *cluster* miR-17~92 foi encontrado expresso durante o desenvolvimento cerebelar de ratos e posteriormente, foi observado que esse cluster está com a expressão aumentada em humanos portadores de MB que apresentam uma ativação da via de sinalização SHH/PTCH (UZIEL et al., 2009) através da atividade de *MYCN* (NORTHCOTT et al., 2009).

Outros estudos descrevem diferentes miRNAs no desenvolvimento do MB. O miR-199b-5p está com expressão reduzida em pacientes portadores de MB com metástase. Esse

miRNA apresenta como alvo, o gene *HES1*, um efetor da via de sinalização Notch (GARZIA et al., 2009). Adicionalmente, o miR-128a é também descrito apresentando baixa expressão em MB em comparação com cerebelos normais e sua re-expressão em linhagens celulares de MB induz a diminuição do crescimento celular; regulação essa que ocorre através de seu alvo, *BMII* (VENKATARAMAN et al., 2010), um oncogene que reprime a expressão de *TP16*, aumentando a proliferação celular (MOLOFSKY et al., 2009).

O miR-21 é descrito com expressão aumentada em amostras de MB e tem como alvo a proteína PDCD4, que foi descrita com baixos níveis de expressão nessas mesmas amostras. Adicionalmente, quando esse miRNA é silenciado em linhagens celulares ocorre redução da motilidade e da invasão dessas células (GRUNDER et al., 2011). Da mesma maneira, o miR-182 também apresenta níveis diferentes de expressão em amostras de MB pertencentes ou não ao grupo SHH, sendo que em MBs não-SHH este miRNA têm a expressão significativamente aumentada em comparação com os MB SHH (BAI et al., 2012).

O miR-218 apresenta níveis baixos de expressão em linhagens celulares de MB e essa expressão é inversamente correlacionada com a expressão de *SH3GL1*, gene alvo desse miRNA, que já foi relacionado com a indução do crescimento celular (SHI, 2013). Da mesma maneira, o miR-495 também apresenta níveis baixos em linhagens celulares e amostras de MB e é relacionado com pior prognóstico; e além disso, *GFII* foi encontrado como alvo desse miRNA; um gene relacionado a crescimento e diferenciação em diferentes tipos celulares (WANG et al., 2015).

Observando todos esses trabalhos é possível perceber que os miRNAs agem de formas diferentes de acordo com o estudo realizado; estando com a expressão diminuída em alguns casos e em outros com a expressão aumentada. Além disso, os miRNAs podem modular oncogenes conhecidos ou genes supressores tumorais, ou ainda agindo eles mesmo como oncogenes ou supressores tumorais, sendo conhecidos, nesses casos, como onco-miRs ou miR-s supressores tumorais por terem como alvos diretos, genes envolvidos na diferenciação celular, proliferação, angiogênese, apoptose ou invasão em vários tipos de câncer (CHO, 2007; GARZON et al., 2006; SHENOUDA; ALAHARI, 2009; ZHANG et al., 2007).

2. Resultados Prévios

Nosso grupo realizou um estudo de expressão de miRNAs em MB em larga escala (SCRIDELI, 2014). Para isso, foi extraído o RNA total dos tecidos utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) e a análise do perfil de expressão de miRNAs das amostras foi realizada utilizando-se a plataforma comercial Agilent de microarrays de oligonucleotídeos. Este ensaio de miRNA Agilent integra oito microarranjos individuais em uma única lâmina de vidro. Cada microarranjo inclui 15K de sondas provenientes do banco de dados Sanger miRBase (release 12.0 - <http://www.mirbase.org>). Neste estudo foi utilizado o Kit “Human miRNA Microarray Kit (V3)” (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA, #Cat. G4470C), contendo sequência de 955 microRNAs. A marcação dos miRNAs foi realizada utilizando-se 100 ng de RNA total seguindo as instruções do fabricante. Para a marcação foi utilizado o kit “miRNA Labeling Reagent and Hybridization Kit” (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA, #Cat. 5190-0456), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o RNA foi inicialmente defosforilado utilizando uma fosfatase alcalina “*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*” (GE Healthcare, E2250Y) sendo então ligado a um nucleotídeo fosforilado marcado com Cianina 3 (Cyanine 3-pCp) utilizando uma enzima T4 RNA Ligase (GE Healthcare, #Cat. E2050Y). O RNA marcado foi então purificado utilizando colunas “Micro BioSpin 6” (Bio-Rad, 732-6221) e hibridado às lâminas (Hybridization Gasket Slide Kit, Agilent, #Cat. G2534-60014). Depois de hibridadas, as lâminas foram lavadas com tampões específicos *Wash Buffers* 1 e 2 (Agilent, #Cat. 5188-5327), escaneadas e analisadas para a quantificação dos *spots* utilizando o *software Agilent Feature Extraction* (AFE - version 8.5). A hibridação dos miRNAs foi realizada pela técnica Amélia Goes sob supervisão do Dr Rodrigo Panepucci do Laboratório de Hematologia da FMRP-USP e um relatório de qualidade das hibridações foi gerado para o controle dos experimentos. O processamento de sinal e análise estatística foram realizadas pelo Bioinformata Dr. David Santos Marco Antonio.

Foram analisadas 19 amostras de MBs pediátricos (12 clássicos e 7 desmoplásicos) no momento do diagnóstico, cinco MBs adultos e dois controles de cerebelos humanos não-neoplásicos (um pool de cerebelo não-neoplásico humano, catálogo 540007, Agilent, e uma amostra de cerebelo humano). Para verificação de expressão diferencial foi utilizada a abordagem Bayesiana empírica e, para controlar a taxa de falsos positivos foi utilizado o valor de falsas descobertas (FDR - *False Discovery Rate*) que nos resulta em um valor de $P \leq 0,05$.). O FDR é um método estatístico utilizado em testes de hipóteses múltiplas para corrigir

comparações múltiplas, como é o caso da técnica de microarranjo, e foi considerado significativos $P_{\text{ajustado}} \leq 0,05$.

As diferenças nos valores da expressão gênica foram apresentadas através da razão de mudança ou *Fold Change* (FC), calculada a partir da divisão dos valores medianos da expressão dos genes para cada variável. A clusterização é a classificação não-supervisionada de dados, formando agrupamentos ou clusters. Ela representa uma das principais etapas de processos de análise de clusters. A análise de clusters envolve, portanto, a organização de um conjunto de padrões em clusters, de acordo com alguma medida de similaridade. A clusterização está normalmente associada com a análise exploratória, pois envolve problemas em que há pouca informação acerca dos dados, e poucas hipóteses podem ser sustentadas. Para este estudo foi utilizado uma clusterização (classificação não supervisionada), a partir de análise gerada pelos miRNAs diferencialmente expressos.

Para o estudo dos genes alvos e vias de sinalização foi utilizado o miRWalk, selecionando genes preditos em pelo menos 5 diferentes algoritmos (Diana-microT, miRanda, miRDB, PICTAR, PITA, RNA22, RNAhybrid e Targetscan) e DIANA- mirPath (Programa de predição TargetScan5 e vias de estudo descritas no KEGG Pathways), respectivamente (DWEET; STICHT; GRETZ, 2013; DWEET et al., 2011). Os resultados deste estudo são mostrados abaixo:

2.1 Análise de Meduloblastoma total versus cerebello não neoplásico

Foram observados 22 miRNAs com expressão significativamente reduzida em meduloblastoma quando comparados a tecido cerebelar não neoplásico (Figura 2 e Tabela 1).

Figura 2 - Heatmap mostrando expressão diferencial entre amostras de MB e tecido cerebelar não-neoplásico, utilizando-se análise não supervisionada com p ajustado $\leq 0,05$ e $fold\ change > 3$.

Tabela 1 - Expressão diferencial de miRNAs em MB versus cerebelo não neoplásico e vias preditas in silico.

ID	logFC	Valor de P ajustado	Vias Preditas
hsa-miR-129-5p	-9,9228	0,0180	
hsa-miR-129-1-3p	-9,1777	0,0279	
hsa-miR-31-5p	-8,2604	0,0319	
hsa-miR-219-2-3p	-8,0149	0,0319	
hsa-miR-323a-3p	-7,7634	0,0319	
hsa-miR-539-5p	-7,5229	0,0251	Orientação axonal
hsa-miR-329	-7,0650	0,0319	Via de sinalizaçãoErbB
hsa-miR-487a	-6,9957	0,0224	Via de sinalizaçãoWnt
hsa-miR-376a-5p	-6,6659	0,0319	Via de sinalização MAPK
hsa-miR-154-3p	-6,3578	0,0480	Formação do eixo dorsoventral
hsa-miR-650	-6,1969	0,0005	Via de sinalização TEGF-beta
hsa-miR-433	-5,8674	0,0279	Glioma
hsa-miR-485-5p	-5,7763	0,0319	Via de sinalizaçãoinsulina
hsa-miR-409-5p	-5,5596	0,0319	Via de sinalizaçãomTOR
hsa-miR-369-5p	-5,4299	0,0480	Via de Sinalização Notch
hsa-miR-889	-5,3914	0,0176	
hsa-miR-628-3p	-5,1495	0,0224	
hsa-miR-211-5p	-4,7154	0,0477	
hsa-miR-1185-5p	-4,6509	0,0477	
hsa-miR-411-3p	-4,4978	0,0251	
hsa-miR-29a-5p	-3,6755	0,0458	
hsa-miR-99b-3p	-3,6430	0,0176	

2.2 Análise de Meduloblastoma adulto versus pediátrico

Foram observados 9 miRNAs com expressões significativamente aumentada em MB adultos quando comparados aos pediátricos (Figura 3 e Tabela 2).

Figura 3 - Heat map mostrando expressão diferencial entre amostras de MB pediátrico e adulto, utilizando-se análise não supervisionada com p não ajustado $\leq 0,05$ e $fold\ change > 3$.

Tabela 2 - Expressão diferencial de miRNAs em MB adulto versus pediátrico e vias preditas in silico.

<i>ID</i>	<i>logFC</i>	Valor de P	Vias Preditas
hsa-miR-512-3p	4,5330	0,0103	Via de sinalização Insulina
hsa-miR-513a-5p	4,4863	0,0148	Via de sinalização TGF-beta
hsa-miR-513c-5p	4,4451	0,0180	Via de sinalização ErbB
hsa-miR-513b	4,3945	0,0181	Glioma
hsa-miR-564	4,2956	0,0132	Via de sinalização mTOR
hsa-miR-135a-5p	4,2199	0,0376	Via de sinalização MAPK
hsa-miR-665	4,0645	0,0224	Via de sinalização VEGF
hsa-miR-885-3p	3,9688	0,0012	Via de sinalização SHH
hsa-miR-1226-5p	3,7643	0,0442	

2.3 Análise de Meduloblastoma pediátrico desmoplásico versus clássico

Foram observados 11 miRNAs diferencialmente expressos, 8 com expressão aumentada e 3 com expressão reduzida em MB desmoplásico quando comparados com o clássico (Figura 4 e Tabela 3).

Figura 4 - Heatmap mostrando expressão diferencial entre amostras de MB clássico e desmoplásico, utilizando-se análise não supervisionada com p não ajustado $\leq 0,05$ e $fold\ change > 3$.

Tabela 3 - Expressão diferencial de miRNAs em MB pediátrico desmoplásico versus clássico e vias preditas in silico.

<i>ID</i>	<i>logFC</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Valor de P ajustado</i>	Vias Preditas
hsa-miR-1471	4,3928	0,0136	0,8747	Via de sinalização Insulina
hsa-miR-424-3p	4,2390	0,0215	0,8747	Via de sinalização Wnt
hsa-miR-513a-5p	4,0197	0,0204	0,8747	Via de sinalização mTOR
hsa-miR-202-3p	3,8103	0,0267	0,8747	Orientação axonal
hsa-miR-1300_v13.0	3,7207	0,0448	0,8747	Via de sinalização p53
hsa-miR-557	3,6844	0,0359	0,8747	Via de sinalização MAPK
hsa-miR-199a-5p	3,6830	0,0438	0,8747	Glioma
hsa-miR-550a-5p	3,1261	0,0404	0,8747	Via de sinalização TGF-beta
hsa-miR-331-5p	-3,6945	0,0261	0,8747	Orientação axonal
hsa-miR-129-2-3p	-5,5740	0,0015	0,4355	Via de sinalização Wnt

2.4. Análise de Meduloblastoma pediátrico versus Cerebelo

Foram observados 10 miRNAs com expressão reduzida em meduloblastoma pediátrico quando comparados a tecido cerebelar não neoplásico (Figura 5 e Tabela 4).

Figura 5 - Heat map mostrando expressão diferencial entre amostras de MB pediátrico e cerebelo não-neoplásico utilizando-se análise não supervisionada com p não ajustado $\leq 0,05$ e $fold\ change > 3$.

Tabela 4 - Expressão diferencial de miRNAs em MB pediátrico versus Cerebelo não-neoplásico e vias preditas *in silico*.

<i>ID</i>	<i>logFC</i>	<i>Valor de P</i>	Vias preditas
hsa-miR-129-5p	9,9068	0,0002	
hsa-miR-219-2-3p	8,4488	0,0004	
hsa-miR-383	8,1967	0,0003	Via de sinalização Wnt
hsa-miR-539-5p	7,5344	0,0007	Via de sinalização p53
hsa-miR-485-3p	6,7734	0,0006	Orientação axonal
hsa-miR-889	5,3694	0,0007	Via de sinalização Notch
hsa-miR-628-3p	5,3535	0,0003	Via de sinalização MAPK
hsa-miR-770-5p	5,3251	0,0001	Via de sinalização SHH
hsa-miR-491-5p	4,7113	0,0001	
hsa-miR-99b-3p	3,8056	0,0001	

3. Justificativa

De acordo com os estudos já descritos pode-se observar que os miRNAs desempenham importantes papéis na progressão do MB, podendo agir como supressores tumorais ou como oncogenes. A partir deste trabalho de microarranjo realizado pelo grupo, foram sugeridos miRNAs envolvidos com o MB, sendo importante verificar a associação do nível de expressão de alguns destes com características clínicas buscando identificar possíveis marcadores de prognóstico.

