UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARISTELLA BERGAMO FRANCISCO DOS REIS

Análise da expressão de microRNAs em ependimomas

Ribeirão Preto
2019

MARISTELLA BERGAMO FRANCISCO DOS REIS

Análise da expressão de microRNAs em ependimomas

Tese apresentada ao departamento de Puericultura e
Pediatría da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo como parte das
exigências para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto

2019

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

Reis, Maristella Bergamo Francisco dos

Análise da expressão de microRNAs em ependimomas /
Ribeirão Preto, 2019.

81p.; il.; 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da criança e do
adolescente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

1. Ependimoma. 2. Expressão gênica. 3. microRNAs

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maristella Bergamo Francisco dos Reis

Título: Análise da expressão de microRNAs em endimomas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Saúde da criança e do
adolescente.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus filhos, os quatro, que vieram durante os 8 anos de pós-graduação. Ao Lucas e à Luiza, amores da minha vida, e aos dois que se foram após poucas semanas, ensinando-me que tudo tem seu tempo. Tudo que sou, tudo que faço é para que sejam pessoas do bem.

“Seja esperta minha filha. Vá embora para a faculdade porque o tempo não para”. Meu pai tinha razão, em seu último dia de vida interrompida por um câncer. O tempo não parou, e aqui está minha tese de doutorado, **graças ...**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Carlos Alberto Scrideli**, por ter acreditado em mim desde o primeiro dia, dando a oportunidade de continuar como oncologista e iniciar como pesquisadora. Por saber, com muita paciência e maestria, começar com uma bronca e terminar com um elogio, não me dando outra opção a não ser fazer o melhor.

Ao Professor **Luiz Gonzaga Tone**, o exemplo de líder que todos nós, tanto da equipe de oncohematologia pediátrica quanto do Grupo de Pesquisa em Oncologia Molecular Pediátrica (GPOMP), queremos ser.

A toda equipe do **laboratório de biologia molecular** do departamento de pediatria da FMRP, e do **GPOMP**, especialmente **Profa. Rosane Queiroz, Keteryne Rodrigues, Carolina Alves, Graziella Souza, Kleiton Borges e Luís Nagano** pela amizade e ajuda indispensáveis a mim e a esse trabalho.

Ao **Departamento de Pediatria da FMRP**, especialmente à secretária **Vera Lucia de Andrade Hamanaka** pelo amparo e suporte prestados.

Ao **Centro Infantil Boldrini**, pela parceria ao conceder as amostras necessárias à complementação desse trabalho.

Ao Departamento de patologia da FMRP, através do **Professor Fernando Silva Ramalho**, e ao Departamento de imagens médicas, hematologia e oncologia clínica, através do **Professor Dr. Antônio Carlos dos Santos**, pelas fotos cedidas para essa tese.

Ao Departamento de Neurocirurgia da FMRP, especialmente ao **Prof. Hélio Machado** e ao **Prof. Ricardo de Oliveira**, por conduzir de forma tão precisa os pacientes neurocirúrgicos desse estudo.

Ao **Dr Pedro Thome F dos Reis Filho**, meu veterano, o carinho do quarto ano, minha dupla no trabalho de sarcoma de partes moles, presidente da liga de oncologia que tornou-se meu amigo, meu marido, pai dos meus filhos **Lucas e Luiza**. Obrigada meu amor pelo exemplo, ensinamentos e apoio.

Aos meus pais, **Chico Bergamo**, por ter sonhado tanto e me estimulado tanto a ser a médica que sou.

A minha mãe, **Marli Sala**, por ter me dado o exemplo diário de como ser uma mulher forte, que luta pelos seus sonhos.

Aos meus irmãos e sobrinhos, **Marlene, Monica, Daniel, Milena, Diogo, Maira, Marina, Ana Maria, Maria Julia e Luís**, por estarem sempre tão perto independente de qualquer obstáculo. Essa palavra para nós não existe.

Ao **Dr. Pedro e Dona Julia**, aos meus cunhados e a minha sobrinha **Ana Clara**, família que eu escolhi, que me acolhe como parte dela desde sempre.

Aos meus **amigos do grupo 2 da XXXII turma** da faculdade de medicina da Universidade de Mogi das Cruzes, e aos **meus amigos, “primos”**, de Ribeirão Preto, as maiores riquezas que a medicina me proporcionou.

Ao meu amigo **Dr Elvis Terci Valera**, por acreditar tanto que eu posso ser sempre melhor, pelo estímulo na área acadêmica e por me mostrar, com seu exemplo, que podemos sim ser bons em tudo, ao mesmo tempo.

À equipe de oncohematologia pediátrica do HCRP, **José Bernardes, Elvis Valera, Ricardo Defavery, Bianca Mori, Nichollas Areco, Tania Liotti, Maria José Menossi, Leilane Iossi**, ao **GACC (grupo de apoio a criança com câncer)**, residentes e toda equipe **multidisciplinar envolvida**, juntos conseguimos suportar tudo.

Ao **Erick, Valentina, Maria Fernanda, Isabela, Mariah, Vitor, William, Matheus, João Paulo**...e cada paciente que tive a honra de cuidar. Seguiremos firmes para que cada detalhe seu, genético, molecular e principalmente da sua infância não seja deixado de lado.

“Porque está lá”

George Mallory, montanhista, respondendo em
1924 o porquê de escalar o Monte Everest.

RESUMO

REIS, BERGAMO F. dos, Maristella. **Análise da expressão de microRNAs em ependimomas. 2019.** 81p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: O ependimoma é atualmente o terceiro tumor cerebral mais comum da infância, correspondendo a aproximadamente 10% dos casos dos tumores intracranianos. A sobrevida está diretamente relacionada com fatores prognósticos bem estabelecidos, como idade, grau de ressecção e histologia, essa última ainda controversa pela dificuldade de diferenciar os subtipos mais frequentes, OMS grau II e grau III. Faz-se necessário, portanto, estudos de fatores genéticos, epigenéticos e moleculares com o intuito de estabelecer subgrupos que possam direcionar o prognóstico e tratamento. Dentre esses fatores estão os microRNAs, moléculas epigenéticas que regulam diversos processos biológicos, exercendo regulação gênica negativa a nível pós-transcricional. O papel dos microRNAs em ependimoma ainda é pouco estudado. **Objetivo:** Avaliar a expressão de 5 miRNAs já descritos como importantes na literatura (miR-21, miR-124-a, miR-135a-5p, miR-383, miR-485-5p) em amostras de ependimoma e analisar potenciais vias genéticas envolvidas com os mesmos. **Metodologia:** Foram avaliadas as expressões dos cinco microRNAs através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR), em 34 amostras de ependimoma (25 tumores primários e 9 recidivas), comparadas com 11 amostras de controle não neoplásico (4 amostras de cerebelo, 5 amostras de substância branca e 2 amostras de células ependimárias de terceiro e quarto ventrículos). Essas expressões foram relacionadas com os dados clínicos dos pacientes e, em seguida, através da análise *in silico*, os principais genes alvos dos microRNAs foram avaliados. Os genes *HOXB3* e *HOXB4* relacionados ao miR-485-5p foram então selecionados para validação do modelo *in silico*. A comparação entre os grupos foi feita por teste de Mann-Whitney e a sobrevida global (SG) por curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank. **Resultados:** Quando comparamos a expressão desses microRNAs com os controles não neoplásicos, observamos diferença significativa na expressão de 4 dos 5 miRNAs analisados, sendo o miR-135a-5p hiperexpresso em relação aos controles e o miR-124a, miR-383 e miR-485-5p, hipoexpressos. Não encontramos correlação entre a expressão dos microRNAs estudados e as características clínicas dos pacientes. Os genes escolhidos para validação, *HOXB3* e *HOXB4*, correlacionados com o miR-485-5p, mostraram diferença significativa de expressão (hiperexpressos) nos tecidos tumorais primários, onde o miR-485 encontra-se hipoexpresso, quando comparada aos controles não neoplásicos. Foi observada ainda uma diferença significativa da expressão desses genes em relação à localização dos tumores em que ambos, *HOXB3* e *HOXB4*, expressam-se mais nos tumores localizados na fossa posterior. **Conclusão:** Foi observado um padrão diferencial de expressão de 4 desses miRNAs em ependimomas quando comparados aos controles não neoplásicos, bem como uma correlação negativa do miR-485-5p com os seus genes alvo *HOXB3* e *HOXB4*. Estudos futuros em um número maior de casos devem ser realizados com o objetivo de confirmar essa relação útil para a caracterização prognóstica e desenvolvimento de potencial terapia alvo para o ependimoma.

Palavras-chave: Ependimoma, Expressão gênica, microRNAs.

ABSTRACT

REIS, BERGAMO F. dos, Maristella. **Analysis of microRNA expression in ependymomas 2019**. 81p (Doctorate degree) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Ependymoma is currently the third most common type of brain tumor of childhood, accounting for approximately 10% of cases of intracranial tumors. Survival is directly related to well-established prognostic factors such as age, extent of resection and histology. However, the latter is still controversial due to the difficulty in differentiating the most frequent subtypes, WHO grade II and grade III. Therefore, studies of genetic, epigenetic and molecular markers are necessary in order to establish subgroups that can guide prognosis and treatment. Among these molecular markers are microRNAs, which are epigenetic molecules that regulate various biological processes, exerting negative gene regulation at the post-transcriptional level. The role of microRNAs in ependymomas is still poorly understood. **Aim:** To evaluate the expression of 5 miRNAs (miR-21, miR-124-a, miR-135a-5p, miR-383, miR-485-5p), previously described as important in the scientific literature, in ependymoma samples and analyze potential pathways modulated by them. **Methods:** Expression of the five microRNAs were evaluated by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in 34 ependymoma samples (25 primary tumors and 9 tumor recurrences) compared with 11 non-neoplastic control samples (4 samples from cerebellum, 5 samples of white matter and 2 samples of ependymal cells of the third and fourth ventricles). This expression data was associated to the patients' clinical data and then, through in silico analysis, the main microRNA target genes were evaluated. The miR-485-5p-related *HOXB3* and *HOXB4* genes were then selected for validation of the in silico model. The comparison between groups was made by Mann-Whitney test and overall survival (SG) by Kaplan-Meier curves and log-rank test. **Results:** When comparing the expression of these microRNAs with non-neoplastic controls, we observed a significant difference in the expression of 4 of the 5 miRNAs analyzed, with miR-135a-5p being overexpressed compared to controls and miR-124a, miR-383 and miR-485-5p, downregulated. We did not find correlation between the expression of the studied microRNAs and the clinical characteristics of the patients. The genes *HOXB3* and *HOXB4* were chosen for validation since they were correlated with miR-485-5p and showed significant difference of expression (overexpressed) in primary tumor tissues, where miR-485 is downregulated when compared to non-neoplastic controls. There was also a significant difference in the expression of these genes in relation to the location of the tumors where both *HOXB3* and *HOXB4* were overexpressed in tumors located in the posterior fossa. **Conclusion:** We observed a differential expression pattern of 4 miRNAs in ependymomas when compared to non-neoplastic controls as well as a negative correlation of miR-485-5p with its target genes *HOXB3* and *HOXB4*. Future studies in a larger number of cases should be performed to confirm this relationship, useful for the prognostic characterization and development of potential target therapy for ependymoma.

Keywords: Ependymoma, gene expression, microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número absoluto de casos de câncer no Brasil em crianças e adolescentes de zero a 19 anos, de acordo com a classificação internacional do câncer na infância (Cici), ambos os sexos, 2009-2011 (DE OLIVEIRA SANTOS, 2018)	16
Figura 2: Principais sinais e sintomas relacionados à localização dos tumores cerebrais	18
Figura 3: Ressonância magnética de paciente com ependimoma em fossa posterior.....	20
Figura 4: Fotomicrografias representativas das amostras tumorais.....	22
Figura 5: Tratamento baseado nos subgrupos moleculares e suas características	27
Figura 6: As dez características do câncer propostas por Hanahan e Weinberg.....	28
Figura 7: Biogênese de miRNAs.....	30
Figura 8: Sobrevida global dos pacientes do estudo com ependimoma primário e recidivado (curvas de Kaplan Meier).	42
Figura 9: Expressão relativa do miR-21 (A), miR-124a (B), miR-135a-5p (C), miR-383 (D) e miR-485-5p (E) em amostras de ependimoma, e controles não neoplásicos.....	46
Figura 10: Expressão relativa do miR-21 (A), miR-124a (B), miR-135a-5p (C), miR 383 (D) e miR-485-5p (E), em amostras de ependimoma, e os controles não neoplásicos de cerebelo, substância branca e epêndima.	47
Figura 11: Sobrevida global de acordo com cada microRNA estudado, utilizando a mediana de expressão como valor de corte.	51
Figura 12: Expressão relativa dos miR-135a-5p, miR-383, miR-485-5p, miR-124a nas amostras deste estudo e disponíveis em banco de dados público.....	53
Figura 13: Expressão dos genes da família HOX.	54
Figura 14: Expressão dos genes <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> em relação à localização tumoral	54
Figura 15: Expressão dos genes <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> em relação à histologia.	55
Figura 16: Comparação da expressão do miR-485-5p com os genes <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> em ependimomas e tecidos não neoplásicos.	56

Figura 17: Expressão dos genes <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> em ependimomas de fossa posterior quando comparados com supratentorial.	57
Figura 18: Expressão dos genes <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> em 5 ependimomas de fossa posterior quando comparados com 5 ependimomas supratentoriais pela técnica de RNASeq.	57
Figura 19: Genes da família HOX, incluindo o <i>HOXB3</i> e <i>HOXB4</i> , com expressão aumentada na fossa posterior, principalmente na porção caudal do tronco cerebral de fetos de ratos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais síndromes genéticas associadas aos tumores do SNC.....	17
Tabela 2: Subgrupo dos tumores de origem endimária, segundo classificação OMS 2016	19
Tabela 3: Principais diferenças histológicas do endimoma grau II e grau III	21
Tabela 4: Aspectos clínicos e moleculares dos subgrupos de endimoma intracraniano.	24
Tabela 5: Resumo dos fatores prognósticos relacionados ao endimoma	24
Tabela 6: Tratamentos clássicos para endimoma, mostrando algum benefício com quimioterapia apenas para crianças menores de 3 anos e especialmente se tumores em região supratentorial.	26
Tabela 7: Principais trabalhos publicados sobre microRNA e endimomas.....	32
Tabela 8: Características clínicas dos pacientes envolvidos no estudo.....	37
Tabela 9: Descrição das sondas utilizadas neste estudo, adquiridos pela Companhia Life Technologies Applied Biosystem.....	40
Tabela 10: Sobrevida global (SG) em 5 anos em endimomas primários de acordo com as características clínicas (Curvas de Kaplan-Meier e teste logrank).	43
Tabela 11: Número de pacientes com tumores primários, seus respectivos subgrupos moleculares e o status atual	43
Tabela 12: Correlação entre os microRNAs estudados.....	44
Tabela 13: Expressão dos microRNAs em relação aos controles não neoplásicos.....	45
Tabela 14: Mediana, valores mínimos e máximos dos miR-21, miR-124a, miR-383, miR-485-5p, miR-135-5p em endimomas primários de acordo com a aspectos clínicos e subgrupos moleculares.	48
Tabela 15: Correlação da expressão dos miRs com sobrevida global (SG) em 5 anos (Curvas de Kaplan-Meier e teste logrank).....	50
Tabela 16: Número de genes-alvos preditos e validados para cada miR estudado que mostrou resultado diferente do controle não neoplásico e descrição das principais vias moduladas por esses miRs.....	52

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CBTRUS: Central de Registro de Tumores Cerebrais dos EUA

CICI: classificação internacional do câncer na infância

DNA: ácido desoxirribonucleico

EUA: Estados Unidos da América

IH: imuno-histoquímica

INCA: Instituto Nacional Do Câncer

miRNAs: microRNAs

NF1: neurofibromatose tipo 1

NF2: neurofibromatose tipo 2

OMS: Organização Mundial da Saúde

PF-EPN-A: ependimoma fossa posterior subgrupo A

PF-EPN-B: ependimoma fossa posterior subgrupo B

POG: *Pediatric Oncology Group*

Pré-MIRNA: pré microRNA

Pri-MIRNA: microRNA primário

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

SERR: *Surveillance, Epidemiology, and End Results*

SNC: sistema nervoso central

ST-EPN-RELA: ependimoma supratentorial subgrupo *RELA*

ST-EPN-YAP1: ependimoma supratentorial subgrupo *YAP*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer na criança e adolescente	16
1.2 Tumores do Sistema Nervoso Central	17
1.3 Ependimoma.....	19
1.4 Genética, epigenética e câncer.....	27
1.5 Micro RNA e câncer.....	29
1.6 microRNA e tumores do SNC	31
1.7 microRNA e ependimoma	31
 2 JUSTIFICATIVA	 33
 3 OBJETIVOS	 34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
 4 DESENHO DO ESTUDO	 35
 5 PACIENTES E MÉTODOS	 36
5.1 Pacientes	36
5.2 Controles.....	39
5.3 Métodos	39
5.3.1 PCR quantitativa em tempo Real (qRT-PCR).....	39
5.3.2 Análise estatística	40
5.3.3 Análise <i>in silico</i>	40
5.3.4 Validação da expressão dos genes escolhidos por PCR em tempo real	41
5.3.5 Validação da expressão dos genes através da análise <i>in silico</i>	41
 6 RESULTADOS	 42
6.1 Sobrevida global de acordo com as características clínicas e biológicas	42
6.2 Correlação entre os miRNAs analisados	44
6.3 Expressão relativa dos miRNAs em ependimomas e controles não neoplásicos	45
6.4 Correlação entre os miRNAs estudados e as características clínicas e biológicas em ependimomas primários.....	48

6.5 Análise da sobrevida global de acordo com cada micro RNA analisado em ependimomas primários.....	50
6.6 Análise <i>in silico</i>	52
6.6.1 Busca de genes e vias envolvidas com cada microRNA estudado.....	52
6.6.2 Busca dos genes já validados em DATASET específico para ependimoma.....	53
6.6.3 Validação da correlação dos genes <i>HOXB3/HOXB4</i> com o miR 485-5p por PCR em tempo real	53
6.6.4 Análise da expressão dos genes da família HOX no banco de dados GSE21687 e no RNAseq	57
7 DISCUSSÃO	58
8 CONCLUSÃO.....	65
9 REFERÊNCIAS	66
10 ANEXOS	74
Anexo 1: Genes validados para o microRNA 135-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.....	74
Anexo 2: Genes validados para o microRNA 135-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.....	75
Anexo 3: Genes validados para o microRNA 485-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.....	76
Anexo 4: Genes validados para o microRNA 485-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.....	78
Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer na criança e adolescente

O câncer na criança e no adolescente é uma doença relativamente incomum que acomete em torno de 300.000 crianças por ano em todo o mundo. Nos Estados Unidos (EUA), segundo dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), em cada 10.000 crianças até 14 anos de idade, aproximadamente, duas são diagnosticadas com câncer (CRONIN et al, 2018). No Brasil, a mais recente publicação do Ministério da Saúde e INCA (Instituto Nacional Do Câncer) estimava 12.600 casos novos de câncer na criança e adolescente para o ano de 2016, sendo a primeira causa de morte por doença nessa faixa etária, de zero a 21 anos (DE OLIVEIRA SANTOS, 2018).

