Carolina de Seixas Couto Leite

Envolvimento da proteína SAM68 na
regulação da proliferação celular em tumores
de sistema nervoso central

SAM68 involvement in the regulation of
proliferation and cellular death in tumors of
the central nervous system

São Paulo

2018

Carolina de Seixas Couto Leite

Envolvimento da proteína SAM68 na
regulação da proliferação celular em tumores
de sistema nervoso central

SAM68 involvement in the regulation of
proliferation and cellular death in tumors of
the central nervous system

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Biologia, na Área de
Genética.

Orientador: Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Leite, Carolina

Envolvimento da proteína SAM68 na
regulação da proliferação celular em
tumores de sistema nervoso central

53

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Meduloblastoma 2. Proliferação
3. Câncer I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

Agradecimentos

À minha família e amigos pela paciência.

Ao meu orientador por toda a ajuda.

À Marcia Cristina Teixeira dos Santos por todas as vivências e
lições para a vida.

Índice

Introdução	6
Epidemiologia do câncer	6
Abordagem molecular do câncer	7
Meduloblastoma	15
SAM68	17
Modificações pós-traducionais	18
Funções	18
Atuação de SAM68 no câncer	20
Objetivos	22
Materiais e Métodos	23
Cultura celular	23
Silenciamento transiente de SAM68	23
Síntese de cDNA e Real-Time PCR	24
Western blot	24
Apoptose	24
Imunocitoquímica	25
Índice mitótico	25
Incorporação de EdU	25
Análise in silico	26
Análises estatísticas	26
Resultados	27
Silenciamento transiente da SAM68	27
Análise de expressão de SAM68	28
Índice Mitótico	29
Incorporação de EdU	30
Apoptose	31
Imunocitoquímica	32
Análise de expressão transcricional em bancos de dados	33
Identificação de possíveis alvos da SAM68	35
Análise da expressão de SAM68 ao longo da diferenciação neuronal	36
Discussão	38
Conclusões	43
Resumo	44
<i>Abstract</i>	45
Referências Bibliográficas	46
Biografia	53

Introdução

Epidemiologia do câncer

Cânceres são a segunda maior causa de morte no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), contabilizando 21% da mortalidade global dentre as doenças comunicáveis e perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, que compõem 48% das mortes mundiais. Apesar de não ser a primeira maior causa de morte, cânceres são doenças muito mais heterogêneas que outras doenças, tendo, portanto, uma resposta mais variável dos pacientes aos tratamentos. Além disso, a mortalidade por câncer é alta em diversos países do mundo, incluindo Canadá, Estados Unidos, Rússia, China e Brasil (FERLAY *et al.*, 2012).

Em relação à incidência, há variação ao longo dos últimos anos, dependendo do tipo de câncer. De acordo com o *Journal of the American Association* (JAMA, 2013), houve uma diminuição da incidência de cânceres de pulmão, estômago, cervical e de cavidade oral, enquanto houve um aumento da incidência de cânceres de próstata, mama, reto e sistema nervoso central, quando comparada a incidência em 1990 e 2013. Esse cenário evidencia a diminuição da incidência de tipos de cânceres que possuem desenvolvimento fortemente ligado a fatores ambientais. Isso revela uma possível eficácia das campanhas de prevenção, como por exemplo, campanhas anti-tabagismo, que está relacionada com o desenvolvimento de câncer de pulmão. Já o aumento da incidência de outros tipos de câncer, que não possuem desenvolvimento muito relacionado a fatores ambientais, pode-se dever a um aumento na sensibilidade dos exames, como ocorre, por exemplo,

para câncer de mama. Outro possível fator que justifica o aumento da incidência desses cânceres é um aumento da expectativa de vida, já que vários tipos de câncer são desenvolvidos em indivíduos mais velhos. Além disso, alguns tipos de cânceres possuem hábitos de vida que vêm se intensificando ao longo dos anos, como o consumo excessivo de determinados tipos de alimentos altamente industrializados, relacionados ao seu desenvolvimento.

Abordagem molecular do câncer

Atualmente, dez características estão relacionadas ao desenvolvimento molecular do câncer, sendo oito delas essenciais e duas facilitadoras (HANAHA & WEINBERG, 2011). Não há uma ordem específica para o desenvolvimento dessas características, sendo a ocorrência delas variável não só para cada tipo de câncer, mas para cada paciente, em relação ao mesmo tipo de câncer.

Apesar do desenvolvimento do câncer ocorrer de maneira clonal, o acúmulo de mutações é variável, pois algumas células filhas podem adquirir mutações que não estão presentes em outras (AL-LAZIKANI *et al.*, 2012). Isso torna a massa tumoral heterogênea e, quanto mais mutações e características diferentes as células tumorais possuem, mais difícil será encontrar um tratamento para erradicar todo o tumor.

A presença de instabilidade genômica e de mutações é uma das características facilitadoras para o desenvolvimento do câncer. Essa instabilidade, que pode ser gerada tanto por mutações quanto por alterações epigenéticas, podem levar a uma retroalimentação positiva, na qual quanto mais instabilidade existir em uma célula viável, mais instabilidade vai ser gerada e isso pode levar ao desenvolvimento do câncer (HOFF, 2013).

Alterações genéticas e epigenéticas podem ser causadas por agentes carcinogênicos, que podem ser endógenos, como erros de replicação e presença de espécies reativas de oxigênio, ou exógenos, como raios-X e luz ultravioleta. Em células normais, essas alterações devem ser percebidas nos pontos de checagem celular. Isso levará à inibição da proliferação e poderão ser seguidos dois caminhos: reparo das alterações, levando à integridade genômica, ou apoptose, se não houver um reparo que permita a viabilidade celular. Porém, se houver falha no ponto de checagem celular, na inibição da proliferação, no reparo das alterações ou na ativação da apoptose, isso pode levar a um acúmulo de alterações que promovem a instabilidade genômica. Essa instabilidade, por sua vez, pode levar à ativação de oncogenes e à inativação de supressores tumorais, culminando no desenvolvimento do câncer.

Proto-oncogenes existem naturalmente no genoma humano e, se ativados, se tornam oncogenes. Eles normalmente estão envolvidos com o controle positivo da proliferação celular e basta a superexpressão de uma das cópias para manifestação do fenótipo, o que é conhecido como efeito dominante.

Há três principais formas pelas quais um proto-oncogene pode ser tornar um oncogene. Uma delas é por meio da inserção de um novo promotor ativo em frente ao proto-oncogene, o que leva a uma estimulação excessiva da produção da proteína relacionada a esse gene. Também pode ocorrer a amplificação gênica, na qual há múltiplas cópias de um determinado gene e isso faz com que tenha uma produção excessiva de proteínas relacionadas a esse gene. Outra forma é por meio da ocorrência de uma mutação de ponto no proto-oncogene, fazendo com

que haja síntese de uma proteína constitutivamente ativa ou que seja resistente à degradação (CANTLEY *et al.*, 1991).

Os supressores tumorais também existem naturalmente no genoma humano e normalmente estão envolvidos com o controle negativo da proliferação celular, por meio do bloqueio da progressão no ciclo celular. Eles normalmente estão inativos ou pouco funcionais em células de câncer, devendo ocorrer alterações em ambas as cópias para manifestação do fenótipo, o que é comumente chamado de efeito recessivo. Os principais modos de ocorrer inativação dos supressores tumorais são por meio de mutações no gene ou metilação do promotor (WEINBERG, 1991).