O MB tem sido alvo de investigação na tentativa de melhor caracterizar a instabilidade genômica e as implicações na progressão do câncer. Além desta abordagem, estudos têm buscado marcadores moleculares que se relacionem com o diagnóstico e/ou prognóstico dos pacientes, na investigação de genes alvos que possam ser utilizados na terapia contra o MB. Após alguns anos de estudo, a literatura está repleta de dados de expressão diferencial de miRNAs em tecidos tumorais e sua contraparte não neoplásica. Análises de bioinformática e ensaios funcionais tornam-se essenciais para estabelecer o papel de miRNAs na biogênese, na progressão ou manutenção do câncer. Dessa forma, caracterizar as diferenças de expressão de miRNAs entre células normais e células tumorais permite compreender melhor a patogênese molecular do MB, visto que este é o tumor maligno do sistema nervoso central com maior prevalência em pacientes pediátricos e contribui para uma alta taxa de mortalidade na oncologia pediátrica, visto que mesmo com os tratamentos disponíveis, apenas cerca de 60-70% dos pacientes atingem cinco anos de sobrevida livre de eventos.

Sendo assim, partindo dos miRNAs encontrados diferencialmente expressos no ensaio de microarranjo e com o auxílio de bancos de dados e do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) foi possível analisar quais destes miRNAs possuíam informações sobre alvos genéticos. Somado a isso foi pesquisado dados na literatura que reforçam a importância dos miRNAs identificados no microarranjo, na tumorigênese do MB. Assim sendo, foram escolhidos para validação os miRNAs: miR-31-5p, miR-135a-5p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-211-5p, miR-329, miR-383, miR-433, miR-485-3p, miR-485-5p, miR-491-5p, miR-512-3p, miR-513a-5p, miR-539-5p e miR-650 em amostras de pacientes portadores de MB e linhagens celulares e buscar uma associação com características clínicas e de prognóstico.

A análise molecular do MB possibilitaria uma melhor estratificação, assim como melhores terapias, para que as sequelas do pós-tratamento sejam reduzidas ou até mesmo evitadas (CRAWFORD et al., 2007). Esse estudo pode contribuir para uma melhor compreensão dos processos carcinogênicos e para um melhor entendimento de funções e vias moleculares, consequentemente possibilitando a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

4. Hipótese

Considerando a importância dos miRNAs na regulação da expressão de genes envolvidos na tumorigênese, a hipótese desse trabalho é de que a desregulação dessas pequenas moléculas está associada a diferença de comportamento do meduloblastoma.

5. Objetivos

5.1.Objetivos Gerais

- Validar o perfil de expressão dos miRNAs obtidos no ensaio de microarray em amostras de pacientes portadores de MB e correlacionar com os parâmetros clínicos e biológicos, buscando um possível envolvimento dos miRNAs na tumorigênese.

5.2.Objetivos Específicos

- Descrever miRNAs diferencialmente expressos em MB;
- Validar a expressão dos miRNAs: miR-31-5p, miR-135a-5p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-211-5p, miR-329, miR-383, miR-433, miR-485-3p, miR-485-5p, miR-491-5p, miR-512-3p, miR-513a-5p, miR-539-5p e miR-650 em amostras de pacientes portadores de MB e linhagens celulares de MB;
- Correlacionar os níveis de expressão dos miRNAs selecionados às características clínicas dos pacientes;
- Identificar possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico.

6. Desenho do Estudo

7. Materiais e Métodos

7.1. Pacientes e linhagens celulares

As amostras utilizadas são provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e Centro Infantil Boldrini - Campinas/SP. Foram utilizadas amostras de 49 pacientes portadores de MB pediátrico, 2 amostras de MB adulto, 7 cerebelos não neoplásicos e 10 cerebelos não neoplásicos fetais, e 4 linhagens celulares de MB: DAOY, ONS-76, UW402 e UW473 (Cujas descrições citogenéticas e moleculares estão apresentadas no APÊNDICE 1). Os dados referentes aos pacientes são mostrados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Dados Clínicos dos Pacientes portadores de MB (continua)

ID Lab	Hosp.	Prot.	Gên.	Idade Diag.	Grau Ressec.	Met.	Risco	Recid.	Hist.	Evento Recidiva/Óbito	Status Doença	Tempo Evento (Meses)	Tempo Óbito (Meses)
100	1	3	1	2	2	1	2	2	1	2	2	10	10
194	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	26	26
323	1	3	2	1	1	1	1	2	1	2	2	29	29
426	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	145	145
449	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	2	51	51
467	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	8	8
483	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	46	46
561	1	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	4	4
761	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	95	95
776	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	87	87
797	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	168	168
899	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	50	53
915	1	3	2	1	1	2	2	1	1	2	2	11	11
952	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	32	32
1073	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	103	103
1218	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	24	31
1270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	79	79
1357	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	76	76
1362	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75	75
1474	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	74	74
1601	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	66	66
1877	1	3	2	1	1	1	1	2	2	2	3	0	0
2045	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	56	56
2113	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	16	18
2166	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	3	0	8
9102	2	3	1	1	2	1	2	1	1	2	3	1	1
64402	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	156	156
65002	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	3	6	6
67002	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	18	18

76002	2	3	1	1	2	2	2	1	1	2	2	5	5
79803	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	144	144
35504	2	3	1	1	1	2	2	1	1	2	2	49	49
43504	2	2	1	1	2	1	2	1	1	2	3	0	0
75304	2	2	1	1	SD	1	SD	1	1	1	1	66	66
8305	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	13	21
49405	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	53	53
54005	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	81	81
44306	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	108	108
51406	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	106	106
79906	2	2	1	1	SD	1		2	2	2	2	7	38
4407	2	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2
44507	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	57	94
73507	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	96	96
58608	2	3	2	2	1	1	2	1	1	2	3	16	16
84408	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	48	61
24509	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	76	76
31010	2	2	SD	1	1	1	1	1	1	1	1	24	24
6611	2	3	1	1	2	1	2	1	1	2	3	41	41
22211	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	52	52
25011	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	3	2	2
31811	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	48	48

Legenda: Hosp: Hospital: 1- HC, 2 – Boldrini. **Prot: Protocolo:** 1- CCNU/ Cisplatina/ Vincristina + Radioterapia, 2- Carboplatina/ Ifosfamida/ Vincristina/ Etoposido + Radioterapia, 3- outros protocolos. **Gen: Gênero:** 1-Feminino, 2-Masculino. **Idade Diag: Idade Diagnóstico:** 1< 3anos, 2> 3anos. **Grau Ressec: Grau Ressecção:** 1- Completo, 2- Incompleto. **Met: Metástase:** 1-Ausência (M0), 2-Presença (M1-M4). **Risco:** 1-Baixo Risco, 2- Alto Risco. **Recid: Recidiva:** 1- Ausência, 2- Presença. **Hist: Histologia:** 1- Outros (Clássicos, Extensamente Nodular ou Grandes células anaplásicos), 2- Desmoplásico. **Evento:** 1-Vivo, 2-Recidiva/Óbito. **Status Doença:** 1-Vivo, 2- Morte por MB, 3- Morte por outras causas. SD – Sem dados disponíveis.

Tabela 6 - Dados Clínicos dos pacientes doadores dos cerebelos não-neoplásicos

	ID Lab	Gênero	Idade	Causa Óbito
Cerebelos Não Neoplásicos	CC5	2	17 dias	Cardiopatía congênita complexa
	CC7	2	7 anos	Broncopneumonia supurativa bilateral
	CC8	2	1 mês	Defeito septo átrio-ventricular
	CC11	1	6 meses	Epidermólise Bolhosa
	CC12	1	1 ano	Infecção Intestinal Grave
	CC13	1	13anos	Linfoma de não-hodgin alto grau
	CC15	1	31 anos	Esofagite Aguda Hemorrágica
Cerebelos Não Neoplásicos Fetais	CN1	2	37 semanas	Agnesia Renal Bilateral
	CN2	2	39 semanas	Hidropsia
	CN3	SD	22 semanas	Não malformação e não aneuploidia
	CN4	2	31 semanas	Não malformação e não aneuploidia
	CN5	SD	36 semanas	Não malformação e não aneuploidia
	CN6	2	24 semanas	Não malformação e não aneuploidia
	CN7	SD	30 semanas	Cardiopatía
	CN8	2	26 semanas	Não malformação e não aneuploidia
	CN9	SD	SD	SD
	CN10	SD	SD	SD

Legenda: Gênero: 1-Feminino; 2-Masculino. SD – Sem dados disponíveis.

Após a coleta, as amostras foram identificadas, microdissecadas e armazenadas em nitrogênio líquido no banco de tumores do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP, o qual possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processos nº 9373/2003; 9374/2003 e 9375/2003) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (processo nº 1.75-050809). O diagnóstico foi confirmado pelo Departamento de Patologia da FMRP/USP e do Centro Infantil Boldrini e após essa confirmação o RNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2. Todas as amostras foram coletadas com participação voluntária do paciente ou responsável, atestada em termo de consentimento (ANEXO 1) e aprovada por comitê de ética (ANEXO 2). Este projeto faz parte do Auxílio Regular FAPESP (processo nº. 2010/07020-9) intitulado “*Estudos moleculares em neoplasias da criança e do adolescente: Assinatura de microRNAs e estudos funcionais de genes candidatos a terapia alvo*”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (processo nº. 8380/2010).

7.2.Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras de pacientes, os cerebelos não neoplásicos e as linhagens celulares de MB tiveram seu RNA total extraído utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) segundo as especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando *primers* específicos para cada miRNA avaliado.

7.3.Validação das Amostras por RT-qPCR

O nível de expressão dos miRNAs pré-selecionados e dos miRNAs controles endógenos (*RNU6B* e *RNU19*) foram quantificados através da técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Todas as reações foram realizadas no aparelho Quant Studio 12K (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sondas TaqMan[®] para os miRNAs foram adquiridas pelo sistema *on-demand* da Applied Biosystems (Tabela 7). O volume final para cada reação foi de 10µL, sendo 4,5µL da amostra investigada (diluída 1/10), 5µL de Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,5µL de cada sonda utilizada. Cada amostra de paciente foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$). Este estudo utilizou o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do miRNA alvo em relação a uma amostra referência (a média dos CTs dos cerebelos não neoplásicos). Portanto a quantificação do miRNA alvo normalizado com os genes endógenos (*RNU6B* e *RNU19*) e em relação ao calibrador foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo C_t o ciclo em que o nível de fluorescência alcança um limiar pré-estabelecido (*threshold*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 7 - Descrição das sondas utilizadas adquiridos da Companhia Life Technologies - Applied Biosystems

ID	#Cat	Assay ID
hsa-miR-31-5p	#4427975	002279
hsa-miR-135a-5p	#4427975	000460
hsa-miR-199a-5p	#4427975	000498
hsa-miR-202-3p	#4427975	002363
hsa-miR-211-5p	#4427975	000514
hsa-miR-329	#4427975	001101
hsa-miR-383	#4427975	000573
hsa-miR-433	#4427975	001028
hsa-miR-485-3p	#4427975	001277
hsa-miR-485-5p	#4427975	001036
hsa-miR-491-5p	#4427975	001630
hsa-miR-512-3p	#4427975	001823
hsa-miR-513a-5p	#4427975	002090
hsa-miR-539-5p	#4427975	001286
hsa-miR-650	#4427975	001603
RNU6B	#4427975	001093
RNU19	#4427975	001003

Legenda: ID: Identificação; # Cat: Número do catálogo.

7.4. Estudo de possíveis alvos preditos e relação com vias de desenvolvimento do MB

Para estudar os genes alvos preditos dos 15 miRNAs e relacioná-los com alterações de vias moleculares clássicas observadas em meduloblastoma foi utilizado o miRWalk 2.0, e foram selecionados como prováveis alvos aqueles genes presentes em pelo menos 5 diferentes bases de dados das 8 incluídas para essa busca (miRWalk, Miranda, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22, RNAhybrid e Targetscan) (DWEET et al., 2011). Sendo assim, a partir da descrição das vias de desenvolvimento clássicas presentes em MB e de acordo com a divisão molecular desse tumor em WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4 (NORTHCOTT et al., 2011; TAYLOR et al., 2012), foi feita uma busca por alvos preditos dos 15 miRNAs estudados, que tivessem alguma relação com essas vias de desenvolvimento.

8. Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa SPSS 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) considerando os resultados significativos valores de $p \leq 0,05$. Para a análise da comparação da expressão dos miRNAs entre as diferentes amostras estudadas (tumores, cerebelos não neoplásicos, cerebelos fetais não neoplásicos e linhagens celulares) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis; para a análise das expressões dos miRNAs em relação às características clínicas dos pacientes, foi utilizado o teste de Mann-Whitney; e para análise da sobrevida global em 5 anos e sobrevida livre de eventos em 5 anos dos pacientes foi realizada a análise univariada onde foi aplicado o teste Log-Rank e construídas curvas de Kaplan-Meier, além de análises multivariadas utilizando a Regressão de Cox, para os quais foi considerada a mediana de expressão de cada microRNA nos tumores como valor de corte para hipoexpressão ou hiperexpressão. Também foi analisada a Sobrevida Livre de Eventos (com recidiva ou óbito como evento desfavorável) e Sobrevida Global (com óbito por qualquer causa como evento desfavorável). Para todos os testes foram consideradas as variáveis: Hospital (HC ou Boldrini), Protocolo Tratamento (CCNU/ Cisplatina/ Vincristina + Radioterapia ou Carboplatina/ Ifosfamida/ Vincristina/ Etoposido + Radioterapia ou outros protocolos), Gênero (Feminino ou Masculino); Idade ao diagnóstico (Maiores de 3 anos ou menores de 3 anos); Grau de Ressecção (Completa ou Incompleta); Metástase (Presente – M1 à M4 - ou Ausente – M0); Risco (Alto risco ou Baixo risco), Recidiva (Presente ou Ausente), Histologia (Desmoplásico ou outros), Evento (se o paciente está vivo ou se foi à óbito/apresentou recidiva), Status da Doença (se o paciente está vivo, se foi à óbito por MB ou se foi à óbito por outras causas).

9. Resultados

9.1. Expressão de microRNAs em amostras de MB

Para investigar o papel dos 15 miRNAs escolhidos em MB, os níveis de expressão foram avaliados por RT-qPCR em amostras de pacientes portadores de MB, nas linhagens celulares e em cerebros não neoplásicos. Utilizando o teste de Kruskal-Wallis e considerando como significativos os valores de $P \leq 0,05$; foi possível observar que 13 dos 15 miRNAs analisados apresentaram diferenças significativas, quando comparados os seguintes grupos: Cerebelo Fetal não neoplásico (CF), Cerebelo não neoplásico (CB), Tumores (TU) e Linhagens Celulares (LIN). São eles: miR-31-5p, -135a-5p, 199a-5p, -202-3p, -211-5p, -329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, -491-5p, -512-5p e 539-5p, sendo que o miR-513a-5p e o miR-650 não apresentaram dados significativos (Figura 6A-O).

Figura 6. Expressão Relativa de miRNAs. Através da técnica de RT-qPCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão dos miRNAs quando comparados com Cerebelo Fetal (CF; N=10), Cerebelo Não-Fetal (CB; N=7), Tumores (TU; N=51) e Linhagens Celulares (LIN; N=4). Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$, obtidos através do teste de Kruskal-Wallis. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

Ao realizar o teste de Mann-Whitney para comparar as expressões entre TU *versus* CB, TU *versus* CF, TU *versus* LIN, LIN *versus* CB, LIN *versus* CF e CB *versus* CF, foi possível observar os valores de *fold change*, que diz respeito à maior ou menor expressão de cada miRNA em cada grupo avaliado em relação a outro (Tabela 8 e 9).

Dessa forma, o miR-31-5p se mostrou hipoexpresso nos tumores em relação à CB (P=0,000). O miR-199a-5p está hiperexpresso nos tumores em relação aos CB (P=0,002). O miR-202-3p está hipoexpresso nos tumores apenas em relação à CF (P=0,018). O miR-650 está hipoexpresso apenas em relação à CF (P=0,009). Para o miR-513a-5p não foi possível calcular o *fold change*, visto que os valores das medianas foram zero, e além disso não houve nenhum valor significativo. Os miR-135a-5p e miR-211-5p não apresentaram dados significativos de expressão nos tumores com relação aos cerebelos fetais e não fetais (Tabela 8). Para os outros miRNAs foi possível observar um padrão nas expressões quando se compara TU, CB e CF; com todos os valores sendo significativos. Sendo assim, os miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, 491-5p, -512-3p e -539-5p estão todos hipoexpressos nos tumores em relação à CB e à CF (Tabela 9).

Com relação às linhagens, o miR-135a-5p (P=0,001), o miR-211-5p (0,002), o miR-383 (P=0,020) e o miR-491-5p (P=0,003) estão hipoexpressos nas linhagens em relação aos tumores. Adicionalmente, estão hipoexpressos nas linhagens em relação à CB e à CF os miRNAs: miR-135a-5p (P=0,008 e P=0,005), miR-202-3p (P=0,008 e P=0,024), miR-211-5p (P=0,008 e P=0,004), miR-329 (P=0,008 e P=0,004), miR-383 (P=0,007 e P=0,004), miR-433 (P=0,008 e P=0,006), miR-485-5p (P=0,008 e P=0,005), miR-491-5p (P=0,008 e P=0,005), miR-512-3p (P=0,017 e P=0,009) e miR-539 (P=0,008 e P=0,005). O miR-485-3p (P=0,008) está hipoexpresso nas linhagens apenas em relação à CB e o miR-650 (P=0,034) está hipoexpresso nas linhagens apenas em relação à CF (Tabela 8 e 9).

Comparando as expressões entre os cerebelos CB *versus* CF, o miR-31-5p está hiperexpresso no CB em relação à CF (P=0,005), enquanto os miR-135a-5p (p=0,015) e miR-199a-5p (P=0,022) estão hipoexpressos no CB em relação à CF (Tabela 8 e 9).

Tabela 8 - Relação de fold change e valores de P para cada microRNA analisados pelo teste de Mann-Whitney (continua).

miRNA	<i>Fold Change</i>	Valor de P
miR-31-5p		
TU X CB	-12,6	0,000
TU X CF	-1,33	0,136
TU x LIN	-48,83	0,202
LIN X CB	+3,85	0,636
LIN X CF	+36,62	0,355
CB X CF	+9,5	0,005
miR-135a-5p		
TU X CB	+5,63	0,079
TU X CF	-1,14	0,316
TU x LIN	+710	0,001
LIN X CB	-126	0,008
LIN X CF	-812	0,005
CB X CF	-6,44	0,015
miR-199a-5p		
TU X CB	NR	0,002
TU X CF	-1,68	1,000
TU x LIN	NR	0,082
LIN X CB	NR	0,827
LIN X CF	NR	0,193
CB X CF	NR	0,022
miR-202-3p		
TU X CB	+1,56	0,981
TU X CF	-5,17	0,018
TU x LIN	+2,77	0,065
LIN X CB	-1,77	0,008
LIN X CF	-14,36	0,024
CB X CF	-8,08	0,079
miR-211-5p		
TU X CB	-1,19	0,452
TU X CF	+2,74	0,539
TU x LIN	NR	0,002
LIN X CB	NR	0,008
LIN X CF	NR	0,004
CB X CF	+3,26	0,118

miR-513a-5p		
TU X CB	NR	0,730
TU X CF	NR	0,400
TU x LIN	NR	0,365
LIN X CB	NR	0,450
LIN X CF	NR	0,238
CB X CF	NR	0,431
miR-650		
TU X CB	+1,11	0,625
TU X CF	-8,3	0,009
TU x LIN	-1,08	0,833
LIN X CB	+1,2	1,000
LIN X CF	-7,69	0,034
CB X CF	-9,22	0,079

NR= Não foi possível realizar devido ao valor da mediana ser zero.

Tabela 9 - Relação de fold change e valores de P para cada microRNA analisados pelo teste de Mann-Whitney (continua).

miRNA	<i>Fold Change</i>	Valor de P
miR-329		
TU X CB	-28	0,000
TU X CF	-20	0,000
TU x LIN	NR	0,227
LIN X CB	NR	0,008
LIN X CF	NR	0,004
CB X CF	+1,4	0,626
miR-383		
TU X CB	-77	0,000
TU X CF	-98,5	0,000
TU x LIN	NR	0,020
LIN X CB	NR	0,007
LIN X CF	NR	0,004
CB X CF	-1,28	0,625
miR-433		
TU X CB	-21,25	0,001
TU X CF	-2,05	0,000
TU x LIN	+1,14	0,444
LIN X CB	-24,28	0,008
LIN X CF	-11,85	0,006
CB X CF	+2,05	0,495
miR-483-3p		
TU X CB	-26	0,001
TU X CF	-18,33	0,000
TU x LIN	-5,33	0,909
LIN X CB	-4,87	0,008
LIN X CF	-3,43	0,066
CB X CF	+1,41	0,464
miR-485-5p		
TU X CB	-20,25	0,003
TU X CF	-15,12	0,000
TU x LIN	1	0,414
LIN X CB	-20,25	0,008
LIN X CF	-15,12	0,005
CB X CF	+1,34	0,558

miR-491-5p		
TU X CB	-3,12	0,022
TU X CF	-2,00	0,025
TU x LIN	+6,25	0,003
LIN X CB	-19,5	0,008
LIN X CF	-12,5	0,005
CB X CF	+1,56	0,435
miR-512-3p		
TU X CB	-34	0,003
TU X CF	-60,6	0,000
TU x LIN	NR	0,068
LIN X CB	NR	0,017
LIN X CF	NR	0,009
CB X CF	-1,78	0,107
miR-539		
TU X CB	-21,5	0,002
TU X CF	-16,12	0,000
TU x LIN	+1,6	0,266
LIN X CB	-34,4	0,008
LIN X CF	-25,8	0,005
CB X CF	+1,33	0,626

NR= Não foi possível realizar devido ao valor da mediana ser zero.

Nas tabelas 10 e 11 pode-se observar os dados obtidos após a realização da validação por qRT-PCR referente aos valores de mediana, valores mínimo e máximo da expressão relativados miRNAs validados.

Tabela 10 - Valores de mediana, mínimo e máximo da expressão relativa dos miRNAs validados das amostras de Cerebelo Fetal Não Neoplásico (CF), Cerebelo Não Neoplásico (CB), Tumores (TU) e Linhagens celulares (LIN).

	31-5p	135a-5p	199a-5p	202-3p	211-5p	329	383
CF							
Mediana	0,040	4,060	2,905	2,585	0,230	0,600	0,985
Mínimo	0,02	0,70	0,00	0,06	0,09	0,17	0,31
Máximo	2,51	169,78	64,74	42,42	21,40	53,04	79,89
CB							
Mediana	0,380	0,630	0,000	0,320	0,750	0,840	0,770
Mínimo	0,06	0,36	0,00	0,24	0,32	0,22	0,47
Máximo	9,46	23,38	0,93	635,03	10,89	8,00	4,69
TU							
Mediana	0,030	3,550	1,730	0,500	0,630	0,0300	0,010
Mínimo	0,00	0,04	0,00	0,07	0,01	0,00	0,00
Máximo	3,25	56,48	335,79	34,42	40,17	1,75	1,61
LIN							
Mediana	1,4650	0,005	0,000	0,180	0,000	0,000	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00
Máximo	8,97	0,01	5,44	0,20	0,01	0,06	0,00
Valor de P	0,002	0,001	0,010	0,019	0,006	0,000	0,000

Tabela 11 - Valores de mediana, mínimo e máximo da expressão relativa dos miRNAs validados das amostras de Cerebelo Fetal Não Neoplásico (CF), Cerebelo Não Neoplásico (CB), Tumores (TU) e Linhagens celulares (LIN).

	433	485-3p	485-5p	491-5p	512-3p	513a-5p	539	650
CF								
Mediana	0,415	0,550	0,605	0,500	1,820	0,000	0,645	4,150
Mínimo	0,15	0,16	0,25	0,25	0,00	0,00	0,17	0,09
Máximo	142,75	37,01	73,85	29,23	393,11	24,28	73,23	84,77
CB								
Mediana	0,850	0,780	0,810	0,780	1,020	0,000	0,860	0,450
Mínimo	0,25	0,39	0,36	0,37	0,00	0,00	0,29	0,28
Máximo	5,25	4,66	7,27	10,73	5,66	0,52	3,32	69,96
TU								
Mediana	0,040	0,030	0,040	0,250	0,030	0,000	0,040	0,500
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,08
Máximo	4,10	2,25	2,53	2,80	8,08	71,35	3,09	26,20
LIN								
Mediana	0,035	0,160	0,040	0,040	0,000	0,000	0,025	0,540
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,37
Máximo	0,15	0,36	0,18	0,06	0,00	0,00	0,04	0,87
Valor P	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,596	0,000	0,054

Comparando os resultados obtidos aqui com aqueles encontrados no ensaio de microarranjo, podemos observar que os miRNAs identificados como hipoexpressos nos tumores em relação aos cerebelos no primeiro estudo também se mostraram hipoexpressos pela análise de RT-qPCR.

9.2. Análise dos níveis de expressão entre os subgrupos desmoplásico e outros

Para analisar a expressão diferencial dos miRNAs entre os subgrupos histológicos desmoplásico e outros subtipos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de $P \leq 0,05$. Das 51 amostras de MB avaliadas, 8 foram classificadas como desmoplásicas e 43 foram classificadas como outras, podendo pertencer aos subtipos clássicos, extensamente nodular ou de grandes células anaplásicas (Tabela 5). Dessa forma, o miR-135a-5p ($P=0,028$) está hiperexpresso nas amostras classificadas como outras quando comparadas com as desmoplásicas (Figura 7A). Os valores de *Fold Change*, Valor de P, Medianas e valores mínimos e máximos estão representados na Figura 7B.

Figura 7A. Expressão Relativa do miR-135a-5p entre os subtipos histológicos. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-135a-5p ($P=0,028$) quando se compara amostras pertencentes ao subtipo histológico clássico, extensamente nodular ou de grandes células anaplásicas (N=43) e aquelas pertencentes ao subtipo histológico desmoplásico (N=8). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-135a-5p.

Os miRNAs 199a-5p ($P=0,062$) e miR-202-3p ($P=0,437$) apesar de não terem apresentado valores significativos na análise por RT-qPCR, também se mostraram hipoexpressos nas amostras clássicas, extensamente nodular e grandes células anaplásicas quando comparadas as desmoplásicas, indo de acordo com o que foi encontrado no ensaio de microarranjo (Figura 8A e 8B e 9A e 9B, respectivamente).

