**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA**

PAULO HENRIQUE DOS SANTOS KLINGER

**Trióxido de arsênico como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de
meduloblastoma pediátrico**

Ribeirão Preto

2018

PAULO HENRIQUE DOS SANTOS KLINGER

Trióxido de arsênico como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Área de concentração: Departamento de Puericultura e Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Elvis Terci Valera

Ribeirão Preto

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Pediatria e Puericultura
Universidade de São Paulo

KLINGER, Paulo Henrique dos Santos

Trióxido de arsênico como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico, 2018.

77 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Elvis Terci Valera

1. Meduloblastoma. 2. Irradiação. 3. Trióxido de Arsênico. 4. Sonic Hedgehog.

KLINGER, Paulo Henrique dos Santos

Trióxido de arsênico como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico

Dissertação apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Aprovado em: ____/____/____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à amiga **Maria Concebida**, um exemplo de superação, inteligência, coragem, persistência e fé. Sua resiliência na luta contra a doença é apenas uma parte do seu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o maior de todos os Mestres, por ser meu apoio e por ter-me conduzido nesta jornada com equilíbrio, força e saúde.

À minha família, Luiz e Maria e meus irmãos, Cleiton e Mara, que sempre promoveram minha educação, ensinaram bons princípios e fizeram-me sentir capaz. Esta vitória também é de vocês.

À minha noiva, Laís, pelo amor, paciência e compreensão. Pelo abraço sincero e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elvis Terci Valera, por todos os ensinamentos, pelas contribuições, sugestões, orientações e principalmente pela comunicação franca e sincera na condução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli e Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, por todos os ensinamentos e oportunidades que contribuíram para a minha formação e para esta pesquisa.

Aos gerentes do laboratório, Dra. Rosane Queiroz e Msc. Veridiane Kill Suozo de Sant'ana e a colaboradora Elizabeth Perna, por contribuírem significativamente com meu conhecimento e auxiliar no trabalho.

Aos pesquisadores, Doutor Danilo Vitorino dos Santos, Doutoranda Lara Alberici Delcin, Dr. Augusto Faria Andrade, Dra. Régia Caroline Peixoto Lira, Dr. Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro e Doutoranda Pamela Viane Andrade, que foram fundamentais na condução de experimentos e vivência em laboratório. Levo comigo todos ensinamentos, mas principalmente a amizade fraterna. Contem sempre comigo.

A toda a equipe do laboratório de pediatria, pelo incentivo, companheirismo, paciência, amizade e conhecimentos construídos. Muito obrigado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo financeiro desta pesquisa.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) Departamento de Pediatria, pela oportunidade de aprimoramento profissional e o grande conhecimento construído ao longo deste processo.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha vida e contribuíram para que fosse possível meu aprimoramento profissional. MUITO OBRIGADO !

“O mundo despedaça todas as pessoas, e posteriormente, muitos se tornam fortes nos lugares partidos.”

Ernest Hemingway

RESUMO

KLINGER, Paulo Henrique dos Santos. **Trióxido de arsênio como possível radiosensibilizante em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico**. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O meduloblastoma (MB) é o tumor maligno cerebral mais frequente em crianças e adolescentes. Trata-se de uma doença heterogênea sob o aspecto genético, sendo reconhecido ao menos 12 subgrupos genético-moleculares, com impacto na apresentação clínico-patológica. Pacientes do subgrupo SHH apresentam mutação somática em genes da via *Hedgehog*, incluindo *PTCH1*, *SUFU*, *SMO* e ativação dos genes *GLI1* e *GLI2*. Mutações no gene *TP53* também podem estar presentes, particularmente em crianças acima de 3 anos, e conferem um pior prognóstico. O trióxido de arsênio (ATO) possui ação inibitória sobre os genes da via SHH, mas pouco se sabe sobre sua ação no MB. O presente estudo objetivou avaliar os potenciais efeitos citotóxicos e radiosensibilizantes do ATO sobre as linhagens de MB pediátrico grupo SHH (ONS-76: *TP53*-selvagem; DAOY: *TP53*-mutado c.725G>T e UW402, *TP53*-mutado c.464C>A). Foram comparadas as taxas de proliferação celular, clonogenicidade e apoptose nas linhagem de MB antes e após o tratamento com ATO. Também foi avaliada a clonogenicidade da associação droga e irradiação. Foram investigadas proteínas responsáveis pelo reparo dos danos causados ao DNA (Rad51 e Ku86) através de Western Blot. Foi realizada análise da expressão gênica relativa por QPCR e estudados genes que integram a via SHH, assim como efetores finais desta via de sinalização. A viabilidade celular foi monitorada nos tempos de 24 à 120 horas pelo ensaio de resazurina. A taxa de apoptose foi mensurada por meio de marcação com anexina e iodeto de propídio e avaliada por citometria de fluxo. Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por *One Way e Two Way* ANOVA, utilizando o pós-teste Bonferroni, e sendo considerados resultados significativos valores de $p < 0,05$. Foi possível observar uma diminuição na viabilidade celular após tratamento com ATO nas três linhagens estudadas. Além disso, houve uma diminuição significativa na capacidade clonogênica. Observou-se também um aumento nas taxas de apoptose nas linhagens, sendo acima de 70% de morte celular para a linhagem DAOY. Foi observado que o tratamento com ATO radiosensibilizou a linhagem UW402, *TP53*-mutado. Não foi encontrada associação com proteínas de reparo no tempo e dose estudados. O estudo de expressões relativas dos genes estudados demonstrou inibição, principalmente nas linhagens de interesse DAOY e UW402 –(SHH *TP53*) mutado. Estes achados *in vitro* apontam para um efeito citotóxico do ATO sobre as linhagens de MB pediátrico, podendo apresentar efeito radiosensibilizante. O ATO deve ser melhor explorado como droga alvo para MB SHH+, em caráter experimental.

Palavras-chave: meduloblastoma; irradiação; trióxido de arsênio, Sonic Hedgehog.

ABSTRACT

KLINGER, Paulo Henrique dos Santos. **Arsenic trioxide as a possible radiosensitizer in pediatric medulloblastoma cell lines.** 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor in children and adolescents. It is a heterogeneous disease under the genetic aspect, with at least 12 genetic-molecular subgroups being recognized, with impact on the clinical-pathological presentation. Patients of the SHH subgroup present somatic mutation in genes of the Hedgehog pathway, including *PTCH1*, *SUFU*, *SMO* and activation of the genes *GLI1* and *GLI2*. Mutations in the *TP53* gene may also be present, particularly in children over 3 years, and confer a worse prognosis. The arsenic trioxide (ATO) has an inhibitory action on SHH pathway genes, but little is known about its action. The present study aimed to evaluate the potential cytotoxic and radiosensitizing effects of ATO on the pediatric MB cells of SHH group (ONS-76: *TP53*-wild type; DAOY: *TP53*-mutated c.725GT and UW402 *TP53*-mutated c.464C>A). Cell proliferation, clonogenicity and apoptosis were compared in the MB strains following ATO treatment. The clonogenicity assay of ATO combined with irradiation was also evaluated. We investigated proteins responsible for repairing DNA damage and performed Western blotting of the Rad51 and Ku86 proteins. Gene expression analysis was performed using the real-time PCR. Selected genes integrating the SHH pathway as well as final effectors of signaling were also assessed. Cell viability was monitored at endpoints from 24 to 120h by the resazurin assay. The rate of apoptosis was measured by labeling with annexin and propidium iodide, as assessed by flow cytometry. The assays were performed in triplicate and analyzed by *One Way* and *Two Way* ANOVA, using the Bonferroni post-test, and being considered significant results a p value less than 0.05. It was possible to observe a decrease in cell viability in the three studied strains. In addition, there was a significant decrease in clonogenic capacity. There was also an increase in the apoptosis rates in the lineages, being above 70% of cell death for the DAOY lineage. It was found that the ATO treatment radiosensitized the UW402 strain - *TP53*-mutated. No association with time and dose of ATO and irradiation on the repair proteins was found. The study of the relative expressions of the studied genes demonstrated inhibition, mainly in the mutant line of interest DAOY and UW-402, a SHH-*TP53* mutated cell-line. These in vitro findings point to a cytotoxic effect of ATO on pediatric medulloblastoma lines, with a potential radiosensitizing effect. This study offers rationale for further assesment of ATO on SHH-MB, either alone or along with radiotherapy as a pre-clinical drug.

Keywords: medulloblastoma; irradiation; Arsenic trioxide, Sonic Hedgehog.

RESUMEN

KLINGER, Paulo Henrique dos Santos. **Trióxido de arsénico como posible radiosensibilizante en linajes celulares de meduloblastoma pediátrico**. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – faculdade de medicina de ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Le médulloblastome (MB) est la tumeur cérébrale maligne la plus courante chez les enfants et les adolescents. C'est une maladie hétérogène sous l'aspect génétique, avec au moins 12 sous-groupes génétiques-moléculaires reconnus, avec un impact sur la présentation clinique-pathologique. Le sous-groupe de SHH des patients possèdent une mutation somatique des gènes de la voie Hedgehog, y compris *PTCH1*, *SUFU*, *SMO* et l'activation des gènes *GLI1* et *GLI2*. La mutation *TP53* peut également être présente, en particulier chez les enfants de plus de 3 ans, et attribuent un mauvais pronostic. Le trioxyde d'arsenic (ATO) a une action inhibitrice sur les gènes de la voie SHH, mais on connaît peu de choses sur son action. Cet étude visait à évaluer les effets cytotoxiques potentiels de ATO seul et associé à l'irradiation sur les lignes MB SHH groupe pédiatrique (ONS-76: type *TP53* sauvage; DAOY: *TP53* c.725G> T muté et UW402 *TP53* c.464C>A muté). Les taux de prolifération cellulaire, de clonogénicité et d'apoptose ont été comparés après traitement par ATO. La clonogénicité de la combinaison médicament-irradiation a également été évaluée. Nous avons étudié les protéines responsables de la réparation des dommages à l'ADN avec Western blot des protéines Rad51 et Ku86. L'analyse de l'expression génique a été réalisée en utilisant la technique de QPCR. Gènes sélectionnés intégrant la voie SHH ainsi que les effecteurs finaux de la signalisation La viabilité cellulaire a été surveillée entre 24 et 120 h par le dosage de la résazurine. Le taux d'apoptose a été mesuré par marquage à l'annexine et à l'iodure de propidium, évalué par cytométrie de flux. Les analyses ont été effectuées en triple exemplaire et analysées par *One Way* / ANOVA à l'aide post-test Bonferroni, et les résultats ont été considérés comme p-valeur significative inférieure à 0,05. Il a été possible d'observer une diminution de la viabilité cellulaire dans les trois lignes étudiées. En outre, il y avait une diminution significative de la capacité clonogénique. Il y avait aussi une augmentation des taux d'apoptose dans les lignées, étant au-dessus de 70% de la mort cellulaire pour la lignée DAOY. Il a été constaté que le traitement avec ATO radiosensibilisé UW402 *TP53* muté. Aucune association avec le temps et les protéines de réparation de dose n'a été trouvée. L'étude des expressions relatives des gènes étudiés a démontré une inhibition, surtout dans la ligne d'intérêt DAOY - SHH *TP53* mutante. Ces résultats in vitro indiquent un effet cytotoxique de l'ATO sur les lignées de médulloblastome pédiatriques et aussi un effet radiosensibilisant. Il devrait être mieux exploré comme un médicament expérimental chez le MB.

Mots-clés: médulloblastome; irradiation; Trioxyde d'arsenic, Sonic Hedgehog.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Nova classificação dos tumores de SNC segundo a WHO.	21
Figura 1: Apresentação esquemática da via de Sinalização Transmembrana SHH.	22
Quadro 2: Característica genética, demográfica, expressão gênica e aspectos clínicos dos subgrupos de meduloblastoma.	25
Figura 2: Estrutura química do Trióxido de Arsênico (As_2O_3).	29
Figura 3: Delineamento experimental.	35
Figura 4: Desenho esquemático da configuração da placa de 384 poços TLDA para a classificação molecular das amostras.	36
Quadro 3: Lista de genes escolhidos para o PCR-Array das amostras do HC-FMRP: 1-22. Genes pertencentes ao “ <i>Codeset</i> ” utilizados para a classificação molecular, 23-25. Genes endógenos, 26-31. Genes da via <i>Notch</i>	38
Quadro 4: Lista de genes escolhidos para o PCR-Array das amostras do CIB: 1-22. Genes pertencentes ao “ <i>Codeset</i> ” utilizados para a classificação molecular, 23-25. Genes endógenos, 26-27. Genes da relacionados <i>MYCN</i> e <i>MYCC</i> , 28-30. Genes relacionados a pluripotência celular, 31. Efetor final da via <i>Sonic Hedgehog</i>	39
Figura 5-6: As Linhagem UW402, ONS-76 e DAOY. Estão alocadas no subgrupo SHH, outras linhagens celulares e amostras de tumores infantis do subgrupo SHH se encontram no <i>Heatmap</i> . Observamos também outras amostras de tumores do tipo meduloblastoma agrupadas nos demais subgrupos moleculares.	48
Figura 7: Viabilidade celular relativa nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES-1. O ensaio foi realizado nos tempos de 48, 72, 96 horas, nas dosagens de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 μ M. A altura das barras indica a porcentagem da viabilidade celular com Resazurina em diferentes tempos de cultura celular (eixo x).	49
Figura 8: Na primeira coluna a densidade celular nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, nas dosagens de 1; 2; 4; 8 e 16 μ M. A altura das barras indica a porcentagem da densidade celular corada com Giemsa em diferentes tempos de cultura celular (eixo x). Na segunda coluna a proliferação celular nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES. O ensaio também foi realizado nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, nas dosagens de 1; 2; 4; 8 e 16 μ M. A altura das barras indica a porcentagem proliferação celular em diferentes tempos de cultura celular (eixo x).....	50
Figura 9: Fração de sobrevida no ensaio de capacidade clonogênica nas linhagens UW402, DAOY e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 0,5, 1, 2 e 4 μ M. Foram consideradas colônias contendo no mínimo 50 células.	51