Há duas principais categorias em que os supressores tumorais são subdivididos. Eles podem ser supressores tumorais de manutenção (*caretakers*), normalmente envolvidos com reparo de DNA, ou podem ser supressores tumorais controladores (*gatekeepers*), geralmente envolvidos com apoptose ou diminuição da taxa de transcrição. Exemplos de supressores tumorais, que são normalmente encontrados pouco expressos em células de câncer podem ser citados, como p53, PTEN, Rb1 e Nf1 (LEVINE *et al.*, 1991; MACLEOD, 2000).

Outra característica que facilita o desenvolvimento tumoral é a inflamação promovida pelo tumor, que normalmente ocorre nos estágios iniciais do câncer. Com a inflamação, há liberação de fatores favoráveis ao tumor, permitindo a aquisição de capacidades funcionais de sobrevivência, proliferação e disseminação das células (COLOTTA *et al.*, 2009).

As espécies reativas de oxigênio geradas podem levar ao surgimento de mutações, aumentando a instabilidade genômica. A renovação celular promovida pela inflamação faz com que haja um

aumento na proliferação, característica favorável ao tumor. Além disso, o processo de diapedese que ocorre durante a inflamação possibilita a migração das células imunes entre os tecidos, modifica a matriz extracelular e favorece não apenas a migração das células imunes, mas também das células tumorais.

Uma das características essenciais para o desenvolvimento tumoral, o potencial replicativo ilimitado depende primordialmente da manutenção do alongamento telomérico. Na maioria das células adultas normais, há encurtamento dos telômeros ao longo de cada replicação celular, devido a um problema no final da replicação causado pela DNA-polimerase. Esta enzima não consegue replicar completamente os telômeros durante a fase S do ciclo celular, restando sempre um fragmento não replicado ao final da mitose (LINGNER *et al.*, 1995). Há um limite para este encurtamento e, quando o limite é atingido, há indução da ativação de vias de resposta a danos no DNA (DI FAGAGNA *et al.*, 2003).

Há algumas mutações que fazem com que as células não ativem as vias de reparo mesmo com o encurtamento do telômero (JIANG *et al.*, 2007). Porém também existem maneiras que as células de câncer utilizam para estender os telômeros. Há dois principais modos descritos pelas quais as células garantem a extensão dos telômeros ao longo das divisões celulares: a reativação da telomerase e o alongamento telomérico alternativo (ARAGONA *et al.*, 2000). A telomerase possui um componente de RNA, que serve como molde para a síntese da sequência telomérica repetitiva, e uma transcriptase reversa, que é a subunidade catalítica da enzima. Já o alongamento telomérico alternativo ocorre de modo ainda não totalmente conhecido, por mecanismos que

envolvem complexos enzimáticos, com replicação aliada a recombinação homóloga do DNA (HENSON *et al.*, 2002).

Mais uma característica essencial para o desenvolvimento do tumor é a sustentação do sinal proliferativo, que em células normais é um processo muito bem regulado. Há estímulo para proliferação apenas quando necessário e esse sinal é cessado logo após a proliferação necessária ter sido concluída.

Já em células de câncer, há três principais modos pelos quais se dá a sustentação da proliferação, sem cessar o sinal. Um deles é a estimulação autócrina, por meio da qual a célula tumoral produz seu próprio fator de crescimento, que atuará sobre ela. Outro modo é a estimulação tumoral do microambiente, na qual as células de câncer induzem a produção de fatores de crescimento pelas células do microambiente que as cerca, mantendo assim uma estimulação constante para a proliferação. Um terceiro modo é a existência de uma hiper-responsividade de algumas células tumorais a fatores de crescimento, que se dá por uma expressão exacerbada de receptores de fatores de crescimento, fazendo com que ela seja ainda mais estimulada a se proliferar.

Além de sustentar o sinal proliferativo, é essencial que as células tumorais evadam supressores de crescimento. Os supressores de crescimento normalmente bloqueiam a proliferação, induzindo a célula a um estado G0 ou pós-mitótico. Em células de câncer os genes que produzem supressores de crescimento estão normalmente mutados, evitando com isso que haja um bloqueio da proliferação celular (SHERR, 2004).

Outra necessidade essencial das células de câncer é evitar a morte celular programada. Em células normais a apoptose é iniciada após

estímulos desencadeados por estresse celular, como danos no DNA. Esses estímulos podem ativar duas vias distintas, a intrínseca e a extrínseca. Em geral a via intrínseca é ativada por estresse intracelular via mitocôndria e a via extrínseca por sinais externos à célula, como o fator de necrose tumoral, uma citocina liberada durante a resposta imune (GHOBRIAL *et al.*, 2005). As células de câncer resistem a apoptose por mutações em diversos genes das vias indutoras de apoptose, inativando indutores de apoptose e superexpressando reguladores antiapoptóticos.

As células de câncer também precisam evadir o sistema imune, outra característica essencial para o desenvolvimento tumoral. As células do sistema imune inato são a primeira linha de defesa do organismo e, juntamente com as células do sistema imune adaptativo, tentam regular a homeostase do organismo eliminando células estranhas ou danificadas (DE VISSER *et al.*, 2006).

Por sua vez, as células tumorais encontram meios de evadir o sistema imune, processo que foi subdividido em três etapas. Inicialmente há a fase de eliminação, na qual as células do sistema imune tentam destruir todas as células de câncer presentes no organismo. Porém, nem todas são eliminadas, por possuírem mecanismos de evasão. Essas células que escaparam da eliminação entram na fase de equilíbrio, na qual o sistema imune busca apenas controlar o crescimento das células tumorais restantes. Se algumas células ainda não responderem ao controle do sistema imune, há progressão para a fase de escape, em que as células do sistema imune não consegue mais agir de modo a eliminar e controlar o crescimento das células tumorais restantes, que continuam a crescer e se proliferar (FINN, 2012).

As células precisam de oxigênio e nutrientes para sobreviver, portanto, outra característica essencial para o desenvolvimento tumoral,

principalmente quando já está formada uma grande massa de células, é a promoção angiogênese. Por meio da indução do crescimento vascular a massa tumoral consegue atingir grandes dimensões. Indutores de angiogênese, como o VEGF, são produzidos pelas células, promovendo a vascularização que as abastecerá com oxigênio e nutrientes, facilitando assim o crescimento tumoral (CARMELIET & JAIN, 2000).

Mais uma das características essenciais para o desenvolvimento do tumor é a reprogramação do metabolismo energético. Por meio dessa alteração de vias bioquímicas de obtenção de energia, as células se tornam capazes de produzir ATP mais rapidamente e alterar o microambiente tumoral de modo a promover a manutenção do estado tumorigênico.

Em presença de oxigênio, as células normais produzem a maior parte do seu ATP no ciclo de Krebs, por meio da glicólise aeróbia. Em ausência de oxigênio, essas mesmas células sintetizam ATP por meio da glicólise anaeróbia, excretando lactato (KAELIN JR & THOMPSON, 2010). Já nas células de câncer, ambas as vias são utilizadas, mas a anaeróbia é mais frequente, mesmo em presença de oxigênio no meio em que essas células se encontram. Este fenômeno é conhecido com o *Warburg Effect* (GARBER, 2004), no qual há produção de lactato mesmo em presença de oxigênio. Este mecanismo é favorável para as células tumorais, uma vez que a excreção de lactato diminui o pH do microambiente e isto faz com que haja um aumento da atividade de proteases, facilitando a degradação da matriz extracelular e favorecendo invasão e metástase. Além disso, um aumento na utilização de glicose aumenta a geração de glicose-6-fosfato, produto intermediário da glicólise, que pode ser convertido em ácidos graxos pela via das pentoses e com isso também aumentar a produção de ácidos nucleicos. Outro

metabolismo muito utilizado pelas células de câncer é a glutaminólise, na qual há, em última instância, conversão de glutamina em lipídeos. O aumento da produção de ácidos nucleicos e lipídeos por meio dos mecanismos citados favorecem o crescimento e proliferação das células tumorais (JÓZWIAC *et al.*, 2015)

Assim como as demais características citadas acima, esta também é uma característica essencial para o desenvolvimento tumoral. Por meio da invasão tecidual e metástase torna-se possível a colonização de outros locais do corpo pelas células tumorais, para além do sítio de origem. Isso ocorre por meio do extravasamento das células tumorais para tecidos adjacentes, circulação pela corrente sanguínea e infiltração nos tecidos de locais distantes.