Figura 8A. Expressão Relativa do miR-199a-5p entre os subtipos histológicos. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes de expressão do miR-199a-5p ($P=0,062$), apesar de não ser significativo, quando se compara amostras pertencentes aos subtipos histológicos clássico, extensamente nodular e grandes células anaplásicas ($N=43$) e aquelas pertencentes ao subtipo histológico desmoplásico ($N=8$). As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-199a-5p.

B.

Outras (N=43)	
Mediana	0,50
Mínimo	0,07
Máximo	34,42
Desmoplásico (N=8)	
Mediana	0,775
Mínimo	0,14
Máximo	18,07
<i>Fold Change</i> (Outras x Desmoplásico)	-1,55
Valor de P	0,437

Figura 9A. Expressão Relativa do miR-202-3p entre os subtipos histológicos. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes de expressão do miR-202-3p (0,437), apesar de não ser significativo, quando se compara amostras pertencentes aos subtipos histológicos clássico, extensamente nodular e grandes células anaplásicas (N=43) e aquelas pertencentes ao subtipo histológico desmoplásico (N=8). As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-202-3p.

9.3. Análise dos níveis de expressão entre as amostras de adulto e as amostras pediátricas.

Para analisar a expressão diferencial dos miRNAs com relação à idade dos pacientes foi utilizado o teste de Mann-Whitney e foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de $P \leq 0,05$. Para o ensaio de microanrranjo foram utilizadas 5 amostras de adultos, das quais apenas 2 foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR devido a disponibilidade do RNA dessas amostras. Sendo assim, a comparação das expressões de 49 amostras de crianças *versus* 2 amostras de adultos não demonstraram valores significativos, além de não ser um número amostral fidedigno para que se estabeleça essa comparação.

9.4. Análise dos níveis de expressão e as características clínicas dos pacientes

Para análise da expressão diferencial dos miRNAs com as características clínicas dos pacientes foi utilizado o teste de Mann-Whitney e foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de $P \leq 0,05$. Sendo assim, as variáveis analisadas foram: Hospital (HC ou Boldrini); Gênero (Feminino ou Masculino); Idade ao diagnóstico (Maiores de 3 anos ou menores de 3 anos); Grau de Ressecção (Completa ou Incompleta); Metástase (Presente ou Ausente); Risco (Alto Risco ou Baixo Risco); Recidiva (Presente ou Ausente), Evento (se o paciente está vivo ou se foi a óbito/apresentou recidiva) e Evento da Doença (se o paciente está vivo ou se morreu por MB). Para a variável Protocolo de Tratamento foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. É importante ressaltar que e os protocolos de tratamento utilizados foram diferentes no HCFMRP-USP (CCNU/ Cisplatina/ Vincristina + Radioterapia) e Centro Boldrini (Carboplatina/ Ifosfamida/ Vincristina/ Etoposido + Radioterapia). Alguns pacientes receberam ainda protocolos diferentes dos descritos acima e foram referidos como “outros”.

Foram considerados como alto risco pacientes com idade menor ou igual a 3 anos, tumor residual maior ou igual 1,5 cm ou presença de metástases (estágios M1 – M4). Para metástases foi considerado o sistema de estadiamento de Chang para meduloblastoma, sendo M0 – ausência de metástases; M1 - presença de células tumorais microscópicas encontradas no líquido cefalorraquidiano; M2- presença de nódulos grosseiros detectado no espaço subaracnóideo cerebelar-cerebral, terceiro ventrículo ou ventrículos laterais; M3 – presença de

nódulos grosseiros no espaço subaracnóide espinhal e M4- metástase extra neuroaxial (PACKER et al., 2010).

Ao analisar a variável Idade ao Diagnóstico, 2 miRNAs se mostraram diferencialmente expressos: o miR-199a-5p (P=0,018) e o miR-329 (P=0,037); ou seja, aqueles pacientes com menos de 3 anos de idade expressam menos esses miRNAs quando comparados aos pacientes que tem mais de 3 anos de idade (Figuras 10A, 10B e 11A, 11B).

Figura 10A. Expressão Relativa do miR-199a-5p com relação a idade ao diagnóstico. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-199a-5p (P=0,018) quando se compara pacientes com menos de 3 anos de idade (N=43) e pacientes com mais de 3 anos de idade (N=8). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-199a-5p.

Figura 11A. Expressão Relativa do miR-329 com relação a idade ao diagnóstico. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-329 ($P=0,037$) quando se compara pacientes com menos de 3 anos de idade ($N=43$) e pacientes com mais de 3 anos de idade ($N=8$). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-329.

Para a variável Grau de Ressecção, 4 miRNAs se mostraram diferencialmente expressos: o miR-202-3p ($P=0,006$), o miR-329 ($P=0,045$), o miR-491-5p ($P=0,026$) e o miR-512-3p ($P=0,008$); ou seja, os pacientes que apresentaram grau de ressecção completo apresentaram menor expressão desses miRNAs quando comparados com os pacientes que apresentaram grau incompleto (Figuras 12A e 12B, 13A e 13B, 14A e 14B, 15A e 15B).

Figura 12A. Expressão Relativa do miR-202-3p com relação ao grau de ressecção. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-202-3p ($P=0,006$) quando se compara pacientes com grau de ressecção completo ($N=33$) e pacientes com grau de ressecção incompleto ($N=16$). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-202-3p.

Figura 13A. Expressão Relativa do miR-329 com relação ao grau de ressecção. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-329 (P=0,045) quando se compara pacientes com grau de ressecção completo (N=33) e pacientes com grau de ressecção incompleto (N=16). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-329. NR=Não foi possível realizar.

Figura 14A. Expressão Relativa do miR-491-5p com relação ao grau de ressecção. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-491-5p (P=0,026) quando se compara pacientes com grau de ressecção completo (N=33) e pacientes com grau de ressecção incompleto (N=16). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-491-5p.

Figura 15A. Expressão Relativa do miR-512-3p com relação ao grau de ressecção. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-512-3p ($P=0,008$) quando se compara pacientes com grau de ressecção completo ($N=33$) e pacientes com grau de ressecção incompleto ($N=16$). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-512-3p. NR=Não foi possível realizar.

Para a variável Risco, 2 miRNAs se mostraram diferencialmente expressos: o miR-202-3p ($P=0,041$) e o miR-512-3p ($P=0,036$); ou seja, os pacientes classificados como baixo risco expressam menos esses miRNAs em comparação com os pacientes classificados como alto risco (Figuras 16A e 16B, 17A e 17B).

As variáveis Hospital, Gênero, Metástase, Recidiva, Evento e Evento da Doença não apresentaram nenhum miRNA diferencialmente expresso estatisticamente significativo.

Figura 16A. Expressão Relativa do miR-202-3p com relação ao risco. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-202-3p ($P=0,041$) quando se compara pacientes classificados como baixo risco ($N=22$) e pacientes classificados como alto risco ($N=27$). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-202-3p.

B.

Baixo Risco (N=22)	
Mediana	0,000
Mínimo	0,00
Máximo	1,81
Alto Risco (N=27)	
Mediana	0,110
Mínimo	0,00
Máximo	8,08
Fold Change	
(Baixo risco x Alto risco)	NR
Valor de P	0,036

Figura 17A. Expressão Relativa do miR-512-3p com relação ao risco. Através da técnica de qRT-PCR foram encontrados níveis diferentes significativos de expressão do miR-512-3p (P=0,036) quando se compara pacientes classificados como baixo risco (N=22) e pacientes classificados como alto risco (N=27). Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$, obtidos pelo teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística. **B.** Quadro demonstrando os valores das medianas, mínimo e máximo, assim como os valores de *Fold Change* e valor de P para o miR-512-3p. NR=Não foi possível realizar.

9.5. Análise dos níveis de expressão e a Sobrevida Livre de Eventos e Global dos pacientes

Para relacionar os dados clínicos dos pacientes e as expressões dos miRNAs com a sobrevida dos mesmos foi realizada uma análise pelo teste Log Rank, a partir do qual foram construídas curvas de Kaplan-Meier, em que foi considerada a mediana de cada variável como valor de corte para hipoexpressão ou hiperexpressão (Tabela 12).

Tabela 12 - Sobrevida livre de eventos e Sobrevida Global entre hipoexpressos e hiperexpressos.

	Sobrevida Livre de Eventos	Sobrevida Global
Hospital	47,4±10,1 <i>versus</i> 48,9±0,0 (P=0,796)	47,4±10,1 <i>versus</i> 40,7±10,8(P=0,837)
Gênero	50,4±8,9 <i>versus</i> 41,2±11,9 (P=0,511)	49,8±9,0 <i>versus</i> 41,2±11,9 (P=0,434)
Idade Diag.	52,5±7,8 <i>versus</i> 25,0±15,3 (P=0,297)	51,7±7,9 <i>versus</i> 25,0,1±15,3 (P=0,208)
Grau Ressec	58,8±8,8 <i>versus</i> 25,0±10,8 (P=0,005)	58,2±9,0<i>versus</i> 25,0±10,8 (P=0,006)
Metástase	54,7±8,2 <i>versus</i> 25,6±13,8 (P=0,066)	54,3±8,2 <i>versus</i> 25,6±13,8 (P=0,053)
Risco	71,8,1±9,8<i>versus</i>27,8±9,0 (P=0,002)	71,1±10,0<i>versus</i>27,8±9,0 (P=0,002)
Histologia	47,8±7,7 <i>versus</i> 50,0±17,7 (P=0,919)	47,5±7,8 <i>versus</i> 50,0±17,7 (P=0,965)
Protocolos	62,3±11,3<i>versus</i>61,5±10,7<i>versus</i> 0,00±0,00 (P=0,000)	62,3±11,3<i>versus</i> 59,7±11,3<i>versus</i> 0,00±0,00 (P=0,000)
miR-31-5p	39,3±9,9 <i>versus</i> 56,5±9,9 (P=0,277)	37,8±10,2 <i>versus</i> 56,3±10,6 (P=0,295)
miR-135a-5p	44,0±9,9 <i>versus</i> 52,1±10,1 (P=0,439)	43,2±10,1 <i>versus</i> 52,1±10,1 (P=0,448)
miR-199a-5p	52,0±10,0 <i>versus</i> 43,8±10,1(P=0,587)	52,0±10,0 <i>versus</i> 42,8±10,3 (P=0,561)
miR-202-3p	44,0±9,9 <i>versus</i> 52,0±10,1 (P=0,609)	44,0±9,9 <i>versus</i> 51,3±10,3 (P=0,679)
miR-211-5p	32,0±9,3<i>versus</i> 63,9±9,7 (P=0,016)	30,9±9,5<i>versus</i> 63,5±9,8 (P=0,021)
miR-329	50,8±10,2 <i>versus</i> 45,1±9,9 (P=0,721)	50,3±10,3 <i>versus</i> 44,4±10,0 (P=0,793)
miR-383	46,4±10,3 <i>versus</i> 49,5±9,9 (P=0,808)	44,8±10,6 <i>versus</i> 40,0±10,4 (P=0,909)
miR-433	42,5±10,2 <i>versus</i> 52,9±9,9 (P=0,385)	42,0±10,3 <i>versus</i> 52,8±9,9 (P=0,345)
miR-485-3p	50,8±10,2 <i>versus</i> 45,1±9,9 (P=0,709)	50,3±10,3 <i>versus</i> 44,8±9,9 (P=0,847)
miR-485-5p	50,8±10,2 <i>versus</i> 45,1±9,9 (P=0,684)	50,3±10,3 <i>versus</i> 44,8±9,9 (P=0,822)
miR-491-5p	43,1±10,1 <i>versus</i> 53,0±9,9 (P=0,803)	42,1±10,3 <i>versus</i> 52,8±10,0 (P=0,820)
miR-512-3p	58,2±10,2<i>versus</i> 38,1±9,6 (P=0,038)	57,7±10,3<i>versus</i> 38,1±9,6 (P=0,031)
miR-513a-5p	53,9±10,9 <i>versus</i> 37,7±11,1(P=0,073)	53,7±11,0 <i>versus</i> 35,9±11,2 (P=0,057)
miR-539-5p	50,8±10,2 <i>versus</i> 45,1±9,9 (P=0,684)	50,3±10,3 <i>versus</i> 44,8±9,9 (P=0,822)
miR-650	40,0±9,8 <i>versus</i> 56,1±10,0 (P=0,283)	40,0±9,8 <i>versus</i> 55,3±10,2 (P=0,270)

Legenda: Idade Diag: Idade Diagnóstico. Grau Ressec: Grau Ressecção. Em negrito os valores significativos, considerando um $P \leq 0,05$. Foi considerada a mediana de cada variável como valor de corte para hipoexpressão ou hiperexpressão.

Ao avaliar todas as variáveis (Hospital, Protocolo de Tratamento, Gênero, Idade ao diagnóstico, Grau de Ressecção, Metástase, Risco e Histologia) para sobrevida livre de eventos (SLE) a variável Protocolo de Tratamento apresentou valor significativo ($P=0,000$) indicado que os pacientes que foram submetidos ao protocolo 1 (Carboplatina, Ifosfamida, Vincristina, Etoposido, Radioterapia) de tratamento tiveram maior SLE, seguidos daqueles pacientes submetidos ao protocolo 2 (CCNU, cisplatina, Vincristina, Radioterapia) e por último os pacientes submetidos ao protocolo 3 (outros), que foram aqueles com menor SLE (Figura 18). O mesmo resultado pode ser observado ao analisar a Sobrevida Global ($P=0,000$) (Figura 19).

Figura 18. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Protocolo de Tratamento ($P=0,000$). Os valores em azul referem-se aos pacientes tratados com o protocolo 1 - Carboplatina, Ifosfamida, Vincristina, Etoposido, Radioterapia ($n=19$), os valores em vermelho referem-se aos pacientes tratados com o protocolo 2 - CCNU, Cisplatina, Vincristina, Radioterapia ($n=21$) e em verde àqueles tratados com o protocolo 3 - outros protocolos ($n=11$).