Os principais cânceres da infância variam sua incidência de acordo com a faixa etária acometida, e são estudados separadamente entre os grupos de crianças e adolescentes (0 -19 anos) e adolescentes e adultos jovens (15 a 29 anos). Os dados brasileiros relacionados ao tipo de câncer se assemelham aos registrados no restante do mundo, sendo a leucemia o mais comum (25 a 35%), seguida dos tumores do sistema nervoso central (SNC) que atualmente ocupa a segunda posição, com aproximadamente 16% dos casos e os linfomas, com 13,7% na terceira posição. (DE OLIVEIRA SANTOS, 2018). Os dados sobre o número de casos de câncer em crianças e adolescentes de 0 a 19 no Brasil estão representados na **Figura 1**.

Figura 1: Número absoluto de casos de câncer no Brasil em crianças e adolescentes de zero a 19 anos, de acordo com a classificação internacional do câncer na infância (Cici), ambos os sexos, 2009-2011 (DE OLIVEIRA SANTOS, 2018)

1.2 Tumores do Sistema Nervoso Central

Representam o maior grupo de tumores sólidos na infância, com grande variedade histológica e grande probabilidade de disseminação ao diagnóstico. A mortalidade associada aos tumores do SNC é a maior vista no grupo de neoplasias pediátricas, e a morbidade relacionada ao tratamento é significativa, com sequelas neuropsicológicas, endocrinológicas e déficits físicos (SANTI et al, 2011).

Histologicamente, há diversas variantes benignas e malignas. Os tumores de origem neuroepitelial representam o maior grupo, com aproximadamente 80% dos casos, incluindo os gliomas (30-50%), seguidos pelos tumores de origem neuronais e glioneuronais (como gangliogliomas e DNET), tumores embrionários (meduloblastoma, tumor teratoide rabdoide atípico) e ependimomas (KOOB e GIRARD, 2014).

Há muitos estudos que tentam elucidar a etiologia dos tumores cerebrais em crianças. Hipóteses como alto peso ao nascimento, dieta e uso de medicamentos pela mãe durante a gestação, exposição ao tabaco e pesticidas parecem aumentar o risco, porém, apenas dois fatores estão bem estabelecidos como risco: exposição a radiação ionizante e associação com síndromes genéticas (SPREHE et al, 2010; BUNIN et al, 2005).

A maioria desses tumores é esporádica, porém um grande número (5 a 10% dos casos) está associado a síndromes genéticas (NEJAT et al, 2008). As mais comuns são neurofibromatose tipo 1 e tipo 2 (NF-1, NF-2), esclerose tuberosa, doença de Von Hippel-Lindau e síndrome de Li-Fraumeni. Os pacientes acometidos por essas síndromes geralmente possuem múltiplos tumores, com histologias variadas. Ependimomas, por exemplo, são mais comumente encontrados em pacientes com NF-2, enquanto gliomas são mais frequentes nos portadores de NF-1 (RANGER et al, 2014). A **Tabela 1** indica as principais síndromes associadas aos tumores do SNC.

Tabela 1: Principais síndromes genéticas associadas aos tumores do SNC. Adaptada de SANTI et al, 2011.

Síndrome	Gene	Tumor SNC
von Hippel - Lindau	<i>VHL</i>	Hemangioblastoma
Li-Fraumenni	<i>TP53</i>	PNET supratentorial, meduloblastoma, astrocitoma
Neurofibromatose tipo 1	<i>NF-1</i>	Neurofibroma, glioma de vias ópticas, astrocitoma
Neurofibromatose tipo 2	<i>NF-2</i>	Schwannomas, meningioma, ependimoma espinhal
Esclerose tuberosa	<i>TSC1- TSC2</i>	Astrocitoma gigante de células ependimárias
Turcot	<i>APC</i>	Astrocitoma e ependimoma

Os sintomas iniciais estão relacionados com a localização do tumor, o tipo histológico do mesmo e a idade da criança. Os sintomas mais frequentes apresentados ao diagnóstico incluem cefaleia, náuseas e vômitos, alteração da marcha e do equilíbrio e distúrbios visuais. Distúrbios endocrinológicos, irritabilidade, perda de peso entre outros podem estar presentes (WILNE et al, 2007). As crianças portadoras de tumores do SNC apresentam muitas vezes sintomas inespecíficos, comuns a outras doenças pediátricas, o que pode acarretar atraso no diagnóstico, piora do estado clínico e consequente complicações relacionadas ao tratamento (STOCCO et al, 2017; PATEL et al, 2019). A localização dos tumores e seus sintomas estão representados na Figura 2.

Figura 2: Principais sinais e sintomas relacionados à localização dos tumores cerebrais. Adaptado de www.cureforkids.org

A classificação atual das neoplasias cerebrais, desenvolvida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) leva em conta não só os aspectos histológicos considerados nas classificações anteriores como incluem os fatores genéticos e moleculares, estipulando como os tumores do SNC devem ser estruturados na era molecular. Assim, são considerados os seguintes grupos: astrocitomas difusos e tumores oligodendrogliais, outros tumores astrocíticos, tumores ependimários, outros gliomas, tumores do plexo coroide, tumores neuronais e neuronais-gliais, tumores da região da pineal, tumores embrionários, tumores dos nervos cranianos, meningiomas, tumores mesenquimais e tumores da região selar. Os ependimomas fazem parte do subgrupo de tumores ependimários, conforme descritos na **Tabela 2** (LOUIS et al, 2016).

Tabela 2: Subgrupo dos tumores de origem endimária, segundo classificação OMS 2016. Adaptado de LOUIS et al, 2016.

Tumores endimários	grau
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
- ependimoma papilar	
- ependimoma células claras	
- ependimoma tanicítico	
Ependimoma, <i>RELA</i> positivo	II ou III
Ependimoma anaplásico	III

1.3 Ependimoma

Descrito pela primeira vez por Virchow em 1926, os tumores endimários vem sendo estudados e subclassificados, buscando, assim, um melhor entendimento. O ependimoma é atualmente o terceiro tumor cerebral mais comum, correspondendo a aproximadamente 10% dos casos dos tumores intracranianos e 23% dos tumores da coluna (VITANZA e PARTAP, 2016).

Segundo dados da Central de Registro de Tumores Cerebrais dos EUA (Central Brain Tumor Registry of the United States – CBTRUS), aproximadamente 1.340 casos de ependimoma e suas variantes são diagnosticados por ano nos EUA, sendo 185 crianças (0-14 anos) e 50 adolescentes (15-19 anos) (OSTROM et al, 2017). Não existem até o momento registros específicos sobre a incidência de ependimoma na população brasileira.

O ependimoma origina-se nas células que revestem a parede ventricular ao longo de todo eixo cranioespinhal, podendo desenvolver-se em locais distintos, como a região supratentorial, a fossa posterior e a coluna espinhal (YAU et al, 2011). Aproximadamente 90% dos casos são intracranianos e dois terços desses aparecem na fossa posterior. A maior incidência ocorre antes dos sete anos de idade, com um segundo pico entre a segunda e terceira década de vida (KUN et al, 1988).

A ressonância magnética é o método de escolha para avaliar a suspeita clínica de um tumor cerebral. Os ependimomas mostram-se como tumores heterogêneos, podendo apresentar uma combinação de componentes sólidos, císticos, calcificação, necrose e hemorragia. No exame pode ser notada extensão ou a invasão do forame de Luschka e

Magendie. São imagens geralmente hipointensas em T1 e hiperintensa em relação ao parênquima em T2. O preenchimento pelo gadolínio costuma ser irregular, incompleto (GIRARB et al, 2014). Esses dados estão representados na **Figura 3**.

Figura 3: Ressonância magnética de paciente com endimoma em fossa posterior. A, D e E: imagem hipointensa em T1. B e C: imagem hiperintensa em T2, pós contraste. F: imagem sagital mostrando preenchimento irregular pelo gadolínio.

A sobrevida está diretamente relacionada com fatores prognósticos bem estabelecidos, porém ainda controversos. O mais importante é o grau de ressecção, com variação de até 66% a 75% de sobrevida se ressecção completa versus 0% a 11 % se ressecção incompleta. A localização do tumor, a idade do paciente e o subtipo histológico também estão relacionados ao prognóstico, sendo que os tumores localizados na fossa posterior, os pacientes menores de 2 anos e o subtipo histológico anaplásico estão comprovadamente relacionados à pior prognóstico (SANTI et al, 2011; CHANG MA et al, 2019).

Sob o ponto de vista histológico, trata-se de um tumor heterogêneo variando de bem diferenciados até lesões altamente celulares, com importante atividade mitótica, anaplasia, proliferação microvascular e necrose (BURGUER et al, 2007). A antiga classificação OMS de 2006 alocava os tumores endimários em dois grandes grupos: O endimona grau II da classificação OMS, em que estão incluídas as formas mais benignas como o endimoma celular, papilar, células claras e tanicíticas, com melhor prognóstico, e o endimoma grau III

da classificação OMS, correspondente ao ependimoma anaplásico, altamente agressivo (LOUIS et al, 2007).

Após essa publicação, diversos autores realizaram estudos tentando mostrar a dificuldade em estabelecer o diagnóstico anatomopatológico final, especialmente para os tumores da fossa posterior e na diferenciação entre o grau II e III. Essa dificuldade pode ser em parte atribuída à variabilidade entre os observadores e o uso de diferentes critérios de estratificação (TIHAN et al, 2008).

A atual classificação publicada pela OMS, pela primeira vez inclui critérios de genética e biologia molecular às características histopatológicas dos tumores do SNC. Os tumores ependimários são alocados em três graus histológicos: o grau I (GI), em que encontram-se o subependimoma e o ependimoma mixopapilar, o grau II (GII), que corresponde ao ependimoma papilar, ependimoma de células claras e ependimoma tanicitico, além do ependimoma *RELA* positivo, e o grau III (GIII), que corresponde ao ependimoma anaplásico (LOUIS et al, 2016).

Sob o ponto de vista imuno-histoquímico (IH), em geral, são positivos para os marcadores S100 e vimetina, e negativos para citoqueratina e marcadores neuronais como sinaptofisina. As principais diferenças patológicas e IH estão listadas na **Tabela 3** e na **Figura 4**.

Tabela 3: Principais diferenças histológicas do ependimoma grau II e grau III (adaptado de TIHAN et al, 2008).

OMS grau II	OMS GRAU III
Pseudorosetas perivasculares.	Presença de necrose.
Morfologia nuclear uniforme.	Hipercelularidade marcada com pleomorfismo nuclear e/ou hipercromasia.
Menos de 5 mitoses por campo (áreas focais 5 a 10 são permitidas).	Mais de 10 mitoses por campo.
Nenhuma proliferação endotelial vascular.	Proliferação endotelial vascular com camadas endoteliais.

Figura 4: Fotomicrografias representativas das amostras tumorais. As secções histológicas coradas pelo H&E (A, C) demonstram que o Ependimoma Grau II é composto por células pequenas, com núcleo hiper cromático, nucléolo indistinto, e com fundo fibrilar. As células neoplásicas esboçam frequentes pseudorrosetas perivascular (C), e não há necrose ou figuras de mitose. O índice de proliferação celular, avaliado por meio da marcação imuno-histoquímica para o Ki67 (E), é de cerca de 10%. Há positividade focal, de padrão pontilhado, para o antígeno de membrana epitelial (EMA - G); e forte positividade citoplasmática para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP - I). Por outro lado, o Ependimoma Anaplásico (Grau III) é uma neoplasia hiper celular maligna constituída por células bastante indiferenciadas, com núcleos grandes, hiper cromáticos e pleomórficos, cromatina granular e nucléolos pequenos (B, D). O citoplasma é escasso e eosinofílico. As células tumorais encontram-se amiúde dispostas ao redor de um vaso sanguíneo (pseudorrosetas perivascular - #), com mitoses atípicas (x) e frequentes figuras de mitose (*). O índice de proliferação celular, avaliado pela imunomarcação para o Ki67 (F), é de 40%. De maneira similar ao tumor grau II, há positividade focal, de padrão pontilhado, para o EMA (H) e positividade difusa para o GFAP (J).

Os aspectos histológicos devem ser associados à localização do tumor. Proliferação microvascular e o elevado índice mitótico estão relacionados diretamente com o prognóstico tanto nos tumores supra quanto infratentoriais, enquanto a formação de canais endimários associa-se com pior prognóstico apenas nos tumores supratentoriais. Tumores da fossa posterior são associados com áreas de hiper celularidade e necrose, não tão evidentes nos tumores supratentoriais (VITANZA et al, 2016).

Diversos autores demonstraram que os tumores infratentoriais são mais agressivos e conferem pior prognóstico quando comparados ao supratentoriais. Também vem sendo demonstrado que há diferenças biológicas e moleculares entre os endimomas nessas duas localizações, com aspectos genéticos e moleculares distintos, mostrando a necessidade de uma classificação mais abrangente. (RAGHUNATHAN et al 2013, PAJTLER et al, 2017).

Taylor e colaboradores publicaram em 2016 o principal consenso que correlaciona os aspectos clínicos dos pacientes aos aspectos genéticos e moleculares. Nove subgrupos são atualmente identificados com características clínicas e moleculares diferentes, divididos principalmente de acordo com a localização anatômica do tumor. Os endimomas supratentoriais, grupo com melhores taxas de sobrevida global, tem como característica a fusão entre os genes *C11ORF95* e *RELA*, característica do subgrupo ST-EPN-RELA. Na população pediátrica há ainda a fusão com o oncogene *YAP1*, determinando o subgrupo ST-EPN-YAP1. Estudos prévios demonstraram que pacientes com essa fusão apresentam excelente prognóstico, com possibilidade de terapia menos agressiva (PAJTLER et al, 2017; MACK et al, 2017).

Quando localizados na região infratentorial, os endimomas são mais agressivos e a ressecção completa ou máxima possível em muitos casos é mais difícil. São subdivididos nos subgrupos PF-EPN-A e PF-EPN-B. Os pacientes do subgrupo PF-EPN-A são principalmente crianças pequenas, enquanto os do subgrupo PF-EPN-B são adolescentes e adultos jovens com prognóstico relativamente melhor (PAJTLER et al., 2017).

A nova classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS 2016) já agrega os aspectos genéticos e moleculares na classificação do endimoma, reconhecendo o subgrupo ST-EPN-RELA como subgrupo específico (LOUIS et al, 2016).