Para a ocorrência de metástase é necessário que haja invasão tecidual, transição epitélio-mesenquimal (EMT) e transição mesenquimal-epitelial (MET). Este é um processo que geralmente ocorre tardiamente no câncer, pois há várias outras características que precisam ser adquiridas para ser possível a ocorrência deste processo, como não ser morta pelo sistema imune, se manter viva autonomamente e conseguir se proliferar. A EMT ocorre por meio da reprogramação celular que leva à perda de características epiteliais, como formato, adesão, junções intercelulares e polaridade e aquisição de características mesenquimais, como motilidade. Desse modo, a célula pode sair do epitélio, migrar pelas camadas mais profundas e atingir a corrente sanguínea. Uma vez no sistema circulatório, há evidências de associação com plaquetas, o que diminui o reconhecimento dessa célula pelo sistema imune. Quando há colonização de um novo local, ocorre então a reprogramação reversa, conhecida como MET, na qual a célula irá perder as características mesenquimais e adquirir novamente as características

epiteliais. Por meio das outras modificações já sofridas durante a tumorigênese, essa célula pode então se proliferar neste novo local e dar origem a uma nova massa tumoral (BRABLETZ, 2012).

Meduloblastoma

Todas essas características moleculares dos cânceres anteriormente descritas são fundamentais para as três principais fases de qualquer câncer: iniciação, promoção e progressão. Isso também ocorre em cânceres de sistema nervoso central, o tipo de tumor sólido mais incidente em crianças de 0-19 anos (NCI, 2009). Os cânceres de sistema nervoso central são divididos em algumas categorias principais (WHO, 2014): tumores astrocíticos e oligodendrogliais, tumores da região pineal, tumores neuronais, tumores ependimários, tumores do plexo coróide, meningiomas, linfomas, tumores mesenquimais e tumores embrionários. Meduloblastomas estão dentro desta última categoria, sendo o tipo mais incidente em crianças de 0-14 anos dentro dela (CBTRUS, 2012).

Células progenitoras comuns dão origem aos progenitores neuronais e aos progenitores gliais. Enquanto os três outros principais tipos de cânceres do sistema nervoso (oligodentromas, glioblastomas e astrocitomas) são originários de células progenitoras gliais em seus diferentes estágios de diferenciação, o meduloblastoma tem origem de células progenitoras neuronais, antes de sua transformação em neurônios (HUSE *et al.*, 2010). Sua localização cerebelar, rápido crescimento e alto grau de metástase fazem com que vários sintomas graves sejam visíveis nas crianças com esse tipo de câncer, principalmente os relacionados com aumento da pressão no cérebro, como dor de cabeça, náusea e

vômito, assim como sintomas relacionados com a própria função do cerebelo, como problemas de coordenação e tontura (ABTA, 2015).

Molecularmente, o meduloblastoma foi dividido inicialmente em quatro subtipos: Wnt, Shh, Grupo 3 e Grupo 4. O Wnt é o menos incidente e que apresenta pacientes com a maior taxa de sobrevivência. O Shh e Grupo 3 apresentam uma incidência intermediária entre os subtipos Wnt e Grupo 4. O Grupo 3 é o mais agressivo, apresentando a menor taxa de sobrevivência entre os quatro subtipos e possui uma maior incidência de metástase do que o Shh. O Grupo 4 é o mais incidente e apresenta uma incidência de metástase semelhante ao Grupo 3 (BAVLE *et al.*, 2016). Esses subtipos também estão relacionados ao momento em que ocorreu a transformação maligna. Apesar de todo meduloblastoma ser originário de células anteriores ao neurônio maduro, há vários estágios de diferenciação existentes durante a formação dos neurônios embrionários. As regiões mais importantes neste quesito são a camada granular externa (EGL) e a zona ventricular (VZ), que ao longo do desenvolvimento embrionário dão origem ao cerebelo (MARSHALL *et al.*, 2014). A EGL e a VZ são regiões altamente proliferativas, que possuem as células menos diferenciadas. O subtipo Wnt é originário das células mais indiferenciadas que podem dar origem ao meduloblastoma, as células-tronco neurais (NSC) presentes na VZ no embrião com menos de seis semanas. Já o subtipo Shh é originário da transição de NSC para células progenitoras granulares (GPC) da camada granular externa em embriões com menos de dez semanas. As GPC dão origem às células que darão origem a neurônios granulares (GNP) no cerebelo e é neste momento que é verificado o surgimento do subtipo Grupo 3, em recém-nascidos de até vinte semanas. Como o desenvolvimento cerebelar se dá até um tempo após o nascimento, essas células GNP ainda se

transformação em neurônios prematuros e posteriormente em neurônios maduros. É na transição entre GNP e neurônios prematuros que é verificado o surgimento do subtipo Grupo 4, em crianças com mais de vinte semanas (HOOPER *et al.*, 2014).

Contudo, estudos ainda mais recentes sugerem que a heterogeneidade molecular de meduloblastoma é ainda maior. Schwalbe *et al.* (2017) propõe uma classificação em sete tipos moleculares, partido dos clássicos quatro grupos já mencionados. Nela, há a subdivisão dos tipos SHH, Grupo 3 e Grupo 4 em dois grupos cada. Isso permitiu a separação de grupos com mutações específicas para cada um, além de diferenças nas idades dos pacientes e prognóstico. Já Cavalli *et al.* (2017) propõe uma classificação composta por doze tipos moleculares. Esta classificação também possui como ponto de partida os quatro subtipos clássicos descritos acima, porém propões subdivisões desses subtipos. O grupo WNT seria dividido em dois, o SHH em quatro, o Grupo 3 em três e o Grupo 4 em três. Essas divisões possuem como base vários parâmetros, como mutações em diferentes genes e presença ou ausência de metástase.

SAM68

A proteína SAM68 (*Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa*) é oficialmente chamada de *KHDRBS1* (*KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1*). Ela é sintetizada a partir da expressão do gene *KHDRBS1*, localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p35), que possui nove éxons e dá origem a quatro transcritos, mas apenas duas proteínas. A isoforma menor não possui o domínio de ligação a RNA (KH) e é expressa apenas em células quiescentes (BARLAT *et al.*, 1997). Além do domínio KH de ligação a

RNA, há outros domínios funcionais importantes nesta proteína, que estão relacionados direta ou indiretamente às suas diversas funções atualmente conhecidas: os domínios P0-P5 (região rica em prolina), o domínio YY (região rica em tirosina) e o sinal de localização nuclear (NLS) (FRISONE *et al.*, 2015).

A SAM68 possui atividade regulada por modificações pós-traducionais, participa de diversas vias com várias funções celulares e possui papéis diferentes de acordo com a função realizada.

Modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais sofridas pela SAM68 estão intimamente ligadas com suas diversas funções celulares. Há três principais tipos de modificações pós-traducionais que podem ocorrer na SAM68: fosforilação, acetilação e SUMOilação (BABIC *et al.*, 2006). A fosforilação pode ocorrer predominantemente em duas regiões distintas, levando resultados diferentes. Quando a fosforilação ocorre em regiões com tirosina, há diminuição da habilidade de ligação a RNA, o que estimula a função da proteína como adaptadora e transdutora de sinal. Quando a fosforilação se dá em regiões de serina/treonina há uma regulação da habilidade *splicing*. Já a acetilação aumenta a atividade de ligação a RNA e a SUMOilação promove uma ação maior na repressão transcricional.

Funções

A literatura descreve a localização da SAM68 como predominantemente nuclear, pois sua maior função descrita até o momento é a regulação de *splicing* alternativo, ocorrendo de maneira

predominante no núcleo celular. Outra função conhecida para a esta proteína e que também tem atuação nuclear é a regulação da transcrição. Porém, a SAM68 também possui funções de transdutora de sinal e reguladora transcricional, atividades que ocorrem no citoplasma. Essas diferentes funções levam a diferentes ações celulares. Desse modo, a SAM68 já foi descrita atuando em diversas funções relacionadas à regulação do desenvolvimento tumoral, como apoptose, migração e invasão, reorganização do citoesqueleto, transição epitélio-mesenquimal e proliferação (FRISONE *et al.*, 2015).

A função da SAM68 como transdutora de sinal vem não só, mas principalmente da sua atuação na apoptose extrínseca, via fator de necrose tumoral (TNF) (RAMAKRISHNAN & BALTIMORE, 2011). A atuação dela neste sentido é por meio da transdução de sinal após ligação do TNF ao seu receptor presente na membrana celular. A SAM68 auxilia então na internalização do complexo proteico formado, que leva à ativação de caspases e, conseqüentemente à apoptose. A função da SAM68 na transcrição requer a habilidade de ligação a RNA. Um dos exemplos desta atuação é no controle do ciclo celular, por meio da repressão da transcrição das ciclinas D e E, levando à parada no ciclo celular (TAYLOR *et al.*, 2004). A função dela na tradução já foi descrita em neurônios, aumentando a tradução de beta-actina nos dendritos, o que leva um aumento das sinapses (KLEIN *et al.*, 2013). Outra função importante e amplamente descrita é a atuação da SAM68 no *splicing* alternativo de diversos alvos, por meio do reconhecimento de sequências ricas em A/U próximas a éxons a serem incluídos ou excluídos (BIELLI *et al.*, 2011; VALACCA *et al.*, 2010; LA ROSA *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2006; MATTER *et al.*, 2002).

Atuação de SAM68 no câncer

Dada a diversidade de funções, a SAM68 parece atuar de maneiras diferentes de acordo com o tipo celular. Assim sendo, em câncer ela já foi descrita tanto com papel oncogênico quanto supressor tumoral. Estudos iniciais destacaram esta proteína como supressora tumoral, mas estudos recentes também têm ressaltado o papel dela como oncogênico.

Já foi relatado que a inibição de SAM68 em fibroblastos leva à transformação maligna (LIU *et al.*, 2000), assim como a superexpressão em células-tronco neuronais leva a uma redução da proliferação (BETRAM *et al.*, 2013). Desse mesmo modo, também foi descrito que a superexpressão desta proteína leva à apoptose via TNF em células HeLa e HEK (RAMAKRISHNAN & BALTIMORE, 2011) e que em câncer de próstata a superexpressão dela leva à apoptose via *splicing* alternativo do gene BCL (PARONETTO *et al.*, 2007). Outros estudos mostraram que a superexpressão de SAM68 leva ao aumento de proliferação em diversos tipos de câncer, tais como carcinoma renal (ZHANG *et al.*, 2009), câncer colorretal (LIAO *et al.*, 2013), câncer de pulmão (ZHANG *et al.*, 2014), câncer de colo de útero (LI *et al.*, 2012), neuroblastoma (ZHAO *et al.*, 2013), câncer de mama (SONG *et al.*, 2010), câncer de próstata (BUSÀ *et al.*, 2007), leucemia aguda (WANG *et al.*, 2016), câncer de ovário (DONG *et al.*, 2016) e câncer de esôfago (WANG *et al.*, 2015).

Na literatura corrente, ainda não há estudos relativos a SAM68 em meduloblastoma humano e a função dessa proteína é desconhecida nesse importante grupo de tumores embrionários do SNC. Tendo em vista as diferentes atuações da SAM68 na regulação da proliferação e apoptose de células tumorais, a hipótese do presente trabalho é a de que SAM68 afete processos celulares relevantes ao desenvolvimento de

meduloblastoma. Entretanto, a função de SAM68 nesse tumor não é evidente, uma vez que SAM68 pode regular positivamente a proliferação de diferentes tipos de células tumorais, mas regula negativamente a proliferação de células-tronco neurais normais. Nesse sentido, qual seria a função de SAM68 na proliferação de células tumorais derivadas da transformação de células-tronco neurais como o meduloblastoma?

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é verificar a função da proteína SAM68 na proliferação e apoptose de células de meduloblastoma humano. Para isto, os objetivos específicos são:

- a) Relacionar o padrão de expressão de SAM68 em amostras de pacientes com indicadores prognósticos, a partir de análise de dados disponíveis em bancos públicos;
- b) Analisar o padrão de expressão e a localização subcelular de SAM68 em linhagens de meduloblastoma;
- c) Verificar se há atuação significativa da SAM68 sobre a proliferação de células de meduloblastoma;
- d) Verificar se há atuação significativa da SAM68 sobre a apoptose de células de meduloblastoma.

Materiais e Métodos

Cultura celular

Linhagens celulares de meduloblastoma humano D283-Med (ATCC HTB-185) e Daoy (ATCC HTB-186) foram compradas diretamente da ATCC. A linhagem celular USP-13-Med foi obtida do repositório do HUG-CEL (*Human Genome and Stem Cell Center* - Universidade de São Paulo) (Silva *et al.*, 2016). D283-Med, Daoy e USP-13-Med foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução 100µg/mL penicilina/streptomicina. Todas as células foram mantidas a 37°C, 5% CO₂. A diferenciação das linhagens embrionárias em neurônios foi feita em parceria com o Dr. Vivek Kumar e Ms. Caroline Kaid, de acordo com o trabalho de Marchetto (2010).

Silenciamento transiente de SAM68

O *siRNA* contra SAM68 (Trilencer-27 *siRNA* Duplex; Origene) foi transfectado nas linhagens Daoy, D283-Med e USP-13-Med usando *Lipofectamine*TM *RNAiMAX* (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A solução de transfecção com *siRNA* SAM68 ou *siRNA* não-específico controle/lipofectamina (10nM) foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e as células foram cultivadas sob a solução de transfecção (transfecção reversa).

Síntese de cDNA e Real-Time PCR

O cDNA foi sintetizado com 1µg de RNA total usando *High-Capacity cDNA Reverse-Transcription* (Applied Biosystems). PCR quantitativo foi realizado usando análise de expressão gênica por *Taqman® probe-based*. Os níveis de expressão se SAM68 foram avaliados e a expressão do gene endógeno Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) foi usada como controle endógeno. As reações foram feitas em triplicata. A análise dos dados de expressão foram realizadas no *real-time PCR system* (MX3005P™; Startagene) e a quantificação foi analisada usando o método $\Delta\Delta C_t$. A expressão gênica normalizada foi calculada com base como gene alvo/*GAPDH*.