Figura 19. Curva de Sobrevida Global com relação ao Protocolo de Tratamento (P=0,000). Os valores em azul referem-se aos pacientes tratados com o protocolo 1 - Carboplatina, Ifosfamida, Vincristina, Etoposido, Radioterapia (n=19), os valores em vermelho referem-se aos pacientes tratados com o protocolo 2 – CCNU, Cisplatina, Vincristina, Radioterapia (n=21) e em verde àqueles tratados com o protocolo 3 – outros protocolos (n=11).

Para a variável Grau de Ressecção (P=0,005), os pacientes com grau de ressecção incompleto tiveram menor SLE em comparação aos pacientes que tiveram grau de ressecção completo do tumor (Figura 20). O mesmo resultado pode ser observado ao analisar a Sobrevida Global (P=0,006) (Figura 21).

Figura 20. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Grau de Ressecção (P=0,005). Os valores em azul referem-se aos pacientes com grau de ressecção completo (n=33) e os valores em vermelho referem-se aos pacientes com grau de ressecção incompleto (n=16).

Figura 21. Curva de Sobrevida Global com relação ao Grau de Ressecção ($P=0,006$). Os valores em azul referem-se aos pacientes com grau de ressecção completo ($n=33$) e os valores em vermelho referem-se aos pacientes com grau de ressecção incompleto ($n=16$).

Para a variável Risco ($P=0,002$), os pacientes classificados como alto risco tiveram menor SLE em comparação àqueles classificados como baixo risco (Figura 22). O mesmo resultado pode ser observado ao analisar a Sobrevida Global ($P=0,002$) (Figura 23).

Figura 22. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação ao Risco ($P=0,002$). Os valores em azul referem-se aos pacientes classificados como baixo risco ($n=22$) e os valores em vermelho referem-se aos pacientes classificados como alto risco ($n=27$).

Figura 23. Curva de Sobrevida Global com relação ao Risco ($P=0,002$). Os valores em azul referem-se aos pacientes classificados como baixo risco ($n=22$) e os valores em vermelho referem-se aos pacientes classificados como alto risco ($n=27$).

Com relação aos miRNAs, o miR-211-5p apresentou valor significativo ($P=0,016$), indicando que os pacientes que expressam menos esse miRNA apresentam menor SLE em comparação àqueles que expressam mais (Figura 24). O mesmo resultado pode ser observado ao analisar a Sobrevida Global ($P=0,021$) (Figura 25).

Figura 24. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação à expressão do miR-211-5p ($P=0,016$). Os valores em azul referem-se aos pacientes com menor expressão do miR-211-5p ($n=25$) e em vermelho referem-se aos pacientes com maior expressão do miR-211-5p ($n=26$).

Figura 25. Curva de Sobrevida Global com relação à expressão do miR-211-5p ($P=0,021$). Os valores em azul referem-se aos pacientes com menor expressão do miR-211-5p ($n=25$) e em vermelho referem-se aos pacientes com maior expressão do miR-211-5p ($n=26$).

E o miR-512-3p ($P=0,038$), indicando que os pacientes que expressam mais esse miRNA apresentam menor SLE em comparação com aqueles que expressam menos (Figura 26). O mesmo resultado pode ser observado ao analisar a Sobrevida Global ($P=0,031$) (Figura 27).

Figura 26. Curva de Sobrevida Livre de Eventos com relação à expressão do miR-512-3p ($P=0,038$). Os valores em azul referem-se aos pacientes com menor expressão do miR-512-3p ($n=25$) e em vermelho referem-se aos pacientes com maior expressão do miR-512-3p ($n=26$).

Figura 27. Curva de Sobrevida Global com relação à expressão do miR-512-3p ($P=0,031$). Os valores em azul referem-se aos pacientes com menor expressão do miR-512-3p ($n=25$) e em vermelho referem-se aos pacientes com maior expressão do miR-512-3p ($n=26$).

Aplicando uma análise multivariada através da Regressão de Cox para as variáveis grupo de risco, expressão do miR-211-5p e miR-512-3p que foram significativas para sobrevida na análise univariada, observamos que grupo de risco ($P = 0,038$) e expressão do miR-211-5p ($P = 0,048$) foram variáveis independentes para a Sobrevida Livre de Eventos. Para Sobrevida Global, apenas grupo de risco ($P = 0,035$) se mostrou variável independente (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise multivariada por modelo de regressão de Cox utilizando-se as variáveis grupo de risco, expressão de miR-211-5p e miR-512-3p.

Sobrevida livre de eventos			
Fator	Risco relativo	Intervalo de confiança – 95%	P
Alto risco	2,718	1,058 - 6,983	0,038
Hiperexpressão mir-211	0,433	0,189 - 0,994	0,048
Hiperexpressão mir-512	1,765	0,765 - 4,076	0,183
Sobrevida global			
Fator	Risco relativo	Intervalo de confiança – 95%	P
Alto risco	3,347	1,087 - 10,303	0,035
Hiperexpressão mir-211	0,447	0,171 - 1,167	0,100
Hiperexpressão mir-512	1,627	0,589 - 4,497	0,348

9.6. Estudos de possíveis genes alvos relacionados com as vias de desenvolvimento do MB

Já se sabe que de acordo com o subgrupo molecular do MB (WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4), diferentes genes estão presentes, apresentando mutações e alterações genéticas, assim como diferentes vias de desenvolvimento estão ativadas ou não (NORTHCOTT et al., 2011; TAYLOR et al., 2012). A partir desse conhecimento, foi feita uma busca para observar se havia alguma relação desses genes presentes nas vias de desenvolvimento do MB com os 15 miRNAs estudados. Essa busca foi realizada através da ferramenta miRWalk 2.0, que permite identificar genes preditos que cada miRNA pode regular através de complementaridade de bases nitrogenadas. Para isso, foram selecionadas 8 bases de dados, para buscar essa relação, são elas: miRWalk, Miranda, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22, RNAhybrid e Taretsan (DWEET et al., 2011). E foram escolhidos como prováveis genes alvos de cada miRNA aqueles genes presentes em pelo menos 5 bases de dados, dessas 8 escolhidas. Muitos genes pertencentes a família WNT foram encontrados como alvos preditos dos miRNAs, assim como os genes *APC*, *AXIN* e *GSK3-β* pertencentes a via de sinalização WNT; os genes *SUFU* e *SMO* pertencentes a via de sinalização SHH; o gene *CDK6*, pertencente aos MBs do subgrupo 4 e o gene *MYCN*, pertencente à via de sinalização SHH e aos MBs do subgrupo 4. Apenas dois miRNAs, o miR-329 e o miR-433 não apresentaram alvos preditos relacionados com os subgrupos moleculares e nenhum miRNA apresentou genes alvos relacionados à MBs do Grupo 3. A tabela 14 mostra quais genes foram encontrados e a relação com os subgrupos moleculares do MB.

Tabela 14 - Genes preditos relacionados com os subgrupos moleculares do MB.

miRNA	WNT	SHH	Grupo 4
31-5p	<i>WNT1, WNT9B, APC e AXIN</i>	<i>SUFU</i>	
135a-5p	<i>APC</i>	<i>SMO</i>	
199a-5p	<i>WNT2, WNT7B, GSK3-β</i>		
202-3p	<i>WNT2B e APC</i>	<i>MYCN</i>	<i>MYCN</i>
211-5p	<i>WNT2, WNT3A e WNT4</i>		<i>CDK6</i>
383	<i>WNT2, WNT16</i>	<i>SUFU</i>	
485-3p	<i>WNT11</i>	<i>MYCN</i>	<i>MYCN e CDK6</i>
485-5p	6 integrantes WNT	<i>MYCN e SUFU</i>	<i>MYCN</i>
491-5p	<i>WNT1, WNT7B</i>	<i>SUFU</i>	
512-3p	<i>WNT2, WNT4, WNT5A, WNT7B APC</i>		
513a-5p	<i>WNT3A e APC</i>	<i>SUFU</i>	<i>CDK6</i>
539-5p	<i>WNT2, WNT3, WNT5A, WNT8B, GSK3-β</i>	<i>SUFU</i>	<i>CDK6</i>
650	<i>WNT1</i>		<i>CDK6</i>

(BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012)

10. Discussão

Estudar os mecanismos pelos quais ocorre o desenvolvimento dos tumores, entender as bases biológicas e os procedimentos necessários para que haja formação tumoral, pode ser a chave para o desenvolvimento de novas terapias. Já se sabe da importância dos miRNAs como moléculas reguladoras de vários mecanismos e processos celulares; estudos mostram que existe uma correlação entre a expressão desregulada de diversos miRNAs e o câncer (PIERSON et al., 2008; SHI, 2013; UZIEL et al., 2009; WANG et al., 2015), sendo importante a análise de miRNAs para auxiliar na identificação de pacientes resistentes a drogas ou com baixa sobrevida, sendo a verificação ainda pouco explorado em MB. Assim, através dos estudos dos mecanismos de ação dos miRNAs é possível compreender melhor a biologia destes tumores, bem como descobrir vias reguladas por estes microRNAs que podem estar associadas a prognóstico e podem ser alvos importantes para o tratamento e consequentemente diminuir a toxicidade das terapias já existentes. Os estudos sobre os papéis dos miRNAs em MB têm trazido informações importantes, pois estes podem ter como alvos genes supressores tumorais ou oncogenes, podem agir em vias de desenvolvimento, alterando a expressão desses genes, e em processos celulares básicos, como a diferenciação celular, por exemplo (HUMMEL; MAURER; HAIER, 2011).

Esse estudo mostra diferentes miRNAs que estão desregulados em amostras de pacientes de MB. O estudo de *microarray* feito para avaliar essas expressões mostrou que ao analisar amostras de MB e cerebelo não neoplásico, 22 miRNAs apareceram hipoexpressos nos MB; comparando-se MB adulto e MB pediátrico, 9 miRNAs estavam hiperexpressos e 1 estava hipoexpresso no adulto; comparando MB desmoplásico e MB clássico, 8 miRNAs estavam hiperexpressos e 3 estavam hipoexpressos nos desmoplásicos; e comparando MB pediátrico com cerebelo não neoplásico, 10 miRNAs estavam hipoexpressos nos MB pediátricos. Muitos deles já foram descritos em vários tipos de tumores, estando também com a expressão alterada e influenciando nos processos celulares. Dos miRNAs encontrados diferencialmente expressos nesse estudo, apenas dois deles já foram descritos em MB: miR-129-5p e o miR-383. Ambos apresentam baixos níveis de expressão em amostras de MB, sendo que quando suas expressões são restauradas, o miR-129-5p promove diminuição da proliferação celular (LUCON et al., 2013) e o miR-383 promove inibição o crescimento celular e induz apoptose (LI et al., 2013). Esses dados corroboram com os encontrados no ensaio de *microarray*, em que o miR-129-5p e o miR-383 também estão com expressão diminuída em MB.

Após a validação dessas expressões não foi possível observar um padrão na expressão desses miRNAs quando analisamos a validação por RT-qPCR como um todo. Dos 15 miRNAs estudados, 8 apresentaram o mesmo padrão de expressão no MB, ou seja, os miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, 491-5p, 512-3p, 539-5p se mostraram hipoexpressos nas amostras de tumores em relação aos cerebelos não neoplásicos e aos cerebelos não neoplásicos fetais (Tabela 9 – Figuras 6F-6L), e esses dados corroboram com aqueles encontrados no *microarray*, em que esses mesmos miRNAs também apareceram hipoexpressos em MB. Quanto aos 7 miRNAs restantes (miR-31-5p, -135a-5p, -199a-5p, -202-3p, -211-5p, -513a-5p e -650) não foi possível observar um padrão em suas expressões em comparação com os 2 tipos diferentes de cerebelo (fetal e não fetal), ou seja, alguns deles se mostraram diferencialmente expressos apenas quando comparados aos cerebelos não fetais, enquanto outros se mostraram diferencialmente expressos quando comparados apenas aos cerebelos fetais, como mostrado na tabela 8 e figuras 6A-E, 6M e 6O.

Além disso, foi possível observar uma diferença significativa na expressão dos miRNAs miR-31-5p, -135a-5p e -199a-5p quando comparamos cerebelos não fetais e fetais, sendo que em cerebelos fetais a expressão desses miRNAs foi menor (Figuras 6A, 6B e 6C – Tabela 8A). Essa diferença de expressão entre os cerebelos também foi observada por Ferretti e colaboradores (2009), que utilizou em seu estudo cerebelos de pacientes adultos de 25 a 70 anos de idade e cerebelos fetais de pacientes de 22 a 36 semanas de gestação, provavelmente correspondendo a diferentes estágios do desenvolvimento (FERRETTI et al., 2009). Variação essa também encontrada em nossas amostras de cerebelos controle (17 dias a 31 anos e 26 a 37 semanas de gestação). Adicionalmente, esses mesmos miRNAs apresentaram uma semelhança na expressão entre os cerebelos fetais e os tumores (Figuras 6A, 6B e 6C – Tabela 8A), o que nos permite dizer que a expressão de alguns miRNAs em MB diz respeito ao que seria um resíduo do cerebelo fetal menos diferenciado, confirmando a hipótese de que esses tumores apresentam algumas características embrionárias (FERRETTI et al., 2009).