Figura 10: Porcentagem de apoptose por Anexina V e PI nas linhagens UW402, DAOY e ONS-76. Foram consideradas células marcadas com Anexina e células marcadas com Anexina e iodeto de propídeo. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2, 4 e 8µM.	52
Figura 11: ATO radiosensibiliza a linhagem UW402. *p<0,001. Os valores mostrados representam a media ± desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de <i>P</i> obtidos por regressão linear são mostrados (ATO <i>versus</i> ATO + Irradiação).	53
Figura 12: Efeito do ATO sobre a linhagem DAOY. *p<0,001. Os valores mostrados representam a media ± desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de <i>P</i> obtidos por regressão linear são mostrados (ATO <i>versus</i> ATO + Irradiação).	54
Figura 13: ATO não radiosensibiliza a linhagem ONS-76.	55
Figura 14: Linhagem ONS-76 ATO não diminui a expressão da proteína Ku86 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).	55
Figura 15: Linhagem DAOY ATO não diminui a expressão da proteína Ku86 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).	56
Figura 16: Linhagem ONS-76 ATO não diminui a expressão da proteína Rad51 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).	57
Figura 17: Linhagem DAOY ATO não diminui a expressão da proteína Rad51 importante no reparo das quebras de dupla-fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).	57
Figura 18: Linhagem DAOY ATO diminui a expressão relativa de <i>GLI</i> nas concentrações, 1, 2 e 4 µM. <i>PTCH</i> apresenta uma tendência a inibição, ao passo que <i>Ciclina-D</i> e <i>MYC</i> apresentam um importante aumento da expressão relativas nas concentrações estudadas.	58
Figura 19: Linhagem ONS ATO aumentou a expressão relativa de <i>GLI</i> na concentração de 2 µM.	59
Figura 20: Linhagem UW402 ATO diminui a expressão relativa de <i>GLI</i> nas concentrações, 1, 2 e na concentração de 4 µM aumentou. Ao passo que <i>MYC</i> , <i>BCL-2</i> , <i>Ciclina-D</i> e <i>MYC</i> apresentam um importante aumento da expressão relativas nas concentrações estudadas.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Característica genética, demográfica, expressão gênica e aspectos clínicos dos conjuntos propostos por CAVALLI para o subgrupo SHH de meduloblastoma.	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATO	Trióxido de Arsênico.
APC	Gene Supressor de Tumor Mutado de Câncer Colorretal.
“As”	Símbolo na tabela periódica do elemento Arsênico.
ATRA	Ácido transretinoico.
<i>βGUS</i>	Gene utilizado como endógeno.
c-DNA	<i>Complementary DNA</i> . Fita complementar do ácido desoxirribonucleico.
CDK6	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i> Ciclina 6 dependente de Quinase .
<i>Ciclina D</i>	Conjunto de proteínas que apresentam dentre suas principais funções controle do ciclo celular.
cm	Centímetros.
COG	<i>Children’s Oncology Group</i> .
<i>CTNNB1</i>	Gene responsável pela transição da proteína beta-catenina em humanos.
c.725G>T	Mutação em <i>TP53</i> encontrada na linhagem celular DAOY.
DAOY	Linhagem celular de meduloblastoma pediátrico
DHH	<i>Desert Hedghog</i> .
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EP	Eficiência de plaqueamento.
EWS-FLI1	Oncoproteína relacionada ao Sarcoma de Ewing
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> .
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
FS	Fração de sobrevivência.
<i>GLI1</i> e <i>GLI</i>	Gene e Proteína que constituem a via SHH.
<i>GLI2</i> e <i>GLI2</i>	Gene e Proteína que constituem a via SHH.

<i>GLI3</i> e GLI3	Gene e Proteína que constituem a via SHH.
<i>GUS-β</i>	Gene endógeno utilizado para técnica de PCR em tempo real.
Gy	Unidade de quantificação de irradiação.
Gy/min	Unidade de irradiação relacionada a unidade de tempo, minuto.
HAM	Meio de cultura para linhagens celulares.
HAM F10	Meio de cultura para linhagens celulares.
<i>HDCT</i>	<i>High doses chemotherapy with stem cells rescue.</i> Megaterapia em altas doses com resgate com células tronco.
IHH	<i>Indian Hedghog.</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
Ku70	Proteína relacionada a reparo do DNA após irradiação.
LPM	Leucemia pró-mielocítica.
MB	Meduloblastoma.
MBEN	Meduloblastoma extensamente nodular.
McCoy	Meio de cultura celular.
LMA-M3	Leucemia Mielóide Aguda Subtipo –M3.
m-RNA	RNA mensageiro.
μL	Microlitro.
μM	MicroMol.
NHEJ	New England Journal.
<i>NOS</i>	Not classified in any other subtype. Não Classificado em nenhum outro subtipo.
<i>Notch1</i>	Pertencente a família de genes <i>Notch</i> .
<i>Notch2</i>	Pertencente a família de genes <i>Notch</i> .
OMS	Organização Mundial da Saúde.
ONS-76	Linhagem celular de meduloblastoma.
PCR_Array	Metodologia que utiliza PCR para agrupamento.
PI	Iodeto de propídio.

PI3K-AKT-mTOR	Via alternativa de sinalização, fosfato três quinase.
PML	Proteína quimérica gerada na Leucemia Promielocítica.
<i>PNET</i>	<i>Primitive neuroectodermal tumor.</i> Tumor neuroectodérmico primitivo.
ppm	Partes por milhão.
PTCH1 e <i>PTCH1</i>	Proteína e Gene que compõe a via SHH.
QDF	Quebra de dupla fita.
<i>QI</i>	Coefficiente de inteligência.
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR (PCR em tempo real quantitativa).
RAD51	Proteína importante no reparo das quebras de dupla fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga.
<i>RBM24</i>	Gene que se relaciona com ligações aos ácidos nucleicos e ao mRNA 3-UTR.
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid</i> na língua portuguesa ácido ribonucleico
RPA	Complexo de Proteína de Replicação.
RPMI	Meio de cultura celular.
SFRP1	Gene que codifica proteínas da família SFRP que contém um domínio rico em cisteína homologado ao sítio de ligação WNT.
SHH	<i>Sonic Hedghog.</i>
SHH-MB	Meduloblastoma do Subtipo <i>Sonic Hedghog.</i>
SHH α	Subconjunto do subgrupo SHH, de meduloblastoma.
SHH β	Subconjunto do subgrupo SHH, de meduloblastoma.
SHH μ	Subconjunto do subgrupo SHH, de meduloblastoma.
SK-ES-1	Linhagem celular de Sarcoma de Ewing.
SMO e <i>SMO</i>	Proteína e Gene que integram a via SHH.
SNC	Sistema Nervoso Central.
<i>SOX2</i>	Gene importante na manutenção da pluripotencialidade e desenvolvimento do SNC durante a embriogênese.
<i>SPSS</i>	<i>Statistical Package for the Social Sciences.</i>

<i>SPRED1</i>	Gene que codifica proteína para regular a ativação da cascatade MAP quinase.
<i>SSB</i>	Quebra de ambas as cadeias simples.
<i>STR</i>	<i>Short Tandem Repeats.</i>
SUFU e <i>SUFU</i>	Proteína e Gene que integram a via SHH.
TERT	Gene promotor se relaciona a funções e manutenção da telomerase.
<i>TLDA</i>	<i>TaqMan Low Density Array.</i>
<i>TP53 selvagem</i>	Gene e proteína que atuam como fator de transcrição e se relacionado com outros genes e mecanismos de checagem do material genético. Selvagem se encontra em sua origem nativa.
<i>TP53 mutado</i>	Gene e proteína que atuam como fator de transcrição e se relacionado com outros genes e mecanismos de checagem do material genético. Mutado ou com sua função alterada.
TRIZOL	Reagente utilizado para isolamento de RNA, DNA e proteína de uma mesma amostra.
USP	Universidade de São Paulo.
UW402	Linhagem Celular de Meduloblastoma pediátrico.
VEGFA	Fator de Crescimento Endotelial e Vascular. <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde. World Health Organization.
WNT	Subgrupo de Meduloblastoma conhecido por <i>Wingless</i> .
YAP1	Proteína que atua como regulador transcricional ativando a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e suprime genes apoptóticos. YAP1 é inibido na via de sinalização Hippo, que permite o controle celular do tamanho do órgão e supressão tumoral.
2 $\Delta\Delta$ CT	Constante exponencial utilizada pela metodologia de Livak para análise relativa da expressão genica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Via de sinalização Hedgehog	21
1.2 Avanços na classificação molecular dos meduloblastomas	23
1.3 Novos conjuntos do subgrupo SHH	26
1.4 Drogas alvo na inibição da via SHH	27
1.5 Trióxido de Arsênio (ATO): droga alvo e inibidor de GLI.....	29
1.6 Radioterapia em crianças	31
1.7 Quebra de dupla fita de DNA e mecanismos de reparo celular pós-irradiação.....	32
 2 OBJETIVOS	 34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 35
3.1 Delineamento experimental realizado	35
3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultura	35
3.3 Isolamento do RNA e síntese de cDNA para estudo TDLA	36
3.4 Taqman Low Density array (TLDA PCR-Array).....	37
3.5 PCR Convencional para sequenciamento genico	40
3.6 Sequenciamento de Sanger	40
3.7 Diluição do Trióxido de Arsênico	41
3.7.1 Descrição do Procedimento para Preparo da Solução de trióxido de arsênio 0,1 mg L ⁻¹ : 0,25 L.....	41
3.8 Ensaio Funcionais	41
3.8.1 Ensaio de Proliferação e densidade celular	41
3.8.2 Ensaio de Clonogenicidade	42
3.8.3 Ensaio de Clonogenicidade da combinação de tratamentos ATO e irradiação.....	43
3.8.4 Ensaio de Apoptose	44
3.9 Expressão proteica - Western Blotting	44
3.9.1 Extração de proteínas.....	44
3.9.2 Western Blotting.....	45
3.10 PCR Quantitativo.....	45
3.10.1 Isolamento do RNA e síntese de cDNA	45

3.10.2 Quantificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	46
3.11 Análise Estatística	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Classificação das linhagens pela técnica Taqman Low Density array (TLDA PCR-Array)	47
4.2 Pesquisa da mutação <i>TP53</i> -mutado nas linhagens celulares ONS-76, DAOY e UW402..	49
4.3 Ensaio piloto de Proliferação Celular e Densidade Celular	51
4.4 Capacidade Clonogênica	53
4.5 Ensaio de Apoptose	54
4.6 Efeito radiosensibilizante do inibidor ATO na capacidade clonogênica.....	55
4.7 Efeito do inibidor ATO na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla fita, causadas pela irradiação	57
4.8 Efeito do inibidor ATO na expressão gênica relativa.....	60
5 DISCUSSÃO	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	77
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) correspondem em conjunto ao tumores sólidos mais comuns em indivíduos com idade inferior a 20 anos. Esta é a principal causa de morte relacionada ao câncer tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Dados dos registros de base populacional em câncer das crianças e dos adolescentes publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) confirmam a alta taxa de mortalidade dos tumores do SNC também no Brasil (INCA, 2008). Em 2003, Monteiro e Koifman analisaram as taxas de mortalidade dos tumores cerebrais no Brasil; os autores observaram um acréscimo na taxa de mortalidade de 2,24 casos/100000 habitantes para 3,35 casos/100.000 habitantes, correspondendo a um aumento aproximado de 50% no período estudado (1980-1998).

O meduloblastoma (MB) é o tumor cerebral maligno mais comum na infância. Constitui aproximadamente 20% de todos os tumores cerebrais em menores de 15 anos de idade e é responsável por taxas significativas de morbimortalidade (PATEL et al., 2014). Apresenta-se em mais de 80% dos casos como um tumor da linha média do cerebelo, de origem primária no vérmis cerebelar. O cerebelo é a parte do cérebro responsável pela coordenação, marcha, equilíbrio, motricidade fina, dentre outras funções importantes. Possui uma íntima proximidade com o quarto ventrículo e associado a um crescimento tumoral agressivo leva à obstrução do fluxo liquórico – síndromes do mutismo cerebelar (PACKER et al., 1999). Como consequência, os pacientes podem apresentar sintomas relacionados: cefaleia, aumento da pressão arterial, náuseas, vômitos e alterações no ritmo respiratório. Já em lactentes e pré-escolares os sintomas podem incluir alterações visuais e na marcha, lateralização do pescoço e rigidez, aumento do perímetro craniano e abaulamento da fontanela (NEJAT et al., 2008).

Em função da sua localização e origem embrionária, os MBs apresentam uma tendência à disseminação para o espaço subaracnoideo, ocasionando o desenvolvimento de implantes metastáticos através do líquido (RICKERT; PAULUS, 2001). O MB pode apresentar metástase ao diagnóstico ou tardiamente (BONT et al., 2008; WELLS et al., 2010). Seu pico de incidência ocorre entre crianças dos 6 a 8 anos de idade (RUTKOWSKI et al., 2005).

Histologicamente os MBs podem ser divididos em subgrupos. O tipo histológico clássico representa 70% dos MBs; aqueles com variação anaplásica ou de grandes células são os de pior prognóstico e os de menor frequência (menos de 5% dos casos), e os tumores desmoplásicos/nodulares, particularmente em lactentes, apresentam as melhores chances de cura (CRAWFORD et al., 2007).

Por um longo período, a classificação dos MB foi apoiada exclusivamente na histologia. O prognóstico e estratificações em subgrupos histológicos em associação à imuno-histoquímica não levavam em consideração alterações moleculares, genéticas, assim como características biológicas da doença. Mais recentemente, com os crescentes avanços na classificação molecular, se fez necessária uma nova classificação que contemplasse aspectos genéticos da doença (LOUIS et al., 2016) (Quadro 01).

Quadro 1 - Nova classificação dos tumores de SNC segundo a WHO.

Tumores de origem Embrionária
Meduloblastoma, com definição genética
Meduloblastoma, WNT-ativado
Meduloblastoma, SHH ativado e <i>TP53</i> mutado
Meduloblastoma, SHH ativado e <i>TP53</i> selvagem
Meduloblastoma, não SHH, não WNT
Meduloblastoma, grupo 3
Meduloblastoma, grupo 4
Meduloblastoma, histologicamente definido
Meduloblastoma, clássico
Meduloblastoma, desmoplásico/nodular
Meduloblastoma, grande células/anaplásico
Meduloblastoma NOS*

Legenda – NOS: Não classificado em nenhum subtipo.

1.1 Via de sinalização Hedgehog

A ativação da via de sinalização SHH é essencial durante o desenvolvimento embrionário para formação de diferentes tecidos e órgãos. Após este período, os genes da via SHH colaboram para a homeostase e reparo dos tecidos adultos, por meio da manutenção de células tronco e progenitoras, controle da proliferação e destino celular. Entretanto, quando ativada de modo aberrante pode levar ao desenvolvimento tumoral em diferentes órgãos (DE SMAELE et al., 2008).

O MB constitui um dos diferentes tipos de tumores que pode ser originado por meio da desregulação da SHH (FELLAY et al., 2011). Esta via é responsável pela proliferação do tecido cerebelar durante seu desenvolvimento. Entretanto, a manutenção da ativação da via

SHH após o período embrionário pode ocasionar o surgimento do MB (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014).

A ativação da via SHH pode se dar pela sinalização por ligantes específicos e também por mutações em componentes da via. Os três principais ligantes, classificados como morfogênicos, são: *Sonic hedgehog* (SHH), *Desert hedgehog* (DHH) e *Indian hedgehog* (IHH), sendo o primeiro o mais estudado (BUCZKOWICZ et al., 2011).