Western blot

As células foram lisadas em *RIPA buffer* e as proteínas foram separadas em *SDS-PAGE*, e transferidas para membranas de poly(vinylidene) difluoride (PVDF) (Life Technologies), que foram bloqueadas e incubadas com anticorpo anti-SAM68 1:5000 (Novus, EPR3232) ou com anti-GAPDH 1:2500 (Abcam, ab9485) seguido por incubação com anticorpo secundário *goat anti-rabbit horseradish peroxide* (HRP)-conjugated 1:5000 (Cell Signaling). A revelação foi realizada por meio do uso de *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore Corporation, USA).

Apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado usando o *Guava Nexin Reagents* (Millipore, USA). Células SAM68-silenciadas e controle foram dissociadas, lavadas com *PBS*, incubadas em 100µL de *1x Annexin V Staining Buffer*, então foram incubadas com *7-AAD* e *Annexin V* diluída

1:40 por 15 minutos. Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com *PBS* e analisadas no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 5HT™* (Millipore - Guava Technologies) com o software *GuavaSoft 2.1*.

Imunocitoquímica

As células de meduloblastoma foram plaqueadas em placas de cultura. Para a coloração, as células foram fixadas com paraformaldeído 3.7% por 40 minutos à temperatura ambiente. As células foram então incubadas com *PBS* 0.1% *Triton-X 100* por 1 hora. A incubação com anticorpo anti-SAM68 1:500 foi realizada *overnight*. Após a marcação com anti-SAM68, houve uma incubação com anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit (*AF567*). As imagens de fluorescência foram obtidas com microscópio *Zeiss AxioVert*.

Índice mitótico

Após 48 horas de transfecção com SAM68 *siRNA* e com *siRNA* não-específico controle, as células foram fixadas com formaldeído 3.7% por 30 minutos. As células foram então coradas com 1µg/mL de *DAPI* por 2 minutos, lavadas com *PBS* e montadas em lâminas com *VectaShield*. Então, foram contadas 1000 células por lâmina em três diferentes lâminas, para cada grupo experimental, e dentre essas 1000 células, foram contadas quantas estavam em mitose.

Incorporação de *EdU*

Após 48 horas de transfecção com SAM68 *siRNA* e com *siRNA* não-específico controle, as células em fase S do ciclo celular foram determinadas por ensaio incorporação de *EdU* (5-ethynyl-2'-

deoxyuridine) de acordo com o protocolo do fabricante (*Click-It EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit. Life Technologies*). A incorporação de *EdU* (10 μ M) teve duração de 30 minutos para todas as linhagens, a fixação foi com formaldeído 3.7% por 30 minutos e as células foram coradas com 1 μ g/mL de *DAPI* por 2 minutos, lavadas com PBS e montadas em lâminas com *VectaShield*. Foram então contadas 1000 células por lâmina (células *DAPI*⁺) em três diferentes lâminas, para cada grupo experimental, e dentre essas 1000 células, foram contadas quantas são *EdU*⁺, ou seja, quantas estavam em fase S do ciclo celular.

Análise *in silico*

As análises de expressão transcricional em tecidos normais foram realizadas de acordo com dados de *RNAseq* disponíveis no banco de dados *The Human Protein Atlas* (proteineatlas.org). Os dados de expressão gênica entre amostras de meduloblastoma e tecido normal (cerebelo) foram obtidos pelo banco de dados *Gene Expression across Normal and Tumor tissue* (medicalgenome.kribb.re.kr).

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e três experimentos independentes foram executados. Os dados foram analisados por *ANOVA* com pós-teste *Bonferroni*. A significância foi estabelecida ao $P \leq 0.05$. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD.

Resultados

Silenciamento transiente da SAM68

Foi realizado o silenciamento transiente da SAM68 de acordo como descrito nos Materiais e Métodos e seu sucesso foi confirmado tanto pela análise de expressão de mRNA (Figura 1A) quanto de proteína (Figura 1B), antes e depois do silenciamento.

A.

B.

Figura 1. Confirmação do silenciamento transiente da SAM68 por (A) Real Time PCR e por (B) Western blot. Tanto para o real time PCR quanto para o western blot foi utilizado o gene endógeno GAPDH. O siRNA CTL é composto apenas pela solução veículo do silenciamento. Verifica-se que em ambos os testes há expressão de SAM68 mesmo com o tratamento com veículo e que após o silenciamento houve uma redução significativa na expressão tanto transcricional quanto proteica. **** $p < 0.0001$.

Análise de expressão de SAM68

Foi realizada a análise de expressão de SAM68, tanto em nível transcricional (Figura 2A) quanto proteico (Figura 2B). Foi utilizada célula-tronco embrionária humana (hESC) como controle positivo. Na análise de expressão de mRNA utilizou-se células de cerebelo como padrão para comparação dos níveis de expressão e pode-se notar que todas as linhagens de meduloblastoma expressam mais Sam68 que as células de cerebelo normal. Além disso, também pode ser observado que os níveis de expressão de Sam68 nas linhagens de meduloblastoma são similares aos níveis de expressão deste mRNA em hESC. O mesmo foi observado na análise de expressão proteica.

Figura 2. Expressão da SAM68. (A) Quantificação de mRNA, utilizando cerebelo como referência; (B) níveis proteicos de SAM68 nas três linhagens de meduloblastoma estudadas e em células-tronco embrionárias humanas (hESC). Ambos experimentos foram realizados com GAPDH como gene endógeno. Verifica-se por real time PCR que todas as linhagens apresentam expressão de SAM68 mais elevada que no cerebelo. Tanto por real time PCR quanto por western blot é possível verificar que a expressão de SAM68 nas linhagens de meduloblastoma estudadas é similar à expressão dessa proteína em hESC.

* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Índice Mitótico

Foram realizados experimentos para determinação de índice mitótico (Figura 3) conforme descrito nos Materiais e Métodos (ver abaixo) para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. Os resultados mostraram uma quantidade significativamente maior de células em mitose após silenciamento de SAM68.

Figura 3. Índice mitótico para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. É possível verificar que, para as três linhagens estudadas, há uma porcentagem significativamente elevada de células em mitose quando SAM68 é silenciada (siRNA SAM68) do que nessas mesmas células apenas na presença do veículo de silenciamento (siRNA CTL).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Incorporação de *EdU*

Em acordo com os resultados prévios de índice mitótico, o experimento de incorporação de *EdU*, realizado com o objetivo de verificar a proliferação por meio da incorporação do agente intercalante *EdU*, apresentou resultados significativos para todas as linhagens de meduloblastoma estudadas. Nesse experimento, detectou-se uma marcação de *EdU* significativamente superior em células silenciadas para SAM68, comparativamente às células controles com níveis basais de SAM68 (Figura 4).

Figura 4. Incorporação de *EdU* para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. É possível verificar que, para as três linhagens estudadas, há uma porcentagem significativamente elevada de células em fase de replicação quando SAM68 é silenciada (siRNA SAM68) do que nessas mesmas células apenas na presença do veículo de silenciamento (siRNA CTL), confirmando a atuação da proteína SAM68 na proliferação.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Apoptose

Experimentos realizados com o objetivo de verificar se a SAM68 tem influência na morte celular das linhagens de meduloblastoma estudadas não detectaram alterações significativas nos índices de apoptose mediante silenciamento de SAM68 (Figura 5).

Figura 5. Ensaio de apoptose para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. Verifica-se que a transfecção do veículo de silenciamento afeta a susceptibilidade à apoptose em algumas linhagens, porém entre as células tratadas com veículo (Controle) e as células com SAM68 silenciada (SAM68) não há diferença significativa em relação à susceptibilidade à apoptose. ** $p < 0.01$.

Imunocitoquímica

A imunocitoquímica foi realizada a fim de detectar a região celular com maior abundância em SAM68. Para as três linhagens estudadas, observou-se baixa localização citoplasmática e massiva localização nuclear (Figura 6).