Para relacionar a expressão dos 15 miRNAs estudados com genes preditos presentes nas vias de desenvolvimento clássicas em MB, buscamos na literatura quais genes estariam desregulados nessas vias e subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4. Sendo assim, utilizamos a ferramenta miRWalk 2.0 e relacionamos a expressão dos miRNAs com os genes *APC*, *AXIN*, *CTNNB1*, *WNT*, *PTCH*, *GSK3-β* e *MYC*, que estão desregulados nos MB do subgrupo WNT; *PTCH*, *SUFU*, *SMO*, *MYCN*, *GLI1* e *GLI2*, que estão desregulados nos

MB do subgrupo SHH; *MYC*, desregulado nos MB do Grupo 3 e *CDK6* e *MYCN*, desregulados nos MB do Grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-329

O miR-329 já foi descrito com baixos níveis de expressão em glioblastomas (SASAYAMA et al., 2009), havendo uma associação dessa hipoexpressão com maior sobrevida global de pacientes, o que pode ser explicado por possíveis interações do miR-329 com outros miRNAs, como o miR-326 e o miR-323 (QIU et al., 2013). Além disso, o gene *E2F1*, um oncogene que está relacionado com a transição das fases G1/S do ciclo celular, foi identificado como um possível alvo, apresentando altos níveis proteicos quando o miR-329 está inibido, o que contribui para a progressão tumoral (XIAO et al., 2013). O neuroblastoma também apresenta baixos níveis de expressão do miR-329 em tecidos metastáticos quando comparados com tecidos de tumor primário além de inibir o gene *KDM1A* (YANG et al., 2014), o qual contribui para a tumorigenese de vários cânceres (HUANG et al., 2013b; SCHULTE et al., 2009). O mesmo foi relatado em câncer gástrico, porém apresentando como alvo o gene *TIAMI* (LI et al., 2015), um ativador da via Rac que participa de diversos processos celulares e fisiológicos (MICHIELS et al., 1995). Portanto, assim como no MB, é possível perceber que o miR-329 encontra-se hipoexpresso na maioria dos tipos tumorais em relação ao tecidos não neoplásicos. Além disso, esse estudo encontrou uma relação entre a expressão do miR-329 e a idade dos pacientes no momento do diagnóstico e também com relação ao grau de ressecção do tumor; ou seja, pacientes com menos de 3 anos e com grau de ressecção completo do tumor expressam menos esse miRNA. Por outro lado, esse miRNA não apresentou relação com nenhum dos genes investigados pertencentes aos subgrupos moleculares de MB.

miR-383

O miR-383 já foi estudado em MB apresentando resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, em que este está hipoexpresso quando comparado com os tecidos não tumorais. O gene *PRDX3* foi descrito como alvo direto desse miRNA, possuindo uma complementaridade perfeita; a principal função desse gene é desintoxicar espécies reativas de oxigênio (ROS) (WOOD et al., 2003) e, além disso, *PRDX3* aparece hiperexpresso nas amostras de MB, o que confirmaria essa associação (LI et al., 2013). Em gliomas o resultado não foi diferente, as amostras tumorais apresentaram baixos níveis de expressão do

miR-383. Além disso, ao analisar genes pertencentes à via de sinalização IGF1/IGF1R, que está frequentemente ativada em gliomas, foi possível perceber que genes como *IGF1R*, *p-AKT* e *MMP2* apareceram hipoexpressos quando o miR-383 estava com uma alta expressão, sugerindo que a ausência desse miRNA poderia induzir a invasão celular através da ativação desses genes (HE et al., 2013). Outro estudo relata a baixa expressão do miR-383 em gliomas, e descreve o gene *CCND1* como um possível alvo direto desse miRNA (XU et al., 2014); um oncogene que controla a progressão do ciclo celular (HOSOKAWA; ARNOLD, 1998).

O miR-383 apresentou como alvos preditos, dois genes membros da família WNT, o *WNT2* e o *WNT16*, e também o gene *SUFU*, pertencente a via SHH (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-433

Corroborando com o que foi encontrado no presente trabalho, o miR-433 apresenta baixos níveis de expressão em glioblastomas (QIU et al., 2013); em câncer gástrico, tendo como alvo o gene *KRAS*, um regulador da via de sinalização ERK (GUO et al., 2013); e em carcinoma hepatocelular (WANG et al., 2012), onde apresenta como alvos os genes *TLR10* e *CREB1*, que podem alterar processos celulares, como a progressão tumoral (YANG et al., 2013). Não houve associação desse miRNA com nenhum dos aspectos clínicos estudados e além disso, esse miRNA não apresentou relação com nenhum dos genes investigados pertencentes aos subgrupos moleculares de MB.

miR-485-3p

O miR-485-3p parece ter sua expressão dependente do tipo tumoral estudado, visto que no presente estudo ele aparece hipoexpresso nas amostras de MB; enquanto em carcinoma hepatocelular, ele está hiperexpresso, apresentando como alvo o gene *MAT1A* (YANG et al., 2012), que está relacionado com a ativação de vias de sinalização como ERK e AKT (LI et al., 2010). Não houve associação desse miRNA com nenhum dos aspectos clínicos estudados. Porém, o miR-485-3p apresentou como alvo predito o gene *WNT11*, e também os genes *MYCN* e *CDK6*, genes desregulados em MBs do Grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-485-5p

O miR-485-5p já foi estudado em ependimoma (COSTA et al., 2011), glioblastoma (QIU et al., 2013), câncer de ovário (KIM et al., 2010) e carcinoma hepatocelular (SUN et al., 2015), e assim como relatado aqui, esse miRNA apresentou baixos níveis de expressão em todos esses tumores. Não houve associação desse miRNA com nenhum dos aspectos clínicos estudados. No entanto, o miR-485-5p apresentou como alvos preditos, 6 membros da família WNT, e também os genes *MYCN* e *SUFU*, pertencentes a via de sinalização SHH e que podem estar desregulados em MB pertencentes à esse subgrupo (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-491-5p

Já o miR-491-5p apresenta diferenças na expressão dependendo do tipo de tumor estudado. No presente estudo, ele encontra-se hipoexpresso nas amostras tumorais de MB, assim como no câncer pancreático, onde a hipoexpressão deste está relacionada com o aumento da expressão de genes como *TP53* (supressor tumoral) e *Bcl-XL* (gene pró-apoptótico) (GUO et al., 2012). Já no câncer de cólon, o miR-491-5p foi descrito como hiperexpresso nas amostras tumorais (TAO et al., 2014). Ao relacionar esse miRNA com as características clínicas foi possível observar uma associação com o grau de ressecção dos pacientes, ou seja, a menor expressão desse miRNA está relacionada com um grau de ressecção completo do tumor. Além disso, o miR-491-5p apresentou como alvos preditos dois genes da família WNT, o *WNT1* e o *WNT7B* e o gene *SUFU*, que pode estar desregulado nos MBs do subgrupo SHH (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-512-3p

O miR-512-3p se encontra hipoexpresso nas amostras de MB no presente trabalho, porém parece ter sua expressão dependente do tipo de tumor avaliado, por exemplo, em câncer de pulmão o miR-512-3p aparece também hipoexpresso, tendo como alvo o gene *DOCK3* (ZHU et al., 2012); esse gene está relacionado com a regulação da organização do citoesqueleto e com as interações célula-célula, além de regular a atividade de Rac-1 (CHEN et al., 2009). Já em carcinoma hepatocelular o miR-512-3p aparece hiperexpresso (WANG et al., 2012).

Além disso, houve uma associação do miR-512-3p com algumas características clínicas dos pacientes. A menor expressão desse miRNA está relacionada com um grau de ressecção

completo do tumor, assim como, com pacientes classificados como baixo risco; além disso, ao avaliar a sobrevida livre de eventos e sobrevida global desses pacientes, a baixa expressão do miR-512-3p está relacionada com maior sobrevida. Esses achados sugerem que este miRNA possa ser um marcador de prognóstico em MB, algumas vezes funcionando como oncogene e outras como supressor tumoral, dependendo do tipo de tumor, ou ainda, regulando oncogenes ou genes supressores tumorais, visto que o miR-512-3p apresentou como alvos preditos 4 genes da família WNT, o *WNT2*, *WNT4*, *WNT5A* e *WNT7B* e também o gene *APC*, que são genes que podem estar desregulados nos MBs do subgrupo WNT (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-539-5p

O miR-539-5p já foi descrito hipoexpresso em osteossarcoma, apresentando como alvo validado o gene *MITF*, que está relacionado com proliferação celular (Hu et al. 2012), e como alvo predito, o gene *MMP8* (Jin & Wang 2015), um gene supressor de tumor ou de metástase em cânceres humanos (AGARWAL et al., 2003). Em câncer de tireóide, no qual o miR-539-5p também se encontra hipoexpresso, ele foi relacionado à progressão tumoral através de seu alvo *CARMA1* (GU; SUN, 2015), gene relacionado com a ativação de NF-κB (BLONSKA; LIN, 2011). Neste estudo o miR-539-5p apresenta baixos níveis de expressão nas amostras tumorais. Não houve associação desse miRNA com nenhum dos aspectos clínicos estudados. No entanto, esse miRNA apresentou como alvos preditos, 4 genes da família WNT, o *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A* e *WNT8B* e também o gene *GSK3*, genes desregulados em MBS do subgrupo WNT; além do gene *SUFU*, desregulados na via de desenvolvimento SHH e do gene *CDK6*, característico dos MBs do Grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-31-5p

O miR-31-5p no presente estudo apresenta-se hipoexpresso nas amostras tumorais em relação aos cerebelos não neoplásicos, e esses dados corroboram com os achados no *microarray*, em que esse miRNA também está hipoexpresso nas amostras de MB. Pesquisadores que já estudaram esse miRNA em MB relatam dados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Pacientes de MB classificados como alto risco apresentaram baixos níveis de expressão do miR-31, sugerindo que a ausência desse miRNA está relacionada com pior prognóstico (FERRETTI et al., 2009). Apesar de no presente estudo a comparação da expressão desse miRNA com baixo e alto risco não ter sido significativa, há

uma tendência dos pacientes classificados como alto risco também expressarem menos esse miRNA.

Em modelo animal, ao comparar MBs com cerebelos normais, foi observado que o miR-31 está hipoeexpresso nos MB, sendo *MCM2* um de seus prováveis genes alvo, contribuindo para a progressão tumoral (Yucui Jin et al. 2014). Para outros tumores humanos, efeitos contrários têm sido descritos e níveis elevados de expressão desse miRNA foram correlacionados com maior avanço do estágio do câncer colorretal (SLATTERY et al., 2014). Por outro lado, em câncer de mama, este miRNA foi encontrado em níveis reduzidos quando comparado com tecidos normais adjacentes (OUYANG et al., 2014), sugerindo que esse miRNA tem sua expressão relacionada com o tipo de tumor estudado; podendo regular diferentes genes alvos, já que o miR-31-5p apresentou como alvos preditos 2 membros da família WNT, o *WNT1*, *WNT9B* e os genes *APC* e *AXIN*, também desregulados em MBs do subgrupo WNT e também o gene *SUFU*, membro da via de desenvolvimento SHH (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-135a-5p

O miR-135a-5p no presente estudo não apresentou valores significativos de expressão dos tumores com relação aos cerebelos, apresentando uma tendência a hiperexpressão nas amostras tumorais; enquanto no ensaio de *microarray*, este microRNase mostrou hipoeexpresso em amostras pediátricas de MB quando comparadas com amostras de MB adulto.

Em adenocarcinoma ductal pancreático, esse miRNA aparece hipoeexpresso nas amostras tumorais (DANG et al., 2014). Em ependimoma, o miR-31-5p também aparece hiperexpresso nas amostras tumorais (COSTA et al., 2011), mostrando que esse miRNA tem uma expressão diferencial dependendo do tipo de tumor estudado. Além disso, ao realizar a comparação das amostras quanto aos subtipos histológico, esse miRNA se mostrou hipoeexpresso nas amostras classificadas como desmoplásicas em comparação aos outros subtipos histológicos; porém, o miR-135a-5p não apareceu no ensaio de microarranjo quando foi feita a comparação entre os subtipos histológicos. Por outro lado, esse miRNA apresentou como alvos preditos os genes *APC*, membro da via de sinalização WNT e *SMO*, membro da via de desenvolvimento SHH (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-199a-5p

O miR-199a-5p apresentou maiores níveis de expressão nas amostras tumorais de MB em relação aos cerebelos não neoplásicos. Quando feita a comparação da expressão dos miRNAs em MBs clássicos *versus* MB desmoplásicos no ensaio de *microarray*, o miR-199a-5p apareceu hiperexpresso nos MB desmoplásicos, da mesma forma, apesar dessa comparação não ter sido significativa para esse miRNA, houve uma tendência do miR-199a-5p para uma hiperexpressão nas amostras desmoplásicas. Em carcinoma hepatocelular, o miR-199a-5p apresentou baixos níveis de expressão em amostras tumorais (WANG et al., 2012).

Ao avaliar as características clínicas dos pacientes, houve uma associação da hipoexpressão desse miRNA com aqueles pacientes com menos de 3 anos de idade; podendo também regular genes importantes para o desenvolvimento do MB, visto que apresentou como alvos preditos, 2 membros da família WNT, o *WNT2* e o *WNT7B* e o gene *GSK3-β*, pertencentes à via de desenvolvimento WNT (BARKER; CLEVERS, 2006).

miR-202-3p

O miR-202-3p se mostrou hipoexpresso nos tumores em relação apenas aos cerebelos fetais, não apresentando valores significativos quando comparados com os cerebelos não fetais. Além disso, houve uma associação da hipoexpressão desse miRNA com o grau de ressecção completo do tumor e com pacientes classificados como baixo risco. Ao avaliar os subtipos histológicos, apesar de não ter sido significativo, o miR-202-3p apresentou uma tendência a hiperexpressão nas amostras desmoplásicas quando comparadas aos outros subtipos histológicos, o que está de acordo com o que foi encontrado no ensaio de *microarray*.