Em suma, em relação ao prognóstico, os endimomas localizados na fossa posterior são divididos em dois subgrupos: A e B (EPN – PFA E EPN- PFB). O EPN-PFA ocorre geralmente em crianças mais novas, e é caracterizado pelo aumento da ocorrência do ganho do cromossomo 1q, e expressão de genes e proteínas previamente descritas como de pior prognóstico. Em contrapartida, o EPN-PFB ocorre principalmente em crianças mais velhas e confere aspectos de melhor prognóstico. O ganho do cromossomo 1q25 está relacionado a

pior prognóstico em tumores localizados tanto na fossa posterior como na região supratentorial, assim como a expressão da enzima hTERT (PAJTLER et al, 2015; ANDREIULO et al, 2017; TABORI et al, 2006). Na Tabela 4 encontram-se dispostas informações dos aspectos clínicos e moleculares desses subgrupos.

Tabela 4: Aspectos clínicos e moleculares dos subgrupos deependimoma intracraniano. Adaptada de PAJTLER et al, 2017

SUPRATENTORIAL				INFRATENTORIAL		
SUBGRUPOS	ST-EPN-RELA	ST-EPN –YAP 1	SP –SE	PF-EPN-A	PF-EPN-B	PF-SE
LOCALIZAÇÃO	Supratentorial	Supratentorial	Supratentorial	Fossa posterior	Fossa posterior	Fossa Posterior
ALTERAÇÕES GENÉTICAS	11q aberrante	11q aberrante	Genoma balanceado	Genoma balanceado	Genoma instável	Genoma balanceado
IDADE	Crianças e adultos	Crianças	Adultos jovens	Crianças pequenas	Adolescentes adultos jovens	Adolescentes adultos jovens
SEXO	Masc>fem	Fem>masc	Masc>fem	Masc>fem	Fem> masc	Fem> Masc
OBSERVAÇÕES RELEVANTES	Sobrevida global baixa	Sobrevida melhor	Excelente prognóstico	Cirurgia/radioterapia suficientes	Bom prognóstico possibilidade de diminuição do tratamento	Excelente prognóstico

O grau de ressecção do endimoma tem impacto direto na sobrevida global. Dois critérios são considerados para avaliar a ressecção: a impressão cirúrgica e, mais importante, a RNM realizada nas primeiras 48 horas após a ressecção (TAMBURRINI et al, 2009). Massimino e colaboradores avaliaram o impacto do grau de ressecção de acordo com o tipo histológico. Foram avaliadas 160 crianças entre 3 e 21 anos de idade. A sobrevida global das crianças com doença residual, independente do tipo histológico, foi de 68,6%, enquanto das crianças submetidas a ressecção completa foi de 97,6% para os tumores GII e 79,1% para os tumores GIII (MASSIMINO et al, 2016).

Além do grau de ressecção e os fatores genéticos e moleculares já citados, outros fatores estão relacionados ao prognóstico, conforme os dados resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Resumo dos fatores prognósticos relacionados ao endimoma (baseado em MC GUIRE et al, 2009; TAMBURRINI et al, 2009; AMIRIAM et al, 2007).

Fator prognóstico	Impacto na sobrevida
Localização do tumor.	Tumores intracranianos tem pior prognóstico em relação aos localizados na coluna.
Idade ao diagnóstico.	Crianças menores de 2 anos tem sobrevida pior em relação as mais velhas.
Histologia anaplásica (GIII).	Pior prognóstico em relação ao G II.
Radioterapia em baixas doses.	Pior prognóstico em relação à dose completa.

A cirurgia historicamente é o principal tratamento do ependimoma. Diversos estudos comprovam essa afirmação, mostrando que a sobrevida global das crianças submetidas a ressecção completa, seguida de radioterapia, gira em torno de 67 a 93%, enquanto aquelas submetidas a ressecção incompleta, mesmo seguida de radioterapia, gira em torno de 22 a 40% (VITANZA et al, 2016). Estudo publicado em 2016, de uma coorte com 820 crianças, mostrou que tanto o EPN-PFA quanto o EPN-PFB apresentam aumento da sobrevida quando submetidos a ressecção total seguida de radioterapia, com impacto pior ao subgrupo EPN-PFA quando submetido a ressecção parcial (RAMASWAMY et al, 2016). Crianças com tumores não anaplásicos, maiores de 3 anos de idade e submetidas a ressecção completa, apresentam aparentemente bom prognóstico, com evidências de seguimento sem tratamento adjuvante (LITTLE et al, 2009).

Adjuvante à cirurgia, a radioterapia tem como principal papel erradicar a doença residual microscópica no leito operatório, prevenindo a recorrência. As indicações para o subgrupo de baixo risco com ressecção completa (GI) ainda é controversa, porém para o GII e GIII está bem estabelecida em diversos estudos para crianças maiores de 3 anos (AGER et al, 2019). Alguns centros realizam tratamento radioterápico em crianças menores de 3 anos e observam melhora da sobrevida especialmente no grupo submetido a ressecção parcial (SNIDER et al, 2017).

A dose preconizada para ependimoma tradicionalmente é 54 Gy a 59.4 Gy em leito tumoral, sem necessidade de irradiar neuroeixo, exceto se houver disseminação. A técnica indicada é a radioterapia conformacional, como a *intensity-modulate radiotherapy treatment* (IMRT) (MERCHANT et al, 2019).

A quimioterapia tem papel controverso no tratamento do ependimoma, possivelmente devido ao fato dos estudos na área serem anteriores a delineação dos subgrupos moleculares. O primeiro estudo descrito pelo POG (*Pediatric Oncology Group*) em 1993 mostrou algum benefício com agentes citostáticos como vincristina, ciclofosfamida, etoposide e cisplatina, postulando que alguns grupos de pacientes não precisariam de irradiação (DUFFENER et al., 1993). Após, diversos estudos clínicos foram realizados, com resultados controversos, conforme se vê na **Tabela 6**.

Tabela 6: Tratamentos clássicos para ependimoma, mostrando algum benefício com quimioterapia apenas para crianças menores de 3 anos e especialmente se tumores em região supratentorial. CIR: cirurgia, QT: quimioterapia, RXT: radioterapia, CARBO: carboplatina, VP: etoposide, CISP: cisplatina, CICLO: ciclofosfamida, MTX: metotrexato, IFO: ifosfamida, ST: supratentorial, FP: fossa posterior, * “oito me um”: CIPS/procarbazona/CCNU/vincristina/CICLO/prednisolona/hidroxiureia/citarabina -, ** CISP/CARBO/VP/metotrexato/vincristina/temozolamida/ - (adaptado de VITANZA et al, 2016).

Estudo	Pacientes	Esquema	Sobrevida global
BBSFOP	73 crianças < 5 anos	Cirurgia + 3 ciclos de quimioterapia (carbo/procarbazona/VP/cisp/ciclo/VCR. Rxt se progressão.	59 % em 4 anos
HIT-SKK87-92	34 crianças alto risco	Ressecção completa: 3 ciclos de MTX/VCR/procarbazona e RXT. Ressecção incompleta: quimioterapia com procarbazona/MTX/IFO/VP/cisp/citarabina + manutenção (ciclo/VP).	56% em 3 anos
UKCCSG	89 crianças menores de 3 anos	Cirurgia + quimioterapia (VCR/carbo/cisp/ciclo). RXT se recorrência.	65% em 4 anos
BABY POG	48 crianças menores de 3 anos	Cirurgia + quimioterapia (VCR/ciclo/cisp/VP).	35% em 4 anos
CCG 921	15 pacientes < 21 anos	Cirurgia + quimioterapia* “oito em um”.	59% em 5 anos
HEAD START 3	19 crianças < 3 anos	Cirurgia + quimioterapia** + consolidação com TMO autólogo (carbo/tiotepa/VP).	100% ST e 73% FP

Atualmente o tratamento do ependimoma recém diagnosticado, seguindo os grupos da OMS, consiste em ressecção cirúrgica e raros casos de observação clínica para o subependimoma e cirurgia com ou sem radioterapia para o ependioma mixopapilar (AMIN et al, 2012; FASSET et al, 2007).

Para o ependimoma GII, GIII, e *RELA* positivo o tratamento preconizado é cirurgia, seguido de terapia adjuvante. Se não houver doença residual nem disseminação, segue radioterapia. Em caso de doença residual sem disseminação, uma nova abordagem – *second look* – está indicada, além da quimioterapia e irradiação. Se doença disseminada, radioterapia em crânio e neuroeixo. Para as crianças menores de 3 anos de idade, há indicação de quimioterapia, e radioterapia em alguns protocolos de estudo. Para os casos recorrentes, o tratamento torna-se individualizado, com cirurgia, radioterapia e alguns esquemas de quimioterapia (LITTLE et al 2009, GHIA et al 2013, AGER et al, 2019; MASSIMINO et al, 2011; GARVIN et al, 2012, BOUFFET et al, 2012).

Consenso internacional com diversos *experts* foi publicado em 2017, mostrando o manejo clínico do ependimoma de acordo com os subgrupos moleculares. Conclui-se que o tratamento não pode ser baseado apenas na histologia, especialmente nos grupos GII e GIII, e

que os tumores localizados na região supratentorial e fossa posterior são diferentes sob o ponto de vista molecular. O EPN-PFA é mais agressivo, especialmente os submetidos a ressecção incompleta, enquanto muitos pacientes do subgrupo EPN-PFB submetidos a ressecção completa podem seguir apenas observação clínica (TAYLOR & RAMASWAMY, 2016; PAJTLER et al 2016). Vê-se esses dados na **Figura 5**.

SUBGRUPO	LOCAL	GENÉTICA	IDADE	SEXO	OS	CONSENSO TRATAMENTO DE ACORDO COM SUBGRUPO
ST-EPN-RELA		11q aberrante				Sem evidência de tratamento diferenciado para esse subgrupo
ST-EPN-YAP1		11q aberrante				Tratamento pode ser diminuído, pois YAP com melhor prognóstico
PF-EPN-A		Cromossomo balanceado				Pacientes > 1 ano, ressecção máxima seguida de radioterapia focal
PF-EPN-B		Instabilidade cromossomo				Apenas observação clínica pós cirurgia se ressecção completa

Figura 5: Tratamento baseado nos subgrupos moleculares e suas características (baseado em PAJTLER, et al 2016).

Além de identificar a importância dos aspectos genéticos e moleculares do câncer, saber como esses genes se expressam, como são regulados e quais os impactos dessa regulação no prognóstico de diversos tipos de câncer, incluindo o ependimoma faz-se necessário (COSTA et al, 2010).

1.4 Genética, epigenética e câncer

Célula pode ser definida como a menor parte de um organismo vivo capaz de desenvolver, de forma autônoma, as funções básicas de reprodução e crescimento. Assumem diferentes formas para desempenhar suas funções, em um processo conhecido como diferenciação celular. Possuem em seu interior proteínas e ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - DNA e ácido ribonucleico – RNA), os responsáveis por manter a estrutura e funcionamento da célula.

O câncer é uma doença genética, causada pela combinação de aberrações germinativas e somáticas no genoma celular, que levam a alterações na expressão dos genes, culminando com desordens de crescimento, falha na diferenciação, redução da apoptose, entre outros eventos celulares que a mantém viva e com capacidade de proliferação (SANTI et al, 2011)

São inúmeras as aberrações constitucionais ou mutações somáticas que o DNA da célula cancerígena pode sofrer. Dentre elas, estão as substituições, inserções, deleções, amplificações e rearranjos. Muitos estudos mostram a correlação dessas mutações com exposição a mutagênicos exógenos como o tabaco. Por outro lado, alguns genes já carregam originalmente mutações cancerígenas, e sofrem outras diversas até desencadear e manter a carcinogênese. Alguns exemplos são o *TP53*, *RBI*, *KRAS* e *EGFR* (PALANICHAMY, 2018)

Em 2000, Hanahan e Weinberg publicaram um importante artigo que mostra os mecanismos que a célula cancerígena desenvolve para seguir a tumorigênese. Dentre os processos, a célula torna-se autossuficiente em produzir sinais de crescimento e, insensível aos sinais antiproliferação. Apresenta evasão do mecanismo de apoptose (morte celular programada), passando a se replicar infinitamente. Torna-se capaz de invadir tecidos e se espalhar, produzindo metástases, e de estimular neoformação vascular (angiogênese). Dez anos depois, dois conceitos foram incorporados a essa lista: a célula torna-se capaz de reprogramar seu metabolismo energético, e escapar da destruição do sistema imune, conforme ilustrado na **Figura 6** (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Desde então, diversos avanços tecnológicos na área genômica vem sendo desenvolvidos, buscando especialmente estudar os mecanismos propostos por Hanahan e Weinberg. Mapas epigenômicos, transcriptômicos e metabolômicos são estudados em paralelo àquelas definições (MOSES et al, 2018).

Figura 6: As dez características do câncer propostas por Hanahan e Weinberg (baseado em HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Epigenética é o processo pelo qual a expressão gênica é regulada por outros eventos que não a alteração na sequência de DNA. São mudanças estáveis e hereditárias na expressão do gene resultando na modificação da molécula de DNA, mantendo intacta sua sequência de nucleotídeos, e que podem ser transmitidas a gerações futuras. Os principais eventos epigenéticos estudados até o momento são metilação do DNA, modificação de histonas, remodelamento da cromatina e RNA não codificantes, incluindo os microRNAs (miRNAs) (ROGERS et al, 2018; ROUSSEL & STRIPAY, 2017). Como reguladores da expressão gênica, os eventos epigenéticos tem grande importância na progressão do câncer, particularmente silenciando genes supressores de tumor ou ativando oncogenes.

1.5 Micro RNA e câncer

Um dos eventos epigenéticos estudados é a regulação gênica por RNA não codificantes, incluindo os microRNAs (miRNAs). Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não-codificadores descobertos no início da década de 90 que participam da regulação da expressão gênica atuando como reguladores pós-transcricionais (CHAKRAWARTI et al, 2016; CATANIA et al, 2012).

A expressão alterada de miRNAs parece desempenhar um papel fundamental na progressão e disseminação de muitas neoplasias, podendo funcionar tanto como facilitadores de desenvolvimento de tumores (oncomiRs) como supressores de tumor (miR supressor tumoral). Segundo a última versão do miRBase (outubro de 2018), um banco de dados com informações sobre a sequência e possíveis alvos de miRNAs, existem atualmente um total de 38.539 miRNAs em diferentes espécies, sendo 1.982 descritos em *Homo sapiens* (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Para se transformar em miRNA, o gene deve primeiramente ser codificado em um transcrito primário (pri-miRNA, do inglês *primary miRNA*). Os genes de miRs, são transcritos pela *RNA polimerase II (Pol II)* e sofrem o capeamento da extremidade 5' e poliadenilação da extremidade 3' (LEE et al., 2004). Apresentam uma estrutura em grampo dentro de seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA (LEE et al., 2004). O pré-miRNA é então exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, uma proteína nuclear especializada no transporte núcleo-citoplasma de macromoléculas (YI et al., 2003). Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela enzima Dicer, transformando-se em um miRNA fita dupla de menor tamanho, conhecido como miRNA duplex. Este é separado por helicases e o miRNA maduro é incorporado a um complexo efetor denominado *RISC* (Complexo de silenciamento induzido por RNA). O miRNA é o elemento que reconhecerá o RNA mensageiro (RNAm) alvo e determinará a inibição da transcrição através

de dois mecanismos distintos dependendo do grau de complementaridade do miRNA com o RNA mensageiro (RNAm). Se o pareamento for perfeito, o RNAm será clivado pela subunidade Argonauta (Ago) presente no *RISC*. O complexo *RISC*, possui sempre um membro da família das proteínas Ago, que apresenta um domínio de ligação a pequenos RNAs, chamado *PAZ* e um domínio catalítico que confere atividade endonucleolítica, chamado *PIWI* (CHAPMAN & CARRINGTON, 2007). Se o pareamento for imperfeito, o *RISC* apenas inibirá o processo de tradução do RNAm. Desta forma o silenciamento gênico pós-transcricional pode ocorrer através de dois mecanismos: clivagem do mRNA ou inibição da tradução como pode ser visto na **Figura 7**. Interessante notar que um microRNA pode regular a transcrição de vários RNAm diferentes e também um RNAm pode ter sua transcrição regulada por vários miRNAs (LEWIS et al., 2003).

Figura 7: Biogênese de miRNAs: Os MiRNAs são transcritos pela RNA-polimerase II no núcleo de modo a formar grandes transcritos pri-miRNA, os quais sofrem o capeamento da extremidade 5' e a poliadenilação da extremidade 3'. Esses transcritos são processados pelas endonucleases Dicer e Droscha gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA. A exportação dos precursores para o citoplasma é subsequentemente mediada pela Exportina-5 de uma maneira dependente Ran-GTP. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer em aproximadamente 22 nucleotídeos formando o miRNA maduro, do qual uma simples fita será incorporada no complexo de silenciamento RISC. Este complexo direciona os miRNA para o seu RNAm-alvo, o que irá conduzir à inibição traducional ou a clivagem dos transcritos alvo (Adaptado de ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006)

Estudos vêm relacionando a expressão de miRNA, através de diversos mecanismos moleculares, com tumorigênese e prognóstico de diversos cânceres humanos como câncer de mama, laringe, pulmão, melanoma, neuroblastoma (CHO, 2010).

Os primeiros estudos de expressão de miRNA em tumores cerebrais foram publicados em 2005 através da análise de adenomas hipofisários e glioblastomas. Desde então, muitos trabalhos tem sido publicados sobre os miRNAs, porém, ainda pouco se sabe sobre o real papel desses pequenos RNAs na regulação das vias moleculares responsáveis pelo surgimento e progressão dos tumores no SNC (CIAFRÉ et al, 2005).

1.6 microRNA e tumores do SNC

Na última década, aproximadamente 70% dos miRNAs descritos foram encontrados em tecidos cerebrais de mamíferos, principalmente cerebelo e córtex cerebral. Em tumores cerebrais, diferentes técnicas avaliaram a expressão dos miRNAs e mostraram diferença de expressão dos mesmos em relação aos controles (EGUÍÁ-AGUILAR, 2017).

O primeiro estudo relacionando a expressão de miRNAs com tumores cerebrais data de 2005 e analisou, pela técnica de microarray, a expressão de 245 microRNAs em glioblastoma, identificando um grupo de seis miRNAs com diferença de expressão, com destaque para a hipoeexpressão do miR -221 (CIAFRÉ et al, 2005).

Desde então, inúmeras publicações surgiram, somando atualmente mais de 200 na literatura. A maioria desses estudos referem-se à gliomas. Também há descrições em meduloblastomas e outros tumores embrionários, e menos frequentemente em ependimomas.

1.7 microRNA e ependimoma

Em estudo publicado em 2011, Costa e colaboradores analisaram a expressão de 365 miRNAs em 34 amostras de ependimoma e 8 amostras de tecido cerebral normal, com o intuito de identificar marcadores moleculares importantes para o manejo clínico desses tumores. Identificaram 28 micro RNAs expressos diferentemente em ependimomas quando comparados ao tecido cerebral normal. Desses, o miR-34a e o miR-135a mostraram-se hiperexpressos, enquanto o miR-485-5p mostrou-se hipoeexpresso. Correlacionando com características clínicas, o miR-7, miR-31, miR-107, miR-124-a, miR-183, miR-339, miR-376a e miR-551a mostraram-se específicos para os supratentoriais, enquanto os infratentoriais superexpressam o miR-34-a. O miR-203 foi identificado como fator independente para o

tempo de recaída, sugerindo que possa ser usado como biomarcador no manejo da progressão da doença. Outros também foram associados ao tempo de recaída como o miR-432, miR-411, miR-376a, miR-381 e miR-487b (COSTA et al, 2011).

Os estudos seguintes corroboraram a diferença de expressão dos miRNAs em amostras de endimoma e controle, por diferentes técnicas, conforme resumido na **tabela 7**.

Tabela 7: Principais trabalhos publicados sobre microRNA e endimomas.

Autor / ano	MicroRNAs	Técnica	Resultado
Sasayama et al, 2009	miR 10-b	RT- qPCR	Hiperexpresso.
Bircks et al, 2011	miR-129; miR – 142-5p; miR-25	RT- qPCR	Diferentemente expressos.
Costa et al, 2010	365 diferentes microRNAs	Array	Diferentemente expressos.
Loudusarmy et al, 2015	miR-29	<i>In silico</i>	Regulador <i>LAMA 2</i> .
Braoudaki et al, 2016	miR-15-a; miR-24-1	RT-qPCR	Hipoexpressos.
Zarkeweska et al, 2016	miR17-5p; miR-19a -3p; miR 106b-5p	IH	miR-15-5p correlacionado com sobrevida.
Margolin-Miller, 2017	miR-124a-3p	RT- qPCR	Hiperexpressão correlacionada com baixos índices de recaída.
Tantawy et al, 2017	82 diferentes microRNAs	RT-qPCR	Diferentemente expressos.
Shu et al, 2018	15 diferentes microRNAs	RT- qPCR	Diferentemente expressos.
Ahram et al, 2018	84 diferentes microRNAs	RT-qPCR	Diferentemente Expressos.
Cipro et al, 2019	miR-135a-3p,miR-137,miR-17-5p,miR-181, miR-203	RT-qPCR	miR-203 hiperexpresso. Os outros, hipoexpressos.

2 JUSTIFICATIVA

O ependimoma é o terceiro tumor cerebral mais comum na infância, com altos índices de morbimortalidade. O tratamento tem se baseado na histologia desses tumores e em fatores prognósticos como grau de ressecção e idade dos pacientes. Porém, já é evidente que a agressividade é diferente de acordo com a localização e fatores genéticos e moleculares.

Existe uma correlação entre a expressão de diversos miRNAs e o câncer, incluindo tumores do SNC, dentre eles o ependimoma. O estudo da expressão desses miRNAs nos diferentes subtipos de ependimomas pode desvendar novas vias associadas ao desenvolvimento e comportamento biológico desses tumores, bem como auxiliar na determinação de qual a estratégia mais adequada para o tratamento individualizado destes pacientes.

Sendo assim, a hipótese desse estudo é que haja diferença na expressão dos microRNAs em ependimoma, e que essa diferença esteja relacionada ou não com a agressividade desses tumores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão de 5 miRNAs já descritos como importantes na literatura (miR - 21, miR124-a, miR-135a-5p, miR- 383, miR - 485-5p) em amostras de pacientes portadores de ependimoma e analisar potenciais vias genéticas envolvidas com os mesmos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar clinicamente e molecularmente amostras de ependimoma ao diagnóstico e recidiva de crianças brasileiras atendidas em 2 centros de tratamento oncológico (HCFMRP-USP e Centro Infantil Boldrini – Campinas).

- Correlacionar os níveis de expressão e as características clínicas dos pacientes ao diagnóstico e durante a evolução;

- Avaliar, através da análise *in silico*, os genes e vias envolvidas com esses microRNAs;

- Escolher, após análise da literatura vigente, um gene ou uma família de genes para validação.

4 DESENHO DO ESTUDO

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Pacientes

Foram analisadas 25 amostras de ependimoma coletadas ao diagnóstico e 9 amostras de recidiva totalizando 34 amostras com material previamente congelado, armazenadas no banco de tumores do laboratório de pediatria da FMRP e do BOLDRINI.

Como controles, foram utilizadas 4 amostras de cerebelo de pacientes do sexo feminino, com idade variando de 6 meses a 31 anos, obtidas pós morte por causas diversas (2 casos por sepse, choque anafilático, hemorragia). Foram ainda utilizadas 5 amostras de substância branca cerebral, obtidas de cirurgia de epilepsia totalizando 9 controles e duas amostra de células ependimárias, de um doador cadáver, provenientes do terceiro e quarto ventrículos.

A distribuição casuística dos pacientes com ependimoma foi de 10 tumores supratentoriais e 24 localizados na fossa posterior (70,5%). Quanto a idade, 13 (38%) pacientes tinham menos de 3 anos de idade, enquanto 21 eram maiores de 3 anos. Em relação ao gênero, 15 crianças eram do sexo feminino e 19 do sexo masculino.

Seguindo a classificação WHO, 16 tumores foram classificados como grau II, 16 grau III e duas amostras não classificadas. Dos pacientes com tratamento descrito em prontuário, a maioria pacientes (dez) foi submetida à cirurgia seguida de quimioterapia e radioterapia, 3 pacientes foram submetidos apenas a cirurgia, um paciente apenas a radioterapia, 6 pacientes receberam cirurgia e radioterapia e 9 pacientes, cirurgia seguida de quimioterapia.

Quanto ao subgrupo molecular, 18 pacientes (52%) pertenciam ao subgrupo FP-EPN-A, 3 pacientes ao subgrupo ST-EPN-RELA, 2 pacientes ao subgrupo ST-EPN-YAP1, 7 pacientes ao subgrupo ST-EPN-NE e 3 pacientes ao subgrupo FP-EPN-NE. Em um paciente não foi possível realizar a classificação.

O grau de ressecção dos tumores de 24 pacientes foi completa, enquanto 10 tiveram lesão residual detectada. Ao diagnóstico, 6 pacientes apresentavam doença metastática. Um total de 18 pacientes apresentou recidiva da doença, 20 pacientes encontram-se vivos e 14 foram a óbito. O resumo dos dados clínicos dos pacientes do estudo está na Tabela 8.

Tabela 8: Características clínicas dos pacientes envolvidos no estudo. P: primário; R: recaída; ST: supratentorial; FP: fossa posterior; M: masculino; F: feminino; OMS: Organização Mundial de Saúde; COMP: completa, PARC: parcial; PRES: presente, AUS: ausente; N: não; S: sim; CIR: cirurgia; RXT: radioterapia; QT: quimioterapia; FP-A: fossa posterior A; FP-B: fossa posterior B; ST-YAP1: supratentorial YAP1; ST-RELA: supratentorial RELA; ST-NE: supratentorial não especificado; FP-NE: fossa posterior não especificada.

ID	amostra	Local	gênero	idade ao dgn (anos)	Classificação OMS	ressecção	recidiva	óbito	tratamento	subgrupo molecular	tempo sobrevida (meses)
1	P	ST	F	1	III	COMP	AUS	N	CIR+QT	ST-YAP1	35
2	P	FP	M	1	II	COMP	AUS	N	CIR+RXT	FP-A	16
3	P	FP	M	2	II	COMP	AUS	N	CIR+RXT	FP-A	82
4	P	FP	F	2	III	COMP	AUS	N	CIR+RXT	FP-A	122
5	P	FP	F	2	II	COMP	AUS	N	CIR+RXT+QT	FP-A	17
6	P	FP	M	1	III	COMP	AUS	N	CIR+QT	ST-NE	13
7	P	FP	F	1	III	COMP	AUS	N	CIR+QT	FP-NE	59
8	P	FP	M	2	II	COMP	AUS	N		FP-NE	99
9	P	ST	F	2	III	COMP	AUS	N	CIR+RXT+QT	ST-RELA	35
10	P	FP	F	2	II	COMP	AUS	N		FP-A	81
11	P	FP	M	2	II	COMP	PRES	N	CIR+QT	FP-A	95
12	R	FP	M	1	II	COMP	PRES	N	CIR+RXT+QT	FP-A	190
13	P	FP	M	2	II	COMP	PRES	N	CIR+RXT+QT	FP-A	140
14	P	ST	F	2	III	COMP	PRES	N	CIR+RXT+QT	ST-NE	45
15	P	ST	M	2	III	COMP	PRES	N	CIR+RXT+QT	ST-NE	64
16	R	FP	F	2	II	PARC	PRES	N	CIR+RXT	FP-A	211
17	P	FP	M	2	III	PARC	PRES	N		FP-A	130
18	R	ST	M	2	III	PARC	PRES	N	CIR+QT	ST-NE	
19	P	FP	F	2	II	PARC	PRES	N	CIR+RXT		211
20	P	FP	F	2	II	COMP	AUS	N		FP-A	60

ID	amostra	Local	gênero	idade ao dgn (anos)	Classificação OMS	ressecção	recidiva	óbito	tratamento	subgrupo molecular	tempo sobrevida (meses)
21	P	ST	M	2	III	COMP	AUS	S	1	ST-NE	0.2
22	P	ST	M	2	III	PARC	AUS	S	1	ST-NE	1
23	P	FP	F	2	III	PARC	AUS	S	CIR+QT	FP-A	2
24	P	FP	F	1	II	PARC	AUS	S	CIR+QT	FP-NE	4
25	R	FP	F	1	II	COMP	PRES	S	CIR+QT	FP-A	120
26	P	FP	M	1	III	COMP	PRES	S	CIR+QT	FP-A	23
27	P	FP	F	1	II	COMP	PRES	S	CIR+RXT+QT	FP-A	63
28	R	FP	M	1	III	COMP	PRES	S	CIR+RXT+QT	FP-A	
29	R	FP	F	1	II	COMP	PRES	S	CIR+RXT+QT	ST-NE	91
30	R	ST	M	2	III	PARC	PRES	S	CIR+RXT	ST-RELA	138
31	R	ST	M	2	III	PARC	PRES	S	CIR+RXT+QT	ST-RELA	70
32	P	ST	M	1	III	COMP	AUS	S	2	ST-YAP1	
33	P	FP	M	1	II	COMP	PRES	N	1	FP-A	
34	R	FP	M	2		PARC	PRES	N		FP-A	

Analizamos em seguida a sobrevida global dos 34 pacientes envolvidos no estudo (25 tumores primários e nove recidivas), buscando associação da mesma com idade, grau de ressecção, presença ou não de metástase, tipo de tratamento e subgrupo molecular.

Foi feita a análise da expressão dos microRNAs entre si, além da comparação dessa expressão em tumores primários com suas características clínicas e subgrupos moleculares, incluindo as relacionadas ao pior prognóstico (idade, localização e grau de ressecção).

5.2 Controles

Para comparar a expressão dos miRNAs com tecidos não neoplásicos, foram utilizadas 9 amostras de tecido cerebral, sendo 4 amostras de cerebelo de pacientes do sexo feminino, com idade variando de 6 meses a 31 anos, obtidas pós morte por causas diversas (2 casos por sepse, choque anafilático, hemorragia), e 5 amostras de substância branca cerebral, obtidas de cirurgia de epilepsia. Além dessas, foram usadas 2 amostras de células endoteliais, de um mesmo doador cadáver, provenientes do terceiro e quarto ventrículos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC/FMRP-USP, nº Proc. 15509/2016 (Anexo I); Banco de Tumores do Laboratório de Biologia Molecular do CIB (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp - reunião dia 17/02/09). Foram obtidos termos de consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis.

5.3 Métodos

5.3.1 PCR quantitativa em tempo Real (qRT-PCR)

Tanto os tumores como os controles foram obtidos durante ressecção cirúrgica, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e microdissecados. O RNA total foi extraído através do reagente Trizol® e reversamente transcrito em cDNA através dos reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. O nível de expressão dos miRNAs previamente escolhidos foram quantificados através da técnica de PCR em tempo real (RT PCR), realizadas no aparelho ABI PRISM TM 7500® (PE Applied Biosystems). Cada amostra de paciente foi amplificada em duplicata e normalizadas com a média dos CTs, controles não neoplásicos. A expressão relativa de cada miRNA ou gene analisado foi calculada através da

formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para os microRNAs foram utilizados como calibradores os *RNU6B* e *RNU44*, para os genes foram utilizados o *GUS* e *HPRT*.

Tabela 9: Descrição das sondas utilizadas neste estudo, adquiridos pela Companhia Life Technologies Applied Biosystem

ID	ID no miRBase	Espécies	#Cat.	
hsa- miR – 21	hsa-miR-21-3p	humano	#4427975	2218
hsa-miR-124-a	hsa-miR-124-a-3p	humano	#4427975	1182
hsa-miR-135-a	hsa-miR-135-a-5p	humano	#4427975	2199
hsa-miR-383	hsa-miR-383	humano	#4427975	1563
hsa-miR-485	hsa-miR-485-5p	humano	#4427975	2676
RNU 6B	-----	-----	#4427975	1093
RNU44	-----	-----	#4427975	1003

5.3.2 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa SPSS 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) considerando os resultados significativos os valores de $p < 0.05$. Para a análise da comparação da expressão dos microRNAs entre tumores e controles não neoplásicos e entre tumores e as características clínicas e biológicas foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis quando apropriado. Para a análise da sobrevida global foi utilizadas as curvas de Kaplan-Meier e o teste log-rank. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de Spearman.

5.3.3 Análise *in silico*

A etapa da análise *in silico* foi realizada com a ajuda do bioinformata Luis Fernando Peinado Nagano.

A primeira ferramenta usada foi o miRwalk 2.0 (STITCH et al, 2018), uma ferramenta computacional aberta que permite identificar genes preditos e validados a partir dos microRNAs pré-selecionados, nesse caso os quatro com expressão diferenciada em relação aos controles não neoplásicos (miR-124a, miR-135-5p, miR-383, miR-485-5p). Dentro da ferramenta miRWalk2.0, foram selecionados os bancos de dados miRDB, PICTAR 2, PITA, RNA 22, RNA hybrid e Target Scan. Foram então obtidos os genes preditos e validados,

alvos dos microRNAs estudados. As principais vias envolvidas foram analisadas através das ferramentas KEEG e Enrichr (KULECHOV et al, 2016)

Após, foi feita a análise do banco de dados GSE21687 composto de 71 amostras de ependimoma, sendo 37 de tumores supratentoriais e 34 de tumores infratentorias de pacientes do Hospital St Jude em Memphis nos Estados Unidos, disponíveis para consulta pública <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21687> (GILBERTSON et al, 2010), com o objetivo de avaliar paralelamente a expressão dos miRs e dos genes alvos validados especificamente em ependimomas, além da análise das vias envolvidas em amostras disponíveis em bancos públicos. Foram analisados ainda os resultados de RNAseq em 10 amostras independentes de ependimoma (5 supra-tentoriais e 5 de fossa posterior) de estudo em andamento do laboratório de Oncologia Pediátrica da FMRP-USP. Em seguida, foi realizada revisão da literatura, buscando escolher um gene ou família de genes com correlação significativa com o miR, para validação.

5.3.4 Validação da expressão dos genes escolhidos por PCR em tempo real

Foi optado pela avaliação da expressão de genes da família *HOX*, após revisão da literatura recente, em que o mesmo apareceu como importante no desenvolvimento embrionário cerebral, além de se mostrar hipoexpresso nesse tecido. A expressão gene *HOXB3* é regulada pelo miR 485-5p, que se mostrou significantemente hipoexpresso em tecidos tumorais quando comparados com tecidos controle (cerebelo, substância branca e células ependimárias). Foi avaliada também a expressão do gene *HOXB4* que está intimamente ligada a expressão do *HOXB3* e também é descrito como hipoexpresso em tecido cerebral.

5.3.5 Validação da expressão dos genes através da análise *in silico*

O comportamento dos genes *HOXB3* e *HOXB4* foi analisado *in silico* no banco de dados públicos de ependimoma GSE 21687 e também em 10 amostras de ependimoma através da técnica de RNAseq (exoma) que está em andamento em estudo financiado pela FAPESP no laboratório de Oncologia Pediátrica da FMRP.

6 RESULTADOS

6.1 Sobrevida global de acordo com as características clínicas e biológicas

Analizando separadamente os casos primários (n=25) e as recidivas (n=9), para os casos primários, a taxa de sobrevida global em 5 anos foi de $72,9 \pm 10\%$, com 18 crianças vivas. Analisando as amostras de recidiva, a sobrevida foi de $50 \pm 10\%$, como se vê na **Figura 8**

Figura 8: Sobrevida global dos pacientes do estudo com ependimoma primário e recidivado (curvas de Kaplan Meier).

Foi possível avaliar as características clínicas em relação à sobrevida em 22 de 25 casos de tumores primários em que havia todos os dados disponíveis. Levando-se em conta a idade, a sobrevida total em 5 anos dos pacientes menores de 3 anos de idade foi de 64,3%, enquanto das crianças maiores de 3 anos foi de 86,7% ($P = 0,09$). Em relação ao grau de ressecção, os pacientes portadores de tumores primários submetidos à ressecção completa tiveram a SG de 92,9%, enquanto nos que seguiram com lesão residual foi de 40% ($P = 0,013$). Os pacientes com tumor primário sem metástase tiveram SG em 5 anos de 87,7% e aqueles com doença metastática ao diagnóstico tiveram 50% de sobrevida ($P = 0,114$). Pacientes classificados como ependimoma grau II tiveram SG em 5 anos de 77,9% e aqueles classificados como grau III de 71,6% ($P = 0,491$). Esses resultados, no entanto, devem ser

avaliados com cautela devido ao número relativamente reduzido de casos, conforme se observa na **tabela 10**.

Tabela 10: Sobrevida global (SG) em 5 anos em ependimomas primários de acordo com as características clínicas (Curvas de Kaplan-Meier e teste logrank).

Variável	SG em 5 anos	p
Idade - < 3 anos (n=7)	64,3±21%	0,09
- ≥ 3 anos (n=15)	86,7±8%	
Grau de ressecção – completa (n=17)	92,9±6,9%	0,013*
- lesão residual (n=5)	40±21,9%	
Metástase – presente (n = 4)	50±25%	0,114
- ausente (n = 18)	87,7±8,2%	
Histologia - grau II (n=11)	77,9±14,1%	0,491
- grau III (n=11)	71,6±14%	

Em relação aos subgrupos moleculares, 16 dos 25 pacientes com tumor primário tiveram o subgrupo molecular identificado, com a descrição do status dos pacientes conforme se vê os dados expostos na **tabela 11**.

Tabela 11: Número de pacientes com tumores primários, seus respectivos subgrupos moleculares e o status atual. ST-RELA: supra tentorial subgrupo RELA; ST-YAP-1: supratentorial subgrupo YAP-1; FPA: fossa posterior subgrupo A; ST-NE: supratentorial subgrupo não especificado; FP-NE: fossa posterior subgrupo não especificado.

número de pacientes	subgrupo molecular	Status
1	ST-RELA	Vivo
2	ST -YAP1	Vivos
13	FP-A	10 vivos, 3 óbitos
5	ST-NE	3 vivos, 2 óbitos
3	FP-NE	1 vivo, 2 óbitos

6.2 Correlação entre os miRNAs analisados

Quando correlacionamos os microRNAs entre si, foi observada correlação positiva significativa apenas entre o miR-21 e miR-124, segundo demonstrado na **Tabela 12**.

Tabela 12: Correlação entre os microRNAs estudados. *Correlação significativa $p < 0,05$ (teste de Spearman).

		miR-21	miR-124	miR-383	miR-485	miR-135
miR21	Coefficiente correlação	1,000	0,508	-0,013	0,092	-0,289
	Valor p (bi-caudal)	.	0,009*	0,951	0,661	0,161
miR124	Coefficiente correlação	0,508	1,000	0,122	0,139	-0,070
	Valor p (bi-caudal)	0,009*	.	0,563	0,507	0,740
miR383	Coefficiente correlação	-0,013	0,122	1,000	0,175	0,085
	Valor p (bi-caudal)	0,951	0,563	.	0,403	0,688
miR485	Coefficiente correlação	0,092	0,139	0,175	1,000	-0,140
	Valor p (bi-caudal)	0,661	0,507	0,403	.	0,504
miR135	Coefficiente correlação	-,0289	-0,070	0,085	-0,140	1,000
	Valor p (bi-caudal)	0,161	0,740	0,688	0,504	.

6.3 Expressão relativa dos miRNAs emependimomas e controles não neoplásicos

Analisando a expressão dos microRNAs estudados em relação aos controles não neoplásicos (cerebelo, substância branca e células endimárias), com exceção do miR-21, todos os outros apresentam diferença significativa de expressão em relação aos controles.

O miR-124a, miR-485-5p e o miR-383 mostraram-se hipoexpressos, enquanto o miR - 135, hiperexpresso conforme pode ser analisado na tabela 14 e nas figuras 9 e 10.

Tabela 13: Expressão dos microRNAs em relação aos controles não neoplásicos. *Valor de p significativo $\leq 0,05$ (Teste de Mann-Whitney).

	miR-21	miR-124a	miR-383	miR-485-5p	miR-135a-5p
Ependimoma (n=25)					
Média	0,91697	0,28307	0,01400	0,09047	13,11000
(Mín-Máx)	(0,059 -60,403)	(0,003 - 47,381)	(0,000 - 24,437)	(0,007-3,329)	(0,051-3259,0)
Controles (n=11)					
Média	0,82000	1,77000	1,76600	0,87833	1,49348
(Mín-Máx)	(0,273 -8,894)	(0,285 - 2,740)	(0,224- 17,767)	(0,360- 3,377)	(0,317- 13,404)
Valor de P	0,206	0,032*	0,005*	0,014*	0,050*

Figura 9: Expressão relativa do miR-21 (A), miR-124a (B), miR-135a-5p (C), miR-383 (D) e miR-485-5p (E) em amostras de ependimoma, e controles não neoplásicos. A linha corresponde ao valor mediano da expressão do miR (Teste Mann-Whitney).

Figura 10: Expressão relativa do miR-21 (A), miR-124a (B), miR-135a-5p (C), miR 383 (D) e miR-485-5p (E), em amostras de ependimoma, e os controles não neoplásicos de cerebelo, substância branca e epêndima. A linha corresponde ao valor mediano da expressão do miR.

6.4 Correlação entre os miRNAs estudados e as características clínicas e biológicas em ependimomas primários

Não foram observadas associações significativas entre os valores de expressão dos microRNAs e as características clínicas e biológicas analisadas conforme o que está na **tabela 14**.

Tabela 14: Mediana, valores mínimos e máximos dos miR-21, miR-124a, miR-383, miR-485-5p, miR-135-5p em ependimomas primários de acordo com a aspectos clínicos e subgrupos moleculares. ST-RELA: supra tentorial subgrupo RELA; ST-YAP-1: supratentorial subgrupo YAP-1; FPA: fossa posterior subgrupo A; STNE: supratentorial subgrupo não especificado; FPNE: fossa posterior subgrupo não especificado. Valor de p calculado por teste de Mann-Whitney* ou de Kruskal Wallis**, significância < 0,05.

	miR-21 mediana (mín- máx)	miR-124a mediana (mín- máx)	miR-383 mediana (mín- máx)	miR-485-5p mediana (mín- máx)	miR-135-5p mediana (mín- máx)
Gênero					
Feminino (n=12)	0,65647 (0,059 - 21,431)	0,25276 (0,003 - 47,381)	0,08073 (0,007 - 3,329)	0,02152 (0,003 - 24,437)	15,51350 (0,659 - 29,232)
Masculino (n=13)	0,86085 (0,185 - 60,403)	0,41551 (0,013 - 10,828)	0,01752 (0,000 - 1,774)	0,15550 (0,011 - 1,471)	4,84850 (0,051 - 32,000)
valor p*	p= 0, 225	p= 0,773	p = 0, 644	p= 0, 355	p = 0,365
Idade					
<3anos (n=9)	1,077 (0,059 - 21,431)	0,100 (0,013 - 47,381)	0,158 (0,007 - 0,717)	0,013 (0,000 - 0,171)	13,515 (0,051 - 29,232)
>3anos (n=16)	0,743 (0,116 - 60,403)	0,65527 (0,003 - 10,828)	0,06200 (0,007 - 3,329)	0,01791 (0,001 - 24,437)	10,75950 (0,659 - 3259,000)
valor p*	p= 0,571	p= 0,213	p = 0, 282	p= 0,571	p = 0,365
Localização					
Supra (n=8)	0,82813 (0,331 - 60,403)	0,28916 (0,13 - 10,828)	0,22950 (0,007 - 3,329)	0,04332 (0,002 - 1,774)	8,75100 (0,051 - 46,209)
Infra (n=17)	0,91697 (0,059 - 21,431)	0,26804 (0,00 - 47,381)	0,09047 (0,007 - 1,471)	0,01400 (0,00 - 24,437)	17,51200 (0,178 - 3259,00)
valor p*	p= 0,415	p= 0,771	p = 0,449	p= 0,382	p = 0,268
Grau de ressecção					
Completa (n=20)	1,0117 (0,059 - 60,403)	0,34350 (0,003 - 47,381)	0,01360 (0,000 - 0,517)	0,12673 (0,007 - 3,329)	10,75950 (0,051 - 3259,000)
Incompleta (n=25)	0,51259 (0,303 - 1,143)	0,22245 (0,030 - 1,132)	0,02904 (0,001 - 24,437)	0,07100 (0,007 - 0,158)	24,93700 (3,836 - 46,209)
valor p*	p= 0, 377	p= 0, 415	p = 0, 541	p= 0,415	p = 0, 248
Classificação OMS					
Grau II (n=12)	0,38444 (0,059 - 4,798)	0,30291 (0,003 - 7,423)	0,01791 (0,000 - 24,437)	0,05773 (0,007 - 1,471)	17,89100 (0,178 - 3259,000)
Grau III (n=13)	1,11055 (0,331 - 60,403)	0,28916 (0,013 - 47,381)	0,03460 (0,001 - 1,774)	0,17150 (0,007 - 3,329)	5,59100 (0,051 - 46,209)
valor p*	p= 0,210	p= 0, 564	p = 0, 644	p= 0, 326	p = 0,119

	miR-21 mediana (mín- máx)	miR-124a mediana (mín- máx)	miR-383 mediana (mín- máx)	miR-485-5p mediana (mín- máx)	miR-135-5p mediana (mín- máx)
Metástase					
Presença (n=20)	0,76200 (0,059 -60,403)	0,33742 (0,003- 47,381)	0,03741 (0,000- 24,437)	0,11923 (0,007 -2,141)	10,96200 (0,051 -3259,000)
Ausência (n=5)	0,63176 (0,331 -1,125)	0,25884 (0,033 - 1,672)	0,00750 (0,003 -0,029)	0,11450 (0,010 - 3,329)	9,88450 (3,836-29,232)
valor p*	p= 0,535	p= 0,938	p = 0, 215	p= 0,816	p = 1,000
Status					
Vivo (n=18)	0,94558 (0,116 - 60,403)	0,29524 (0,003 -47,381)	0,01400 (0,001 - 24,437)	0,16300 (0,007 - 3,329)	13,11000 (0,051-3259,000)
Óbito (n=7)	0,71478, (0,059-7,153)	0,14155 (0,022-1,582)	0,4102 (0,0005-1,774)	0,06200 (0,011 -0,158)	10,67400 (0,859 -46,209)
valor p*	p= 0, 620	p= 0, 457	p = 0, 852	p= 0, 852	p = 0, 620
Recidiva*					
Ausente (n=15)	0,91697 (0,116-21,431)	0,29524 (0,003-47,381)	0,02183 (0,002 - 1,774)	0 ,07100 (0,007 - 3,329)	13,51500 (0,051 - 46,209)
Presente (n=10)	0,39596 (0,059 - 60,403)	0,18849 (0,022 -10,828)	0,14800 (0,007 -2,141)	0,14800 (0,007-2,141)	6,79000 (0,659-3259,000)
valor p	p= 0, 745	p= 0, 984	p = 0, 626	p= 0, 567	p = 0, 149
Subgrupo molecular					
ST-RELA (n= 1)	0,33132 (0,331-0,331)	0,29524 (0,295-0,295)	0,00846 (0,008-0,008)	3,32900 (3,329-3,329)	13,11000 (13,110-13,110)
ST-YAP-1 (n=2)	2,18442 (1,078-3,291)	0,19171 (0,100 -0,283)	0,00425 (0,002 -0,006)	0,03300 (0007 - 0,059)	16,67550 (13,515 -19,836)
FPA (n=14)	0,94558 (0,059-7,153)	0,26804 (0,003 -7,423)	0,00800 (0,000- 0,251)	0,09047 (0,007- 1,471)	8,40900 (0,178 - 3259,00)
STNE (n=5)	0,57843 (0,396-60,403)	1,13170 (0,013-10,828)	0,09722 (0,013-1,774)	0,40000 (0,011 -2,141)	1,69400 (0,051-46,209)
FPNE (n=3)	0,57000 (0,347-21,431)	5,15154 (0,033 -47,381)	0,02904 (0,022 -0,056)	0,15800 (0,025-0,231)	19,12600 (1,984 -29,232)
valor p**	p= 0, 505	p= 0, 401	p = 0, 140	p= 0, 451	p = 0, 543

6.5 Análise da sobrevida global de acordo com cada micro RNA analisado em ependimomas primários

Utilizando-se a mediana de expressão dos microRNAs analisados como ponto de corte para hiper ou hipoexpresso, não foi encontrada correlação dessa expressão com a sobrevida dos pacientes com ependimomas primários, conforme se vê na tabela 15 e na figura 11.

Tabela 15: Correlação da expressão dos miRs com sobrevida global (SG) em 5 anos (Curvas de Kaplan-Meier e teste logrank).

MicroRNA	SG em 5 anos	P
miR 21 < mediana	66,5±17,3%	0,827
≥ mediana	76,2±12,1%	
miR 124a < mediana	60,8±15,8%	0,465
≥ mediana	83,3±10,8%	
miR 135-5p < mediana	70,1±14,7%	0,711
≥ mediana	72,5±14,1%	
miR 383 < mediana	80,8±12,5%	0,463
≥ mediana	64,1±15,2%	
miR 485-5p < mediana	65,6±14%	0,320
≥ mediana	76,4±15,5%

Figura 11: Sobrevida global de acordo com cada microRNA estudado, utilizando a mediana de expressão como valor de corte. (A) miR-21, (B) miR-124a, (C) miR-135-5p, (D) miR-383, (E) miR-485-5p (Kaplan-Meier e teste log-rank).

6.6 Análise *in silico*

6.6.1 Busca de genes e vias envolvidas com cada microRNA estudado

A busca na ferramenta miRWalk 2.0 resultou em inúmeros genes tanto preditos quanto validados como alvo para cada microRNA estudado. Os genes validados para os miR-135a, miR-383 e miR-485 estão descritos nas tabelas suplementares 1, 2 e 3. Com base nesses genes, foi realizada a busca das principais vias moduladas pelos mesmos, através das ferramentas KEGG e Enrichr (**Tabela 16**).

Tabela 16: Número de genes-alvos preditos e validados para cada miR estudado que mostrou resultado diferente do controle não neoplásico e descrição das principais vias moduladas por esses miRs. Análise realizada pelo programa Enrichr a partir dos genes alvo validados gerados pelo programa miRWalk (CHEN 2013; DWEEP et al., 2011).

Id	genes preditos	genes validados	Principais vias moduladas (genes validados)
hsa - miR - 124-a	1248	410	Via sinalização VEGF Senescência celular Câncer de pulmão não pequenas células Via sinalização FoxO
hsa - miR- 135a-5p	593	70	Vias regulatórias de células tronco pluripotentes Via sinalização Jak STAT Câncer colorretal MicroRNAs em câncer Via sinalização TGF- B Vias de sinalização em câncer Via sinalização Wnt
hsa - miR-383	710	92	Via de sinalização HIF1A Glioma Vias de sinalização em câncer Via de sinalização VEGF MicroRNAs em câncer Via sinalização RAS
Hsa - miR-485-5p	1485	430	Apoptose Replicação DNA Via sinalização receptor NOD like Câncer de pulmão de pequenas células

6.6.2 Busca dos genes já validados em DATASET específico paraependimoma

O padrão de expressão dos microRNAs, nesse estudo, apresentaram padrão de expressão semelhante ao observado no banco específico paraependimoma (GSE21687), como mostra a **figura 12**.

Figura 12: Expressão relativa dos miR-135a-5p, miR-383, miR-485-5p, miR-124a nas amostras deste estudo e disponíveis em banco de dados público. (A) Expressão relativa nos endotimomas deste estudo. (B) Expressão relativa nos endotimomas do banco de dados GSE21687 (St Jude Children Hospital – EEUU).

6.6.3 Validação da correlação dos genes *HOXB3/HOXB4* com o miR 485-5p por PCR em tempo real

Como descrito na seção Pacientes e Métodos, os genes alvos do miR-485-5p, *HOXB3* e *HOXB4* foram escolhidos para validação nas amostras de endotimoma desse estudo.

Em análise realizada por PCR em tempo real, foi observada uma diferença significativa entre a expressão do *HOXB3* e do *HOXB4* nos tecidos tumorais primários, onde o miR-485 encontra-se hipoexpresso, quando comparada aos controles não neoplásicos, como pode ser observado na **figura 13**.

Figura 13: Expressão dos genes da família HOX. (A) expressão do *HOXB3* quando comparada aos controles não neoplásicos. (B) expressão do *HOXB4* quando comparada aos controles não neoplásicos (teste de Mann-Whitney).

Ainda considerando os tumores primários, foi observada uma diferença significativa da expressão desses genes em relação à localização dos tumores em que ambos, *HOXB3* e *HOXB4*, expressam-se mais nos tumores localizados na fossa posterior, conforme representado na **Figura 14**.

Figura 14: Expressão dos genes *HOXB3* e *HOXB4* em relação à localização tumoral. ST – supratentorial, FP – fossa posterior. Ambos mostraram níveis significativamente maiores de expressão nos tumores da fossa posterior (teste de Mann-Whitney).

Em relação à histologia, tanto o *HOXB3* quanto o *HOXB4* apresentam maior expressão nos endimomas grau II, quando comparados ao grau III, de acordo com o representado na **Figura 15**.

Figura 15: Expressão dos genes *HOXB3* e *HOXB4* em relação à histologia. Ambos os genes mostram níveis significativamente maiores de expressão nos endimomas grau II (teste de Mann-Whitney).

Comparando-se paralelamente a expressão do miR 485-5p e dos genes em questão, em cada tecido avaliado, os resultados são opostos. Enquanto o miR-485-5p mostra-se hipoexpresso nos endimomas, tanto o *HOXB3* quanto o *HOXB4* mostram-se hiperexpressos nos endimomas. Já nos tecidos não neoplásicos (cerebelo, substância branca, células endimárias do terceiro e quarto ventrículos), enquanto o miR 485-5p tem a expressão bastante aumentada em relação aos tumores, os genes praticamente não se expressam nestes controles como se vê na **Figura 16**. Esses dados sugerem um controle negativo do miR-485-3p nos genes *HOXB3* e *HOXB4*, como esperado.

Figura 16: Comparação da expressão do miR-485-5p com os genes *HOXB3* e *HOXB4* em endimomas e tecidos não neoplásicos. (A) expressão do miR 485-5p, (B) expressão do *HOXB3*, (C) expressão do *HOXB4*.

6.6.4 Análise da expressão dos genes da família HOX no banco de dados GSE21687 e no RNAseq

A análise *in silico* do comportamento dos genes *HOXB3* e *HOXB4* nos bancos de dados selecionados confirmou a diferença de expressão de ambos os genes nos endimomas de fossa posterior, quando comparados com os supratentoriais, conforme se pode verificar nas Figuras 17 e 18.

Figura 17: Expressão dos genes *HOXB3* e *HOXB4* em endimomas de fossa posterior quando comparados com supratentorial. Fonte: banco de dados GSE21687 (St Jude Children Hospital – EEUU). **** - $P < 0,05$ (Teste Mann-Whitney).

Figura 18: Expressão dos genes *HOXB3* e *HOXB4* em 5 endimomas de fossa posterior quando comparados com 5 endimomas supratentoriais pela técnica de RNASeq. Fonte: banco de dados RNAseq do Serviço de Oncologia Pediátrica da FMRP-USP.

7 DISCUSSÃO

O ependimoma apresenta-se em geral como um tumor agressivo, especialmente se localizado na fossa posterior onde, em muitos casos, a ressecção completa não é possível e está relacionada a altos índices de recorrência. (Shun-Chang Ma et al, 2018). Por muitos anos, a histologia do ependimoma delineou o grau de agressividade e o tratamento, porém a similaridade entre os dois principais grupos histológicos – OMS grau II e OMS grau III – dificultava o consenso, mesmo entre os mais experientes patologistas. (TIHAN et al, 2008). Fez-se então necessário o estudo de outros fatores prognósticos, não apenas clínicos, mas genéticos, epigenéticos e moleculares, tentando identificar subgrupos com prognóstico e evolução semelhantes (PAJTLER et al, 2015).

Até o momento nove subgrupos moleculares foram identificados, e diversos estudos seguem tentando elucidar outros fatores envolvidos com a evolução e prognóstico dos pacientes. A epigenética é atualmente definida como alterações na expressão gênica que não alteram a sequência de DNA, porém são irreversíveis e passam de geração em geração. Dentre os principais mediadores epigenéticos estão os RNA não codificantes, incluindo os microRNAs (TANG et al, 2007; COSTA et al., 2010).

No presente estudo, cinco dos quatro microRNAs analisados possuem diferença de expressão nas amostras de ependimoma, quando comparados com o tecido cerebral não neoplásico (cerebelo, substância branca e células ependimárias). Na análise *in silico*, diversos genes foram identificados como alvos desses microRNAs e os escolhidos para validação, o *HOXB3* e *HOXB4*, mostraram aumento de sua expressão nas amostras de ependimoma quando comparados com tecidos não neoplásicos. Além desse dado, notamos ainda diferença significativa na expressão desses dois genes quando comparamos amostras de ependimoma supratentorial com ependimomas de fossa posterior, em que a expressão desses genes se mostra significadamente maior. Observamos também uma maior expressão desses genes em ependimomas grau II em relação àqueles classificados como grau III.

A literatura mostra que até 40% dos pacientes portadores de ependimoma são incuráveis e fatores como localização na fossa posterior, histologia grau III (OMS) e doença disseminada ao diagnóstico estão relacionados com os piores índices de sobrevida global (FINLAY et al, 2013; TIHAN et al, 2008; TAYLOR et al, 2016; PAJTLER et al, 2015). Com o conhecimento dos subgrupos moleculares, observa-se que os pacientes agrupados no subgrupo fossa posterior A (EPN – FPA) possuem os menores índices de sobrevida global (PAJTLER et al, 2015).

A taxa de sobrevida global em 5 anos para os pacientes recém diagnosticados (tumores primários, n=25) no presente estudo foi de 72,9%. Esse índice foi menor para os grupos notoriamente de pior prognóstico: as crianças com ependimomas anaplásicos (SG=71,6%), crianças menores de 3 anos (SG=64,3%) e crianças submetidas a ressecção parcial do tumor, (SG= 40%). Apesar de que para os 2 primeiros a diferença não foi estatisticamente significativa.

A análise de sobrevida de acordo com subgrupos moleculares em nosso estudo não é possível, devido à pequena quantidade de pacientes agrupados em cada subgrupo. O subgrupo com maior número de pacientes é o EPN –FPA (n=13), com um total de 10 pacientes vivos e 3 óbitos.

A literatura recente mostra variação da taxa de sobrevida global para o ependimoma recém-diagnosticado entre 50 a 81%. Quando considerados os pacientes menores de 3 anos, esse índice varia de 35 a 59%, a depender do protocolo de tratamento utilizado (VITANZA et al, 2016). Quanto ao grau de ressecção, há limitações na literatura. Muitos estudos não apresentam grupo controle para comparação dos dados ou utilizam coortes de pacientes com diferentes tipos histológicos e localização dos tumores comprometendo a análise dos resultados (LITTLE et al, 2009). É bem determinada a influência do grau de ressecção na sobrevida dos pacientes. Recente estudo analisou 94 pacientes portadores de ependimoma de fossa posterior, em que a sobrevida global variou de 60% para aqueles submetidos a ressecção total para 25% aos submetidos a ressecção parcial (MA SHUN-CHANG et al, 2019).

Em relação a histologia, apesar de reconhecida a dificuldade de consenso entre os patologistas principalmente ao definir o grau II e grau III da OMS, está bem estabelecido que o anaplásico (grau III) apresenta índices de sobrevida menores, chegando até em torno de 25% (ELLISON et al, 2011; SHU et al, 2018; TIHAN et al, 2008). Os artigos que discutem subgrupos moleculares mostram o subgrupo A de fossa posterior (EPN – FPA) como sendo o de pior prognóstico, com altos índices de recaída e óbito, especialmente se submetidos a ressecção subtotal (TAYLOR & RAMASWAMY, 2016).

Apesar do número reduzido de casos nesse estudo, a comparação das taxas de sobrevida com as descritas na literatura mostra concordância, especialmente nos grupos de pior prognóstico como das crianças menores e dos tumores com ressecção parcial. A mesma concordância é observada no caso da sobrevida do subgrupo molecular fossa posterior A, no qual esse estudo observou o maior número de óbitos quando comparado aos outros subgrupos, sugerindo o pior prognóstico desses pacientes.

Quando buscamos correlacionar as características clínicas e subgrupos moleculares dos pacientes desse estudo com a diferença de expressão dos microRNAs em questão, não encontramos resultados estatisticamente significativos, fato esse, que pode ser também justificado pelo número limitado de pacientes para tal análise. Ao comparar a expressão dos microRNAs nos tecidos tumorais e no grupo controle de tecido não neoplásico encontramos diferença em 4 dos 5 microRNAs previamente selecionados. Mostraram-se significativamente hipoexpressos os miRs 124-a, miR 383 e miR 485-5p, enquanto o miR-135a-5p mostrou-se hiperexpresso. Revisando a literatura, observamos que o resultado positivo de nosso estudo parece ter concordância com os dados já descritos em relação aos microRNAs selecionados.

miR 124-a

Em osteossarcoma, baixos níveis do miR-124-a foram correlacionados com presença de metástase e pior prognóstico (CONG et al, 2018). Baixos níveis também foram relacionados à piora da sobrevida em pacientes com câncer colorretal (WEI et al, 2019). Em gliomas também há relação da baixa expressão com pior prognóstico (ZANG et al, 2019). Em ependimoma, recente publicação mostra a relação de altos níveis do miR-124-a com recaída e pior prognóstico, especialmente nos ependimomas sem disseminação ao diagnóstico (ZANGH et al, 2019).

No estudo de Costa e colaboradores em 2011, esse mesmo microRNA foi identificado como hiperexpresso nos tumores supratentoriais. Tendo em vista que os tumores supratentoriais tem geralmente melhores índices de sobrevida, esses dois principais artigos que relacionam o miR-124-a com ependimoma apresentam resultados contraditórios, sugerindo que mais estudos com uma casuística maior são necessários para elucidação do prognóstico deste miRNA em ependimomas.

Na maioria dos estudos envolvendo o miR 124-a, o mesmo parece atuar como gene supressor de tumor, onde promove *down regulation* em genes relacionados a proliferação vascular, inibidores de apoptose, entre outros envolvidos com a oncogênese. Em câncer de esôfago, por exemplo, altos níveis do miR-124-a estão associados ao baixo número de células em apoptose, conferindo maiores chances de progressão tumoral (HU et al, 2019). Em câncer de pulmão, altos índices de expressão desse miR parece regular negativamente a proteína *STAT3*, relacionada a capacidade celular de proliferação e metástase. A hipoexpressão do mesmo estaria então ligada a capacidade de proliferação celular (QI et al, 2019).

Em tumores do SNC está descrito em glioblastoma, como supressor tumoral ao suprimir a proteína PHF19 e a enzima EZH2, ambas associadas à proliferação nesses tumores (LU J et al, 2018). Também tem sido descrito em meduloblastoma, em que parece atuar como supressor tumoral inibindo a expressão da ciclina CDK6 (PIERSON et al, 2008).

No presente estudo, o nível de expressão desse miR foi baixo em relação aos tecidos não neoplásicos. Essa baixa expressão foi confirmada no banco de dados públicos de ependimoma (GSE 21687). Esses dados corroboram com um potencial efeito supressor de tumor em ependimomas, de forma semelhante ao descrito nos tumores acima, uma vez que ele está associado à inibição de genes associados a proliferação tumoral.

miR 135a – 5p

O microRNA 135-5p foi descrito como relacionado a pior prognóstico em câncer de mama quando hiperexpresso (TAIPALEENMÄKI et al, 2015). Em adenocarcinoma ductal pancreático, aparece hipoexpresso em amostras tumorais (DANG et al, 2014). Em ependimomas, mostrou-se hiperexpresso e relacionado à pior prognóstico em dois importantes estudos (TANTAWY et al, 2018; COSTA et al, 2011).

Descrito em câncer de mama, no qual altos níveis parecem suprimir a proteína Runx2, relacionada à metástase (TAIPALEENMÄKI et al, 2015). Ainda em câncer de mama, altos índices desse microRNA suprimem a ativação da via WNT/B-catenina, responsável por proliferação vascular e outros mecanismos de proliferação da célula cancerígena (JIANG et al, 2019).

A análise *in silico* nos mostrou relação desse microRNA com vias de sinalização e genes relacionados a proliferação celular, como WNT e TGF- β , e a ciclina (*CCND1*) gene com importante papel no ciclo celular (CHEN et al, 2019). Até o momento este microRNA parece regular mais de uma centena de genes, sendo 70 genes validados e 593 genes preditos.

Nesse estudo, de forma semelhante ao encontrado por outros (COSTA et al., 2011; TANTAWY et al., 2018), esse miRNA se mostrou hiperexpresso em amostras de ependimoma quando comparadas aos controles não neoplásicos, sugerindo que ele possa estar associado ao desenvolvimento do tumor e comportamento compatível com um oncomiR. No entanto não foi observado nesse atual estudo associação com prognóstico. Esses dados devem ser vistos com cautela, devido ao pequeno número de amostras analisadas, bem como por parte do controle não neoplásico ser constituído por tecido cerebelar e substância branca que

podem não corresponder à contraparte normal do tumor. Em células endoteliais não neoplásicas esse miR apresentou-se hipoexpresso.

Esse miR parece apresentar comportamento diferente em distintos tumores, ora atuando como supressor tumoral e ora como oncomiR. Este fato pode ser explicado pela enorme variedade de genes e vias ativadoras e inibidoras que são regulados pelo mesmo, dependendo do tipo tumoral.

miR - 383

O miR-383 aparece na literatura associado ao câncer de pulmão de células escamosas, no qual altos índices de expressão estão relacionados com melhora da sobrevida global (QI et al, 2019). Em gliomas, a hiperexpressão está relacionada à inibição da via VEGF (ZAOH et al, 2016). Ainda em gliomas, genes pertencentes à via IGF1/IGF1R aparecem hipoexpressos quando o miR-383 está hiperexpresso, sugerindo que a baixa ou ausente expressão desse gene poderia induzir a invasão celular (HE et al, 2013). Resultados diferentes foram descritos, em que observaram uma menor expressão desses genes em gliomas malignos e que sua hiperexpressão em linhagens de glioblastoma foi relacionada a menor expressão do gene *CCND1*, importante para o ciclo celular, como possível alvo (XU et al, 2014).

Em ependimoma, semelhante ao descrito no presente estudo, foi observada uma menor expressão deste miR quando comparado com controles não neoplásicos, porém sem correlação com características clínicas e prognóstico descritas (COSTA et al, 2011). Também descrito como hipoexpresso em câncer colorretal (YAN et al 2018; CUY et al, 2018).

Nesse estudo vigente, não houve correlação do miR-383 com características clínicas, conforme mencionado. Porém o mesmo mostrou-se hipoexpresso em relação ao tecido cerebral não neoplásico. As principais vias envolvidas com esse micro na análise *in silico* incluem a do *VEGF*, relacionada a angiogênese, e *HIF1A*, ligada a hipóxia celular. Podemos inferir que a hipoexpressão do mesmo, no caso de comportar-se como *down-regulation* conforme previamente descrito no estudo de Costa e colaboradores, promoveria aumento da atividade das vias envolvidas com angiogênese e proliferação das células cancerígenas.

miR 485-5p

A baixa expressão do miR 485-5p foi descrita como associada ao pior prognóstico de câncer gástrico e glioblastoma (JING et al, 2016; WANG et al, 2017). Também apresentou

hipoexpressão em estudos para câncer de ovário e carcinoma hepatocelular (QUIU et al, 2013; KIM et al, 2010). Em ependimomas foi descrito como hipoexpresso, sem correlação direta com parâmetros clínicos e prognóstico (COSTA et al, 2011).

Em câncer de mama, foi descrito como supressor de tumor, desempenhando papel oposto ao da proteína *MCAK*, associada a agressividade (LU et al, 2019). Em câncer de esôfago aparece também atuar como supressor tumoral, onde altos níveis da sua expressão suprime a proliferação, invasão e migração celular (HAN et al, 2019).

Nesse estudo, o miR 485-5p mostrou-se hipoexpresso em relação aos controles, porém sem correlação com características clínicas e moleculares. Na análise *in silico*, as principais vias envolvidas com o mesmo incluem vias relacionadas a apoptose.

Ainda na análise *in silico*, inúmeros genes validados foram relacionados a esse miR, incluindo o *HOXB3*, escolhido para validação por ser descrito como relacionado a embriogênese do tecido cerebral, por não se expressar em tecido cerebral normal e já ter sido descrito em ependimomas (PAJTLER et al, 2018; CHACRAVA et, 2014). O gene *HOXB4* foi também analisado nesse presente estudo, já que sua ação está intimamente associada ao *HOXB3*, sendo ambos os genes da família *homeobox*.

Trata-se de uma família de genes amplamente descrita em outros tipos de câncer como leucemia, mama, próstata, ovário, neuroblastoma, pulmão. Tem importante papel na oncogênese como apoptose, motilidade e angiogênese. Expressão aberrante desses genes pode contribuir para ativação desregulada dessas vias, com consequente progressão tumoral (SAHA e SUKUMAR, 2010).

Em relação a esses genes, validados nesse estudo por PCR em tempo real, observou-se uma diferença significativa de expressão ao comparar a sua expressão nos tecidos tumorais primários e nos controles não neoplásicos, onde praticamente não apresentam expressão. Diferença semelhante também foi encontrada por Madhavi e colaboradores (MADHAVI et al., 2014) em ependimoma e tumor teratoide rabdoide atípico, quando comparada ao controle.

Identificou-se ainda importante diferença na expressão desses genes quando se comparou a localização supratentorial com fossa posterior. A expressão é significativamente maior nos tumores localizados na fossa posterior.

Essa diferença foi anteriormente descrita por Pajtler e colaboradores, quando em estudo específico para ependimoma de fossa posterior demonstraram, dentro do subgrupo fossa posterior A (EPN-FPA), a existência de subgrupos menores com diferentes níveis de expressão gênica. Nesse contexto, os genes *HOXB3* e *HOXB4* foram descritos como ativados

na fossa posterior, porém principalmente na região caudal do tronco cerebral de fetos de ratos, como se vê na Figura 21. (PAJTLER et al, 2018).

Figura 19: Genes da família HOX, incluindo o HOXB3 e HOXB4, com expressão aumentada na fossa posterior, principalmente na porção caudal do tronco cerebral de fetos de ratos. Baseada em Pajtler et al, 2018.

Não há na literatura, até onde se tem conhecimento, a associação da expressão do miR-485-5p com os genes da família HOX, apesar dessa associação ser validada *in silico*. Há descrição de associação de outros miRs como o miR-196 e miR-27 com a expressão desses genes, porém em tecidos não neoplásicos (Li et al, 2017; Divouex et al, 2018).

A associação de hipoexpressão deste miR com maior expressão dos genes *HOXB3* e *HOXB4* observada no presente estudo, em análises *in silico* e confirmadas por análise em outros bancos de ependimoma disponíveis sugerem fortemente que esses genes são alvo do miR-485-5p.

Nossos resultados sugerem a possível participação de 4 dos miRNAs avaliados na gênese de ependimomas na infância. Esses dados podem sugerir vias desreguladas nesses tumores que seriam potenciais alvos para terapia. Estudos funcionais em modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como validação em um maior número de casos são necessários para confirmação desses resultados.

8 CONCLUSÃO

Com esse estudo concluímos que o miR-124-a, miR-135a-5p, miR-383 e miR-485-5p apresentam expressão diferente nas amostras de ependimomas, em relação ao tecido não neoplásico, sendo o miR-135-a hiperexpresso e os demais hipoexpressos em relação aos controles.

As características clínicas e biológicas dos tumores analisados são semelhantes às descritas na literatura e não foram observadas associações entre expressão dos miRNAs com características clínicas e biológicas, nem com sobrevida na amostra estudada.

Diversos genes são validados como alvo desses miRs *in silico*, dentre eles os genes *HOXB3* e *HOXB4*. Esses genes, apresentaram uma correlação negativa com o miR 485-5p e mostraram uma expressão significativamente menor nos tumores quando comparados com os controles, especialmente nos localizados na fossa posterior e nos ependimomas graus II.

Estudos em um maior número de casos, bem como estudos funcionais, *in vitro* e *in vivo* são necessários para um melhor conhecimento da relação desses miRs e desses genes com o ependimoma.

9 REFERÊNCIAS

AGER, Bryan J. et al. The value of high-dose radiotherapy in intracranial ependymoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 66, n. 6, p. e27697, 2019.

AHRAM, Mamoun et al. Association of MicroRNAs with the Clinicopathologic Characteristics of Ependymoma. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 3, p. 307-313, 2018.

ANDREIUOLO, Felipe et al. Integrating Tenascin-C protein expression and 1q25 copy number status in pediatric intracranial ependymoma prognostication: A new model for risk stratification. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178351, 2017.

BIRKS, Diane K. et al. Survey of MicroRNA expression in pediatric brain tumors. **Pediatric blood & cancer**, v. 56, n. 2, p. 211-216, 2011.

BOUFFET, Eric et al. Survival benefit for pediatric patients with recurrent ependymoma treated with reirradiation. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 83, n. 5, p. 1541-1548, 2012.

BRAOUDAKI, M. et al. miR-15a and miR-24-1 as putative prognostic microRNA signatures for pediatric pilocytic astrocytomas and ependymomas. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9887-9897, 2016.

BUNIN, Greta R. et al. Maternal diet during pregnancy and its association with medulloblastoma in children: a children's oncology group study (United States). **Cancer Causes & Control**, v. 16, n. 7, p. 877-891, 2005.

BURGER P, SCHEITHAUER B. AFIP atlas of tumor pathology. **American Registry of pathology**, 2007.

CATANIA, Alessia et al. Insight into the role of microRNAs in brain tumors. **International journal of oncology**, v. 40, n. 3, p. 605-624, 2012.

CHAKRAVARTI, Deboki et al. Synthetic biology approaches in cancer immunotherapy, genetic network engineering, and genome editing. **Integrative Biology**, v. 8, n. 4, p. 504-517, 2016.

CHAPMAN, Elisabeth J.; CARRINGTON, James C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 11, p. 884, 2007.

CHEN, Gang et al. MicroRNA-584 directly targets CCND1 and inhibits cell proliferation and invasion in pancreatic cancer. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 1, p. 719-726, 2019.

CHO, William CS. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 8, p. 1273-1281, 2010.

CIAFRE, S. A. et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 4, p. 1351-1358, 2005.

CIPRO, Šimon et al. MicroRNA expression in pediatric intracranial ependymomas and their potential value for tumor grading. **Oncology letters**, v. 17, n. 1, p. 1379-1383, 2019.

CONG, Chunlei et al. Identification of serum miR-124 as a biomarker for diagnosis and prognosis in osteosarcoma. **Cancer biomarkers**, v. 21, n. 2, p. 449-454, 2018.

COSTA, Fabricio F. et al. Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25114, 2011.

CRONIN, Kathleen A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**, v. 124, n. 13, p. 2785-2800, 2018.

DE OLIVEIRA SANTOS, Marceli. Incidência, Mortalidade e Morbidade Hospitalar por Câncer em Crianças, Adolescentes e Adultos Jovens no Brasil: Informações dos Registros de Câncer e do Sistema de Mortalidade. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 3, p. 439-440, 2018.

DIVOUX, Adeline et al. MicroRNA-196 regulates HOX gene expression in human gluteal adipose tissue. **Obesity**, v. 25, n. 8, p. 1375-1383, 2017.

DUFFNER, Patricia K. et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 24, p. 1725-1731, 1993.

EGUÍA-AGUILAR, Pilar et al. Expression of microRNAs in tumors of the central nervous system in pediatric patients in México. **Child's Nervous System**, v. 33, n. 12, p. 2117-2128, 2017.

ELLISON, David W. et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 10, n. 1, p. 7, 2011.

ESQUELA-KERSCHER, Aurora; SLACK, Frank J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 4, p. 259, 2006

FASSETT, Daniel R.; PINGREE, James; KESTLE, John RW. The high incidence of tumor dissemination in myxopapillary ependymoma in pediatric patients: report of five cases and review of the literature. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 102, n. 1, p. 59-64, 2005.

GARVIN JR, James H. et al. Phase II study of pre-irradiation chemotherapy for childhood intracranial ependymoma. Children's Cancer Group protocol 9942: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric blood & cancer**, v. 59, n. 7, p. 1183-1189, 2012.

GHIA, Amol J. et al. Supratentorial gross-totally resected non-anaplastic ependymoma: population based patterns of care and outcomes analysis. **Journal of neuro-oncology**, v. 115, n. 3, p. 513-520, 2013.

HAN, D. L. et al. MiRNA-485-5p, inhibits esophageal cancer cells proliferation and invasion by down-regulating O-linked N-acetylglucosamine transferase. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, n. 7, p. 2809-2816, 2019.

HAN, Yu-Ling et al. Correlations of microRNA-124a and microRNA-30d with clinicopathological features of breast cancer patients with type 2 diabetes mellitus. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 2107, 2016.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v.144, p. 646-674, 2011

HE, Zhanwen et al. Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, p. 557, 2013.

HU, Shanliang et al. Highly expressed microRNA-124 inhibits migration and promotes apoptosis of esophageal cancer cells by degrading PDCD6. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 24, n. 2, p. 805-812, 2019.

JAIN, Amit et al. Subependymoma: clinical features and surgical outcomes. **Neurological research**, v. 34, n. 7, p. 677-684, 2012.

JIANG, Daqiong et al. miR-135 regulated breast cancer proliferation and epithelial-mesenchymal transition acts by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **International journal of molecular medicine**, v. 43, n. 4, p. 1623-1634, 2019

JING, L. L.; MO, X. M. Reduced miR-485-5p expression predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 8, p. 1516-20, 2016.

KOOB, M.; GIRARD, N. Cerebral tumors: specific features in children. **Diagnostic and interventional imaging**, v. 95, n. 10, p. 965-983, 2014.

KULESHOV, Maxim V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W90-W97, 2016.

KUN LE, KOVNAR EH, SANFORD RA. Ependymomas in children. **Pediatric Neuroscience**, v. 14, p. 57-63, 1988

LEE, Rosalind; FEINBAUM, Rhonda; AMBROS, Victor. A short history of a short RNA. **Cell**, v. 116, p. S89-S92, 2004.

LEWIS, Benjamin P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-798, 2003.

LITTLE, Andrew S. et al. The management of completely resected childhood intracranial ependymoma: the argument for observation only. **Child's Nervous System**, v. 25, n. 3, p. 281-284, 2009.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOUIS D, OHGAKI H, WIESTLER O et al. Ependymoma. In: **WHO classification of tumors of the central nervous system**, 2007.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LOURDUSAMY, Anbarasu et al. microRNA network analysis identifies miR-29 cluster as key regulator of LAMA2 in ependymoma. **Acta neuropathologica communications**, v. 3, n. 1, p. 26, 2015.

LU, Huajun et al. Human Mitotic Centromere-Associated Kinesin Is Targeted by MicroRNA 485-5p/181c and Prognosticates Poor Survivability of Breast Cancer. **Journal of oncology**, v. 2019, 2019.

LU, Jian et al. microRNA-124a suppresses PHF19 over-expression, EZH2 hyper-activation, and aberrant cell proliferation in human glioma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 503, n. 3, p. 1610-1617, 2018.

MA, Shun-Chang et al. Clinical Characteristics and Prognostic Factors of Treatment in Pediatric Posterior Cranial Fossa Ependymoma. **Pediatric neurosurgery**, v. 54, n. 2, p. 98-107, 2019.

MARGOLIN-MILLER, Yulia et al. Prognostic relevance of miR-124-3p and its target TP53INP1 in pediatric ependymoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 56, n. 8, p. 639-650, 2017.

MASSIMINO, Maura et al. Final results of the second prospective AIEOP protocol for pediatric intracranial ependymoma. **Neuro-oncology**, v. 18, n. 10, p. 1451-1460, 2016.

MASSIMINO, Maura et al. Second-look surgery for ependymoma: the Italian experience. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 8, n. 3, p. 246-250, 2011.

MCGUIRE, Courtney S.; SAINANI, Kristin L.; FISHER, Paul Graham. Both location and age predict survival in ependymoma: a SEER study. **Pediatric blood & cancer**, v. 52, n. 1, p. 65-69, 2009.

MERCHANT, Thomas E. et al. Conformal Radiation Therapy for Pediatric Ependymoma, Chemotherapy for Incompletely Resected Ependymoma, and Observation for Completely Resected, Supratentorial Ependymoma. 2019.

NEJAT, Farideh; KAZMI, Syed Shuja; ARDAKANI, Shahin Behjati. Congenital brain tumors in a series of seven patients. **Pediatric neurosurgery**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2008.

OSTROM, Quinn T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-oncology**, v. 19, n. suppl_5, p. v1-v88, 2017.

PAJTILER, Kristian W. et al. Molecular classification of ependymal tumors across all CNS compartments, histopathological grades, and age groups. **Cancer cell**, v. 27, n. 5, p. 728-743, 2015.

PAJTILER, Kristian W. et al. Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. **Acta neuropathologica**, v. 136, n. 2, p. 211-226, 2018.

PALANICHAMY, Kamalakannan et al. Lack of constitutively active DNA repair sensitizes glioblastomas to Akt inhibition and induces synthetic lethality with radiation treatment in a p53-dependent manner. **Mol Cancer Ther**, 2018

PATEL, Vanisha; MCNINCH, Neil L.; RUSH, Sarah. Diagnostic delay and morbidity of central nervous system tumors in children and young adults: a pediatric hospital experience. **Journal of neuro-oncology**, p. 1-8, 2019.

PIERSON, Jessica et al. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008.

QI, Lingyu et al. MicroRNAs associated with lung squamous cell carcinoma: New prognostic biomarkers and therapeutic targets. **Journal of cellular biochemistry**, 2019.

QI, M. M. et al. MiR-124 changes the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin through targeting STAT3. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, n. 12, p. 5242-5250, 2019.

QIN, Zhen; LIU, Xia. miR-124, a potential therapeutic target in colorectal cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 749, 2019.

RAGHUNATHAN, Aditya et al. Histological predictors of outcome in ependymoma are dependent on anatomic site within the central nervous system. **Brain pathology**, v. 23, n. 5, p. 584-594, 2013.

RAMASWAMY, Vijay; TAYLOR, Michael D. Treatment implications of posterior fossa ependymoma subgroups. **Chinese journal of cancer**, v. 35, n. 1, p. 93, 2016.

RANGER, Adrianna M. et al. Familial syndromes associated with intracranial tumours: a review. **Child's Nervous System**, v. 30, n. 1, p. 47-64, 2014

ROGERS, Hazel Anne et al. Limitations of current in vitro models for testing the clinical potential of epigenetic inhibitors for treatment of pediatric ependymoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 92, p. 36530, 2018.

ROUSSEL, Martine F.; STRIPAY, Jennifer L. Epigenetic drivers in pediatric medulloblastoma. **The Cerebellum**, v. 17, n. 1, p. 28-36, 2018.

SANTI, M; GILBERTSON, R; PARSONS, D; POLLACK, I. Gliomas, ependymomas and

SASAYAMA, Takashi et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1407-1413, 2009.

SHU, C. et al. Prognostic and microRNA profile analysis for CD44 positive expression pediatric posterior fossa ependymoma. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 11, p. 1439-1447, 2018.

SNIDER, C. A. et al. Impact of radiation therapy and extent of resection for ependymoma in young children: A population-based study. **Pediatric blood & cancer**, v. 65, n. 3, p. e26880, 2018.

SPREHE, Michael R. et al. Comparison of birth weight corrected for gestational age and birth weight alone in prediction of development of childhood leukemia and central nervous system tumors. **Pediatric blood & cancer**, v. 54, n. 2, p. 242-249, 2010.

STICHT, Carsten et al. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0206239, 2018.

STOCCO, Chiara et al. Presentation and symptom interval in children with central nervous system tumors. A single-center experience. **Child's Nervous System**, v. 33, n. 12, p. 2109-2116, 2017.

TABORI, Uri et al. Human telomere reverse transcriptase expression predicts progression and survival in pediatric intracranial ependymoma. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 10, p. 1522-1528, 2006.

TAIPALEENMÄKI, Hanna et al. Targeting of Runx2 by miR-135 and miR-203 impairs progression of breast cancer and metastatic bone disease. **Cancer research**, v. 75, n. 7, p. 1433-1444, 2015.

TAMBURRINI, G. et al. Survival following treatment for intracranial ependymoma: a review. **Child's Nervous System**, v. 25, n. 10, p. 1303-1312, 2009.

TANTAWY, Marwa et al. Identification of microRNA signature in different pediatric brain tumors. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 27-34, 2018.

TIHAN, Tarik et al. The prognostic value of histological grading of posterior fossa ependymomas in children: a Children's Oncology Group study and a review of prognostic factors. **Modern pathology**, v. 21, n. 2, p. 165, 2008.

VITANZA, Nicholas A.; PARTAP, Sonia. Pediatric ependymoma. **Journal of child neurology**, v. 31, n. 12, p. 1354-1366, 2016.

WANG, Zhi-Qiang et al. Low serum level of miR-485-3p predicts poor survival in patients with glioblastoma. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184969, 2017.

WEI, Chen et al. MicroRNA-124 regulates TRAF6 expression and functions as an independent prognostic factor in colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 18, n. 1, p. 856-863, 2019.

WILNE, Sophie et al. Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. **The lancet oncology**, v. 8, n. 8, p. 685-695, 2007.

YAU, Y; MACK, S; TAYLOR, M. Molecular genetics of ependymoma. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30 (10), p. 669-681, 2011

YI, Rui et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & development**, v. 17, n. 24, p. 3011-3016, 2003.

ZAKRZEWSKA, Magdalena et al. Altered microRNA expression is associated with tumor grade, molecular background and outcome in childhood infratentorial ependymoma. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158464, 2016.

ZHANG, Yanming et al. Prognostic Significance of MicroRNAs in Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

10 ANEXOS

Anexo 1: Genes validados para o microRNA 135-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.

miR 135a - 5p				
<i>CEP135</i>	<i>HTR1A</i>	<i>TRIM4</i>	<i>NHS</i>	<i>SCYL3</i>
<i>PIAS4</i>	<i>CCDC85C</i>	<i>IL17RA</i>	<i>KIAA1143</i>	<i>SMAD5</i>
<i>ROCK1</i>	<i>ZNF846</i>	<i>HEYL</i>	<i>NR3C2</i>	<i>GAGE1</i>
<i>ZNF107</i>	<i>APOA1</i>	<i>GPX8</i>	<i>ZNF805</i>	<i>SKIL</i>
<i>PCP4L1</i>	<i>BIRC5</i>	<i>SNED1</i>	<i>NUFIP2</i>	<i>ST8SIA4</i>
<i>MYC</i>	<i>RAB3GAP2</i>	<i>GNL1</i>	<i>IRS2</i>	<i>BMPR2</i>
<i>CENPN</i>	<i>SLC6A4</i>	<i>SLC39A6</i>	<i>SLC19A3</i>	<i>HMGB2</i>
<i>VLDLR</i>	<i>AMOTL2</i>	<i>PEX2</i>	<i>SIAH1</i>	<i>KIF6</i>
<i>APC</i>	<i>GATA6</i>	<i>TRIM66</i>	<i>MPL</i>	<i>MBNL1</i>
<i>ZNF468</i>	<i>CDR1</i>	<i>DPP8</i>	<i>COX6B1</i>	<i>TNPO2</i>
<i>TOX4</i>	<i>MARCKS</i>	<i>ARC</i>	<i>HOXA10</i>	<i>STAT6</i>
<i>TXNIP</i>	<i>LRRC15</i>	<i>KIAA1958</i>	<i>NSA2</i>	<i>CAPZA2</i>
<i>LAX1</i>	<i>BCL2</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIP5K1A</i>	<i>TTLL7</i>
	<i>PCTP</i>	<i>MTSS1</i>	<i>TSC22D2</i>	

Anexo 2: Genes validados para o microRNA 135-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.

miR 383-5p				
<i>HEBP2</i>	<i>NRF1</i>	<i>ZIC5</i>	<i>ALDH1B1</i>	<i>WDR5B</i>
<i>SRSF2</i>	<i>WBP2</i>	<i>SYNRG</i>	<i>ZFP37</i>	<i>RPL41</i>
<i>GATA6</i>	<i>APOL2</i>	<i>TSN</i>	<i>SLC22A23</i>	<i>WAC</i>
<i>AHR</i>	<i>UBN2</i>	<i>PLA2G4D</i>	<i>MOB4</i>	<i>CTDSPL2</i>
<i>YOD1</i>	<i>DYRK2</i>	<i>CLUAP1</i>	<i>SH3TC2</i>	<i>SLC35E2</i>
<i>PEAR1</i>	<i>C5orf22</i>	<i>VCP</i>	<i>UNC119B</i>	<i>DDX21</i>
<i>KLHL15</i>	<i>RBM27</i>	<i>CAPN6</i>	<i>PRDX3</i>	<i>TMEM30A</i>
<i>ZMYM2</i>	<i>GRAP2</i>	<i>KCNJ12</i>	<i>GLUL</i>	<i>GOSR1</i>
<i>LDHA</i>	<i>ADSS</i>	<i>MSH6</i>	<i>CENPN</i>	<i>CREBRF</i>
<i>TRPM7</i>	<i>SLC11A2</i>	<i>ZNF699</i>	<i>MICA</i>	<i>ZBTB21</i>
<i>VEGFA</i>	<i>PLCG2</i>	<i>TRIM71</i>	<i>RIMBP3C</i>	<i>ATG10</i>
<i>IER2</i>	<i>CLIC4</i>	<i>TRAF5</i>	<i>IGF1R</i>	<i>RAD21</i>
<i>FNBP1L</i>	<i>SGK494</i>	<i>DDIT4</i>	<i>C5orf45</i>	<i>GDPD5</i>
<i>ZNF460</i>	<i>SMC2</i>	<i>TMEM59</i>	<i>TAF13</i>	<i>RHD</i>
<i>IRF1</i>	<i>PCDH11Y</i>	<i>GTPBP3</i>	<i>NPAT</i>	<i>SUCO</i>
<i>TMEM199</i>	<i>DIO1</i>	<i>ANKRD44</i>	<i>CLIC6</i>	<i>PCNXL2</i>
<i>TWF1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>GAS1</i>	<i>GGA2</i>	<i>PCDH11X</i>
<i>CCND1</i>	<i>KIAA1009</i>	<i>TMOD3</i>	<i>PPP1R10</i>	<i>GABARAPL1</i>
	<i>SFPQ</i>	<i>HSPE1-</i> <i>MOB4</i>	<i>CRTC3</i>	

Anexo 3: Genes validados para o microRNA 485-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.

mir-124-a								
AATF	CCDC121	DNAH5	GAR1	KIF7		RCAN1	STX18	ZBED3
ABCC3	CCDC3	DNAJC1	GBP1	KLHL28	NTMT1	RFX1	STX2	ZDHHHC14
ABCF2	CCDC86	DNM2	GFPT2	KLHL42	NUFIP2	RFX2	SULF1	ZFP36L1
ACSL5	CCL2	DNM3	GK5	KRI1	NUP50	RHBDL2	SYCP1	ZFP36L2
ACTB	CCNA1	DPF2	GNB4	L1CAM	OAF	RIBC2	SYNC	ZFP69B
ACTR5	CCND2	DPH5	GOLT1B	LAMA1	OCA2	RILPL2	SYNE1	ZMPSTE24
ADAM15	CD2AP	DRD4	GPALPP1	LAS1L	OGFOD2	RIN1	TADA2B	ZNF395
ADAMTS1	CDADC1	DRG2	GPATCH8	LCA5L	PACSIN3	RNF141	TARBP1	ZNF420
ADARB1	CDC27	DSCAML1	GPX4	LCLAT1	PAK3	ROCK1	TBX2	ZNF440
ADCY3	CDH11	DSG2	GRAMD3	LDLR	PALLD	RRAS2	TBX22	ZNF451
ADCY6	CDH2	DYNC2H1	GRIA1	LDLRAD4	PANK2	RRP15	TBXA2R	ZNF655
AFAP1L1	CEBPA	DZIP1	GRIA2	LHX2	PAPSS2	RUFY3	TLN1	ZNF678
AHNAK2	CERS2	ECE1	GRM1	LIMCH1	PBX1	SCAMP2	TMED1	ZXDB
AHRR	CHST14	EFNB1	GRSF1	LIN7A	PDAP1	SCAMP4	TMED5	
AIF1L	CHST6	EIF2AK2	GSN	LMNA	PDLIM7	SCN3A	TMED9	
AKT3	CHSY3	EIF3B	GSTK1	LPCAT3	PDPR	SEC11A	TMEFF2	
ALDH9A1	CKAP4	EIF3M	GTF3C5	LRRC2	PEA15	SEN8	TMEM181	
ALG14	CLDND1	EML1	GUK1	LRRC40	PHF21B	SEPT9	TMEM248	
ANAPC5	CLTA	EMP1	H6PD	LRRC42	PHF7	SERP1	TMEM5	
ANPEP	CMTM3	ENAH	HADH	LRRFIP2	PIK3CA	SERPINB6	TMTC2	
ANXA11	CMTM4	EPHA2	HCN2	MALSU1	PLEKHA7	SERTAD4	TNFRSF12A	
AR	CNN3	ERBB2	HEATR5A	MAN2B2	PLOD3	SGMS1	TNPO1	
ARFIP1	CNP	ERCC5	HIPK3	MANBAL	PNPLA2	SGPL1	TOPBP1	
ARHGAP28	COL12A1	ERF	HKDC1	MAPK11	POGLUT1	SGSM3	TP63	
ARHGEF26	COL1A1	EVI5	HN1L	MAPK14	POLR2J	SIRT1	TRIM29	
ARMC1	COL8A2	EYA4	HOXA3	MAPKAPK2	PPP1R13L	SKIL	TRIM37	
ARPP21	COLGALT1	F11R	HS1BP3	MAPKAPK3	PPP2R1B	SLC16A1	TRIM38	
ATOH8	CORO2A	F3	HSD17B6	MESDC2	PRKAG1	SLC35A2	TRIM7	
AVEN	CSGALNACT1	FAM105A	HSPB7	MFSD12	PRKCB	SLC35G1	TRIP11	
BABAM1	CSPG4	FAM120A	HTATIP2	MICAL2	PRR14L	SLC38A2	TRIP12	
BARX1	CTDSP2	FAM122B	IFNAR2	MIEF1	PTBP3	SLC38A5	TRPV3	
BCL6B	CTGF	FAM134B	IGFBP1	MINA	PTPN11	SLC39A11	TSC22D4	

<i>BDNF</i>	<i>CTNS</i>	<i>FAM171B</i>	<i>IKBKE</i>	<i>MKX</i>	<i>PTPN12</i>	<i>SLC39A3</i>	<i>TSEN54</i>
<i>BEX1</i>	<i>CUX2</i>	<i>FAM206A</i>	<i>IL18R1</i>	<i>MLEC</i>	<i>PTPN14</i>	<i>SLC44A1</i>	<i>TSKU</i>
<i>BLOC1S6</i>	<i>CXXC1</i>	<i>FAM76A</i>	<i>IL27RA</i>	<i>MOBP</i>	<i>PTPRB</i>	<i>SLC7A1</i>	<i>TSPAN6</i>
<i>BRWD1</i>	<i>CYBRD1</i>	<i>FARP1</i>	<i>IL6</i>	<i>MPHOSPH10</i>	<i>PTRF</i>	<i>SLC9A9</i>	<i>TTC7A</i>
<i>BVES</i>	<i>CYP2U1</i>	<i>FAXDC2</i>	<i>IL6R</i>	<i>MPHOSPH9</i>	<i>PTTG1IP</i>	<i>SLITRK4</i>	<i>TTC8</i>
<i>C1orf198</i>	<i>DACT1</i>	<i>FBXO28</i>	<i>INA</i>	<i>MRPS11</i>	<i>PXN</i>	<i>SNRPF</i>	<i>TUBB6</i>
<i>C3orf58</i>	<i>DAPK1</i>	<i>FGF5</i>	<i>INO80C</i>	<i>MSRA</i>	<i>QRFPR</i>	<i>SNTB2</i>	<i>TUBE1</i>
<i>C6orf89</i>	<i>DBT</i>	<i>FHDC1</i>	<i>INO80D</i>	<i>MTMR6</i>	<i>QSOX1</i>	<i>SNX16</i>	<i>TYK2</i>
<i>CABLES1</i>	<i>DCC</i>	<i>FLI1</i>	<i>IPCEF1</i>	<i>MYH7B</i>	<i>RAB2A</i>	<i>SNX7</i>	<i>UMPS</i>
<i>CABP1</i>	<i>DCTD</i>	<i>FLOT1</i>	<i>IQCK</i>	<i>NDE1</i>	<i>RAB3GAP1</i>	<i>SOS1</i>	<i>USP47</i>
<i>CABP7</i>	<i>DCUN1D5</i>	<i>FMNL2</i>	<i>ITGA3</i>	<i>NECAP2</i>	<i>RAB8A</i>	<i>SOS2</i>	<i>VAMP3</i>
<i>CACUL1</i>	<i>DDX3Y</i>	<i>FMOD</i>	<i>JAG2</i>	<i>NEK6</i>	<i>RANBP10</i>	<i>SOX9</i>	<i>VANGL1</i>
<i>CAMTA1</i>	<i>DDX52</i>	<i>FNDC3B</i>	<i>KANK1</i>	<i>NFIB</i>	<i>RARG</i>	<i>SPIN1</i>	<i>VIM</i>
<i>CAST</i>	<i>DFFB</i>	<i>FOXF2</i>	<i>KAT2A</i>	<i>NLRX1</i>	<i>RASIP1</i>	<i>SPOCD1</i>	<i>WRAP53</i>
<i>CBX2</i>	<i>DHCR24</i>	<i>FPGS</i>	<i>KCNC4</i>	<i>NR3C1</i>	<i>RASSF1</i>	<i>SS18L2</i>	<i>WTAP</i>
<i>CC2D2A</i>	<i>DHRS1</i>	<i>FSTL1</i>	<i>KCNK2</i>	<i>NR4A3</i>	<i>RAVER1</i>	<i>SSNA1</i>	<i>XBP1</i>
<i>CCAR2</i>	<i>DIEXF</i>	<i>G3BP2</i>	<i>KIAA0930</i>	<i>NRF1</i>	<i>RAVER2</i>	<i>STK36</i>	<i>YBX3</i>

Anexo 4: Genes validados para o microRNA 485-5p. Fontes: ferramenta mirWalk 2.0 e banco de dados GSE21687.

miR-485-5p			
AAED1	DNAJC28	MRE11A	SLIT1
ABHD17B	DYNC1H1	MRPS16	SPAST
AKNA	ELMSAN1	MUC20	SRD5A1
AP1S3	ENTPD5	NEK9	SSH3
APTX	EXOSC6	OGFRL1	SYNJ2
ARHGDIA	FAM118A	PACS2	SYT15
ARHGEF3	FBXW2	PAQR7	TMBIM6
ARL10	GALNT2	PCSK1	TMCO1
C11orf84	GLUL	PDE12	TMEM145
C1orf174	GRSF1	PDP2	TMEM19
C5orf45	GSTCD	PER2	TMEM216
CASC4	HIF3A	PGPEP1	TRAF1
CC2D1A	HOXB3	PLEKHA6	TSPAN15
CDC73	IKZF3	PLEKHB2	ULBP3
CDK19	IRGQ	PSD4	UQCR11
CHMP1B	ITCH	PSMC4	UQCRQ
CPE	KIAA0408	RAD23B	USP34
CRIP1	KIAA1191	RIMS4	WDR73
CRKL	KIF5C	SCARF1	WSB1
CSNK2A1	KIF6	SIKE1	ZNF33A
DENR	KLHDC8A	SLC19A3	ZNF566
DFFB	LPCAT1	SLC27A1	ZNF581
DHODH	LPIN1	SLC2A5	ZNF583
DNAH9	MAK	SLC35D2	ZNF589
MPPE1	MLEC	SLC35E3	ZNF623
		ZNF641	ZNF638

Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

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

Nome do paciente:

Nome do responsável:

Assinatura

Data: ____/____/____

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

Assinatura

Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Grupo com neoplasia**

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

Pesquisadora Responsável: Carlos Alberto Scrideli

Informações e Esclarecimentos

Prezado paciente e responsável,

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

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

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

Qual o objetivo deste estudo?

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

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

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

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

Como será o estudo?

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

Preciso participar?

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

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

O que devo fazer?

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

Quais são os possíveis benefícios?

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

A informação obtida será confidencial?

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

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

E se eu tiver dúvidas?

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

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