Figura 6. Localização da SAM68 por imunocitoquímica para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. Com DAPI visualizamos a marcação nuclear, a marcação de SAM68 em verde se mostra coincidente com a marcação nuclear na junção das duas imagens (MERGE), indicando uma concentração de SAM68 predominantemente nuclear para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. Aumento de 10x.

Análise de expressão transcricional em bancos de dados

Com base em análises de expressão de SAM68 *in silico*, verificou-se que a quantidade de transcritos de SAM68 em células de meduloblastoma encontra-se aumentada quando comparada aos níveis transcricionais de SAM68 em células de cerebelo e córtex cerebral humanos (Figura 7B).

Alguns transcritos são mais presentes em tipos celulares específicos, como NeuN em neurônios e miosina em músculo. Porém, para a SAM68, verificou-se que a expressão transcricional não ocorre em um tipo celular específico, estando presente em níveis semelhantes em tipos celulares variados (Figura 7A).

A.

B.

Figura 7. Análise *in silico* da expressão de SAM68. (A) Comparação da expressão transcricional entre cerebelo, córtex cerebral, mama e músculo esquelético, para Sam68, NeuN e Myh1. (B) Expressão transcricional de Sam68 em diferentes estudos com amostras de meduloblastoma (Meduloblastoma) e cerebelo normal (Cerebelo). n=204

**RPKM: Reads Per Kilobase per Million reads mapped*

Identificação de possíveis alvos da SAM68

De acordo com os resultados anteriores, que serão discutidos posteriormente, fez-se necessária a formulação de hipóteses que os explicassem. Assim sendo, uma delas foi uma ação indireta em alvos que regulassem a proliferação. De acordo com a literatura (TREMBLAY & RICHARD, 2006; ITOH *et al.*, 2002; KOSO *et al.*, 2014; ZINKE *et al.*, 2015), foram selecionados alguns possíveis alvos com os quais a SAM68 poderia estar envolvida e realizado um qPCR para os transcritos desses alvos, com amostras oriundas de ensaio de coimunoprecipitação. Assim é possível obter maior evidência de que há ligação da SAM68 a esses alvos (Figura 8). De acordo com os resultados, não houve um alvo que mostrasse expressão significativa dentre as três linhagens de meduloblastoma estudadas.

Figura 8. Análise da expressão de possíveis alvos da SAM68 por qPCR, após ensaio de coimunoprecipitação. É possível observar que não foi encontrado um alvo que possuísse diferença de expressão significativa entre células apenas transfectadas com veículo de silenciamento (siRNA Ctl) e células com SAM68 silenciada (siRNA SAM68) para todas as linhagens estudadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Análise da expressão de SAM68 ao longo da diferenciação neuronal

Outra hipótese formulada para explicar os resultados obtidos tem relação com o aumento de expressão de SAM68 ao longo do desenvolvimento neuronal (BERTRAM & HOLST, 2013). Desse modo, foi realizada a análise de transcritos de SAM68 por qPCR em células representativas de diferentes estágios de diferenciação ao longo do

desenvolvimento neuronal (Figura 9). Os resultados mostraram-se compatíveis com a literatura, havendo aumento significativo de transcritos de SAM68 ao longo da diferenciação neuronal a partir de células pluripotentes.

Figura 9. Análise da expressão transcricional de SAM68 ao longo da diferenciação neuronal. ESC: células-tronco embrionárias humanas; NPC: células progenitoras neurais; NEU: neurônios maduros.

**** $p < 0.0001$

Discussão

As análises *in silico* mostraram estar de acordo com os resultados obtidos por qPCR e western blot, os quais apresentam uma alta expressão de SAM68 nas linhagens de meduloblastoma. Além disso, as análises *in silico* também revelaram que a expressão de transcritos de SAM68 em células de meduloblastoma é mais alta que em células de cerebelo normal. Essas análises realizadas com um maior tamanho amostral corroboram e complementam os resultados obtidos nos experimentos com as linhagens celulares. Outro resultado importante das análises *in silico* diz respeito aos níveis de expressão transcricional de SAM68 em vários tipos de tecido, em comparação à expressão transcricional de outros genes específicos desses tipos de tecido. Como já era esperado, verificou-se uma maior expressão de MYH1 em células musculares. Do mesmo modo, Observou-se maior expressão de NEUN em células de sistema nervoso, e, sendo ela uma proteína mais presente em neurônios. Seguindo essa linha de raciocínio, verificou-se alta expressão de SAM68 em todos os tecidos estudados, revelando que a sua expressão não é específica para um único tipo de tecido. Porém, vale ressaltar que, apesar de apresentar expressão considerável nos diversos tipos de tecido, ela está altamente expressa em cerebelo.

Visando entender o que essa alta expressão ocasiona para as células de meduloblastoma, foi realizado o silenciamento transiente em células de linhagens estabelecidas de meduloblastoma. Os resultados de qPCR e western blot demonstram que o silenciamento foi eficiente. Assim, com essas células silenciadas, buscamos verificar se esta ausência de SAM68 influenciava em pelo menos uma das duas funções mais importantes em que esta proteína já foi descrita: apoptose e proliferação

celular. Ambas as funções, além de serem alvos desta proteína, são funções vitais para o tumor, podendo relacionar a SAM68 tanto com seu papel pró-oncogênico quanto com seu papel supressor tumoral. Não foi realizada uma superexpressão pois a SAM68 já se encontra altamente expressa em meduloblastoma, como demonstrado tanto nas análises *in silico* quanto nos experimentos de qPCR e western blot aqui realizados.

O ensaio de apoptose foi realizado comparando-se células de meduloblastoma não transfectadas, células transfectadas apenas com veículo (controle) e células com silenciamento transiente de SAM68. Para as três linhagens de meduloblastoma aqui estudadas, não houve diferença significativa em morte por apoptose entre as células controle e as células silenciadas. Isso nos leva a crer que, em meduloblastoma, a SAM68 não está atuando majoritariamente em morte celular programada. Os ensaios de proliferação também foram realizados para as três linhagens de meduloblastoma (Daoy, USP13 e D283-Med), comparando-se as células silenciadas para SAM68 com as não silenciadas, transfectadas apenas com veículo. O ensaio de índice mitótico (IM) nos revela células em mitose no momento do ensaio. Os ensaios aqui realizados mostraram que há mais células em mitose nas linhagens de meduloblastoma com silenciamento de SAM68 do que em células não silenciadas. Isso pode indicar que há um aumento de proliferação nas células de meduloblastoma após redução dos níveis SAM68. Entretanto, esses resultados também podem indicar que células com silenciamento SAM68 apresentam um maior tempo em mitose ou mesmo estacionam em algum momento na mitose. Para sanar essas várias interpretações possíveis, foi realizado o teste de incorporação de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (*EdU*), que é um agente intercalante de DNA que só liga ao DNA no momento da síntese de uma nova fita, durante a proliferação

celular. Os resultados aqui apresentados para as análises de incorporação de *EdU* confirmam os resultados do IM, demonstrando que há maior proliferação celular após o silenciamento de SAM68.

Também foi realizado um ensaio de imunocitoquímica (ICC), para verificar a localização celular da SAM68. Verificou-se uma presença de SAM68 muito mais pronunciada no núcleo do que no citoplasma, para as três linhagens estudadas. Isso corrobora os resultados anteriores, já que a via de apoptose em que a SAM68 está envolvida é citoplasmática e o auxílio da SAM68 em proliferação se dá com interação desta proteína com componentes nucleares.