Em câncer gástrico esse miRNA está hipoexpresso em amostras tumorais e quando analisado os dados clínicos dos pacientes, aqueles que apresentaram menor expressão desse miRNA possuíam idade mais avançada, porém não houve relação desse miRNA com a idade dos pacientes no presente trabalho. Como alvo predito desse miRNA, o gene *Gli1* (regulador da via de sinalização SHH (LEE et al., 1997) foi o mais interessante visto que a expressão desse gene e do miR-202-3p se mostraram inversamente correlacionadas no câncer gástrico (ZHAO et al., 2013). Além disso, esse mesmo miRNA também aparece hipoexpresso em câncer colorretal e apresentou como alvo, o gene *ARL5A*, envolvido em diversos processos celulares (WANG et al., 2014). Como genes preditos, esse miRNA está relacionado com a

expressão dos genes *WNT2B* e *APC*, ambos pertencentes à via de desenvolvimento WNT e também com o gene *MYCN*, que está presente na via SHH e também nos MBs de grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-211-5p

No ensaio de microarranjo esse miRNA se mostrou hipoexpresso nos MBs quando comparados aos cerebelos; apesar de não ter sido significativo, o miR-211-5p no presente estudo apresentou uma tendência a hipoexpressão nas amostras tumorais. Além disso, a baixa expressão desse miRNA foi associada com menor sobrevida livre de eventos e sobrevida global dos pacientes estudados, indicando que esse miRNA possa ser um marcador de prognóstico em MB; podendo regular genes preditos envolvidos com o desenvolvimento do MB, por exemplo, genes da família WNT, *WNT2*, *WNT3A* e *WNT4* e também o gene *CDK6*, presente em MBS do grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

Nos outros tumores já estudados, o miR-211-5p aparece hipoexpresso, como em glioblastomas, no qual sua relação com a tumorigênese deve ao seu alvo *MMP-9* (ASUTHKAR et al., 2012), um oncogene que aumenta a capacidade de invasão das células tumorais (EGEBLAD; WERB, 2002); no câncer de mama (SONG; ZHAO, 2015); e em carcinoma hepatocelular (JIANG et al., 2015).

miR-650

No ensaio de microarranjo esse miRNA apresentou menor expressão nos MBs quando comparados aos cerebelos, o que vai de encontro ao observado no presente estudo, onde o miR-650 aparece hipoexpresso nos tumores apenas em relação aos cerebelos fetais. O miR-650 foi encontrado hiperexpresso em adenocarcinoma de pulmão, onde uma maior expressão foi relacionada com uma maior predisposição para o desenvolvimento de metástases nos linfonodos e pior prognóstico (HUANG et al., 2013a). Esse mesmo miRNA apresentou expressão elevada em amostras de gliomas e ao avaliar o grau de desenvolvimento desse tumor, a expressão do miR-650 aumenta nos tumores de maior grau, além disso, sua maior expressão está relacionada com pior sobrevida global dos pacientes (SUN et al., 2013); no presente estudos não houve associação da expressão do miR-650 com nenhum aspecto clínico dos pacientes. Por outro lado, houve associação da expressão desse miRNA com alguns alvos preditos, como o gene *WNT1*, pertencente a via de desenvolvimento WNT e também o gene

CDK6, pertencentes aos MBS do grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

miR-513a-5p

O miR-513a-5p não apresentou valores significativos para nenhuma análise realizada. Porém nos ensaios de *microarray*, o miR-513a-5p está hipoexpresso nos MB pediátricos em relação aos MB adultos. Na técnica de *microarray*, um número menor de amostras é analisado e pode ter havido uma semelhança nessas amostras, dando, portanto um valor significativo de hipoexpressão. Além disso, esse miRNA apresentou relação com alguns alvos preditos, como os genes *WNT3A* e *APC*, relacionados com a via de desenvolvimento WNT, além do gene *SUFU*, presente na via de sinalização SHH, e o gene *CDK6*, pertencentes aos MBS do grupo 4 (BARKER; CLEVERS, 2006; TAYLOR et al., 2012).

O miR-513a-5p, que já foi estudado em tumor ósseo de células grandes, apresentando maior expressão nas amostras tumorais metastáticas do que nas não metastáticas (MOSAKHANI et al., 2012).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, 491-5p, 512-3p, 539-5p são aqueles indicados para maiores investigações de seus mecanismos de ação e relação com o desenvolvimento tumoral, visto que estão hipoexpressos nas amostras tumorais em MB, tanto nesse trabalho como no de outros autores que estudaram MB; assim como em outros tumores relatados na literatura (GUO et al., 2012; HU et al., 2012; LI et al., 2013; QIU et al., 2013; SASAYAMA et al., 2009; ZHU et al., 2012). Dentre estes, o miR-512-3p seria um possível alvo para maiores investigação do seu papel na tumorigênese do MB, visto que sua baixa expressão foi associada com uma maior sobrevida dos pacientes, além de uma associação com o grau de ressecção completo dos tumores e com aqueles pacientes classificados como baixo risco. O miR-512-3p apresentou uma hipoexpressão nas amostras tumorais e linhagens celulares de MB, sendo importante uma verificação do seu papel nessas linhagens celulares como um estudo mais aprofundado de sua ação.

Ao levar em consideração as características clínicas dos pacientes avaliados no presente estudo, deve-se ficar atento a algumas limitações como, por exemplo, o relativo baixo número de casos analisados e o uso de diferentes protocolos de tratamento, que podem levar a um viés

potencial na análise de alguns dados. Outra limitação do estudo esteve relacionada a classificação histológica dos casos analisados, uma vez que uma parte dos casos foi classificada apenas como meduloblastoma e uma revisão criteriosa destes casos para a confirmação do subtipo histológico é necessária para análise mais apropriada da associação destes microRNAs com subtipos histológicos específicos e por este motivo foi analisado apenas as diferenças entre desmoplásico e outros. A classificação molecular também não foi realizada e dados importantes da associação destes microRNAs com estes subtipos moleculares não puderam ser analisados. Acreditamos que estas limitações não inviabilizaram o trabalho, que apresentou dados inéditos e outros que vão de acordo com o descrito por outros autores. Análise de um número maior de casos, submetidos a um mesmo protocolo de tratamento, bem como uma classificação histológica e molecular mais acurada são importantes para validação dos dados aqui apresentados.

É importante ressaltar que foram descritos no presente estudo 15 miRNAs diferencialmente expressos em MB; no entanto, são necessários estudos mais aprofundados para definir a ação desses miRNAs para que seja possível encontrar qual a relação dessas expressões diferenciadas dessas moléculas nesse tipo tumoral e uma tentativa de melhorar o prognóstico e auxiliar no tratamento desses pacientes.

Estudando a maneira pela qual um miRNA age, é possível investigar o alvo específico desse miRNA e, a partir disto pode-se desenvolver ferramentas mais precisas para o correto prognóstico e diminuir a toxicidade do tratamento. Além disso, os miRNAs podem estar relacionados com o desenvolvimento ou não de metástases em determinados tumores e ter relação com a idade do paciente que está sendo avaliado, visto que a ação de um miRNA pode interferir em como um paciente responde a um tratamento de acordo com a idade que ele apresenta. Sendo assim, nossos dados mostram a importância dos miRNAs na tumorigênese do MB; seja funcionando como supressores tumorais ou oncogenes; eles regulam genes importantes para o correto funcionamento celular, portanto, sua correta regulação é essencial para que as funções celulares permaneçam estáveis.

11. Conclusão

Após o estudo realizado podemos afirmar que os miRNAs miR-31-5p, -199a-5p, -202-3p, -329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, -491-5p, -512-3p, -539-5p e -650 apresentaram expressões diferenciadas em amostras de pacientes portadores de MB quando comparadas aos cerebelos não neoplásicos fetais e não fetais. Além disso, o que foi encontrado vai de acordo com os resultados prévios obtidos no ensaio de microanrranjo. Sendo que os miRNAs miR-329, -383, -433, -485-3p, -485-5p, 491-5p, 512-3p, 539-5p estão todos hipoexpressos nos tumores quando comparados com cerebelos não neoplásicos fetais e não fetais. Os outros miRNAs apresentam um perfil de expressão particular, ou seja, o miR-31-5p está hipoexpresso nos tumores apenas em relação aos cerebelos não fetais; o miR-202-3p e o miR-650 também estão hipoexpressos, mas apenas em relação aos cerebelos fetais; já o miR-199a-5p está hiperexpresso apenas em relação aos cerebelos não fetais.

A associação das expressões desse miRNAs com os dados clínicos dos pacientes nos mostrou que os pacientes classificados com MBs desmoplásicos tem menor expressão do miR-135a-5p; pacientes diagnosticados com MB antes dos 3 anos tem menor expressão do miR-199a-5p e do miR-329; os pacientes que tiveram grau de ressecção completo do tumor apresentam menor expressão do miR-202-3p, miR-329, miR-491-5p e miR-512-3p e os pacientes classificados como baixo risco apresentam menor expressão do miR-202-3p e do miR-512-3p. Além disso, os miRNAs miR-211-5p e o miR-512-3p foram associados com a sobrevida dos pacientes estudados, o que sugere que esses miRNAs possam ser possíveis marcadores de prognóstico.

Descrevemos aqui pela primeira vez a expressão de 13 miRNAs em MB, com exceção do miR-31-5p e do miR-383, que já foram estudados nesse tumor, e sua relação com dados clínicos de pacientes portadores da doença. Cada um podendo ter um ou mais genes alvos específicos que podem ativar ou inibir vias de desenvolvimentos importantes associadas ao desenvolvimento normal do cerebelo e ao desenvolvimento do meduloblastoma. Estudos funcionais em modelos *in vitro* e *in vivo* são necessários para um melhor conhecimento da ação de cada um destes miRNA nestas neoplasias.

12. Referências Bibliográficas

AGARWAL, D. et al. Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenic human breast cancer model. **Differentiation**, v. 71, n. 2, p. 114–125, 2003.

ASUTHKAR, S. et al. Epigenetic regulation of miRNA-211 by MMP-9 governs glioma cell apoptosis, chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncotarget**, v. 3, n. 11, p. 1439–54, 2012.

BAI, A. H. C. et al. MicroRNA-182 promotes leptomeningeal spread of non-sonic hedgehog-medulloblastoma. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 529–538, 2012.

BARKER, N.; CLEVERS, H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 12, p. 997–1014, 2006.

BLONSKA, M.; LIN, X. NF- κ B signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 55–70, 2011.

BROWN, P. et al. Novel targeted drug therapies for the treatment of childhood acute leukemia. **Expert review of hematology**, v. 2, n. 9, p. 145, 2009.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, 2002.

CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2999–3004, 2004.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7390–7394, 2006.

CASTRO-GAMERO, A. M. et al. Chromosomal heterogeneity and instability characterize pediatric medulloblastoma cell lines and affect neoplastic phenotype. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 871–85, 2013.

CHAN, J. A.; KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human. n. 14, p. 6029–6033, 2005.

CHEN, Q. et al. NIH Public Access. v. 29, n. 1, p. 118–130, 2009.

CHO, W. C. S. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. **Molecular cancer**, v. 6, p. 60, 2007.

COSTA, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, v. 410, n. 1, p. 9–17, 2008.

COSTA, F. F. et al. Identification of micrornas as potential prognostic markers in ependymoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

CRAWFORD, J. R.; MACDONALD, T. J.; PACKER, R. J. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 12, p. 1073–1085, 2007.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Molecular Cell**, v. 16, n. 6, p. 861–865, 2004.

DANG, Z. et al. MicroRNA-135a inhibits cell proliferation by targeting Bmi1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 733–745, 2014.

DUCASSE, M.; BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. **Molecular cancer**, v. 5, p. 60, 2006.

- DWEEP, H. et al. miRWalk – Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 44, n. 5, p. 839–847, 2011.
- DWEEP, H.; STICHT, C.; GRETZ, N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. **Current genomics**, v. 14, n. 2, p. 127–36, 2013.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.
- ELLISON, D. W. et al. Medulloblastoma: Clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. **Acta Neuropathologica**, v. 121, n. 3, p. 381–396, 2011.
- ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–269, 2006.
- ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. p. 1–12, 2008.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, 2011.
- FAN, X.; EBERHART, C. G. Medulloblastoma stem cells. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 17, p. 2821–2827, 2008.
- FERRETTI, E. et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. **The EMBO journal**, v. 27, n. 19, p. 2616–2627, 2008.
- FERRETTI, E. et al. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 568–577, 2009.
- FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.
- GAJJAR, A. et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. **Lancet Oncology**, v. 7, n. 10, p. 813–820, 2006.
- GALLINARI, P. et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. **Cell research**, v. 17, n. 3, p. 195–211, 2007.
- GARZIA, L. et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.
- GARZON, R. et al. MicroRNA expression and function in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 12, p. 580–587, 2006.
- GRUNDER, E. et al. MicroRNA-21 suppression impedes medulloblastoma cell migration. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 16, p. 2479–2490, 2011.
- GU, L.; SUN, W. MiR-539 inhibits thyroid cancer cell migration and invasion by directly targeting CARMA1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 4, p. 1128–1133, 2015.
- GUO, L. H. et al. The tumor suppressor roles of miR-433 and miR-127 in gastric cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14171–14184, 2013.
- GUO, R. et al. MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14733–14747, 2012.
- HATTEN, M. E.; ROUSSEL, M. F. Development and cancer of the cerebellum. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 3, p. 134–142, 2011.
- HE, Z. et al. Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 557, 2013.