A SHH possui um peso molecular inicial de 45 kDa, apresenta atividade autocatalítica e pode ser clivada nas duas porções, N-terminal e C-terminal - 20 kDa e 25 kDa, respectivamente (SHAHI et al., 2012). O grupamento Carboxil da porção N-terminal de SHH sofre uma alteração formando colesterol, que facilita sua ligação, secreção e tráfego. Para sua secreção e ação parácrina é necessária a interação com a proteína *Dispatched*. Quando SHH se liga ao receptor transmembrana PTCH1 ocorre uma liberação de SMO, receptor usualmente inibido por PTCH1, que modifica sua conformação e transloca para o citoplasma. Neste compartimento celular, a proteína SMO se liga a SUFU, através desta ligação ocorre a liberação de proteínas da família GLI. Estas proteínas, GLI1 (ativador), GLI2 (ativador ou inibidor) e GLI3 (inibidor), translocam para o núcleo onde atuam como fatores de transcrição, que regulam a expressão de diferentes alvos, tais como *GLI*, *PTCH1*, *CICLINA D* e *MYC* (Figura 1). Este conjunto de genes está envolvido na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (BUCZKOWICZ et al., 2011).

Figura 1. Apresentação esquemática da via de Sinalização Transmembrana SHH (baseado em Han e Alvarez-Buylla, 2010).

Outro mecanismo que leva à ativação da via SHH é a mutação de genes reguladores inibitórios. Um exemplo deste mecanismo é a perda de heterozigose e mutação somática do gene que codifica o homólogo *PTCH1* (ROBINSON et al., 2015). Assim como outros componentes da via de sinalização SHH, a mutação de *PTCH1* parece ser suficiente para o desenvolvimento de MB. Em um subconjunto de MBs pediátricos foram descritas mutações em *PTCH* (RAFFEL et al., 1997); sendo que as mutações observadas foram tanto da linha germinal ou somáticas, e particularmente podem apresentar mutações em *SUFU* (TAYLOR et al., 2002). A atividade efetora final da família de proteínas GLI também está intimamente ligada à tumorigênese. A inativação de ambos os alelos de *GLI* levou à formação de MB em camundongos heterozigotos para *PTCH*, sugerindo que a sinalização de SHH pode dirigir a tumorigênese de uma maneira independente (RAFFEL et al., 1997).

Mesmo sendo encontradas quantidades similares de mutações nos quatro grupos de estudo, o sequenciamento genético em MB sugere a compartimentalização em doenças diferentes que acometem em faixas etárias específicas (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014). As mutações em *SUFU* foram verificadas na maior parte em lactentes e as mutações de *SMO* foram encontradas principalmente em adultos. Já as mutações em *TP53* foram encontrados em quase 50% dos pacientes com 4-17 anos de idade, o que confere pior prognóstico ao subgrupo molecular SHH de meduloblastoma. Estes resultados sugerem que o tratamento de MB poderá ser estratificado segundo a faixa etária e alteração genética presente em um futuro próximo (TAYLOR et al., 2002; PATEL et al., 2014).

1.2 Avanços na classificação molecular dos meduloblastomas

O estudo molecular dos MBs revelou perfis de expressão genético-moleculares distintos entre os diferentes subgrupos deste tumor. Inicialmente foram considerados quatro subgrupos principais, classificados de modo independente dos subgrupos histológicos, e que foram denominados por Taylor e colaboradores (2012) como, *Wingless* (WNT), *Sonic Hedgehog* (SHH), Grupo 3 e Grupo 4. Sendo assim, o MB compreende um conjunto de diversos subgrupos que compõe uma mesma neoplasia sob o aspecto anátomo-patológico (NORTHCOTT et al., 2011; GERBER et al., 2014; PATEL et al., 2014). Mais recentemente, essa subclassificação molecular foi expandida, com o reconhecimento de 12 subgrupos distintos para o MB: dois WNT, quatro SHH, três grupo 3 e três grupo 4 (CAVALLI et al., 2017).

O subgrupo WNT corresponde a 10% de todos os MBs e apresenta como uma de suas principais características a mutação somática no gene *CTNNB1*, que codifica a proteína beta-catenina. Quando esta proteína não é degradada acumula-se no citoplasma, sendo estabilizada e translocada para o núcleo. O acúmulo da beta-catenina nuclear leva à regulação da transcrição de uma série de genes-alvo, envolvidos principalmente na proliferação celular (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014). Este grupo também pode apresentar mutação germinal no gene supressor de tumor *APC*, além de monossomia no cromossomo 6. Geralmente acomete crianças de maior idade, o subtipo histológico MB clássico é mais comum neste subgrupo, raramente ocorre metástase ao diagnóstico e pode estar associado à Síndrome de Turcot (HAMILTON et al., 1995).

O subgrupo SHH, na maioria dos casos, apresenta mutação somática em um ou mais genes da via SHH (ex.: *PTCH1*, *SUFU* ou *SMO*), o que contribui para a sua ativação constitutiva. O seu tipo histológico pode ser desmoplásico, extensivamente nodular ou clássico, e mais raramente anaplásico. A faixa etária de ocorrência é bifásica, acometendo lactentes/pré-escolares e adolescentes/adultos jovens. O prognóstico em lactentes é particularmente excelente, quando associado à histologia extensamente nodular ou desmoplásica (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014). A tendência atual para subgrupo de lactentes com tumores SHH mutados é a de reduzir a intensidade da terapia, visando manter boas chances de cura e menor morbidade (RUTKOWSKI et al., 2005). Entretanto, MBs desmoplásicos/nodulares do grupo SHH que ocorrem em crianças acima de 3 anos, adolescentes e adultos jovens apresentam pior sobrevida; a evolução desfavorável desse subgrupo associa-se a mutações no *TP53* (RAMASWAMY et al., 2015). O MB do grupo SHH pode estar associado à síndrome de Gorlin (EVANS et al., 2010; GARRÈ et al., 2009). Assim como a mutação do *TP53* pode estar associada à síndrome de Li-Fraumeni, o que, além de gerar mal prognóstico, predispõe ao surgimento de diferentes tipos de câncer (SORRELL et al., 2013).

O subgrupo 3 é, quase em sua totalidade, diagnosticado em crianças e muito raramente em adultos ou adolescentes. Apresenta uma maior incidência no sexo masculino e maior ocorrência de metástases no diagnóstico. Este grupo possui prognóstico reservado, geralmente pertencendo aos subtipos histológicos de grandes células/anaplásico ou clássico. Na maioria dos casos apresenta o gene *MYC* amplificado. No futuro, espera-se que os genes envolvidos nesta via, a exemplo do *MYC* e outros, possam ser candidatos a terapia-alvo farmacológica (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014).

O subgrupo 4 é o mais comum, ocorre em todas as idades, pode ser metastático ao diagnóstico e apresenta um prognóstico intermediário. É descrita a ocorrência de amplificação dos proto-oncogenes *n-MYC* e *CDK6* - Ciclina-dependente de Quinase 6-(NORTHCOTT et al., 2011). Assim como o grupo 3, não há definição exata de predisposição genética. Embora na maioria dos casos apresente o isocromosomo 17 como um marcador citogenético, ainda constitui o grupo menos caracterizado sob o aspecto molecular dentre todos os subgrupos dos MBs (FELLAY et al., 2011; GERBER et al., 2014).

Quadro 2. Característica genética, demográfica, expressão gênica e aspectos clínicos dos subgrupos de meduloblastoma.

Grupos	WNT	SHH	Grupo 3	Grupo 4
Genética	<i>CTNNB1</i> mutado	<i>PTCH1/SMO/SUFU</i> mutado <i>GLI2</i> Amplificado <i>n-MYC</i> amplificado	17q <i>MYC</i> amplificado	17q <i>CDK6</i> amplificado <i>n-MYC</i> amplificado
Expressão Genica	WNT sinal <i>MYC</i> +	SHH sinal <i>n-MYC</i> +	Fotorreceptor/GABAérgico <i>MYC</i> +++	Neuronal/ <i>n-MYC</i> Mínimo <i>MYC/n-MYC</i>
Aspectos Clínicos	H*: Clássico M**: Raro P***: Bom	H: Desmoplásico/nodular e Clássico M: Incomum P: Bom em crianças; outros grupos indeterminado.	H: Clássico M: Frequentemente P: Pobre	H: Clássico M: Frequentemente P: Indeterminado
Demografia	Mais comum em adultos seguido por crianças; igual entre os sexos	Mais comum em lactentes e adultos; igual entre os sexos	Mais comum em crianças seguido por lactentes; predomínio no sexo masculino em uma razão de 2 casos para 1	Comum em crianças, ocorrendo também em lactentes e adultos, predomínio no sexo masculino em uma razão de 2 casos para 1

Legenda: *H Histologia **Metástase *** Prognóstico

Ao se analisar a sobrevida global destes subgrupos observa-se que crianças com MB do subgrupo WNT apresentam em torno de 95% de sobrevida em 5 anos, enquanto que pacientes classificados como grupo 3 e 4 apresentam sobrevida variando entre 39-58%, a depender da idade de acometimento, presença de metástase e alterações citogenéticas desfavoráveis coexistentes (CAVALLI et al., 2017). Pacientes com MB do subgrupo SHH apresentam uma sobrevida intermediária, sendo esta sobrevida particularmente superior no grupo dos lactentes. Esse achado, provavelmente, está associado à alta frequência da histologia desmoplásica entre tumores SHH em lactentes, uma vez que a histologia desmoplásica/nodular neste grupo etário é um marcador isolado de prognóstico favorável (NORTHCOTT et al., 2011; FELLAY et al., 2011; PATEL et al., 2014). Em contrapartida, pacientes do subgrupo SHH que não apresentam histologia desmoplásica/nodular demonstram uma pior sobrevida. Esse subgrupo de pacientes com MB, em conjunto com pacientes do grupo 3, necessita de novas abordagens terapêuticas a fim de melhorar suas chances de cura e diminuir os efeitos colaterais ocasionados pelo tratamento atual (NORTHCOTT et al., 2011; FELLAY et al., 2011).

1.3 Novos conjuntos do subgrupo SHH

Por meio da técnica de agrupamento espectral de amostras do subgrupo SHH foram identificados quatro padrões distintos do ponto de vista clínico e citogenético (CAVALLI et al., 2017). Deste modo, as crianças e adolescentes com idade entre 3 e 16 anos possuem pior prognóstico e, frequentemente, apresentam amplificações de *n-MYC* e amplificações do gene *GLI2* - quadro 2 (GERBER et al., 2014). A citogenética deste grupo frequentemente demonstra achados singulares como a perda de 9q, 10q e 17p e amplificações de *YAP1* (CAVALLI et al., 2017). Conforme descrito anteriormente no Quadro 1, a nova classificação da OMS contempla tumores meduloblastoma SHH, *TP53* mutados, como uma categoria de muito alto risco (LOUIS et al., 2016; RAMASWAMY et al., 2015). O grupo de estudos de Cavalli et al. (2017) encontrou mutações enriquecidas em *TP53* no conjunto SHH α como sendo preditivo de mau prognóstico; a sobrevida global para SHH α encontrada foi de 69,8%, o percentual de metástase de 20% e a histologia mais frequente foram desmoplásica e de grandes células anaplásico.

Curiosamente, os tumores SHH em crianças com idade inferior a 3 anos encontram-se distribuídos principalmente nos conjuntos SHH β e SHH γ . Os tumores SHH β são frequentemente metastáticos e se apresentaram em 33% dos casos com disseminação, mostram frequentemente deleções focais de *PTEN* associadas a múltiplos focos de

amplificações, com sobrevida global de 67,3% e sua histologia predominante desmoplásica. Em contrapartida, o agrupamento SHH γ se correlaciona a melhores sobrevidas (88%) e muito mais raramente apresentam metástase (8,9% dos casos) (CAVALLI et al., 2017). Com predominância histológica de nodularidade extensa e desmoplásica a divisão SHH γ apresenta um comportamento clínico mais indolente. Porém, a diferença de sobrevivência dos pacientes SHH γ não é estatisticamente significativa entre os tumores MBEN e não MBEN, sugerindo que a afiliação do subtipo é um biomarcador mais forte do que a histopatologia em lactentes com meduloblastoma do subgrupo SHH (CAVALLI et al., 2017).

Já o conjunto SHH δ é composto de adultos, que têm prognóstico favorável – sobrevida de 88,5%, as metástases são pouco frequentes (9,4%) e são enriquecidos por mutações do promotor *TERT*, assim como translocação 10q22 e 11q23.3 (CAVALLI et al., 2017).

Tabela 1. Característica genética, demográfica, expressão gênica e aspectos clínicos dos conjuntos propostos por CAVALLI para o subgrupo SHH de meduloblastoma

Conjunto	SHH α	SHH β	SHH γ	SHH δ
Idade	>3 anos e <17 anos	< 3 anos	< 3 anos	Adultos
Histologia	LCA, Desmoplásico	Desmoplásico	MBEN Desmoplásico	Desmoplásico
Metástase	20%	33%	8,9%	9,4%
Sobrevida	69,8%	67,3%	88%	88,5%
Citogenética	9q ⁻ , 10q ⁻ , 17p ⁻		Genoma balanceado	
Amplificações e alterações focais	<i>n-MYC</i> Amplificação <i>GLI2</i> Amplificação <i>YAPI</i> Amplificação	Perda de <i>PTEN</i>		10q22 ⁻ , 11q23.3 ⁻
Outros eventos	Mutação de <i>TP53</i>			Mutações no promotor <i>TERT</i>

*Tabela adaptada de Cavalli et al., (2017).

1.4 Drogas alvo na inibição da via SHH

Estratégias para inibir a via SHH estão em contínuo avanço. Os primeiros estudos de desenvolvimento de drogas inibidoras desta via centraram-se na ação direta sobre a proteína

SMO, com seu papel regulador central da via SHH. Neste contexto surgiu a Ciclopamida. A Ciclopamida foi descrita inicialmente como um alcaloide esteroidal e, posteriormente, foi observada sua ação de antagonista do receptor de SMO (KIM et al., 2010). Diversos outros inibidores de SMO foram sintetizados desde então. Quatro destes compostos evoluíram para ensaios clínicos de fase II, incluindo Vismodegib (GDC-0449), NVP-LDE225 (Novartis), IPI-926 (Infinito) e XL-139 (BMS/Exelis). Todos esses compostos atuam como inibidores competitivos do ligante de Ciclopamida (KIM et al., 2010). A resposta à terapia com essas drogas mostrou-se eficiente em um primeiro momento da terapia, porém casos de resistência ao tratamento foram descritos após um período de uso. Como possíveis causas desta resistência foram descritas alterações de *GLI2*, amplificação de *CCND1* e ativação alternativa da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR (KIM et al., 2010).

Novas estratégias farmacológicas para inibição da via SHH foram avaliadas partindo-se da observação de que a expressão aumentada de *GLI1* e *GLI2* confere mau prognóstico em MB pediátrico, sendo *GLI2* central para a ativação de SHH. A expressão de *GLI2* leva à redução da viabilidade, número de células e mudança na sua morfologia, assim como redução na apoptose em MB. O gene *GLI1* apresenta sítio de transcrição próximo ao *GLI2*, sendo transcrito em conjunto. Entretanto, acredita-se que *GLI1* não possui ação principal, sendo apenas um marcador transcricional, o que relaciona *GLI2* como efector principal e possível alvo terapêutico (BUCZKOWICZ et al., 2011).

Já era descrito em literatura que o ATO apresentava ação em linhagens celulares tanto de sarcoma de Ewing assim como MB, este último devido à sua interação com *GLI*, mas, o exato mecanismo de ação ainda não havia sido elucidado. Beauchamp et al. (2009) demonstrou ser a ligação intranuclear de forma direta com DNA o mecanismo de inibição do ATO. Por meio de marcadores citoplasmáticos e nucleares, observou que as concentrações intracitoplasmáticas e nucleares da proteína GLI não se alteravam com a inibição com ATO (BEAUCHAMP et al., 2011).

Novas estratégias para o tratamento do meduloblastoma estão em constante desenvolvimento, especialmente drogas alvo-direcionadas para o subgrupo de mau prognóstico SHH com *TP53* mutado. A via SHH, e seus componentes PTCH1, SMO e SUFU foram inicialmente investigados na tentativa de se desenvolver uma droga específica para bloqueio destas vias. Os primeiros resultados clínicos desta intervenção foram positivos, mas após um período de uso terapêutico foi observada resistência ao tratamento. Prosseguindo nesta tentativa de bloqueio, o gene *GLI* é um alvo pouco explorado.

1.5 Trióxido de Arsênio (ATO): droga alvo e inibidor de GLI

O Arsênio é o elemento químico de número atômico 33 com o símbolo do elemento “As”. É um semimetal que, dependendo de sua modificação, pode exibir propriedades metálicas e não metálicas. O Arsênio ocorre muito raramente na forma livre, mas geralmente está presente como um composto e geralmente como sulfetos (os sulfetos são sais de sulfato de hidrogênio H_2S). Ocorre praticamente em todos os solos, mas em concentrações muito baixas que, raramente, excedem 10ppm. De todos os elementos químicos, ocupa o 53^o na “classificação total” dos elementos mais comuns.

O trióxido de arsênio possui um histórico de aplicação terapêutica prodigioso. Seu uso terapêutico data de 400 a.C., havendo relatos de seu emprego por Hipócrates, Aristóteles, Dioscorides e Plínio (AU, 2011). A estrutura química do ATO encontra-se ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química do Trióxido de Arsênio (As_2O_3). Modificado em (AU, 2011)

O ATO é uma droga antiga que tem sido estudada e empregada em diversas doenças. Os minerais de Arsênio foram usados contra febre, doenças reumáticas, malária, enxaqueca, tuberculose, diabetes. No século XVIII, uma droga milagrosa foi introduzida, contendo Arsenito de Potássio e água lavanda, a chamada solução de Fowler. Porém, logo surgiram os efeitos adversos.

Acredita-se que o primeiro relato de sua ação cancerígena tenha sido observado em Paris (1822). Em 1888, Hutchinson relatou na *London Pathology Society* seis casos de câncer de pele em pacientes que haviam ingerido arsênio para tratamento de dermatoses.

Também foi usado por Paul Ehrlich um composto à base de Arsênio para o tratamento de Sífilis nos anos de 1900. Com o desenvolvimento das penicilinas a substância ficou obsoleta. Em 1905, a substância sintetizada por Antoine Béchamp foi empregada contra a

doença do sono africana apresentando bom efeito. Apesar dos relatos de ação cancerígena, a droga foi usada na Alemanha até os anos de 1960 como remédio para Psoríase e, ainda hoje, é utilizada em soluções de homeopatia com o nome de *Arsenicum album*.

Após séculos das primeiras utilizações, não deixa de ser curioso constatar que o ATO, em pleno século XXI, ressurge como uma das drogas empregadas no tratamento da leucemia promielocítica aguda (LPA) subtipo M3 refratária ao tratamento com o ácido transretinoico (ATRA), com bons resultados (NASR et al., 2008). O emprego de ATO, em primeira remissão para LPA, se encontra na fase clínica II, sendo seu uso promissor, devido à redução na dose de antracíclicos utilizados no protocolo, reduzindo assim a toxicidade causada pelo tratamento convencional (KUTNY et al., 2017).

O ATO é um elemento semimetálico, conhecido por exercer seu efeito biológico por meio da interação direta do seu ânion trivalente AsO_3^- sobre grupamentos “Thiol” em cisteínas vicinais de proteínas-alvo (NASR et al., 2008). Na LPA o domínio N-terminal do gene *PML* é rico em cisteína; esse domínio inclui um anel principal (R) e um domínio em hélice contidos dentro da proteína que são Zn-finger (LU et al., 2007).

Estudo realizado por Au e colaboradores (2012) demonstrou, em pacientes portadores de LPA com recaída em SNC ou em profilaxia intratecal, que o ATO em administração enteral, atinge concentração satisfatória no SNC. Nesse estudo, foi demonstrada também a correlação entre o nível sérico e o nível líquórico do ATO, sendo a relação da concentração encontrada no SNC 17,7% do nível plasmático circulante (AU et al., 2012).

Foi demonstrado que o ATO inibe o crescimento tumoral, bloqueando a transcrição de *GLI*. O ATO também foi capaz de reduzir a expressão de genes da via SHH como *PTCH1*, *GLI1* e *GLI2*, em linhagens tumorais humanas de osteosarcoma (NAKAMURA et al., 2013). Nesse mesmo estudo foi observado que o tratamento com ATO promove apoptose das células neoplásicas causada pelo acúmulo de danos diretos ao DNA. Também avaliando-se linhagens celulares de tumores ósseos – sarcoma de Ewing – foi observado sensibilidade ao uso de ATO apresentando ligação direta de ATO à oncoproteína EWS-FLI1 (BEAUCHAMP et al., 2011).

O ATO foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de LPA. Ademais, esse é um medicamento que apresenta uma boa permeabilidade no SNC e está implicado na inibição de uma via central de genes ativados no MB, particularmente no grupo SHH. Todas estas características em conjunto tornam o ATO uma droga bastante atraente para o estudo *in vitro*, modelos animais e posterior avaliação do seu potencial terapêutico em MB do subgrupo SHH (NAKAMURA et al., 2013).

1.6 Radioterapia em crianças

O emprego da irradiação é fundamental para o tratamento de crianças com MB com idade acima de 3 anos. Os primeiros protocolos de tratamento do MB com radioterapia exclusiva utilizavam doses de 36 Gy em crânio e coluna, adicionados a um reforço em fossa posterior totalizando 54- 56 Gy. Com essa estratégia, as taxas de sobrevida em 5 anos chegaram em torno de 50-60% para crianças maiores de 3 anos com doença de baixo risco: pacientes com ressecção completa ou resíduo menor que 1,5 cm, com doença localizada (GERBER et al., 2014).

A despeito da boa sobrevida global, observou-se uma grande morbidade relacionada às altas doses de radioterapia utilizadas nos primeiros protocolos de tratamento dos MBs. A irradiação do SNC pode reduzir em média 4 pontos/ano o coeficiente de inteligência (QI) destas crianças. A radioterapia ainda pode levar a alterações endócrinas, no desenvolvimento pondero-estatural, perda auditiva e neoplasias secundárias. Desse modo, foram e ainda são necessárias estratégias para redução dos efeitos tóxicos da radioterapia, com possível melhora de sobrevida em crianças com MB (GERBER et al., 2014).

No grupo de crianças menores de 3 anos de idade observa-se uma morbidade quase sempre inaceitável com emprego de radioterapia para o tratamento do MB. Uma estratégia para este grupo é o uso de quimioterapia seguido por transplante autólogo com resgate de células tronco hematopoéticas (HDCT). Para que esta estratégia seja eficaz é necessário controle da doença, com ressecção macroscópica total ou subtotal, exceto para pacientes com doença metastática. Neste grupo de pacientes há uma sobrevida comparável ou superior ao emprego da irradiação, porém com morbidade reduzida (GERBER et al., 2014).

Resultados favoráveis na redução da morbidade no tratamento de MB foram obtidos com protocolos que utilizaram quimioterapia adjuvante à radioterapia. Tal estratégia possibilitou a redução das doses de radioterapia utilizadas profilaticamente em neuroeixo de pacientes com MB de baixo risco. A irradiação cranioespinal na dose de 23,4 Gy seguida de *boost* no leito tumoral na dose final de 54 a 55,8 GY associado à vincristina como radiosensibilizante, seguido de oito ciclos de quimioterapia com Cisplatina/Vincristina/Lomustina ou Ciclofosfamida possibilitou uma sobrevida global excelente para paciente com MB baixo risco (PACKER et al., 2006).

Outro exemplo de redução na intensidade da radiação foi a utilização do agente radiosensibilizante Carboplatina com o emprego de radioterapia hiperfracionada em pacientes de alto risco de recidiva (MASSIMINO et al., 2000). Pacientes do grupo de alto

risco – doença disseminada, pacientes menores de 3 anos, ressecção incompleta ou com resíduo maior que 1,5 cm – e metastáticos foram tratados com quimioterapia neoadjuvante – metotrexate, ciclofosfamida e etoposídeo, seguidos por radioterapia hiperfracionada com emprego de Carboplatina; estes pacientes de alto-risco apresentaram uma sobrevida em 5 anos de 72-73% (GANDOLA et al., 2009).

Apesar das melhoras na sobrevida com a abordagem terapia combinada de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, ainda se faz necessária a melhora da sobrevida dos pacientes com MB, particularmente para os pacientes de alto risco (GANDOLA et al., 2009).

1.7 Quebra de dupla fita de DNA e mecanismos de reparo celular pós-irradiação

O DNA é considerado o principal alvo da radioterapia, que provoca a morte celular através da indução de ambas as quebras de cadeia simples (SSB) e quebras de cadeia dupla (DSB). DSBs são potentes indutores de mutações e morte celular e que ocorrem frequentemente após irradiação (SONG et al., 2015).

A recombinação homóloga desempenha um papel-chave na reparação de quebras de cadeias duplas (DSB), e contribui de forma significativa para a tolerância celular à radioterapia e quimioterapia. A reparação de DSB por recombinação homóloga é iniciada por 5' a 3' reparo (DSB reparo), gerada com nucleases de DNA de cadeia simples a 3' (3'ssDNA) em locais de DSB. Após a quebra de dupla fita de DNA, a ativação das cascatas de proteínas quinases amplifica e diversifica o sinal por meio de uma série de moléculas efetoras. Como resultado deste efeito citotóxico, uma desregulação do controle do ciclo celular, de reparação de dupla quebra, e de regulação da transcrição e pós-transcrição é iniciado, levando a apoptose (RICHARDSON; JASIN, 2000).

O complexo MRN corta as extremidades 5' e 3' da quebra dupla que será coberto pela proteína de replicação A (RPA). A RPA é então trocada pela proteína RAD51, esse processo que é mediado pelas proteínas BRCA2 e PALB2, resultando na formação de filamentos nucleoproteicos, após ocorrer a invasão na cromátide irmã intacta. Devido a essa invasão, um *loop* será formado e as duas cromátides irmãs irão se conectar, formando assim duas junções de Holliday. Após a síntese de DNA pelas DNA polimerases e a ligação das duas fitas, por meio de DNA ligases, as duas junções de Holliday são desfeitas pela ação catalítica de resolvases, levando assim ao reparo completo (MOYNAHAN; JASIN, 2010).

Ao contrário da HR, o reparo pela união terminal não homóloga (NHEJ) é uma forma menos precisa de reparo de DSB, pois as duas terminações da molécula de DNA quebrada são

processadas para formar extremidades compatíveis que serão ligadas diretamente sem se basear em uma molécula de DNA não danificada. Esse mecanismo é sujeito a uma maior ocorrência de erros. Na via NHEJ, o heterodímero Ku70/Ku86 (Ku86 também é conhecido como Ku80) ATP dependente é a primeira proteína a se ligar às extremidades danificadas do DNA, no sítio das quebras da dupla fita (MIMORI; HARDIN, 1986).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do ATO como possível agente radiosensibilizante nas linhagens de meduloblastoma pediátrico como inibidor de GLI na via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do inibidor ATO nas taxas de proliferação celular, capacidade clonogênica e taxa de apoptose das linhagens de meduloblastoma pediátrico.
- Analisar o efeito radiosensibilizante do ATO combinando com o tratamento de irradiação na capacidade clonogênica das linhagens.
- Avaliar a expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla fita, induzidas pela irradiação, após o tratamento com ATO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental realizado

Figura 3. Delineamento Experimental.

3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Foram utilizadas as linhagens de MB pediátrico DAOY (SHH *TP53* mutado - c.725G>T), ONS-76 (*TP53* nativo), UW402 (SHH, *TP53*-mutado c.464C>A), e a linhagem SK-ES-1, proveniente de um sarcoma de Ewing, que apresenta efeito de ATO sobre a oncoproteína EWS-FLI1, e, portanto, foi utilizada como controle positivo nos ensaios de proliferação (BEAUCHAMP et al., 2011). As linhagens celulares DAOY e ONS-76, pertencentes ao grupo SHH (ZANINI et al., 2013), foram mantidas em meio RPMI (Sigma) suplementadas com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL penicilina e 100µg/mL estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. A linhagem UW402, classificada no laboratório de Oncologia Pediátrica como do subgrupo SHH, foi cultivada em meio HAM F10 (Sigma) e a linhagem SK-ES-1 foi mantida em meio McCoy (Sigma) sob as mesmas condições. Todas as linhagens

utilizadas são radiosensíveis, foram realizados testes de autenticação através da análise do perfil de STR (*Short Tandem Repeats*), gentilmente realizados pelo laboratório de investigação de paternidade do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), sob a responsabilidade do professor Dr. Aguinaldo Simões. A confirmação do subgrupo SHH para as linhagens DAOY, ONS-76 e UW402 foram realizadas no laboratório de Pediatria pelo método *TaqMan Low Density Arrays* (TLDA) (STEG et al., 2006) pelo Doutor Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Anexo 1), tendo sido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dispensado por se tratar de estudo envolvendo linhagens celulares tumorais.

3.3 Isolamento do RNA e síntese de cDNA para estudo TLDA

As linhagens celulares confluentes foram submetidas a digestão enzimática e lise celular. O *pellet* resultante foi ressuspensão com solução salina (PBS). Foram acrescentado 0,75 mL do reagente TRIZOL LSa e clorofórmio, precipitado com isopropanol durante 24 horas a -20°C, lavado duas vezes com 75% de etanol e ressuspensão em 50µL de água DEPC para obtenção do RNA. A síntese de cDNA a partir do mRNA foi realizada utilizando o *kit High Capacity*, (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 500ng de RNA para a síntese. Para cada amostra, os cDNAs foram sintetizados em duplicata, sendo 25 µL de reação em cada microtubo. Depois, a cada microtubo de reação foram adicionados 25µL de água DEPC e 50 µL de Master Mix Universal (Life Technologies ®) em uma proporção de 1:1. Finalmente foram aplicadas em cada canaleta 100µL do mix com cDNA e Master Mix. Como observado no desenho da placa, a cada duas canaletas analisa-se uma amostra para o conjunto de genes (31+1).

Figura 4. Desenho esquemático da configuração da placa de 384 poços TLDA para a classificação molecular das amostras.

3.4 Taqman Low Density array (TLDA PCR-Array)

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) no equipamento QuantStudio 12K Flex (Life Technologies®) utilizando-se sondas Taqman específicas para cada um dos genes de estudo. Para a classificação molecular, foram utilizados os 20 genes dos 22 denominados “*CodeSet*” previamente descritos por Taylor e colaboradores. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK, 2001).

Para a classificação de cada amostra para cada subgrupo molecular foi realizada uma *Clusterização* hierárquica não supervisionada utilizando o método de Correlação de Pearson. Um *Heatmap* foi gerado utilizando como parâmetros de agrupamento valores de r (coeficiente de correlação de Pearson) e *Average linkage* como algoritmo de clusterização (a matriz da correlação de Pearson se encontra nos Anexos). O tipo de mapa escolhido foi “*target-centric*”. O *software* utilizado para a execução dos métodos estatísticos e representação gráfica por *Heatmap* foi o Expression Suite 1.0.4 (©Life Technologies). Para a detecção de falsos-positivos foi realizado o pós-teste de Benjamin Hochberg. A tipificação molecular das linhagens de acordo com a sua clusterização foi gentilmente realizada pelo Doutor Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro.

Quadro 3. Lista de genes escolhidos para o PCR-Array das amostras do HC-FMRP: 1-22. Genes pertencentes ao “*Codeset*” utilizados para a classificação molecular, 23-25. Genes endógenos, 26-31. Genes da via Notch.

	ID do ensaio (TaqMan)	Nome do Gene
1	Hs00183662_m1	WIF1
2	Hs01115665_m1	TNC
3	Hs01065893_m1	GAD1
4	Hs00205294_m1	DKK2
5	Hs00244574_m1	EMX2
6	Hs01062534_m1	PDLIM3
7	Hs00166804_m1	EYA1
8	Hs01011015_m1	HHIP
9	Hs00944192_s1	ATOH1
10	Hs00610060_m1	SFRP1
11	Hs01097136_m1	IMPG2
12	Hs00181291_m1	GABRA5
13	Hs01650973_m1	EGFL11(EYS)
14	Hs00172997_m1	NRL
15	Hs00740710_s1	MAB21L2
16	Hs01099013_m1	NPR3
17	Hs00264798_s1	KCNa1
18	Hs00172872_m1	EOMES
19	Hs01064779_m1	KHDRBS2
20	Hs00290607_m1	RBM24
21	Hs00369888_m1	UNC5D
22	Hs00973637_m1	OAS1
23	Hs99999909_m1	HPRT
24	Hs99999908_m1	GUS-B
25	Hs99999910_m1	TBP
26	Hs00172878_m1	HES1
27	Hs01070032_m1	JAG1
28	Hs00171432_m1	JAG2
29	Hs00194509_m1	DLL1
30	Hs01062014_m1	Notch1
31	Hs01050702_m1	Notch2

Quadro 4. Lista de genes escolhidos para o PCR-Array das amostras do CIB: **1-22.** Genes pertencentes ao “*Codeset*” utilizados para a classificação molecular, **23-25.** Genes endógenos, **26-27.** Genes da relacionados MYCN e MYCC, **28-30.** Genes relacionados a pluripotência celular, **31.** Efetor final da via Sonic Hedgehog.

	ID do ensaio (TaqMan)	Nome do Gene
1	Hs00183662_m1	WIF1
2	Hs01115665_m1	TNC
3	Hs01065893_m1	GAD1
4	Hs00205294_m1	DKK2
5	Hs00244574_m1	EMX2
6	Hs01062534_m1	PDLIM3
7	Hs00166804_m1	EYA1
8	Hs01011015_m1	HHIP
9	Hs00944192_s1	ATOH1
10	Hs00610060_m1	SFRP1
11	Hs01097136_m1	IMPG2
12	Hs00181291_m1	GABRA5
13	Hs01650973_m1	EGFL11(EYS)
14	Hs00172997_m1	NRL
15	Hs01040900_s1	MAB21L2
16	Hs01099013_m1	NPR3
17	Hs00264798_s1	KCNa1
18	Hs00172872_m1	EOMES
19	Hs01064779_m1	KHDRBS2
20	Hs00290607_m1	RBM24
21	Hs00369888_m1	UNC5D
22	Hs00973637_m1	OAS1
23	Hs99999909_m1	HPRT
24	Hs99999908_m1	GUS-B
25	Hs99999910_m1	TBP
26	Hs00232074_m1	MYCN
27	Hs00153408_m1	MYCC
28	Hs01053049_s1	SOX2
29	Hs04195369_s1	OCT4
30	Hs01370653_m1	RBFOX3
31	Hs01119974_m1	GLI2

3.5 PCR Convencional para sequenciamento genico

O DNA das linhagens DAOY, ONS-76 e UW402 foi extraído com o kit Qiaamp DNA mini kit, de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de DNA e utilizadas as seguintes concentrações dos reagentes: 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 15 pmoles de cada *primer* (F- TGGCTCTGACTGTACCACCA e R- GGAGTCTTCCAGTGTGATGATG) e 1U de Taq DNA polimerase (PlatinumTMTaq, Invitrogen, EUA).

As condições da PCR foram 35 ciclos de desnaturação 95°C (1min), anelamento à 58°C (1min) e extensão à 72°C. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta Bio-Imaging Systems MiniBis Pro.

3.6 Sequenciamento de Sanger

Os produtos de PCR foram sequenciados, utilizando o reagente “*Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*”. Os *primers* do sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR convencional. Para cada reação (Volume final = 10 µL) foram utilizados: 1µL do produto de PCR; 1 µL de Big Dye Terminator e 2 µL de tampão (Tris-HCl 0,2M, pH 9,0 e MgCl₂ 50mM) e 1 µL do *primer*.

Após o término da reação, foi realizada precipitação, utilizando: 1 µL de EDTA 125nM; 1 µL de acetato de sódio 3M (pH4,0) e 25 µL de etanol absoluto. O material foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugado por 30 minutos a 3000 rpm, -4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 35 µL de etanol 70% gelado seguido por centrifugação por 15 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram enviadas para o Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) do Hemocentro de Ribeirão Preto e o sequenciamento foi realizado no equipamento 3500 xl genetic analyzer (Applied Biosystems).

3.7 Diluição do Trióxido de Arsênico

3.7.1 Descrição do Procedimento para Preparo da Solução de trióxido de arsênio 0,1 mg L⁻¹ : 0,25 L

Em uma placa de Petri, pesou-se cerca de 0,3 g do reagente As₂O₃, sendo, posteriormente, levado à estufa para secagem a uma temperatura de 110°C, por um período de 4 horas, sobre vidro de relógio. Após secagem, o reagente foi armazenado em dessecador sob sílica gel, sob alto vácuo, até o momento de utilização do mesmo. Durante a secagem do reagente, preparam-se as soluções de hidróxido de sódio e solução diluída de ácido sulfúrico. Para o preparo da solução alcalina, pesou-se 0,251 g de NaOH em um béquer, em seguida, foi adicionada 1,00 g de H₂O, constituindo numa solução de massa final de 1,251 g. O preparo da solução diluída de H₂SO₄ foi realizada em um balão volumétrico (5 mL) por meio da adição de 0,264 g de ácido sulfúrico concentrado (~98%) a 4,736 g de água destilada. Na solução alcalina preparada dissolveu-se 0,025 g de trióxido de arsênio (base seca) e, após sua completa solubilização com auxílio de ligeira agitação em agitador de tubos, adicionou-se 1,49 g de solução diluída de ácido sulfúrico diluído (21,1%) para neutralização. Com o auxílio de uma pipeta graduada, adicionaram-se 2,5 mL da solução diluída de H₂SO₄ e, após completa homogeneização e resfriamento, transferiu-se o volume total para um balão volumétrico de 250 mL, sendo completado com água destilada até o volume exato de 250 mL. Esta solução final contém 0,1 mg de trióxido de arsênio.

3.8 Ensaios Funcionais

3.8.1 Ensaio de Proliferação e densidade celular

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio com o Kit Resazurin Cell Viability (Cell Signaling Technology, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram semeadas 2x10³ células/poço das linhagens UW402, ONS76 e DAOY e 3x10³ células/poço da linhagem celular SK-ES-1, em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24 horas. Foi realizado um experimento teste, com doses de ATO já utilizadas na literatura. As células foram tratadas com o ATO nas diferentes concentrações (0,001-10 μM) e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo de tratamento foi adicionada a solução de Resazurina (10% do volume inicial). As placas foram incubadas por 4 horas nas

condições de cultura padrão. O reagente azul não fluorescente é reduzido a resorufina altamente fluorescente através de enzimas desidrogenase presentes em células metabolicamente ativas com pico de absorbância 570 nm e 595 nm (*ratio*), após 4 horas da aplicação de resazurina. A absorbância foi lida no leitor de placa iMax Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) sendo o valor encontrado proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas. Após o experimento piloto foi estabelecido intervalo menor entre as doses, que foram de 1-16 μ M, e os tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas, todos os experimentos realizados em triplicata em três momentos independentes.

O ensaio de densidade Giemsa foi conduzido de acordo com Castro-Gamero et al. (2013). Foram semeadas 2×10^3 células/poço das linhagens UW402, ONS76 e DAOY e 3×10^3 células/poço da linhagem celular SK-ES-1, em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24 horas. Foi realizado um experimento teste, com doses já utilizadas na literatura, como já descrito na metodologia do ensaio de proliferação. As células foram tratadas com o ATO nas diferentes concentrações (0,001-10 μ M) e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. A cada intervalo de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com corante Giemsa (1%). As células foram, então, lavadas com água, e o corante foi removido com 100 μ L de metanol absoluto por poço. O valor da absorbância em cada poço foi determinado foi 595 nm (*ratio*), utilizado um leitor iMax Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA), todos os experimentos realizados em triplicata em três momentos independentes.

3.8.2 Ensaio de Clonogenicidade

As linhagens de MB pediátrico foram semeadas numa densidade de 500 células/poço em placas de seis poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ATO (0,5-4 μ M) e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Uma vez finalizado o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS 1x, e meio sem droga foi acrescentado para permitir o crescimento de colônias durante aproximadamente 7-9 dias à 37 °C. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com 1% Giemsa. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas com lupa, e foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP) sob a fórmula:

$$EP = \frac{\text{Nº de colônias formadas}}{\text{Nº de células plaqueadas}} \times 100$$

Com o qual isso, foi calculada a fração de sobrevivência (FS), sob a fórmula:

$$FS = \frac{\text{Nº de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Nº de células plaqueadas} \times EP}$$

A EP é própria de cada linhagem para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que têm a capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento, e representa a percentagem de células plaqueadas que, após o tratamento ainda apresentam a capacidade de formar colônia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A partir dos dados de FS foram realizadas as análises estatísticas.

3.8.3 Ensaio de Clonogenicidade da combinação de tratamentos ATO e irradiação

As linhagens de MB pediátrico foram semeadas numa densidade de 500 células/poço em placas de seis poços. Após 24 horas de incubação, foram separados dois grupos. O primeiro grupo de células, foi tratado com ATO na concentrações de 0,5 μM e o segundo grupo não recebeu tratamento quimioterápico. Ambos os grupos foram, então, incubados em estufa a 37°C por 48 horas. Uma vez finalizado o tempo de tratamento para o grupo com ATO, o meio de cultura foi retirado, as células tratadas foram então lavadas com PBS 1x, e meio ausente de drogas foi acrescentado antes de serem irradiadas utilizando um aparelho RS-2000 X-Ray Irradiator Biological System (Rad Source Technologies, Inc., Suwanee, USA). A taxa de dose foi de 1,115 Gy/min e as doses foram 0, 0,5, 1, 2 e 4Gy. As células irradiadas foram, então, incubadas a 37°C por 7-9 dias, fixadas com metanol absoluto, coradas com Giemsa, e subsequentemente contadas. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os demais procedimentos utilizaram a mesma metodologia descrita em análise clonogênica.

3.8.4 Ensaio de Apoptose

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V – Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V fluorescein isothiocyanate* - BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) e células necróticas com iodeto de propídio (PI). A anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a este composto com especificidade. A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para que as células sejam removidas. A marcação com PI indica que as células perderam a integridade da membrana.

Após o tratamento com as diferentes concentrações do ATO (2-8 μM) as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min, lavadas com PBS 1x gelado e ressuspendidas em 200 μL de Tampão de ligação 1x para anexina V (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, Califórnia, USA). As células foram então marcadas com 5 μL de Anexina V e 50 μL de uma solução de 50 μM de iodeto de propídeo (PI), e analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences Pharmigen) contabilizando um total de 10.000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para este experimento contou-se com a gentil colaboração do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade de Patrícia Vianna Bonini Palma.

3.9 Expressão proteica - Western Blotting

3.9.1 Extração de proteínas

A extração de proteína total da linhagem celular foi realizada utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) juntamente com inibidores de protease e fosfatase, seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Uma solução de soro albumina bovina (BSA, 0,1 mg/mL) foi utilizada como padrão. Os valores de absorbância foram obtidos através da leitura em espectrofotômetro iMax Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm.

3.9.2 Western Blotting

A metodologia utilizada, seguida de acordo com Sambrook e colaboradores (1989), foi modificada como descrito a seguir. Concentrações iguais (80µg) de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, EUA). Após o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose, seguiu-se o processo de imunodeteção. As membranas foram bloqueadas em solução *non-fat-Milk* 5% em TBST (0,1%) por uma hora. Em seguida ocorreu a incubação com os anticorpos primário específicos para cada proteína RAD51 na concentração 1:500, (Santa Cruz Biotechnology, EUA) Ku86 1:1000, (Santa Cruz Biotechnology, EUA), *overnight* e anti-GAPDH e anti-Vinculina anticorpo primário na concentração 1:1000, (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por uma hora. Posteriormente as membranas foram lavadas com TBS-T (cinco lavagens de cinco minutos cada). Finalmente, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário na concentração anti-rabbit 1:10000 em TBST para RAD51 e para Ku86 anti-goat 1:10000 em TBST já para anti-GAPDH e anti-Vinculina anti-Mouse 1:10000, conjugado a uma enzima *horseradish* peroxidase e mais um ciclo de lavagem. A revelação foi realizada por meio do emprego do substrato quimioluminescente ECLTM (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e a visualização no aparelho ChemiDOC XRS (Bio-Rad, EUA). As proteínas avaliadas por esta metodologia foram RAD51, e Ku86.

3.10 PCR Quantitativo

3.10.1 Isolamento do RNA e síntese de cDNA

As amostras de cultura foram submetidas a lise celular e o *pellet* resultante foi ressuspenso em solução salina (PBS). Foi acrescentado à amostra 0,75 mL do reagente TRIZOL LSa e posteriormente seguiu-se a extração de RNA segundo as especificações do fabricante. A síntese de cDNA, a partir do mRNA, foi realizada utilizando o *kit High Capacity*, (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10.2 Quantificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) em equipamento ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection Systems (PE Applied Biosystems), utilizando-se sondas Taqman específicas para cada um dos genes de estudo, que foram adquiridas *by demand* da Applied Biosystems. A concentração final dos *primers* foi de 900 nM e a concentração para as sondas Taqman foi de 300 nM. O volume final para cada PCR foi de 20 µL, incluindo 9 µL de amostra investigada diluída (1/10), 10 µL Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 µL de sonda. Foram utilizados como controle endógeno os genes β GUS e GAPDH. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através dos *softwares* Statistical Package for the Social Sciences – SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) e os gráficos foram realizados com *GraphPad Prism* 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Com relação aos ensaios funcionais, foram realizados três experimentos independentes, cada um deles avaliado em triplicata. Para a análise foi considerada a média dos experimentos realizados e, posteriormente, avaliados através do teste *ANOVA one-way*, *post test* de *Bonferroni*. Valores de $p < 0.05$ foram adotados para o nível de significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 Classificação das linhagens pela técnica Taqman Low Density array (TLDA PCR-Array)

A *Clusterização* hierárquica das linhagens celulares UW402, ONS-76 e DAOY foi gerada para confirmar, que as três são pertencentes ao subgrupo molecular SHH. Foi gerado um *Heatmap* utilizando como parâmetros de agrupamento valores de r (coeficiente de correlação de Pearson) e *Average linkage* como algoritmo de clusterização (a matriz da correlação de Pearson). A *clusterização* gerada confirmou serem do subgrupo SHH, estando agrupados conjuntamente às demais amostras tumorais do subgrupo SHH.

4.2 Pesquisa da mutação *TP53*-mutado c.725G>T nas linhagens celulares ONS-76, DAOY e UW402 e *TP53*-mutado c.464C>A para linhagem UW402.

A pesquisa da mutação das linhagens celulares, ONS-76, DAOY e UW402 foi gerada para confirmar que a linhagem celular DAOY possui a mutação em homozigose de *TP53*-mutado c.725G>T (Figura 7). Também para confirmar que as linhagens celulares ONS-76 e UW402 não apresentam a mutação específica *TP53*-mutado c.725G>T. Investigado pontualmente que a linhagem UW402 apresenta *TP53*-mutado c.464C>A.

Figura 7. Linhagem DAOY, ONS-76 e UW402. A linhagem celular DAOY (C) possui a mutação em homozigose de *TP53*-mutado c.725G>T, já as linhagens celulares ONS-76 (A) e UW-402 (B) não demonstraram ter esta mutação. A linhagem celular UW-402 (D) possui a mutação em homozigose de *TP53*-mutado c.464C>A.

4.3 Ensaio piloto de Proliferação Celular e Densidade Celular

A fase inicial de ambos os experimentos contou com dose teste para determinação das concentrações de ATO a serem utilizadas (Figura 4). Após análise da morfologia celular por coloração de Giemsa observou-se que o fármaco levou a uma diminuição na densidade celular de maneira significativa na maioria dos tempos e concentrações estudadas. De uma forma geral, em ordem decrescente de sensibilidade ao ATO observamos as ONS-76, DAOY, UW402 e SK-ES-1 (Figura 8).

Os ensaios de proliferação celular foram concordantes com os ensaios de densidade celular e também apresentaram significância estatística na maior parte dos tempos e concentrações estudadas (Figura 9).

Figura 8. Viabilidade celular relativa nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES-1. O ensaio foi realizado nos tempos de 48, 72, 96 horas, nas dosagens de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 μ M. A altura das barras indica a porcentagem da viabilidade celular com Resazurina em diferentes tempos de cultura celular (eixo x).

Figura 9. Na primeira coluna a densidade celular nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES. O ensaio foi realizado nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, nas dosagens de 1; 2; 4; 8 e 16 μ M. A altura das barras indica a porcentagem a densidade celular corada com Giemsa em diferentes tempos de cultura celular (eixo x). Na segunda coluna a proliferação celular nas linhagens DAOY, ONS- 76, UW402 e controle positivo SK-ES. O ensaio também foi realizado nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, nas dosagens de 1; 2; 4; 8 e 16 μ M. A altura das barras indica a porcentagem proliferação celular em diferentes tempos de cultura celular (eixo x). * $p < 0.05$.

4.4 Capacidade Clonogênica

A sobrevivência clonogênica é também um importante critério de sobrevivência celular em resposta a agentes antitumorais, pois a morte celular pode ocorrer após algumas divisões celulares. O ATO se mostrou eficiente em impedir a formação de colônias de forma significativa nas concentrações de 0,5; 1; 2; e 4 μM em todas as linhagens de meduloblastoma pediátrico testadas, com destaque para DAOY (Figura 10).

Figura 10. Fração de sobrevivência no ensaio de capacidade clonogênica nas linhagens UW402, DAOY e ONS-76. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 0,5, 1, 2 e 4 μM . Foram consideradas colônias contendo no mínimo 50 células. * $p < 0.05$.

4.5 Ensaio de Apoptose

Após 48 horas de tratamento com ATO, a linhagem celular UW402 apresentou taxa de apoptose superior a 20, 25 e 60% para concentrações respectivas de 2, 4 e 8 μ M. Já a linhagem celular ONS-76 apresentou no tempo de 48 horas 5, 10 e 20% de apoptose nas concentrações de 2, 4 e 8 μ M, respectivamente. A linhagem celular DAOY apresentou no mesmo tempo aproximadamente 10, 40 e 70% de apoptose nas concentrações de 2, 4 e 8 μ M, respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Porcentagem de apoptose por Anexina V e PI nas linhagens UW402, DAOY e ONS-76. Foram consideradas células marcadas com Anexina e células marcadas com Anexina e iodeto de propídeo. O ensaio foi realizado com tratamento de 48 horas, nas dosagens de 2, 4 e 8 μ M. * $p < 0.05$.

4.6 Efeito radiosensibilizante do inibidor ATO na capacidade clonogênica

Para determinar o efeito radiosensibilizante de ATO (redução da dose de radioterapia empregada obtendo o mesmo efeito clínico), as linhagens pediátricas foram tratadas com o inibidor, sendo utilizado 0,5 μ M do ATO em associação com radiação nas doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy. Foi observado que o tratamento com o inibidor promoveu radiosensibilização na linhagem UW402. Esta linhagem apresentou uma diminuição na formação de colônias, na dose máxima de irradiação, de 20% (Figura 12) e a linhagem DAOY, uma diminuição, na formação de colônias na dose máxima de irradiação, de 40% (Figura 13). Apesar do aparente efeito radiosensibilizante da combinação, não foi observado efeito significativamente estatístico para a linhagem DAOY. Portanto, o tratamento com ATO foi capaz de sensibilizar as linhagem UW402 à radiação. Não houve efeito sobre a linhagem ONS-76 (Figura 14).

Figura 12. ATO radiosensibiliza a linhagem UW402. * $p < 0,001$. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (Irradiação *versus* Irradiação+ATO).

Figura 13. Efeito do ATO sobre a linhagem DAOY. Os valores mostrados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Para todas as linhagens celulares os valores de P obtidos por regressão linear são mostrados (Irradiação *versus* Irradiação+ATO).

Figura 14. ATO não radiosensibiliza a linhagem ONS-76. *p não significativo.

4.7 Efeito do inibidor ATO na expressão de proteínas responsáveis pelo reparo das quebras de dupla fita, causadas pela irradiação

Através de Western Blot, foi avaliada a capacidade do ATO em alterar a expressão de algumas proteínas presentes nas principais vias responsáveis pelo reparo das quebras de dupla fita, causadas pela irradiação: proteína RAD51, importante na via de recombinação homóloga (HR), o heterodímero Ku70/Ku86 e a proteína DNA-PKcs importantes na união terminal não homóloga (NHEJ). Para a realização da análise, foi utilizado o valor 0,5 μ M, em associação com radiação, sendo a dose utilizada de 0,5, Gy para as linhagens DAOY e ONS-76. As proteínas foram coletadas após 4 horas de exposição à irradiação.

Os resultados demonstraram que o ATO não diminuiu a eficiência das linhagens estudadas para reparar as DSBs causadas pela irradiação, não diminuindo a expressão destas duas proteínas responsáveis pelo reparo (Figuras 15, 16, 17 e 18).

Figura 15. Linhagem ONS-76 ATO não diminui a expressão da proteína Ku86 importante no reparo das quebras de dupla fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).

Figura 16. Linhagem DAOY ATO não diminui a expressão da proteína Ku86 importante no reparo das quebras de dupla fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).

Figura 17. Linhagem ONS-76 ATO não diminui a expressão da proteína Rad51 importante no reparo das quebras de dupla fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).

Figura 18. Linhagem DAOY ATO não diminui a expressão da proteína Rad51 importante no reparo das quebras de dupla fita causadas pela irradiação através da via de recombinação homóloga (HR).

4.8 Efeito do inibidor ATO na expressão gênica relativa

Por meio do PCR em tempo real (qRT-PCR), foi avaliada a capacidade do ATO em alterar a expressão gênica relativa de genes-alvos da via SHH. Foram escolhidos genes que compõem a via SHH, sendo representativos da sinalização inicial até a via efetora final. Desta forma, foram analisados os genes *PTCH1*, *GLI1*, *n-MYC*, Ciclina-D e *BCL-2* eleitos por constituir a via SHH representando a via inicial e efetora. Para as três linhagens DAOY, ONS-76 e UW-402 foi realizada análise no tempo 48 horas. As concentrações de ATO utilizadas foram 1, 2 e 4 μ M (Figuras 19, 20 e 21).

Figura 19. Linhagem DAOY ATO diminui a expressão relativa de Gli nas concentrações, 1, 2 e 4 μ M. PTCH apresenta uma tendência a inibição, ao passo que Ciclina-D e MYC apresentam um importante aumento da expressão relativa nas concentrações estudadas.

Figura 20. Linhagem ONS ATO aumentou a expressão relativa de Gli na concentração de 2 μ M.

Linhagem UW402 ATO diminui a expressão relativa de Gli nas concentrações, 1, 2 e na concentração de 4 μ M aumentou. Ao passo que MYC, BCL-2, Ciclina-D e MYC apresentam um importante aumento da expressão relativa nas concentrações estudadas.

6 DISCUSSÃO

Diferentes tumores podem utilizar-se de ativação da via canônica SHH como o evento primário para o início ou a manutenção de neoplasias, como é o caso do MB. São exemplos de tumores que utilizam-se dessa via o carcinoma basocelular, câncer de mama, câncer de pâncreas, câncer de próstata, leucemia mieloide aguda, câncer de esôfago, câncer de pulmão do tipo pequenas células, osteosarcoma, câncer colorretal, carcinoma hepatocelular, tumores de sistema nervoso central – meduloblastoma e PNET, dentre outros (RODRIGUES-BLANCO et al., 2017). Desse modo, estudos que concentram-se na ativação da via SHH e a pesquisa de fármacos que modificam essa sinalização de forma alvo-dirigidas são de fundamental importância para o entendimento da tumorigenese (KLINGER et al., 2017) em diversas neoplasias humanas.

Em se tratando de quimioterapia e radioterapia, é desejada no tratamento oncológico a redução de morbidade e mortalidade. Esse efeito pode ser obtido, dentre outros modos, ao se reduzir a quantidade de irradiação empregada, mantendo-se o mesmo resultado no tratamento. Carboplatina e Vincristina são exemplos de agentes quimioterápicos adjuvantes com efeito radiosensibilizantes que são empregados na prática clínica (PACKER et al., 2006).

Outra forma de redução de morbidade e mortalidade em terapia é a substituição de medicamentos quimioterápicos que apresentam efeito tóxico elevado por agentes com menor toxicidade. Ao exemplo do tratamento da LPA, onde, em estudo clínico fase III, o emprego de ATO reduziu a necessidade de doses de antracíclicos – que são cardiotoxícos – apresentando boas taxas de remissão da doença com menor toxicidade (WANG et al., 2010; KUTNY et al., 2017).

Sobre efeitos tóxicos e tratamento, um dos modelos bem-sucedidos da Oncologia Pediátrica é o uso da poliquimioterapia em LLA. Esta estratégia de associação de drogas modificou o tratamento e o prognóstico destas crianças. Ela consiste em uso sequencial de diferentes fármacos que atuam em conjunto, seguido por fases que contemplam drogas fundamentais para momentos específicos do tratamento (EVANS, 2013). Para a reprodução desse modelo em outros tipos histológicos de tumor infantil, há necessidade de uma maior variedade de drogas disponíveis para uso clínico.

Com relação aos tumores cerebrais, um dos pontos fundamentais a serem transpostos no tratamento é a barreira hematoencefálica. São desejáveis também boas concentrações em LCR e clarificação lenta, de modo a manter boas concentrações por um longo período de tempo das drogas para tratar neoplasias cerebrais. Para atingir esse objetivo alguns protocolos

utilizam-se de fármacos que promovem mieloablação como efeito adverso. Thiothepa é exemplo onde a penetração no SNC da droga de infusão endovenosa é excelente, sendo que a toxicidade medular gerada leva à necessidade de resgate com células tronco hematopoéticas – transplante autólogo para suporte dos efeitos tóxicos sobre a hematopoese (FANGUSARO et al., 2008).

Na busca por avanços no tratamento oncológico ressurgiu, após décadas de pouco uso, o trióxido de Arsênio. O Arsênio é um semimetal, que apresenta um perfil de toxicidade já conhecido e bem tolerado, boa penetração em SNC, sendo aprovado para uso pelo FDA e com grande expertise clínica de utilização (AU et al., 2012). O ATO também possui um bom índice terapêutico: faixa do nível sérico que compreende a dose terapêutica e a dose tóxica do fármaco. O desejado é a dose tóxica afastada da dose terapêutica, o que ocorre com o ATO. Em estudos de LPA o uso de 0,15 mg/kg/dose por 25 dias, 5 dias por semana, demonstrou baixo grau de toxicidade. O ATO apresenta uma meia-vida de 10-14 horas e sua excreção se faz pela via renal e hepática (AU et al., 2012). Um dos efeitos de ATO é o de inibidor direto de *GLI*, que compõe a via final da sinalização SHH (BEAUCHAMP et al., 2011).

Para reproduzir um modelo laboratorial correspondente ao subgrupo SHH de meduloblastoma, observado na prática clínica, utilizaram-se as linhagens celulares DAOY, ONS-76 e UW-402. As linhagens celulares DAOY e ONS-76, pertencentes ao grupo SHH, sendo DAOY (SHH *TP53* mutado - c.725G>T), ONS-76 (*TP53* nativo) (ZANINI et al., 2013). A linhagem UW402, também pertencente ao grupo SHH, mas não tipificada nesse estudo quanto aos ganhos e/ou mutações adicionais, apenas constatado ser SHH *TP53* mutado - c.464C>A. As três linhagens foram estudadas por TDLA no presente estudo e *clusterizaram* em conjunto no grupo SHH, assim como realizado a investigação da mutação de *TP53* seguido pelo sequenciamento. Desta forma, foi possível reproduzir em laboratório as condições clínicas desejáveis para observar a ação do ATO sobre a proliferação, capacidade clonogênica e apoptose.

Proliferação celular

O presente estudo pretendeu avaliar ação citotóxica e radiosensibilizante do ATO em linhagens celulares de MB humanos do subtipo SHH. Como fase piloto deste estudo, utilizamos diferentes concentrações de ATO em cultura, variando de 0,001 até 10 μ M. Foi observado que doses em concentrações entre 1 e 10 μ M demonstravam efeito sobre a proliferação celular. Schleicher et al. (2017) estudando linhagens celulares de

rabdomiossarcoma utilizou dose de 1 μM de ATO. Moloudi e colaboradores (2017) estudando linhagens celulares de glioblastoma, encontrou como dose as concentrações entre 2 – 5 μM . Wu et al. (2016) em linhagens celulares de mielodisplasia utilizou doses entre 2 – 8 μM de ATO. Linhagens celulares de meduloblastoma também apresentaram como concentração média ideal 1 μM (BEAUCHAMP et al., 2011) sendo as concentrações empregadas neste estudo foram concordantes com a literatura existente.

A proliferação celular descontrolada é uma característica dos tumores agressivos (IARC, 2015). Neste estudo, o ensaio de proliferação celular foi realizado em diferentes tempos e doses de ATO, mostrando a eficiência da droga na inibição da proliferação para as três linhagens estudadas, chegando a mais de 60% de inibição nas maiores concentrações da droga para o tempo de 120 horas.

O IC_{50} é a medida da eficácia de um composto na inibição de uma função biológica ou bioquímica (IARC, 2015). Esta medida quantitativa indica o quanto um determinado medicamento é necessário para inibir um determinado processo biológico em 50% (IARC, 2015). Observamos que nas três linhagens atingimos a inibição de 50% em diferentes concentrações do fármaco em período de tempo distintos, e que a maior sensibilidade na inibição foi apresentada pela linhagem celular DAOY (SHH *TP53* mutado - c.725G>T), seguida pela ONS-76 (*TP53* nativo) e UW402 (SHH *TP53* mutado c.464C>A), com inibição em diferentes concentrações e diversos tempos. O resultado obtido com a linhagem celular DAOY foi concordante com o estudo de Beauchamp et al. (2011) que também utilizou linhagens celulares de meduloblastoma. O maior efeito inibitório sobre a proliferação celular do ATO sobre a linhagem SHH *TP53* mutada (DAOY) foi um achado de extrema relevância sob o aspecto clínico. Os pacientes com meduloblastoma do subtipo histológico desmoplásico/nodular (SHH positivos) e que apresentam mutação do *TP53* são os que demonstram pior sobrevida dentro deste subgrupo. Novas abordagens terapêuticas são desejáveis para esses pacientes.

Respeitando as diferentes características biológicas e as diferentes concentrações empregadas pode-se considerar que os dados do presente estudo sejam concordantes com o observado por Schleicher e colaboradores (2017), no qual uma dose de ATO de 1 μM inibiu a proliferação celular de linhagens de rabdomiossarcoma após 4 dias em aproximadamente 50%. Moloudi et al, (2017) pesquisando linhagens celulares de glioblastoma também obteve bons resultados sobre a proliferação celular em concentrações de 5 μM em combinação com radioterapia 4 Gy.

Estudo clínico realizado por Au e colaboradores (2008) em pacientes com LPA encontrou a mediana da concentração plasmáticas de ATO de 0,49 $\mu\text{M/L}$ em pacientes submetidos a tratamento desta leucemia. As concentrações que utilizamos no modelo experimental foram próximas das empregadas em pacientes na prática clínica, sendo bem toleradas nos ensaios celulares *in vitro*.

Capacidade clonogênica e efeito radiosensibilizante

A capacidade de uma célula formar colônia é fundamental para o estabelecimento de metástases após a migração, visto que estas células ainda precisam manter a capacidade de colonizar o novo ambiente (IARC, 2015). Além disso, por meio deste ensaio, pudemos observar por um período maior o comportamento da linhagem celular e, por conseguinte, a interação com a droga testada e com a radioterapia (IARC, 2015). Isso posto, o uso da capacidade clonogênica é útil ao analisarmos potenciais drogas para o tratamento tumoral. A sobrevivência clonogênica é também importante na avaliação da resposta aos agentes antitumorais, isso porque a morte celular ocorre após algumas divisões celulares sucessivas (IARC, 2015). A droga em estudo mostrou-se eficiente em impedir a formação e progressão das colônias de forma significativa nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 μM após 48 horas de tratamento para as linhagens UW402, DAOY e ONS-76. A inibição na formação das colônias ocorreu de forma diretamente proporcional à concentração de ATO para as concentrações descritas nas três linhagens.

Os ensaios funcionais confirmaram um importante efeito citotóxico da droga sobre células tumorais de MB subgrupo SHH. O passo seguinte foi a avaliação da combinação do fármaco com a modalidade clássica de tratamento: a irradiação. ATO foi capaz de sensibilizar as linhagem UW402 (*TP53* mutado) à irradiação; a combinação também apresentou algum efeito marginal aparente sobre a linhagem DAOY, apesar de não estatisticamente significante. Já para a linhagem ONS-76 não houve efeito radiosensibilizante. Foi verificada a expressão de proteínas presentes nas principais vias de reparo das quebras de dupla fita, causadas pela irradiação: proteína RAD51, via de recombinação homóloga (HR), o heterodímero Ku86 e a proteína DNA-PKcs união terminal não homóloga (NHEJ). O ATO não se mostrou competente em diminuir a eficiência das linhagens estudadas para reparar as DSBs causadas pela irradiação, não diminuindo a expressão das proteínas. Sendo assim, o efeito radiosensibilizante sobre a linhagem UW-402 não pôde ser explicado pelo mecanismo de reparo estudado.

Estes resultados são concordantes com os observados por Gao e colaboradores (2015) que estudando linhagens celulares de câncer de pâncreas e utilizando concentrações entre 2 e 6 μM com 48 e 72 horas de tratamento com ATO obtiveram inibição na formação de colônias neoplásicas. Ding et al, (2014) estudando linhagens celulares de células tronco de glioblastoma, submetem as células ao tratamento por 72 horas, com concentrações entre 1 - 5 μM , em combinação com irradiação 4 Gy e observaram uma inibição da capacidade clonogênica de células pluripotenciais tumorais (neurosferas). O estudo também correlacionou este efeito sobre a inibição das vias *SHH* e *Notch*.

Apoptose

A apoptose é o processo de morte programada. Anormalidades nesse processo possuem um papel importante na tumorigênese (IARC, 2015). Os resultados do presente estudo mostram uma indução de apoptose nas três linhagens avaliadas por citometria de fluxo, alcançando valores superior a 70% para as linhagem DAOY, acima de 60% para UW402 e próximo a 20% para ONS-76 na concentração de 8 μM . Dentre os ensaios funcionais o ensaio de apoptose apresentou também um resultado relevante. Ding et al, (2014) com linhagens celulares de células tronco de glioblastoma também obteve boas taxas de apoptose; as concentrações utilizadas por este autor foram entre 1 – 5 μM .

Roboz e colaboradores (2000) demonstraram que o ATO pode induzir apoptose em células leucêmicas e em células endoteliais de vasos sanguíneos, de forma dose e tempo dependentes. O mecanismo pelo qual o ATO inibe as células endoteliais neste modelo de estudo é através da inibição do VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor), inibindo o fator de crescimento endotelial via receptor vascular, suprimindo assim a angiogênese e o crescimento tumoral. Utilizando o perfil de microRNA de células endoteliais derivadas de células tronco foi descrito que miR-126 regula negativamente a sinalização VEGFA, de forma direta através da PI3KR2 e SPRED1, ambos reguladores negativos desta via. Atualmente há o entendimento de que fármacos, mesmo sendo utilizados para terapia-alvo, não possuem um único efeito. Esta ação indireta pode ser até desejada em uma droga quando ocorre efeito sinérgico no combate ao tumor, afetando outros mecanismos do microambiente tumoral, assim como a neovascularização que afeta diretamente a nutrição, metástase, clonogenicidade e leva a uma maior taxa de apoptose.

Outro mecanismo de apoptose descrito por Zhang et al. (2017) foi a ativação da via de sinalização WNT/ β -catenina na linhagem celular HeLa, o que pode relacionar-se com um possível efeito em linhagens celulares com essa via ativada (ZHANG et al., 2017).

O presente estudo obteve uma maior taxa de apoptose na linhagem celular DAOY e UW-402 que simula o subgrupo de interesse clínico de MB SHH/*TP53* mutado, mas também apresentou importante taxa de apoptose na linhagem DAOY. Diferentes vias de ativação podem estar relacionadas a este efeito apoptose atuando de forma simultânea. O estudo dos diferentes mecanismos de apoptose apontam ser de particular importância e podem ser objetivos para etapas posteriores deste trabalho.

Expressão gênica relativa - *PCR em tempo real (qRT-PCR)*

Através do PCR em tempo real (qRT-PCR) avaliado a capacidade do ATO em alterar a expressão gênica relativa de genes-alvos da via SHH: genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (BUCZKOWICZ et al., 2011). Para a linhagem DAOY, o ATO diminui a expressão relativa de *GLI* nas concentrações de 1, 2 e 4 μ M. O *PTCH* apresenta uma tendência a inibição, ao passo que *Ciclina-D* e *MYC* apresentam um importante aumento da expressão relativas nas concentrações estudadas. Para análise no tempo 48 horas nas concentrações de ATO de 1, 2 e 4 μ M, o fármaco parece inibir a expressão relativa de alguns dos genes da via efetora inicial, ao passo que, possivelmente por um mecanismo de escape, hiperexpressou os genes *Ciclina-D* e *n-MYC*. Para linhagem ONS, ATO aumentou a expressão relativa de *GLI* na concentração de 2 μ M, sendo que os demais genes estudados não apresentaram alteração na expressão relativa. Para linhagem UW402, o fármaco diminui a expressão relativa de *GLI* nas concentrações, 1, 2 e na concentração de 4 μ M ocorreu aumento. Por outro lado, a expressão dos genes *MYC*, *BCL-2* e *Ciclina-D* demonstraram um importante aumento da expressão relativas nas concentrações estudadas. Estes dados apontam mais uma vez para diferentes mecanismos de ação do ATO sobre fatores de transcrição nucleares regulados por *GLI*. Estudo de Nakamura et al. (2013) demonstrou que o ATO foi capaz de reduzir a expressão de genes da via SHH (a exemplo de *PTCH1*, *GLI1* e *GLI2*) em linhagens celulares de osteosarcoma com a via SHH ativada. Neste mesmo estudo foi observado que o tratamento com ATO promove apoptose das células neoplásicas causada pelo acúmulo de danos diretos ao DNA. Modelos *in vivo* demonstraram diminuição da expressão do gene alvo *GLI* de *PTCH1* e *GAS1* após o tratamento com ATO (BEAUCHAMP

et al., 2011). Os resultados preliminares desta análise ainda precisam ser repetidos em triplicata para melhor interpretação.

Limitações no tratamento experimental de meduloblastoma

A partir de estudos genéticos voltados ao subgrupo SHH de MBs, foi possível investigar os mecanismos de resistência aos inibidores de SMO assim como avaliar qual o grupo que possui benefício no emprego desta medicação. Também foram investigados as vias alternativas de ativação, mecanismos de escape, bem como as principais mutações e amplificações que compõem esse grupo. A estratificação pela idade também foi de grande importância, quando se obteve o percentual de cada mutação e o tipo de mutação para cada faixa etária (KOOL et al., 2014).

As mutações da via SHH que envolvem *PTCH1* estão presentes em todas as faixas etárias. Alterações em *SUFU* presentes em lactentes, incluindo a linha germinal e alterações de SMO são mais observadas em adultos. Ensaio funcionais em modelos xenográficos de SHH-MB demonstram que os SHH-MBs que apresentam mutação de *PTCH1* respondem à inibição de SMO, ao passo que os tumores que possuem mutação de *SUFU* ou amplificação de *MYCN* são resistentes (KOLL et al., 2014). Estes resultados sugerem que o tratamento de MB poderá ser mais bem direcionado segundo alteração genética presente (KOOL et al., 2012; KOOL et al., 2014; TAYLOR et al., 2002). Ou seja, o grupo de maiores de 3 anos e adolescentes possuem um grande interesse clínico para o emprego de drogas que inibam a ativação da via SHH.

A necessidade da busca de drogas com ação SHH específica foi reforçada ao considerarmos a nova subdivisão do subgrupo SHH proposta por Cavalli et al. (2017) através do agrupamento espectral. Foi subdividido o subgrupo SHH em quatro conjuntos, sendo o conjunto SHH α composto pelo grupo de pacientes maiores de 3 anos e menores de 17 anos com as características de pior prognóstico. O conjunto de variáveis clínicas e moleculares que definiram o agrupamento leva também ao estudo de novas estratégias para terapia.

Nessa linha, diferentes grupos de estudo buscam inibir a via SHH. São exemplos de inibidores da via SHH: Vismodegib, Sonidegib, Saridegib que inibem SMO com emprego em diferentes tipos de tumores a nível experimental. Inibidores de *GLI*, GANT58 e GANT61, que atuam inibindo a ligação de *GLI* ao DNA, e o ATO. Ainda inibidores de sinalização epigenética como I-BET762 (GSK525762). Ou mesmo produtos que já estão sendo testados e que são compostos de inibidores de SMO e PI3K (NCT01576666) (KLINGER et al., 2017). O ATO que ressurge com novas utilizações clínicas, sendo uma possível droga-alvo para contornar o impasse das ativações de vias alternativas por inibição de genes que estão no início da cascata de sinalização geradas pelos inibidores de SMO. O ATO parece apresentar

especial benefício para a terapia-alvo, especialmente no subgrupo SHH α com *TP53* mutado. Apesar do presente estudo ter tido o cuidado de confirmar o subtipo molecular das 3 linhagens (todas SHH positivas por TDLA), de realizar teste de autenticação de linhagem por STR e de confirmar a mutação específica do *TP53* das linhagens DAOY e UW-402, é possível a ocorrência de mutações genéticas secundárias nas passagens celulares em cultura. Também não dispomos do número de passagens de colônias das nossas linhagens estudadas, nem uma melhor caracterização genético-molecular da linhagem UW-402.

Importância do ATO em outros modelos

Outros tipos histológicos tiveram também bons resultados com emprego de ATO. Linhagens celulares de rhabdomyosarcoma (RMS) humanas, de diferentes subtipos, apresentaram redução da viabilidade celular, crescimento clonal e aumento da morte celular. Foi testado também a associação de ATO com Lítio o que também trouxe resultados positivos. A singularidade do uso de novas drogas para o tratamento de tumores do tipo RMS podem futuramente representar uma melhora na sobrevida, que hoje é de 20% para doença metastática (SCHLEICHER et al., 2017).

Os tumores do trato gastrointestinal também apresentam um prognóstico reservado em doenças metastáticas. Quando testados com ATO, linhagens celulares de tumor gástrico apresentaram aumento na apoptose. O mecanismo relacionado foi aumento do AMPc e redução da proteína quinase (ABUDOUREYIMU et al., 2017). Aprofundando nos mecanismos de apoptose, Moghaddaskho et al. (2017) demonstraram que linhagens celulares de câncer de mama apresentam parada do ciclo celular relacionados a mecanismos epigenéticos de desmetilação e alteração na expressão de genes relacionados ao ciclo celular.

Cohen et al. (2013) confirmaram a segurança e tolerabilidade de ATO administrado na dose de 0,15 mg/kg/dia concomitante com radioterapia focal no tratamento de gliomas infiltrativos em crianças. A toxicidade observada foi modesta e atribuída principalmente própria radioterapia. Esse estudo somado ao crescente número de evidências sobre o mecanismo da citotoxicidade induzida por ATO, assim como sua ação como inibidor alvo dirigido de SHH e a necessidade de novas terapias levam a vislumbrar a possibilidade do Arsenico ser um agente utilizado em combinação no tratamento de pacientes com meduloblastoma.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novas estratégias para o tratamento do meduloblastoma estão sendo desenvolvidas. Na tentativa de bloqueio da via SHH com terapia alvo, o gene *GLI* é ainda pouco explorado. Desta forma, drogas que bloqueiam diretamente *GLI* apresentam potencial para serem adicionadas ao esquema terapêutico já existente (Poliquimioterapia e/ou radioterapia). Apresentando singular histórico, ampla experiência clínica e boa penetração em SNC, o trióxido de arsênico é ainda hoje objeto de investigação que vai além das leucemias. Estudos pré-clínicos e clínicos do ATO em tumores cerebrais onde a participação da via SHH está envolvida, particularmente nos MBs pediátricos, demonstram perfil aceitável para sua avaliação em modelos animais de MB, quer seja associado à quimioterapia ou como agente radiosensibilizante. Com os resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que o ATO apresenta um potencial para ser avaliado em modelos animais de MB-SHH, tanto como monoterapia ou em associação à radioterapia, a fim de ser avaliado seu potencial para estudos fase I nesse subgrupo de tumores cerebrais pediátricos.

REFERÊNCIAS

- AU, W. Y.; A biography of arsenic and medicine in Hong Kong and China. **Hong Kong Med J**, v. 17, n. 6, p. 507-13, 2011.
- AU, W. Y.; et al. Oral arsenic trioxide for relapsed acute promyelocytic leukemia in pediatric patients. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 4, p. 630-2, 2012.
- BEAUCHAMP, E.; et al. GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. **J Biol Chem**, v. 284, n. 14, p. 9074-82, 2009.
- BEAUCHAMP, E. M.; et al. Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. **J Clin Invest**, v. 121, n. 1, p. 148-60, 2011.
- BONT, J. M.; et al. Biological background of pediatric medulloblastoma and ependymoma: a review from a translational research perspective. **Neuro Oncol**, v. 10, n. 6, p. 1040-60, 2008.
- BUCZKOWICZ, P.; MA, J.; HAWKINS, C. GLI2 is a potential therapeutic target in pediatric medulloblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 70, n. 6, p. 430-7, 2011.
- 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.
- CASTRO JR, C. G.; GREGIANIN, L. J.; BRUNETTO, A. L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 77, n. 5, p. 345-360, Oct. 2001. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572001000500004&lng=en&nrm=iso>. access on 16 May 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572001000500004>.
- CAVALLI, F.M.G.; et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell**, v.31, n.6, p. 737-54, 2017.
- CRAWFORD, J. R.; MACDONALD, T. J.; PACKER, R. J. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 12, p. 1073-85, 2007.
- EVANS, W.E.; et al. A health-care system perspective on implementing genomic medicine: pediatric acute lymphoblastic leukemia as a paradigm. **Clin Pharmacol Ther.** v.94, n.2, p.224-9, 2013.

FANGUSARO, J.; et al. Intensive chemotherapy followed by consolidative myeloablative chemotherapy with autologous hematopoietic cell rescue (AuHCR) in young children with newly diagnosed supratentorial primitive neuroectodermal tumors (sPNETs): report of the Head Start I and II experience. **Pediatr Blood Cancer**, v.50, n.2, p. 312-8, 2008.

FELLAY, C. N.; et al. Medulloblastomas in adults: prognostic factors and lessons from paediatrics. **Curr Opin Neurol**, v. 24, n. 6, p. 626-32, 2011.

GANDOLA, L.; et al. Hyperfractionated accelerated radiotherapy in the Milan strategy for metastatic medulloblastoma. **J Clin Oncol.**, v. 27, n. 4, p. 566-71, 2009.

GARRÈ, M.L.; et al. Medulloblastoma variants: age-dependent occurrence and relation to Gorlin syndrome--a new clinical perspective. **Clin Cancer Res**, v.15, n.7, p. 2463-71, 2009.

GE, H. Y.; et al. VEGFA Expression Is Inhibited by Arsenic Trioxide in HUVECs through the Upregulation of Ets-2 and miRNA-126. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135795, 2015. ISSN 1932-6203.

GERBER, N. U.; et al. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 3, p. 356-65, 2014. ISSN 1532-1967.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs of Carcinogenic Risks to Humans and Handbooks of Cancer Prevention**. [Geneva]: WHO, 2015. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/OrganSitePoster.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. 1 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2008. 220 p

KOOL, M.; et al. Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothed Inhibition. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 393–405, 2014.

KIM, J.; et al. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 30, p. 13432-7, 2010.

KLINGER, P.H.; et al. Inhibition of SHH pathway mechanisms by arsenic trioxide in pediatric medulloblastomas: a comprehensive literature review. **Genet Mol Res**. v.16, n.1, 2017.

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 Neuropathol**, v. 123, n. 4, p. 473-84, 2012.

KUTNY, M.A.; et al. Arsenic Trioxide Consolidation Allows Anthracycline Dose Reduction for Pediatric Patients With Acute Promyelocytic Leukemia: Report From the Children's Oncology Group Phase III Historically Controlled Trial AAML0631. **J Clin Oncol**. v.35, n.26, p. 3021-3029, 2017 .

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

LU, J.; CHEW, E. H.; HOLMGREN, A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 30, p. 12288-93, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p. 402-8.

MIMORI, T.; HARDIN, J.A. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. **J Biol Chem**, v.261, n.22, p.10375-9, 1986

MOYNAHAN, M.E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.11 n.3, p.196-207, 2010 .

NAKAMURA, S.; et al. Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69466, 2013.

NASR, R.; et al. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1333-42, 2008.

NEJAT, F.; et al. Initial management of childhood brain tumors: neurosurgical considerations. **J Child Neurol**, v. 23, n.10, p. 1136-48, 2008.

NORTHCOTT, P. A.; et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 11, p. 1408-14, 2011.

PACKER, R. J. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 25, p. 4202-8, 2006.

PACKER, R. J.; et al. Improved survival with the use of adjuvant chemotherapy in the treatment of medulloblastoma. **J Neurosurg**, v. 74, n. 3, p. 433-40, 1991.

PATEL, S.; et al. Are pediatric brain tumors on the rise in the USA? Significant incidence and survival findings from the SEER database analysis. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 1, p. 147-54, 2014.

RAMASWAMY, V.; et al. p53 and Medulloblastoma. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.6, n.2, p. a026278, 2015.

RAFFEL, C.; et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. **Cancer Res**, Philadelphia, v. 57, n. 5, p. 842-5, 1997.

RICHARDSON, C.; JASIN, M. Recombination between two chromosomes: implications for genomic integrity in mammalian cells. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 65, p. 553-60, 2000.

RICKERT, C. H.; PAULUS, W. Epidemiology of central nervous system tumors in childhood and adolescence based on the new WHO classification. **Childs Nerv Syst**, v. 17, n. 9, p. 503-11, 2001.

ROBINSON, G. W.; et al. Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 24, p. 2646-54, 2015.

ROBOZ, G. J.; et al. Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis. **Blood**, v. 96, n. 4, p. 1525-30, 2000.

RODRIGUEZ-BLANCO, J.; et al. Targeting SHH-Subgroup Medulloblastoma. **JSM Brain Sci**. v.2, n.2, p. 1014, 2017.

RUTKOWSKI, S.; et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 978-86, 2005.

SHAH, M. H.; REY, J. A.; CASTRESANA, J. S. The sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway in brain tumor development. **Expert Opin Ther Targets**, v. 16, n. 12, p. 1227-38, 2012.

SMAELE, E.; et al. An integrated approach identifies Nhlh1 and Insm1 as Sonic Hedgehog-regulated genes in developing cerebellum and medulloblastoma. **Neoplasia**, Radarweg, v. 10, n. 1, p. 89-98, 2008.

SONG, YZ.; et al. Association between Single Nucleotide Polymorphisms in XRCC3 and Radiation- Induced Adverse Effects on Normal Tissue: A Meta- Analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

SORRELL, A.D.; et al. TP53 Testing and Li-Fraumeni Syndrome: Current Status of Clinical Applications and Future Directions. **Mol Diagn Ther**, 2013; v.17, n.1, p. 31–47, 2013.

TAYLOR, M. D. et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. **Nat Genet**, v. 31, n. 3, p. 306-10, 2002.

WELLS, E. M.; et al. Postoperative cerebellar mutism syndrome following treatment of medulloblastoma: neuroradiographic features and origin. **J Neurosurg Pediatr**, v. 5, n. 4, p. 329-34, 2010.

WANG, H.; et al. Retrospective study of arsenic trioxide for childhood acute promyelocytic leukemia in China: a single-center experience. **Int J Hematol**, v. 91, n.5, p. 820-5, 2010 .

ZANINI, C.; et al. Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 cells: increased stem cell population and proteomic modifications. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63748, 2013.

ZHANG, P.; et al. Leukemia-associated gene MLAA-34 reduces arsenic trioxide-induced apoptosis in HeLa cells via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **PLoS One**. v.12, n.10, p. e0186868, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ofício de Encaminhamento ao CEP

UPC
HCFMRP - USP

PROJETO DE PESQUISA

8514

Ribeirão Preto, 01 de OUTUBRO de 2015.

Ilustríssima Senhora
Prof.ª Dr.ª Márcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado TRIÓXIDO DE ARSÊNIO COMO POSSÍVEL RADIOSSENSIBILIZANTE EM LINHAGENS CELULARES DE MEDULOBLASTOMA PEDIÁTRICO, juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA.

Informo também que o pesquisador responsável e orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Atenciosamente,

ELVIS TERCI VALERA

Dr. Elvis T. Valera
CRM 85161

PAULO HENRIQUE DOS SANTOS KLINGER

De acordo:

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA
Carimbar e Assinar

Prof. Dra. Maria Márcia Mussi
Chefe do Departamento
de Puericultura e Pediatria
FMRP-USP

**Equipe Técnica
UPC**
01/10/2015
d/

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA
Carimbar e Assinar

Prof. Dr. Luis Gonzaga Tovo
Coordenador e Supervisor
de Puericultura e Pediatria

Carlos Henrique Greco
Coordenador
Unidade de Pesquisa Clínica-HCFMRP
Matrícula 6276

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone (16) 3902-2832 FAX: 3902-2962

APÊNDICE B - Solicitação de dispensa de Termo de Consentimento

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DE TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome da Pesquisa: TRIÓXIDO DE ARSÊNIO COMO POSSÍVEL
RADIOSENSIBILIZANTE EM LINHAGENS CELULARES DE
MEDULOBLASTOMA PEDIÁTRICO.

Pesquisadora Responsável: Paulo Henrique dos Santos Klinger

Solicito dispensa de termo para a pesquisa acima. A pesquisa irá utilizar apenas linhagens comerciais de células de meduloblastoma. Pela não utilização de prontuários, não utilização de dados dos pacientes e consistir apenas em ensaios funcionais in vitro, solicitamos a dispensa do termo de consentimento informado.

Ribeirão Preto, 21 de agosto de 2015.

Não há necessidade
de submissão ao CEP

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

ANEXOS

ANEXO 1 – FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: TRATAMENTO DE ARGÊNIO COMO POSSÍVEL RADIOSENSIBILIZANTE EM LINHAGENS CELULARES DE MEDULOBLASTOMA PEDIÁTRICO.		2. Número de Participantes da Pesquisa: 9	
3. Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP)			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4, Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Paulo Henrique dos Santos Klingner			
6. CPF: 035.707.575-77	7. Endereço (Rua, n.º): R. do Professor 1551 s/nº Jd. São RIBERAÇO PRETO SÃO PAULO 14000080		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: 16981272757	10. Outro Telefone:	11. E-mail: pklingner@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que esta folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: 02 / 10 / 2015		Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE		13. CNPJ:	
MEDICINA DE RPPSP		14. Unidade/Orgão: Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas	
15. Telefone: (16) 3622-1000		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: <u>Prof. Dr. Eduardo S. Coelho</u>		CPF: <u>058.332.438-28</u>	
Cargo/Função: <u>Coordenador Técnico Científico de Unidade de Pesquisa Clínica HCFMRP-USP</u>			
Data: 05 / 10 / 2015		Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			