Assim sendo, gerou-se um questionamento intrigante: se a SAM68 parece apresentar um padrão semelhante a uma supressora tumoral, ou seja, quando ausente aumenta a proliferação celular, por que ela está altamente expressa em células de meduloblastoma? Elaboramos duas hipóteses para este questionamento, que serão discutidas a seguir. Porém, essas hipóteses não foram completamente solucionadas por este trabalho, já que o foco inicial foi apenas verificar se a SAM68 está envolvida com proliferação ou com apoptose.

A primeira hipótese trata da possibilidade de que a SAM68 seja importante para a regulação do *splicing* de algum alvo específico de sistema nervoso. Nessa linha, foram realizadas buscas na literatura e alguns alvos envolvidos com proliferação e altamente expressos em sistema nervoso central foram selecionados: ALX4, FOXR2, PRDX1, TGIF2 e WAC (TREMBLAY & RICHARD, 2006; ITOH *et al.*, 2002; ZINKE *et al.*, 2015; KOSO *et al.*, 2014). Esses possíveis alvos foram analisados com relação a quantidade de transcritos em presença e ausência de SAM68 para as três linhagens de meduloblastoma estudadas. Contudo, nenhum dos alvos apresentou diferença significativa de

expressão entre células com e sem silenciamento de SAM68 para todas as três linhagens de meduloblastoma estudadas.

A segunda hipótese elaborada para tentar explicar a alta expressão de SAM68 apesar da atuação dela semelhante a uma supressora tumoral é que talvez ela seja importante durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Assim, como o meduloblastoma é desenvolvido em um estágio que a diferenciação de neurônios cerebelares ainda não está completa (MARSHALL *et al.*, 2014), é possível que a expressão desta proteína esteja alta no momento em que houve a transformação maligna e tenha continuado alta posteriormente. Os resultados obtidos neste trabalho, após a realização de qPCR com células em três estágios de diferenciação (células-tronco embrionárias humanas, células progenitoras neurais e neurônios maduros) mostram uma elevação da expressão dos transcritos de SAM68 ao longo da diferenciação neuronal, sendo esta hipótese um bom indício do que pode ocorrer para explicar os resultados obtidos em relação à proliferação.

Deste modo, este trabalho nos guia para uma atuação da SAM68 ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso. A importância dela no envolvimento com *splicing* alternativo de isoformas importantes para a diferenciação neuronal, contudo, não deve ser descartada, visto que foram testados apenas cinco alvos. O envolvimento da SAM68 com regulação de *splicing* alternativo é a função mais descrita desta proteína em diversas células, como já mencionado, e o *splicing* alternativo de vários transcritos é essencial para o desenvolvimento neuronal (CHAWLA *et al.*, 2009). Assim, é possível que as duas hipóteses aqui levantadas para explicar a alta expressão desta proteína em células de meduloblastoma estejam relacionadas de modo a criar uma terceira que ainda não foi extensamente explorada e testada: a proteína SAM68 pode

estar relacionada com a regulação de transcritos alternativos importantes para o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central humano. O quanto esta atuação está relacionada com uma menor proliferação de células de meduloblastoma ainda não foi esclarecido, visto que meduloblastoma é um câncer muito agressivo e a expressão de SAM68 não difere entre os subtipos moleculares que possuem agressividades diferentes.

Conclusões

Em células de meduloblastoma humano estudadas no presente trabalho, a proteína SAM68:

1. Possui localização predominantemente nuclear;
2. Está altamente expressa quando comparada ao cerebelo normal
3. Não atua em apoptose;
4. Atua em proliferação celular;
5. Possui um papel semelhante a uma proteína supressora tumoral, aumentando a proliferação celular quando silenciada;
6. Pode estar aumentada apesar do papel supressor por atuar regulando o *splicing* alternativo de alvos envolvidos na diferenciação neuronal.

Resumo

Meduloblastoma é o câncer do Sistema Nervoso Central mais comum em crianças entre 0 e 4 anos. Ele é originado de células precursoras neuronais, que falharam em se diferenciar e continuaram a se proliferar. A proteína SAM68 está desregulada em várias linhagens de células de cânceres humanos e é uma proteína que pode estar envolvida em uma ampla gama de vias de sinalização importantes, incluindo metabolismo de RNA, regulação do ciclo celular, apoptose, regulação de *splicing* e transdução de sinal. Em células-tronco neurais (NSC), níveis elevados de SAM68 levam a uma redução importante na proliferação celular. Contudo, na maioria dos cânceres estudados até o momento, a SAM68 está envolvida com progressão tumoral.

Com este trabalho, buscou-se entender o envolvimento de SAM68 na proliferação e morte de células de meduloblastoma. Por meio da análise de expressão transcricional e proteica, do silenciamento de SAM68, análise de apoptose por citometria de fluxo e análise de proliferação por índice mitótico e incorporação de EdU, observou-se que, em linhagens de meduloblastoma, a SAM68 está envolvida com proliferação, mas não com apoptose. Seu funcionamento em meduloblastoma é similar aos resultados obtidos com NCS do que com outros tipos de câncer, visto que o silenciamento dessa proteína favorece a proliferação das células de meduloblastoma. Em vista dos resultados aparentemente conflitantes, tendo um papel mais semelhante a um supressor tumoral, porém sendo altamente expressa em meduloblastoma, sugeriram-se algumas hipóteses, que foram apenas inicialmente testadas neste trabalho, mas precisam ser aprofundadas em trabalhos futuros.

Abstract

SAM68 is considered a prototype of STAR proteins (Signal Transducers and Activators of RNA protein), that are involved in the signal translation and RNA activation. In cancer, the intracellular levels of Sam68 are crucial to the progression of the disease. Recent observations indicate Sam68 with both pro-oncogenic and tumor suppressor activities, depending on the type of cell. Here, we analyzed SAM68 expression by real time PCR and western blot, proliferation of cell with and without SAM68 by mitotic index and incorporation of EdU and cell death by flux cytometry to define the relevance of the presence of SAM68 to cell proliferation and death. We found that proliferation of medulloblastoma cell lines are affected for absent SAM68, but not apoptosis. Because the contrast of an action similar to a tumor suppressor and a high expression level, we hypothesized that the increase of SAM68 levels is important during the neuronal development, regulating splicing variants. Our results allied to some literature data corroborate this hypothesis.

Referências Bibliográficas

- ABTA (American Brain Tumor Association). Medulloblastoma Brochure. 2015.
- Al-Lazikani, B., Banerji, U., & Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature biotechnology*, 30(7), 679-692.
- Aragona, M., Maisano, R., Panetta, S., Giudice, A., Morelli, M., La Torre, I., & La Torre, F. (2000). Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *International journal of oncology*, 17(5), 981-990.
- Babic I, Cherry E, Fujita D J. SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene* 2006, 25(36), 4955-4964.
- Barlat, I., Maurier, F., Duchesne, M., Guitard, E., Tocque, B., & Schweighoffer, F. (1997). A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3129-3132.
- Bavle A A, Lin F Y, Parsons D W. Applications of genomic sequencing in pediatric CNS tumors. *Oncology* 2016, 30(5), 411-411.
- Bertram B. Functional analysis of the signal transduction and activation of RNA metabolism (STAR) proteins Sam68, Slm-1 and Slm-2 in the mouse developing forebrain. Ruhr-University Bochum 2013.
- Bielli, P., Busà, R., Paronetto, M. P., & Sette, C. (2011). The RNA-binding protein Sam68 is a multifunctional player in human cancer. *Endocrine-related cancer*, 18(4), R91-R102.
- Brabletz, T. (2012). EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells?. *Cancer cell*, 22(6), 699-701.

Busà R, Paronetto M P, Farini D, Pierantozzi E, Botti F, Angelini D F, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2007, 26(30), 4372-4382.

Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., & Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64(2), 281-302.

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature*, 407(6801), 249.

Cavalli, F. M., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D. J., Luu, B., ... & Agnihotri, S. (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*, 31(6), 737-754.

CBTRUS Statistical Report. Distribution in Children of Primary Brain and CNS Tumors. NPCR and SEER 2008-2012.

Chawla, G., Lin, C. H., Han, A., Shiue, L., Ares, M., & Black, D. L. (2009). Sam68 regulates a set of alternatively spliced exons during neurogenesis. *Molecular and cellular biology*, 29(1), 201-213.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.

De Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), 24.

di Fagagna, F. D. A., Reaper, P. M., Clay6-Farrace, L., & Flegler, H. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194.

Dong L, Che H, Li M, Li X. Sam68 is Overexpressed in Epithelial Ovarian Cancer and Promotes Tumor Cell Proliferation. *Medical Science*

Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2016, 22, 3248.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012.

Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of oncology*, 23(suppl_8), viii6-viii9.

Frisone P, Pradella D, Di Matteo A, Belloni E, Ghigna C, Paronetto M P. SAM68: signal transduction and RNA metabolism in human cancer. *BioMed research international* 2015.

Garber, K. (2004). Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 96(24), 1805-1806.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178-194.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., & Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *oncogene*, 21(4), 598.

Hoff, P. M. G. (2013). *Tratado de oncologia*. Editora Atheneu.

Hooper C M, Hawes S M, Kees U R, Gottardo N G, Dallas P B. Gene expression analyses of the spatio-temporal relationships of human medulloblastoma subgroups during early human neurogenesis. *PloS one* 2014, 9(11).

Huse J T, Holland E C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature reviews cancer* 2010, 10(5), 319-331.

Itoh, M., Haga, I., Li, Q. H., & Fujisawa, J. I. (2002). Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic acids research*, 30(24), 5452-5464.

Jiang, H., Ju, Z., & Rudolph, K. L. (2007). Telomere shortening and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 40(5), 314-324.

Józwiak P, Forma E, Bryś M, Krześlak A. O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Frontiers in endocrinology* 2014, 5.

Kaelin Jr, W. G., & Thompson, C. B. (2010). Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature*, 465(7298), 562-564.

Klein, M. E., Younts, T. J., Castillo, P. E., & Jordan, B. A. (2013). RNA-binding protein Sam68 controls synapse number and local β -actin mRNA metabolism in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 3125-3130.

Koso, H., Tsuchioka, A., Lyons, E., Ward, J. M., Rust, A. G., Adams, D. J., ... & Watanabe, S. (2014). Identification of FoxR2 as an oncogene in medulloblastoma. *Cancer research*, 74(8), 2351-2361.

La Rosa P, Bielli P, Compagnucci C, Cesari E, Volpe E, Vecchioli S F, Sette C. Sam68 promotes self-renewal and glycolytic metabolism in mouse neural progenitor cells by modulating Aldh1a3 pre-mRNA 3'-end processing. *eLife* 2016, 5.

Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351(6326), 453.

Li Z, Yu C P, Zhong Y, Liu T J, Huang Q D, Zhao X H, Liu J H. Sam68 expression and cytoplasmic localization is correlated with lymph node

metastasis as well as prognosis in patients with early-stage cervical cancer. *Annals of Oncology* 2012, 23(3), 638-646.

Liao W T, Liu J L, Wang Z G, Cui Y M, Shi L, Li T T, Song L B. High expression level and nuclear localization of Sam68 are associated with progression and poor prognosis in colorectal cancer. *BMC gastroenterology* 2013, 13(1), 126.

Lim D A, Suárez-Farinas M, Naef F, Hacker C R, Menn B, Takebayashi H, Alvarez-Buylla A. In vivo transcriptional profile analysis reveals RNA splicing and chromatin remodeling as prominent processes for adult neurogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2006, 31(1), 131-148.

Lingner, J., Cooper, J. P., & Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?. *Science*, 269(5230), 1533.

Liu K, Li L, Nisson P E, Gruber C, Jessee J, Cohen S N. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(51), 40195-40201.

Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 81-93.

Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., ... & Muotri, A. R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 143(4), 527-539.

Marshall G M, Carter D R, Cheung B B, Liu T, Mateos M K, Meyerowitz J G, Weiss W A. The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2014, 14(4), 277-289.

Matter N, Herrlich P, König H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 2002, 420(6916), 691-695.

Paronetto M P, Achsel T, Massiello A, Chalfant C E, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J Cell Biol* 2007, 176(7), 929-939.

Ramakrishnan, P.; Baltimore, D. Sam68 is Required for Both NF- κ B Activation and Apoptosis Signaling by the TNF Receptor. *Molecular Cell* 43, 167-179. Elsevier, 2011.

Schwalbe, E. C., Lindsey, J. C., Nakjang, S., Crosier, S., Smith, A. J., Hicks, D., ... & Pizer, B. (2017). Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *The Lancet Oncology*.

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235-246.

Silva et al. *Cytotechnology*. 2016 Aug;68(4):1545-60.

Song L, Wang L, Li Y, Xiong H, Wu J, Li J, Li M. Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumourigenicity of breast cancer cells. *The Journal of pathology* 2010, 222(3), 227-237.

Taylor, S. J., Resnick, R. J., & Shalloway, D. (2004). Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC cell biology*, 5(1), 5.

Tremblay, G. A., & Richard, S. (2006). mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. *RNA biology*, 3(2), 90-93.

Valacca C, Bonomi S, Buratti E, Pedrotti S, Baralle F E, Sette C, Biamonti G. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of cell biology* 2010.

Wang Q, Li Y, Cheng J, Chen L, Xu H, Li Q, Pang T. Sam68 affects cell proliferation and apoptosis of human adult T-acute lymphoblastic leukemia cells via AKT/mTOR signal pathway. *Leukemia research* 2016, 46, 1-9.

Wang Y, Liang L, Zhang J, Li M, Zhu J, Gong C, Ni R. Sam68 promotes cellular proliferation and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* 2015, 36(11), 8735-8745.

Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254(5035), 1138-1146.

Zhang Z, Li J, Zheng H, Yu C, Chen J, Liu Z, Song L. Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2009, 18(10), 2685-2693.

Zhang, Z, Xu Y, Sun N, Zhang M, Xie J, Jiang Z. High Sam68 expression predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2014, 16(10), 886-891.

Zhao X, Li Z, He B, Liu J, Li S, Zhou L, Xu Z. Sam68 is a novel marker for aggressive neuroblastoma. *OncoTargets and therapy* 2013, 6, 1751.

Zinke, J., Schneider, F. T., Harter, P. N., Thom, S., Ziegler, N., Toftgård, R., ... & Liebner, S. (2015). β -Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma. *Molecular cancer*, 14(1), 17.

Biografia

Carolina de Seixas Couto Leite

Graduação em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Realizou iniciação científica por cinco anos no Laboratório de Genômica Translacional pelo IB-USP sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, com projeto de pesquisa intitulado “Participação da proteína SAM68 no processo de apoptose em tumores cerebrais”. Atualmente realiza mestrado também no IB-USP, com o mesmo orientador e linha de pesquisa. Foi estagiária e atualmente é contratada do laboratório do Grupo Genera, onde realiza exames e pesquisas em biologia molecular. Participa de um projeto da empresa GeneSeq, sob comando do pesquisador Marcos Valadares, em colaboração com as Professoras Doutoras Maria Rita Passos-Bueno e Mayana Zatz.