- HOSOKAWA, Y.; ARNOLD, A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 22, n. 1, p. 66–71, 1998.
- HU, H. et al. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. **Oncology Letters**, v. 4, n. 5, p. 1037–1042, 2012.
- HUANG, J. Y. et al. MicroRNA-650 Was a Prognostic Factor in Human Lung Adenocarcinoma and Confers the Docetaxel Chemoresistance of Lung Adenocarcinoma Cells via Regulating Bcl-2/Bax Expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–16, 2013a.
- HUANG, Z. et al. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) Contributes to Colorectal Tumorigenesis via Activation of the Wnt/B-Catenin Pathway by Down-Regulating Dickkopf-1 (DKK1). **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70077, 2013b.
- HUMMEL, R.; MAURER, J.; HAIER, J. MicroRNAs in Brain Tumors - A New Diagnostic and Therapeutic Perspective? **Molecular Neurobiology**, p. 1–12, 2011.
- JIANG, G. et al. miR-211 suppresses hepatocellular carcinoma by downregulating. v. 6, n. 11, 2015.
- JIN, H.; WANG, W. MicroRNA-539 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro and targeting Matrix metalloproteinase-8. v. 8, n. 7, p. 8075–8082, 2015.
- KIM, T. H. et al. Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. **Histopathology**, v. 57, n. 5, p. 734–743, 2010.
- KIM, Y.-K.; KIM, V. N. Processing of intronic microRNAs. **The EMBO journal**, v. 26, n. 3, p. 775–783, 2007.
- KOOL, M. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 473–484, 2012.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001.
- LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5543, p. 858–862, 2001.
- LEE, J. et al. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, p. 2537–2552, 1997.
- LEE, R. C. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & II-14. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.
- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5543, p. 862–864, 2001.
- LI, J. et al. Forced Expression of Methionine Adenosyltransferase 1A in Human Hepatoma Cells Suppresses in Vivo Tumorigenicity in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 5, p. 2456–2466, 2010.
- LI, K. K. W. et al. MiR-383 is downregulated in medulloblastoma and targets peroxiredoxin 3 (PRDX3). **Brain Pathology**, v. 23, n. 4, p. 413–425, 2013.
- LI, Z. et al. By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth. 2015.
- LIU, C.-G. et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9740–4, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.
- LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834–838, 2005.
- LUCON, D. R. et al. Downregulation of 14q32 microRNAs in Primary Human Desmoplastic Medulloblastoma. **Frontiers in oncology**, v. 3, n. September, p. 254, 2013.
- LUJAMBIO, A. The microcosmos of cancer. **Changes**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.
- MABBOTT, D. J. et al. Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors. **Neuropsychology**, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2008.
- MACRAE, I. J.; ZHOU, K.; DOUDNA, J. A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 10, p. 934–940, 2007.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 11, p. 630–641, 2005.
- MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 3, p. 155–159, 2009.
- MICHELIS, F. et al. **A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion.** **Nature**, 1995.
- MOLOFSKY, A. V et al. From Progenitor Proliferation. **October**, v. 425, n. 6961, p. 962–967, 2009.
- MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Handbook of Epigenetics**, p. 521–534, 2003.
- MOSAKHANI, N. et al. MicroRNA expression profiles in metastatic and non-metastatic giant cell tumor of bone. **Histology and histopathology**, p. 671–678, 2012.
- NORTHCOTT, P. A et al. Molecular subgroups of medulloblastoma. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 871–884, 2012a.
- NORTHCOTT, P. A. et al. The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. **Cancer Research**, v. 69, n. 8, p. 3249–3255, 2009.
- NORTHCOTT, P. A. et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 1408–1414, 2011.
- NORTHCOTT, P. A. et al. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 6, p. 340–351, 2012b.
- OUYANG, M. et al. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–8, 2014.
- PANG, J. C. S. et al. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. **Acta Neuropathologica**, v. 117, n. 6, p. 599–611, 2009.
- PIERSON, J. et al. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 90, n. 1, p. 1–7, 2008.
- PUGH, T. J. et al. NIH Public Access. v. 488, n. 7409, p. 106–110, 2013.
- QIU, S. et al. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. **Journal of translational medicine**, v. 11, n. 1, p. 10, 2013.
- REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.

- ROOD, B. R.; MACDONALD, T. J.; PACKER, R. J. Current treatment of medulloblastoma: Recent advances and future challenges. **Seminars in Oncology**, v. 31, n. 5, p. 666–675, 2004.
- SASAYAMA, T. et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1407–1413, 2009.
- SCHULTE, J. H. et al. Lysine-Specific Demethylase 1 Is Strongly Expressed in Poorly Differentiated Neuroblastoma: Implications for Therapy. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 2065–2071, 2009.
- SCRIDELI, C. A. ET AL. PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM MEDULOBLASTOMAS PEDÁTRICO E DE ADULTOS E CEREBELO NÃO-NEOPLÁSICO: IDENTIFICAÇÃO DE VIAS PREDITAS ENVOLVIDAS NA TUMORIGÊNESE. 2014.
- SEVIGNANI, C. et al. Mammalian microRNAs: A small world for fine-tuning gene expression. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 3, p. 189–202, 2006.
- SHENOUDA, S. K.; ALAHARI, S. K. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 3-4, p. 369–378, 2009.
- SHI, J. miR-218 is downregulated and directly targets SH3GL1 in childhood medulloblastoma. **Molecular Medicine Reports**, p. 1111–1117, 2013.
- SLATTERY, M. L. et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. **International Journal of Cancer**, v. 438, p. n/a–n/a, 2014.
- SONG, G.; ZHAO, Y. MicroRNA-211, a direct negative regulator of CDC25B expression, inhibits triple-negative breast cancer cells' growth and migration. **Tumor Biology**, 2015.
- SPIEGLER, B. J. et al. Change in neurocognitive functioning after treatment with cranial radiation in childhood. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 706–713, 2004.
- SUN, B. et al. MicroRNA-650 expression in glioma is associated with prognosis of patients. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 115, n. 3, p. 375–380, 2013.
- SUN, X. et al. Involvement of miR-485-5p in hepatocellular carcinoma progression targeting EMMPRIN. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 58–65, 2015.
- TAO, K. et al. Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer. **American Journal of Translational Research**, v. 6, n. 4, p. 391–401, 2014.
- TAYLOR, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 465–472, 2012.
- TAYLOR, R. E. et al. Outcome for patients with metastatic (M2-3) medulloblastoma treated with SIOP/UKCCSG PNET-3 chemotherapy. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 5, p. 727–734, 2005.
- THOMPSON, M. C. et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 12, p. 1924–1931, 2006.
- TURNER, J. D. et al. The many roles of microRNAs in brain tumor biology. **Neurosurgical focus**, v. 28, n. 1, p. E3, 2010.
- UZIEL, T. et al. The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 2812–2817, 2009.
- VENKATARAMAN, S. et al. MicroRNA 128a increases intracellular ROS level by targeting Bmi-1 and inhibits medulloblastoma cancer cell growth by promoting senescence. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–10, 2010.
- VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2257–

2261, 2006.

WANG, C. et al. MiR-495 is a Predictive Biomarker that Downregulates GF11 Expression in Medulloblastoma. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1430–1439, 2015.

WANG, Q. et al. MicroRNA-202-3p inhibits cell proliferation by targeting adp-ribosylation factor-like 5a in human colorectal carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 5, p. 1146–1157, 2014.

WANG, W. et al. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 38, p. 5442–5453, 2012.

WOOD, Z. A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 1, p. 32–40, 2003.

XIAO, B. et al. MiRNA-329 targeting E2F1 inhibits cell proliferation in glioma cells. **Journal of translational medicine**, v. 11, n. 1, p. 172, 2013.

XU, Z. et al. MicroRNA-383 inhibits anchorage-independent growth and induces cell cycle arrest of glioma cells by targeting CCND1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 4, p. 833–838, 2014.

YANG, H. et al. MicroRNAs regulate methionineadenosyltransferase 1A expression in hepatocellular carcinoma. v. 123, n. 1, p. 1–14, 2012.

YANG, H. et al. MiR-329 suppresses the growth and motility of neuroblastoma by targeting KDM1A. **FEBS Letters**, v. 588, n. 1, p. 192–197, 2014.

YANG, Z. et al. MicroRNA-433 inhibits liver cancer cell migration by repressing the protein expression and function of cAMP response element-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 40, p. 28893–9, 2013.

YOO, C. B.; CHENG, J. C.; JONES, P. A. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. **Biochemical Society transactions**, v. 32, n. Pt 6, p. 910–912, 2004.

YUCUI JIN, ET AL. MicroRNA-31 suppresses medulloblastoma cell growth by inhibiting DNA replication through minichromosome maintenance 2. v. 5, n. 13, 2014.

ZHANG, B. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, p. 1–12, 2007.

ZHAO, Y. et al. Decrease of miR-202-3p Expression, a Novel Tumor Suppressor, in Gastric Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–11, 2013.

ZHI, F. et al. From small to big: MicroRNAs as new players in medulloblastomas. **Tumor Biology**, v. 34, n. 1, p. 9–15, 2013.

ZHU, X. et al. The International Journal of Biochemistry Inhibition of RAC1-GEF DOCK3 by miR-512-3p contributes to suppression of metastasis in non-small cell lung cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 61, n. 2015, p. 103–114, 2012.

13. Apêndices

APÊNDICE 1 - Caracterização Citogenética e Molecular das linhagens celulares de meduloblastoma utilizadas no presente estudo.

Linhagem	UW402	UW473	DAOY	ONS-76
Origem/sexo/idade	-	MB/ Masculino/ 5 anos	MB Desmoplásico/ Masculino/ 4 anos	MB clássico/ Feminino/ 2 anos
Grupo molecular	Grupo 3 ou 4	Grupo 3 ou 4	SHH	SHH
Status <i>TP53</i>	-	-	Mutante	Mutação R72P SNP, não afeta função
Amplificação MYC	-	-	NÃO	NÃO
Tumorigenicidade <i>in vivo</i>	NÃO	NÃO	SIM	SIM
Doubling Time (h)	-	-	34	18,6
Outros	Isocromossomo 17q	-	Expressa MGMT	-

(Castro-Gamero et al. 2013; Yamada et al. 1989)

14. Anexos

ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, RG. _____ li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no estudo “**ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO**” e tive a oportunidade de discutir e tirar minhas dúvidas.

Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo em participar voluntariamente do presente estudo.

Entendo que receberei uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido assinado. Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames ou da criança ou adolescente sob minha responsabilidade legal em revistas médicas nacionais e internacionais. Entendi que todas as informações que fornecidas serão processadas e analisadas de maneira confidencial.

Nome do paciente:

Nome do responsável:

Assinatura

Data: ____/____/____

Responsável pelo estudo: Prof Dr Carlos Alberto Scrideli, Professor Associado, Departamento de Puericultura e Pediatria, FMRP-USP

Assinatura

Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo com neoplasia

Nome da Pesquisa: ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO.

Pesquisadora Responsável: Carlos Alberto Scrideli

Informações e Esclarecimentos

Prezado paciente e responsável,

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) para participar de um estudo clínico, coordenado por Carlos Alberto Scrideli, docente do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Hospital das Clínicas.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o (a) senhor (a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconforto.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça perguntas se tiver qualquer dúvida.

Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste estudo é buscar novas possibilidades para identificar genes que possam estar associados ao desenvolvimento e agressividade dos principais tipos de câncer da criança e do adolescente.

Sabemos que nas células do câncer, estes genes que serão estudados produzem substâncias (proteínas) com função alterada que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença e agressividade da mesma.

Por isto, este trabalho pretende encontrar alterações nas células tumorais que possa ajudar no entendimento de como o câncer ocorre, abrindo perspectivas de novos tratamentos.

A criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal irá retirar um pedaço do tumor ou da medula óssea que será utilizada para fazer o diagnóstico anátomo-patológico. Depois dos testes, grande parte da amostra do tumor retirada ou medula óssea fica guardada como arquivo no laboratório. Esta parte guardada é a que gostaríamos de utilizar. Para este estudo, este material retirado será útil para sabermos como se comporta o tumor para assim estudarmos o que está errado no tecido doente.

Como será o estudo?

O estudo será feito com o material retirado na hora da cirurgia ou biópsia de tratamento do tumor. Neste pedaço iremos estudar o comportamento de diversas moléculas que estão no interior das células com câncer e se estas moléculas podem ter importância no tratamento da doença.

Preciso participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do (a) senhor (a). Se decidir participar, o senhor deve assinar este documento chamado de Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, poderá desistir a qualquer momento.

Se o (a) senhor (a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o atendimento neste hospital e continuará recebendo do seu médico o melhor tratamento que ele pode oferecer.

O que devo fazer?

Você não deverá fazer nada e o estudo será realizado com o material que será retirado devido ao tratamento de sua doença ou da doença que a criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal, não sendo necessária a coleta de nenhum material adicional.

Quais são os possíveis benefícios?

Os benefícios serão os de entender melhor este tipo de câncer e da possibilidade da descoberta de novos tipos de tratamento para estas doenças.

A informação obtida será confidencial?

As informações sobre as condições de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. A identificação será por um número, mantendo-se confidencial. Somente seus médicos saberão que as informações estão relacionadas com o (a) senhor(a) ou da criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal.

O resultado deste estudo será publicado em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

E se eu tiver dúvidas?

Se o (a) senhor (a) tiver alguma dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato com:

Carlos Scrideli – Telefones (16) 3602-2651 ou (16) 8119-3449, E-mail: scrideli@fmrp.usp.br

ANEXO 2 - Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 23 de julho de 2010

Ofício nº 2436/2010
CEP/MGV

Prezado Professor,

O trabalho intitulado **“ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8380/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-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
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

PROF. DR. CARLOS ALBERTO SCRIDEI
Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP