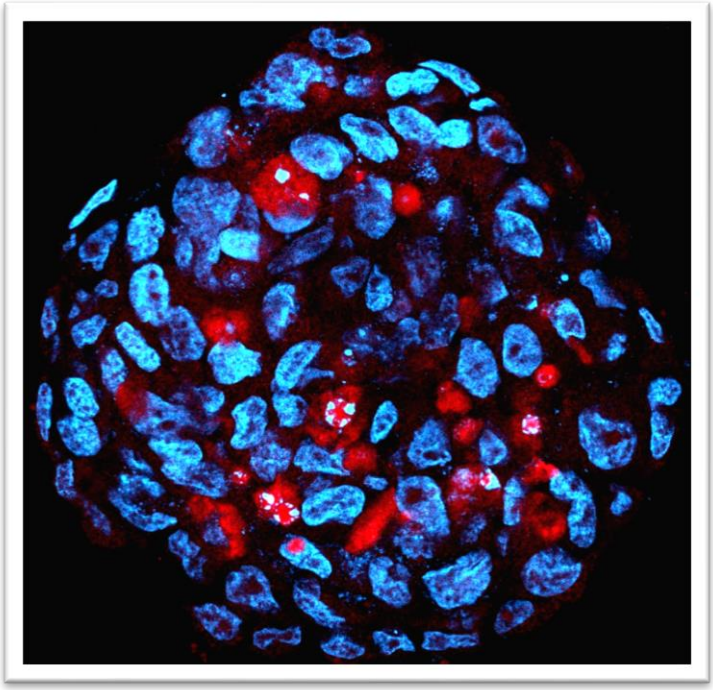
CAROLINI KAID DÁVILA



Identificação de biomarcadores e avaliação pré-clínica de novas terapias para tumores embrionários do sistema nervoso central: miR-367 como alvo terapêutico e efeito oncolítico do vírus ZIKA

Biomarkers investigation and pre-clinical study of new therapies for central nervous system embryonal tumors: miR-367 as therapeutic target and oncolytic effect of ZIKA virus

São Paulo

2018

CAROLINI KAID DÁVILA

Identificação de biomarcadores e avaliação pré-clínica de novas terapias para tumores embrionários do sistema nervoso central: miR-367 como alvo terapêutico e efeito oncolítico do vírus ZIKA

Biomarkers investigation and pre-clinical study of new therapies for central nervous system embryonal tumors: miR-367 as therapeutic target and oncolytic effect of ZIKA virus

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de **Título de Doutor em Ciências**, na **Área de Biologia (Genética)**.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

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

Kaid, Carolini

Identificação de biomarcadores e avaliação pré-clínica de novas terapias para tumores embrionários do sistema nervoso central: miR-367 como alvo terapêutico e efeito oncolítico do vírus ZIKA / Carolini Kaid Dávila – São Paulo, 2018.

Número de páginas: 194

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

Programa de Pós-graduação: Biologia (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

1. Tumores embrionários do Sistema Nervoso Central
2. Célula-Tronco Tumoral
3. Biomarcadores
4. Terapias oncogênicas

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Programa de Pós-Graduação Biologia (Genética)

Folha de Avaliação

Nome: KAID, Carolini

Título: Identificação de biomarcadores e avaliação pré-clínica de novas terapias para tumores embrionários do sistema nervoso central: miR-367 como alvo terapêutico e efeito oncolítico do vírus ZIKA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Aprovado em: ___/___/___.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Isaac, por tornar tudo mais desafiador;

Ao Henrique, por tornar tudo mais fácil;

À Deus, por tornar tudo possível.

AGRADECIMENTOS

No longo período de doutorado, muitas pessoas me ajudaram neste caminho, espero conseguir agradecer a todos por aqui:

Ao meu orientador Dr. Oswaldo Keith Okamoto por todos ensinamentos e frases de grande sabedoria: *"Se você fosse uma camundonga, você seria uma médica neurocirurgiã!"*

Às minhas companheiras de laboratório Patrícia Benites, Carol Rodini, Amanda Assoni e Beatriz Cortez. Em especial ao Dr. Bruno Araújo que foi minha base durante o início do doutorado. Sob sua supervisão crítica aprendi muito. Agradeço por não perder a confiança em mim mesmo depois de desligar o aparelho!

Aos meus companheiros do CEPID, principalmente o Luiz Ernesto que depois descobri que eram pessoas distintas. O Ernesto Goulart sendo um grande comediante do nosso cotidiano, sempre fazendo dupla com o Luiz Caires-Junior, mais conhecido como Boris Francês. Agradeço também ao aluno de iniciação Kayque Telles-Silvia e ao seu irmão gêmeo. A Prof. Mayana Zatz pelo seu entusiasmo e carisma, tornando-se meu grande modelo de pesquisadora e mãe.

Ao Instituto Butantan, em especial à Alessandra e Renato, pela paciência e parceria que foram fundamentais.

À Patrícia Semedo por participar de todos os momentos: compras de materiais, discussão dos resultados, discussão do projeto, discussão da organização do laboratório, discussão da maternidade, discussão da vida...

À Heloisa Bueno, sem ela não conseguiria fazer 1% dos meus experimentos com camundongos. Obrigada por enxugar o álcool dos meus olhos e por me motivar a trazer comidinhas quentinhas a alguém que muitas vezes não tem tempo de almoçar.

A todos os professores da pós-graduação, em especial ao Prof. Carlos Vilela Ribeiro, Prof. Lyria Mori e Prof. Cris Miyaki. Vocês são os meus preferidos sempre!

À CAPES pela bolsa concedida. Sem ela nada disso seria possível. Agradeço também à FAPESP e CEPID pelo auxílio financeiro aos projetos.

Aos meus pais, José Carlos e Maristela, por terem me criado imersa nos estudos, sempre rodeada pelas revistas da SUPER INTERESSANTE. Aos meus irmãos queridos, Felipe e Danilo, que sempre competiam comigo para ver quem lia a SUPER INTERESSANTE primeiro. À minha sogra e cunhados, por me acolherem como irmã e filha. Em especial à minha mãe e sogra Genoveva que cuidaram do Isaac, meu filho amado, quando ele tinha apenas 4 meses enquanto eu dedicava minha vida à ciência.

A meu marido, Henrique, por todo companheirismo. Por investir na minha vida por longos 10 anos, nunca desistir de mim. Pelos conselhos preciosos, que mesmo achando que nunca escuto, são sempre minha prioridade. Você foi o único que sempre me incentivou a continuar na pesquisa. Obrigado por me amar e por amar o meu sonho.

À Deus, meu eterno Amigo e Pai, que me deu salvação e paz. Espero que minha vida seja para sempre agradável aos Seus olhos.

ÍNDICE

I- Dedicatória ---------- 5

II- Agradecimentos ---------- 6

III- Índice ---------- 7

IV- Resumo Geral ---------- 8

V- *Abstract* ---------- 10

VI- Lista de Abreviaturas ---------- 12

VII- Introdução Geral ---------- 14

1. Heterogeneidade Tumoral ---------- 11
2. Tumores do Sistema Nervoso Central ---------- 18
3. Tumores Embrionários do SNC ---------- 20

VIII- Objetivos ---------- 33

IX- Capítulo 1: Proteínas e miRNAs presentes em microvesículas tumorais ---------- 34

X- Capítulo 2: miR-367 como alvo terapêutico em tumores embrionários do SNC ---------- 59

XI- Capítulo 3: Efeito oncolítico do vírus ZIKA---------- 85

XII- Discussão Geral ---------- 134

XIII- Conclusões ---------- 146

XIV- Apêndices ---------- 148

1. Padronização Ensaio de Formação de Neuroesferas ---------- 148
2. Padronização Ensaio de Invasão 3D ---------- 150
3. Padronização Proliferação em Tempo Real ---------- 152
4. Padronização do Ensaio in vivo (injeção intracranial do miR-367 *inhibitor* em modelo ortotópico) ---------- 154
5. Estabelecimento de novas linhagens celulares de tumores pediátricos ---------- 159
   - 5.1. Estabelecimento da linhagem USP7-ATRT ---------- 160
   - 5.2. Estabelecimento da linhagem USP21-EPE ---------- 164
   - 5.3. Sequenciamento de EXOMA do paciente 22 ---------- 167
6. Efeito Oncolítico de vírus ZIKV^{BR} ---------- 173
   - 6.1. Efeito Oncolítico do ZIKV^{BR} em USP21-EPE ---------- 174
   - 6.2. Efeito Oncolítico do ZIKV^{BR} em linhagens celulares de glioblastoma ---------- 176

XV- Anexos ---------- 180

XVI- Referências Bibliográficas ---------- 188

RESUMO GERAL

Os tumores embrionários do Sistema Nervoso Central (SNC) são os mais comuns em crianças de zero a quatro anos e a principal causa de mortalidade infantil. O tratamento convencional desses tumores malignos resulta em diversas sequelas que afetam significativamente a qualidade de vida dos sobreviventes. Diferentes estudos têm demonstrado que a ativação de genes tipicamente expressos em células-tronco, como o fator de pluripotência OCT4A, confere características mais primitivas e agressivas às células tumorais, frequentemente associadas ao prognóstico clínico desfavorável. Fundamentado na hipótese da existência das células-tronco tumorais (CTT) e sua contribuição na progressão tumoral, o presente estudo pré-clínico teve como objetivo identificar novos biomarcadores moleculares em tumores embrionários agressivos do SNC e avaliar novas abordagens terapêuticas capazes de destruir as CTT. A análise de proteomica e sequenciamento de microRNAs (miRNAs) presentes em microvesículas (MVs) derivadas de quatro linhagens celulares de meduloblastoma (DAOY, CHLA-01-MED, D283-MED e USP13-MED) identificou 464 proteínas e 10 miRNAs comumente expressos nas células tumorais com superexpressão de OCT4A. O estudo global de interação dessas proteínas e miRNAs exclusivamente expressas nas MVs derivadas das células tumorais com maior agressivas revelaram alteração em vias de sinalização como ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGF/EGFR, e principalmente vias envolvidas com a auto renovação de células-tronco embrionárias (CTE). Dentre os fatores encontrados expressos nas MVs derivadas de células com superexpressão de OCT4A, quatro proteínas (UBE2M, HNRNPCL2, HNRNPCL3, HNRNPCL4) e cinco miRNAs (miR-4449, miR-500b, miR-3648, miR-1291, miR-3607) não apresentam relatos de expressão em tecidos normais, plasma ou soro sanguíneo. O miR-367, importante para a manutenção do estado pluripotente em CTE, também apresentou aumento dos níveis de expressão nas MVs derivadas de linhagens celulares de tumores embrionários do SNC com superexpressão de OCT4A. A inibição do miR-367 diminuiu significativamente a proliferação e invasão celular, a atividade clonogênica e a capacidade de gerar neuroesferas em todas as linhagens celulares de tumores embrionários do SNC. Em modelo pré-clínico de camundongos Balb/C Nude submetido ao xenoenxerto de tumores embrionários com superexpressão de OCT4A, foi demostrado que injeções seriadas do miR-367 *inhibitor* diretamente no líquido cefaloraquidiano foram capazes de inibir a progressão tumoral e aumentar significativamente a sobrevida *in vivo*. Neste mesmo estudo, foi comprovado que o SUZ12, componente do complexo PRC2

envolvido com o silenciamento epigenético de fatores de pluripotência, incluindo o gene *POU5F1* que codifica o OCT4A, é alvo direto do miR-367. Por fim, visto que o vírus ZIKA (ZIKV) infecta preferencialmente células progenitoras neurais (NPCs), enquanto neurônios não são susceptíveis a infecção, inibindo a proliferação das células alvo, como também induzindo a diferenciação prematura e morte por apoptose, o efeito oncolítico do ZIKV também foi avaliado em tumores embrionários do SNC cujas células tumorais apresentam propriedades de células-tronco. A ZIKV infectou seletivamente e causou morte celular nas células tumorais de origem neural, porém o mesmo não foi observado nas células oriundas de tumor humanos mais comuns como tumor próstata, colorretal e mama. Em ensaio de cultura 3D, o ZIKV foi capaz de destruir as esferas de tumores embrionários do SNC com mais eficiência quando comparadas com neuroesferas normais formadas a partir de NPCs. Em ensaio *in vivo*, uma única injeção intracerebroventricular contendo mil partículas virais do ZIKV brasileiro foi capaz de aumentar significativamente a sobrevida de camundongos com tumores embrionários de origem humana, diminuir o tamanho do tumor, os sítios metastáticos, e apresentar remissão completa do tumor em vários animais. Adicionalmente, células tumorais com fenótipo molecular similar às NPCs e com ativação anormal da via de sinalização Wnt apresentaram maior suscetibilidade aos efeitos oncolíticos do ZIKV. Portanto, ao realizar a modulação da via Wnt, foi observado uma alteração significativa na infecção e morte celular causada pelo ZIKV.

Deste modo, podemos concluir que diversas proteínas e miRNAs foram encontradas presentes exclusivamente em MVs derivadas de células tumorais com superexpressão de OCT4A e poderiam ser utilizadas como biomarcadores de agressividade em meduloblastoma. Adicionalmente, os ensaios *in vitro* e *in vivo* evidenciaram o miR-367, envolvido na regulação da auto renovação de CTE, como oncomiR e possível alvo terapêutico no tratamento de tumores embrionários do SNC. Além disso, o ZIKV demostrou potente e seletivo efeito oncolítico nas células tumorais do SNC com caráter progenitor e apresentou níveis de infecção mais proeminente nas células com alta expressão basal de Wnt/β-catenina. Portanto, os resultados pré-clínicos encontrados no presente estudo evidenciam novos biomarcadores de células tumorais agressivas com perfil de células-tronco, que podem ser explorados em futuras pesquisas translacionais de refinamento do diagnóstico clínico, estratificação de pacientes, detecção precoce de recidiva tumoral, além de revelar novas abordagens terapêuticas direcionadas às CTTs, beneficiando os pacientes afetados com tumores embrionários do SNC cujas terapias convencionais não são efetivas.

ABSTRACT

Embryonal tumors of central nervous system (CNS) are the most fatal pediatric tumors occurring in young children. Treatment of these aggressive CNS tumors may also result in serious long-term sequelae, affecting the patient's quality of life. Several studies have demonstrated that activation of genes encoding proteins typically expressed in stem cells, such as the pluripotency factor OCT4A, confers more primitive and aggressive features to tumor cells. These stem-like features in cancer cells are often associated with unfavorable clinical prognosis. The aim of this preclinical study was to identify new molecular markers of aggressive embryonal CNS tumor cells and evaluate new therapeutic approaches capable of killing these stem-like tumor cells of the CNS. The rationale of this study considered the existence of the so called cancer stem cells (CSC) and their contribution to tumor progression. Proteome analysis and miRNA sequencing of microvesicles (MVs) derived from four distinct medulloblastoma cell lines (DAOY, CHLA-01-MED, D283-MED, and USP13-MED) identified a common set of 464 proteins and 10 microRNAs associated with aggressive OCT4A-overexpressing tumor cells. The interactome mapping of these exclusive proteins and miRNAs revealed ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGF/EGFR, and embryonic stem cell (ESC) self-renewal as the main oncogenic signaling pathways altered in these aggressive medulloblastoma cells. Of these MV cargos, four proteins (UBE2M, HNRNPCL2, HNRNPCL3, HNRNPCL4) and five miRNAs (miR-4449, miR-500b, miR-3648, miR-1291, miR-3607) have not been previously reported in MVs from normal tissues.

The miR-367 was another new ESC-related miRNA found up-regulated in embryonal CNS tumor cells overexpressing OCT4A. Inhibition of miR-367 in these cells significantly reduced their proliferative and invasive behavior, clonogenic activity, and tumorsphere generation capability. Therapeutic targeting of miR-367 *in vivo*, through direct injections of a specific inhibitor in the cerebrospinal fluid (CSF) of Balb/C Nude mice bearing OCT4A-overexpressing tumor xenografts, inhibited tumor development and improved overall survival. miR-367 was also shown to target SUZ12, one of the core components of the PRC2 complex known to be involved in epigenetic silencing of pluripotency-related genes, including *POU5F1* encoding OCT4A. Finally, considering that the Zika virus (ZIKV) prominently infects and kills neural stem and progenitor cells (NPCs), we also tested whether ZIKV would have the same effects in CNS embryonal tumors, given that these tumors are originated from NPC aberrations and are comprised by cells

with neural stem cell-like features. When evaluating the oncolytic properties of Brazilian ZIKV strain against human breast, prostate, colorectal and embryonal CNS tumor cell lines, a selective infection of CNS tumor cells, followed by a massive tumor cell death, was verified. Notably, ZIKV was more efficient in destroying embryonal CNS tumorspheres than normal stem cell neurospheres. A single intracerebroventricular injection of ZIKV in BALB/c nude mice bearing orthotopic human embryonal CNS tumor xenografts resulted in significantly longer survival, decreased tumor burden, fewer metastasis and complete remission in some animals. Tumor cells closely resembling neural stem cells at the molecular level and with activated Wnt signaling were more susceptible to ZIKV oncolytic effects. Furthermore, modulation of Wnt signaling pathway significantly affected ZIKV-induced tumor cell death and viral shedding.

In conclusion, several proteins and miRNA were identified exclusively in MVs from OCT4A-overexpressing tumor cells, which might serve as biomarkers of aggressive stem-like medulloblastoma cells. The miR-367 involved in ESC self-renewal displayed properties typical of oncomiRs as indicated by *in vitro* and *in vivo* assays, supporting its eligibility as a therapeutic target in embryonal CNS tumor cells. Also, ZIKV displayed potent and selective oncolytic effects toward human embryonal CNS tumor cells, at low infection rates. These effects were more prominent in tumors generated by neural stem–like cancer cells with high Wnt/β-catenin basal activity. Altogether, these preclinical findings open opportunities of future translational studies to evaluate new putative biomarkers of aggressive stem-like tumor cells in refining diagnosis, patient stratification, and early detection of relapsed disease, while also revealing novel therapeutic approaches targeting these stem-like tumor cells that could benefit patients affected by CNS tumors lacking effective treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

- SNC: Sistema Nervoso Central
- CTT: células-tronco tumorais
- miRNAs: microRNAs
- MVs: microvesículas
- CTE: células-tronco embrionárias
- ZIKV: vírus ZIKA
- NPCs: células progenitoras neurais (*neural progenitor cells*)
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- ATRT: tumor teratóide rabidóide atípico
- iPS: células-tronco pluripotentes induzidas
- TEM: transição epitélio-mesenquimal

INTRODUÇÃO GERAL

No último século, devido à rápida urbanização e aos avanços na área da saúde, o cenário das principais causas de morte por doença no mundo apresentou significativa mudança de modo que o câncer passou a ocupar o primeiro lugar nos 50 países mais desenvolvidos e o segundo lugar no ranking dos 40 países em desenvolvimento (BRAY; SOERJOMATARAM, 2015). Deste modo, em 2012 o câncer foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em todo o mundo (GLOBOCAN 2018). Acredita-se ainda que esse taxa de mortalidade aumente exponencialmente nos próximos anos devido ao envelhecimento da população e a adoção de comportamentos que aumentam o risco da doença (TORRE et al., 2016). Portanto, a mortalidade relacionada ao câncer é um problema de saúde pública que preocupa muitos países inclusive o Brasil.

Estatísticas publicadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) registraram no Brasil um aumento de 31% nos casos de mortes associadas ao câncer, alcançando uma mortalidade de 223,4 mil brasileiros no final de 2015. Em pesquisa recente realizada por Fidler e colaboradores, foi possível concluir que os óbitos correlacionados ao câncer representaram uma perda de 4,6 bilhões de dólares na economia do Brasil e aproximadamente 53,3 mil dólares por pessoa economicamente ativa, desconsiderando-se os gastos com internação e medicamentos (FIDLER; BRAY; SOERJOMATARAM, 2018). Mesmo que os avanços tecnológicos na medicina tenham aumentado a sobrevida de certos pacientes oncológicos nos últimos anos, os prejuízos financeiros correlacionados ao câncer continuam crescendo. Dentre as explicações para esse crescente, temos as sequelas do tratamento terapêutico ao paciente que impossibilitam sua reinserção à comunidade economicamente ativa.

Devido a essa problemática, a comunidade científica, juntamente com incentivos privados e públicos, têm empenhado grandes esforços para proporcionar diagnósticos mais precoces e tratamentos mais efetivos para os diversos tipos de tumores.

1. Heterogeneidade Tumoral

A grande dificuldade de tratamento e diagnóstico dos vários tipos de tumores decorre de sua alta complexidade biológica e molecular. O câncer é caracterizado por um complexo sistema de alterações genéticas e epigenéticas que afeta desde atividades intracelulares à nível molecular bem como comunicações entre células e órgão distantes (DU; ELEMENTO, 2015). Em cada um desses níveis biológicos do tumor, o padrão de interações genéticas se mantém complexo, o que dificulta a identificação de fatores chaves para a progressão tumoral e, consequentemente, o desenvolvimento de terapias mais efetivas. Ao avaliar o perfil genômico, as células tumorais apresentam uma constante instabilidade com altas taxas de mutações em genes e moduladores epigenéticos importantes para a manutenção celular (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010; SHIH et al., 2012; SUVA; RIGGI; BERNSTEIN, 2013; VOGELSTEIN et al., 2013).

Além da instabilidade genômica, existe também um importante papel do microambiente local no qual a célula tumoral está inserida. Essa interação entre as células tumorais e o microambiente local pode ser realizada (1) através da secreção direta de fatores da célula tumoral para o meio ou (2) através da liberação de microvesículas derivadas das células tumorais (CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015). Como o tumor frequentemente apresenta ampla heterogeneidade, os vários subtipos celulares, com diferentes perfis de expressão e propriedades funcionais, contribuirão de maneira diversificada ao microambiente, atribuindo maior complexidade à progressão tumoral (QUAIL; JOYCE, 2013). Essas subpopulações de células presentes em uma mesma massa tumoral, com marcadores de superfície, alterações genéticas e estágios de diferenciação diferentes foi definido recentemente como heterogeneidade intra-tumoral (CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015).

Os estudos sobre a heterogeneidade intra-tumoral são importantes do ponto de vista clínico, pois apresentam um relevante potencial no delineamento de novas terapias devido a capacidade única de alguns subtipos celulares resistirem aos tratamentos atuais (CABRERA;

HOLLINGSWORTH; HURT, 2015). Este interesse clínico ganhou expressiva força com a identificação de uma subpopulação celular com características de células-tronco (NGUYEN et al., 2012). Definidas como células-tronco tumorais (CTT), essa subpopulação possui a capacidade de se auto renovar e abastecer o tumor com novas células progenitoras e diferenciadas, como também são frequentemente insensíveis às terapias utilizadas atualmente, atribuindo assim maior agressividade ao tumor (HUANG; ROFSTAD, 2017). Deste modo, muitos pesquisadores acreditam que as CTTs são as células iniciadoras do tumor e responsáveis pela heterogeneidade intra-tumoral.

Não obstante, a presença das CTTs é insuficiente para explicar o surgimento dos diferentes tipos de tumores originados de um mesmo órgão, ou seja, a existência da heterogeneidade "inter-tumoral", que se refere as diferenças moleculares, clínicas e histopatológicas de um mesmo tipo de tumor (VISVADER, 2011). Para tal, é preciso definir de maneira clara as diferenças entre heterogeneidade inter-tumoral e intra-tumoral.

O esquema da figura 1 mostra a diferenciação normal de uma célula que se inicia com a célula-tronco pluripotente progressivamente gerando células progenitoras cada vez mais comprometidas com a diferenciação até a produção de células maduras que constituem os tecidos (Figura 1A). Células em diferentes estágios do desenvolvimento podem sofrer alteração genética ou epigenética levando a transformação neoplásica (Figura 1B). Deste modo, uma célula progenitora que sofreu a transformação neoplasia gera uma célula tumoral com caráter progenitor, ou seja, as células-de-origem do tumor apresentam o perfil de expressão correspondente ao seu estágio original do desenvolvimento. Porém, dependendo da natureza da mutação, uma célula diferenciada também pode gerar uma CTT desde que genes responsáveis pela manutenção do caráter progenitor sejam alterados durante a transformação neoplásica. Assim sendo, o fenótipo da célula-de-origem pode mudar dependendo do tipo de evento oncogênico que ocorrer. Deste modo, células diferenciadas podem dar origem à célula tumoral com caráter progenitor desde que a natureza do evento oncogênico seja característico de células progenitoras (Figura 1B).

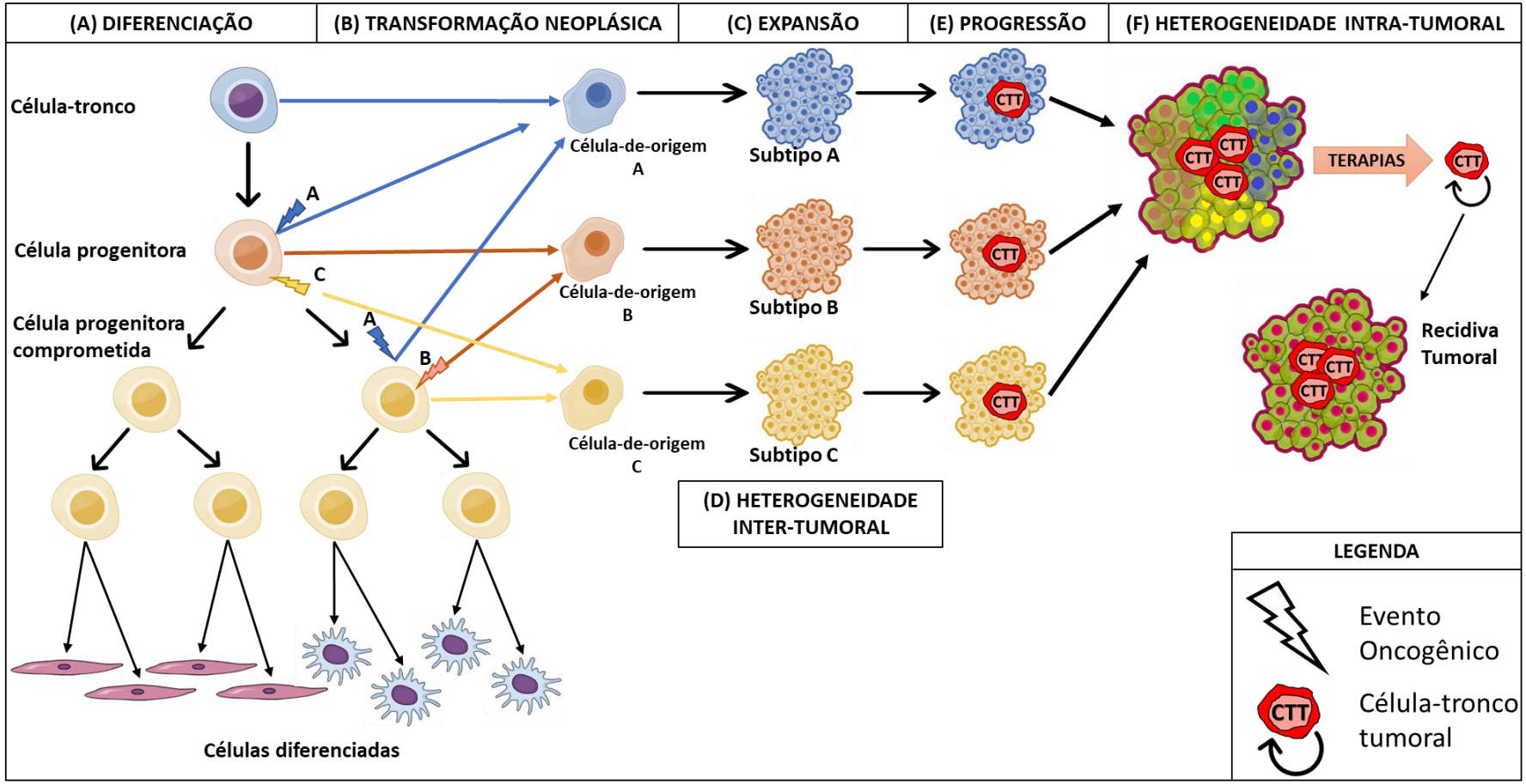


Figura 1: A célula-de-origem do tumor e a evolução da célula-tronco tumoral. (A) A diferenciação normal de uma célula se inicia com a célula-tronco pluripotente (azul) que gera células progenitoras (laranja) e mais comprometidas (amarela) até a produção de células diferenciadas. (B) Células-de-origem do tumor em diferentes estágios de diferenciação submetidas à transformação neoplásica após evento oncogênico de perfil tronco (raio A, em azul), progenitor (raio B, em laranja) ou diferenciado (raio C, em amarelo). (C) Expansão e crescimento da massa tumoral. (D) Heterogeneidade inter-tumoral. Cada massa tumor apresentará perfil correspondente à sua célula-de-origem. (E) Progressão tumoral. A origem progenitora da célula neoplásica somado ao acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas durante a progressão do tumor podem resultar no surgimento de uma célula-tronco tumoral (CTT). (F) Heterogeneidade intra-tumoral atribuído devido à presença da subpopulação de CTTs. Após os tratamentos terapêuticos, essas células seriam responsáveis pelo reabastecimento e recidiva tumoral por serem mais resistentes às terapias atuais.

Durante expansão e crescimento do câncer, cada tumor apresentará um perfil molecular correspondente à sua célula-de-origem, resultando na heterogeneidade inter-tumoral (Figura 1C). Assim, a heterogeneidade inter-tumoral é atribuída pela presença de uma célula-de-origem diferente para cada subtipo tumoral, ou seja, àquela célula normal submetida ao evento de mutação promotora da transformação neoplásica (VISVADER, 2011). Portanto, a massa tumoral pode progredir de forma benigna característica de células diferenciadas com baixa taxa proliferativa ou pode apresentar um perfil de expressão mais progenitor, o que geralmente atribui maior agressividade tumoral. Do ponto de vista clínico, os estudos sobre a heterogeneidade inter-tumoral buscam melhorar a estratificação clínica dos pacientes para uma adequação mais efetiva do tratamento terapêutico (FRIEDMANN-MORVINSKI; VERMA, 2014).

A origem progenitora da célula neoplásica somado ao acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas durante a progressão do tumor podem resultar no surgimento de uma CTT (Figura 1E). Neste modelo dinâmico, tumores originados de células diferenciadas também podem sofrem uma reprogramação celular através da expressão aberrante de fatores de pluripotência dando origem à CTT (VERMEULEN et al., 2012). A presença da subpopulação de CTTs atribui heterogeneidade intra-tumoral devido a sua capacidade de auto renovação e, após os tratamentos, essas células seriam responsáveis pelo reabastecimento e recidiva tumoral por serem mais resistentes às terapias atuais (Figura 1E). Portanto, a heterogeneidade intra-tumoral, se refere a progressão do tumor e a existência das CTTs, a subpopulação de células com características de células-tronco e responsáveis pelo reabastecimento e propagação do tumor (CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015) (Figura 1E).

O surgimento de uma CTT pode ocorrer tanto no subtipo tumoral originado de uma célula progenitora, como também células tumorais diferenciadas podem adquirir mutações que induzam a reprogramação e o surgimento de uma célula tumoral com perfil de célula-tronco (NGUYEN et al., 2012). Além de atribuir maior heterogeneidade ao tumor devido a sua capacidade de gerar diferentes tipos de células, a presença de CTTs está clinicamente correlacionado ao pior

prognóstico de pacientes com diversos subtipos tumorais pois seriam as células responsáveis pelo reabastecimento do tumor uma vez que são capazes de resistir às terapias atuais (HUANG; ROFSTAD, 2017; PANOSYAN et al., 2010; ZHAO et al., 2014).

Portanto, apesar de muitos estudos tratarem as células-de-origem e CTTs de modo equivalente, se referem à conceitos genuinamente distintos que se relacionam de maneira complexa (VISVADER, 2011). Essa dinâmica do fenótipo tumoral atribuído pela relação entre a célula-de-origem e as CTTs é bem representado pelos tumores do SNC.

2. Tumores do Sistema Nervoso Central

Como podemos ver na figura 2, os tumores do SNC correspondem atualmente há 13 tipos histológicos diferentes e cada tipo tumoral apresenta vários subtipos com células-de-origem diferentes (heterogeneidade inter-tumoral) (OSTROM et al., 2016).

No Brasil, os tumores do SNC correspondem ao 10° tipo tumoral mais incidente, com aproximadamente 500 mil casos por ano e uma mortalidade de 86% dos pacientes (GLOBOCAN 2018). A alta letalidade associada às graves sequelas motoras e cognitivas, afetando significativamente a qualidade de vida do paciente, está correlacionada à baixa efetividade dos tratamentos terapêuticos disponíveis (OSTROM et al., 2016). Os tumores malignos do SNC correspondem a classe de neoplasias que menos respondem às terapias atuais quando comparados aos outros canceres mais comuns como tumor de próstata, mama e cólon retal (DOLECEK et al., 2012). A dificuldade na efetividade dos tratamentos existentes reflete a alta heterogeneidade inter- e intra-tumoral dos tumores do SNC. Tal constatação é devido à diversidade de perfil histológico, genéticos, epigenéticos e anomalias cromossômicas observadas em cada tipo tumoral do SNC, sugerindo células-de-origem e mutações oncogênicas distintas (TAYLOR et al., 2005; VISVADER, 2011).

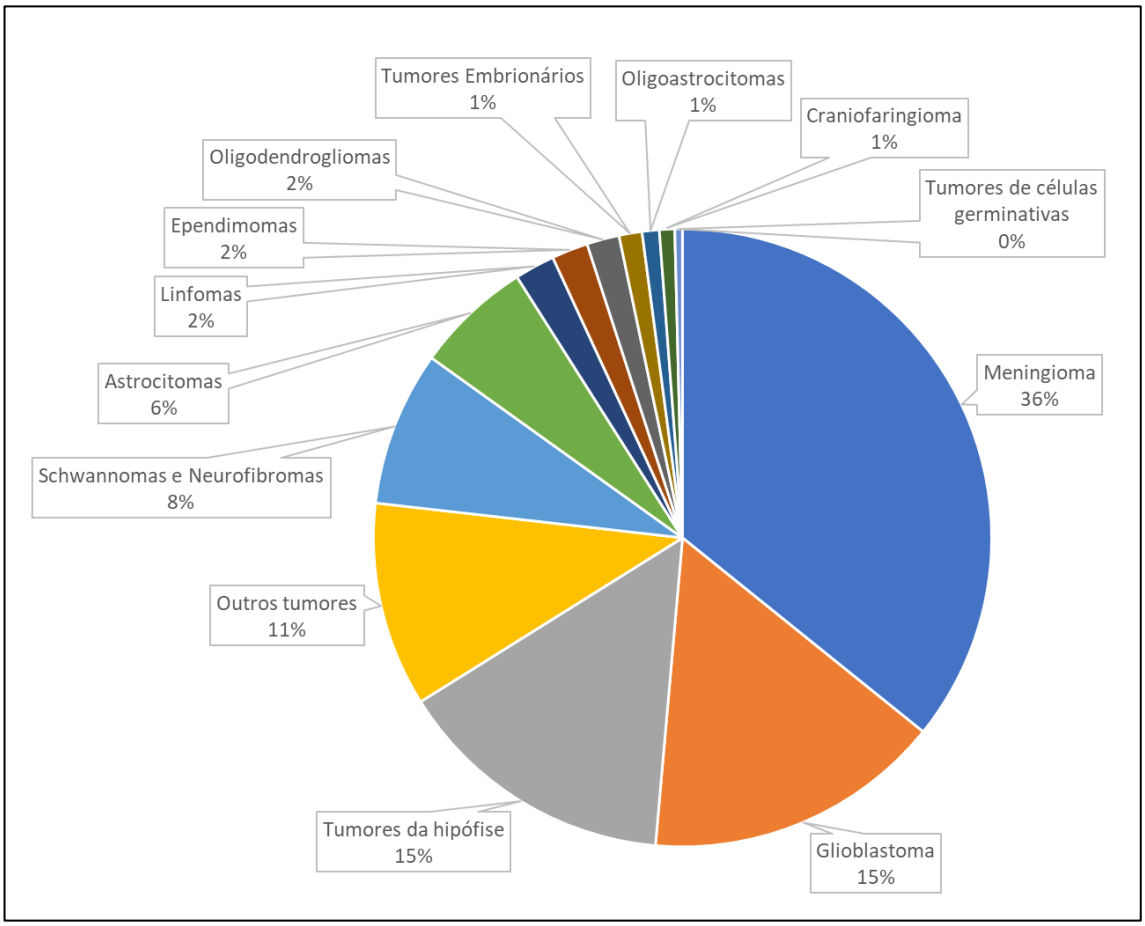


Figura 2: Distribuição dos diferentes tipos de tumores primários do SNC (n: 326,711). Dados de 2006-2010 (*CBTRUS Statistical Report:* NPCR e SEER). Adaptado de Ostrom et al, 2013. Dentre os tumores apresentados, os gliomas representam 28%. Ao considerar apenas os tumores malignos, os gliomas representam 80% e os tumores embrionários do SNC estão em segundo lugar com 3,3%.

Os principais tumores malignos do SNC em adultos e crianças (0-14 anos) são, respectivamente, o glioblastoma e os tumores embrionários (OSTROM et al., 2016). Juntos, eles representam a principal causa de morte associada aos tumores sólidos malignos do SNC. Além da alta letalidade, o glioblastoma e os tumores embrionários do SNC compartilham a expressão de marcadores pluripotentes e a presença da subpopulação de CTTs, proporcionando maior agressividade na progressão desses tumores (HUANG et al., 2010; SINGH et al., 2003). A origem do glioblastoma é a partir das células gliais presentes no indivíduo adulto, que adquirem o perfil tronco-tumoral após modificações genética e epigenéticas (ALCANTARA LLAGUNO; XIE; PARADA, 2016). Por outro lado, células em um estado mais progenitor foram identificadas como

as células-de-origem dos tumores embrionários do SNC (HO et al., 2015; MARSHALL et al., 2014).

A ativação anormal de vias do desenvolvimento neural, como a via Hedgehog (SHH), em células granulares progenitoras neurais dão origem ao tumor embrionário mais frequente em crianças, o meduloblastoma, porém o mesmo não é observado em tumores de origem glial como os astrocitomas ou oligodendrogliomas (SCHÜLLER et al., 2008; YANG et al., 2008). Devido a origem dos tumores embrionários do SNC e a sua malignidade ser associada a presença da subpopulação de CTTs, esses tumores são um modelo experimental importante no estudo da biologia do câncer e na elaboração de novas terapias mais efetivas.

2.1. Tumores Embrionários do SNC

Mais de 70% dos tumores embrionários do SNC incidentes são representados pelo meduloblastoma e o tumor teratóide rabidóide atípico (ATRT) (FISCHER-VALUCK et al., 2017; HO et al., 2000). Os outros 30% são tumores raros classificados como tumores embrionários não-meduloblastoma (tumor embrionário com roseta multicamadas; meduloepiteliomas; neuroblastoma do SNC; ganglioneuroblastomas do SNC) (LOUIS et al., 2016). O meduloblastoma é o tumor sólido pediátrico mais incidente (56% dos casos de tumores embrionário do SNC) e se localiza no cerebelo, região do encéfalo responsável pela manutenção do equilíbrio, controle do tônus muscular e dos movimentos voluntários (NORTHCOTT et al., 2012b). O ATRT, responsável por 20% dos casos de tumores embrionários do SNC, pode ocorrer tanto na região infratentorial como na supratemporal, porém é mais comum no cerebelo, por isso foi por muito tempo clinicamente confundido com o meduloblastoma (HO et al., 2000).

Originados a partir de células progenitoras neurais, os meduloblastomas e os ATRTs são histologicamente formados por células hipercromáticas, com citoplasma pequeno e alta atividade mitótica (SHAH; UBHALE; SHAH, 2015). Ambos são clinicamente considerados tumores malignos de Grau IV e, diferentemente dos outros tumores primários do SNC, o meduloblastoma

e ATRT frequentemente geram metástases em outras regiões do SNC, podendo se disseminar pelo líquido cefalorraquidiano e espalhar a metástase por todo o neuroeixo (encéfalo e medula espinhal) e, mais raramente, podem gerar metástases na medula óssea, linfonodos e pulmão (GUERREIRO STUCKLIN et al., 2018).

O prognóstico clínico dado ao paciente no momento do diagnóstico é definido pela extensão do tumor, idade do paciente, presença de tumor residual pós-cirúrgico e histopatológica do tumor, deste modo, o paciente é clinicamente dividido em médio e alto risco. Pacientes menores de 3 anos, ou com tumor residual pós-cirúrgico, ou com presença de metástase são automaticamente classificados como grupo de alto risco (PIETSCH et al., 2014). Caso o paciente não apresente nenhuma dessas características, a classificação é realizada pelo tipo histopatológico do tumor: 1- Tipo Clássico (menos agressivo); 2- Tipo Desmoplásico/Nodular (agressividade intermediária); 3- Tipo Nodular Extenso (agressividade intermediária); 4- Tipo Células-Grandes / Anaplásico (alta agressividade) (Figura 3).

Não obstante, um terço dos pacientes de médio risco, submetidos à doses mais brandas de quimioterapia e radioterapia, apresentam um desfecho clínico semelhante aos pacientes de alto risco e, em sua maioria, sucumbem a doença (RODINI et al., 2012). Diante deste prognóstico adverso, muitos estudos moleculares procuram desvendar a origem da agressividade dos tumores embrionários para identificação de novos alvos terapêuticos e biomarcadores de pior prognóstico com o intuito de aprimorar a estratificação clínica dos pacientes. A descoberta de subgrupos moleculares representou um avanço fundamental para a compreensão dos tumores embrionários do SNC e sua grande heterogeneidade inter-tumoral.

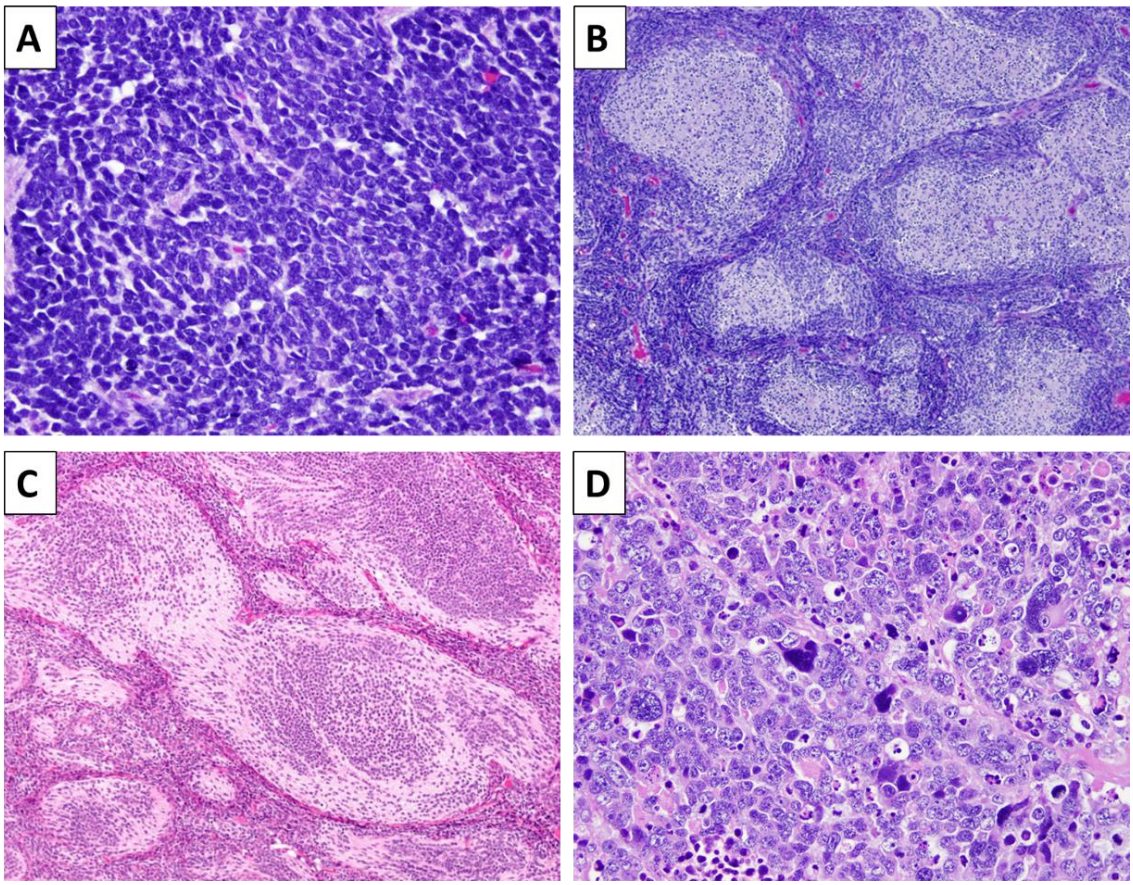


Figura 3: Tipos histopatológicos de meduloblastoma. (A) Clássico. (B) Desmoplásico/Nodular. (C) Nodular extenso. (B) Células-Grande/Anaplásico. Adaptado de http://neuropathology-web.org.

O meduloblastoma, tumor maligno do SNC mais comum em crianças de zero a quatro anos, foi o primeiro a ser classificado em quatro subgrupos moleculares após consenso internacional realizado em 2012 (TAYLOR et al., 2012). Baseado em estudos de transcriptoma do genoma, perfil de metilação do DNA e características clínico-patológicas de 200 amostras primárias de pacientes com meduloblastoma, foi possível identificar quatro subgrupos moleculares. Dois subgrupos demostraram ativação anormal de vias importantes para o desenvolvimento neural, a via Wnt e SHH (PARSONS et al., 2011). Os outros dois subgrupos de meduloblastoma (Grupo 3 e Grupo 4), são mais heterogêneos, com baixa taxa de mutação, múltiplas alterações nos números de cópias do DNA, alta agressividade e pior sobrevida (JONES et al., 2012). Deste modo, apesar de muitos estudos clínicos e moleculares terem avançado após essa classificação consenso, a heterogeneidade molecular e clínica permaneceu irresoluta,

principalmente quando correlacionados a evolução da doença (LOUIS et al., 2016). Mais recentemente, o estudo que utilizou uma nova análise de bioinformática chamada de "fusão de vias similares" (*similarity network fusion – SNF*) aplicado à dados de expressão gênica, metilação de DNA, variações somáticas no número de cópias no DNA (VNCs) e características clínicas de 763 amostras primárias de meduloblastoma, foi possível identificar 12 subgrupos diferentes do meduloblastoma (CAVALLI et al., 2017) (Figura 4). Nesta nova classificação molecular, as características clínicas como idade, histologia, presença de metástase e sobrevida por 5 anos livre da doença variam significativamente entre os 12 subtipos.

O subgrupo WNT, caracterizado pela presença de mutações que levam a uma ativação anormal da via Wnt, representa 9% de todos os casos de meduloblastoma e apresenta um prognóstico favorável com uma sobrevida livre da doença de 97-100% após 5 anos. Os estudos de Cavalli e colaboradores identificaram um grupo de pacientes adultos com 12,8% mais chances de desenvolver metástase, quando comparado com pacientes pediátricos do subgrupo WNT, subdividindo esse subgrupo em WNT α e WNT β (CAVALLI et al., 2017). Além da idade e presença de metástase e uma monossomia no cromossomo 6 foi comumente encontrada no subgrupo WNT α.

O segundo subgrupo mais frequente, o SHH, com 29% de incidência, foi subdividido em 4 novos grupos: SHH α; SHH β; SHH γ; SHH δ. Com o pior prognóstico, o subgrupo SHH α compreende a pacientes de 3-16 anos e apresenta diversas alterações genéticas e cromossômicas que culminam na classificação dos pacientes como alto risco. Em destaque está a amplificação dos genes *MYCN, GLI2 e YAP1,* mutação no *TP53*, e deleções cromossomas nas regiões 9q, 10q e 17q.

Subgrupo (frequência)		WNT (9%)		SHH (29%)				GRUPO 3 (19%)			GRUPO 4 (43%)		
Subtipo (frequência dentro do subgrupo)		WNT α (70%)	WNT β (30%)	SHH α (29%)	SHH β (16%)	SHH γ (21%)	SHH δ (34%)	Grupo 3α (47%)	Grupo 3β (26%)	Grupo 3γ (28%)	Grupo 4α (30%)	Grupo 4β (33%)	Grupo 4γ (37%)
Dados Clínicos	Idade (anos)	0-10	>10	0-10	0-3	0-3	>17	0-10	3-17	0-10	3-17	3-17	3-17
	Histologia *	CL	CL	CG DN	DN	NE DN	DN	CL CG/A	CL CG/A	CL CG/A	CL CG/A	CL CG/A	CL CG/A
	Metástase	8,6%	21,4%	20%	33%	8,9%	9,4%	43,4%	20%	39,4%	40%	40,7%	38,7%
	Sobrevida (até 5 anos)	97%	100%	69,8%	67,3%	88%	88,5%	66,2%	55,8%	41,9%	66,8%	75,4%	82,5%
Alterações cromossômicas, genéticas e epigenéticas**		Ativação via WNT Monossomia chr6	Ativação via WNT	Alteração via SHH *MYC* amp, *GLI2* amp, *YAP1* amp, *Mutação TP53*	Alteração via SHH Perda de *PTEN*	Alteração via SHH	Alteração via SHH Mutações no promotor de *TERT*	Deleções nos chr 8, 10 e 11. Amplificação no chr 7 i17q	Ganho de função em *OTX2* Perda de função em *DDX31* Alta expressão de *GFI1/1B*	Amplificação no chr 7 i17q *MYC* amp	Deleções nos chr 8p Amplificação no chr 7q *MYCN* amp i17q	Duplicação de *SNCAIP* i17q	Deleções nos chr 8p Amplificação no chr 7q I17q (perda) *CDK6* amp

Figura 4: **Sumário dos 12 subtipos moleculares de meduloblastoma.** Representação esquemática das características clínicas e alterações na expressão gênica, metilação de DNA e variações somáticas no número de cópias de DNA dos 4 principais subgrupos (WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4) que subdividem o meduloblastoma em 12 diferentes subtipos moleculares. Amostragem de 763 tumores primários. *Tipos histológicos: Clássico (CL); Células Grandes / Anaplásico (CG/A), Desmoplásico/Nodular (DN); Nodular Extenso (ND). **Alterações cromossômicas como deleções, amplificações e isocromossomo 17q (i17q) e alterações genéticas e epigenéticas que acarretam o aumento de expressão (amp) de diversos genes. (Adaptado de Cavalli et al. 2017)

Os subgrupos SHH β e SHH γ compreendem os pacientes com idade menor que 3 anos e se diferenciam entre si pela taxa de metástase (33,3% no SHH β contra 9,4% do SHH γ) e, consequentemente, pior prognóstico do subgrupo SHH β. Geneticamente, o subgrupo SHH β se caracteriza por deleções focais no gene *PTEN*. Já o subgrupo SHH γ apresenta baixas taxas de alterações nos números de cópias, sem deleções e amplificações recorrentes, sendo principalmente identificado pelo tipo histológico nodular/desmoplásico. Pacientes adultos com meduloblastoma foram separados no subgrupo SHH δ, apresentam um prognóstico favorável e são fortemente enriquecidos com mutações no promotor do gene *TERT*.

O Grupo 3, considerado o grupo com pior prognóstico dentro do meduloblastoma (NORTHCOTT et al., 2012a), foi subdividido em 3 subgrupos com sobrevidas distintas: Grupo 3α (sobrevida em 5 anos de 66,2%); Grupo 3β (sobrevida em 5 anos de 55,8%); Grupo 3γ (sobrevida em 5 anos de 41,9%). Apesar de ambos os Grupo 3α e o Grupo 3γ corresponderem aos pacientes mais jovens (< 3 anos) e apresentarem frequências similares de disseminação de metástase, o Grupo 3γ exibe a sobrevida mais baixa quando comparado com todos os subgrupos de meduloblastoma, provavelmente devido à amplificação do gene *MYC* encontrada nesses tumores. O Grupo 3β compreende pacientes pediátricos maiores que 3 anos e é caracterizado pela perda e amplificação de *DDX31* e *OTX2*, respectivamente, ocasionando a ativação do oncogene *GF11/1B* (CAVALLI et al., 2017).

Compreendendo os tumores mais heterogêneos e menos estudados, o Grupo 4 é o mais predominante (> 40%) dentro todos os casos de meduloblastoma e muito frequentemente apresentam metástases (NORTHCOTT et al., 2012a). A nova classificação molecular dividiu o Grupo 4 em três novos grupos: Grupo 4α; Grupo 4β; Grupo 4γ. Clinicamente, os três subgrupos se diferenciam pela ligeira diferença de idade dos pacientes do Grupo 4α (8,22 anos), Grupo 4β (10 anos) e Grupo 4γ (7 anos), porém todos apresentam valores similares de sobrevida e ocorrência de metástase. Apesar de apresentarem deleções cromossômicas na posição i17q, eles se diferenciam geneticamente pela amplificação do gene *MYCN*, duplicação de *SNCAIP* e

amplificação de *CDK6*, ocorrendo respectivamente nos Grupo 4α, Grupo 4β e Grupo 4γ. O Grupo 4 permanece pouco caracterizado com necessidade de mais estudos para sua devida caracterização, estratificação e terapia aplicada.

Essa classificação molecular apresenta duas implicações imediatas no refinamento da estratificação clínica de risco dos pacientes:

1- Mutações no gene supressor tumoral *TP53* são um indicativo específico de alto risco para o grupo SHH, uma vez que são enriquecidos apenas no subgrupo SHH α. Apesar de ser identificado como novo grupo apenas em 2017, pacientes do subgrupo SHH com mutação em *TP53* já eram classificados como pacientes de risco mais elevado (sobrevida de <50 %) e priorizados nos tratamentos com terapias alternativas na Europa e América do Norte (RAMASWAMY et al., 2016);

2- A presença de amplificações no gene *MYC e MYCN* permitiu identificar pacientes de alto risco nos subgrupos de meduloblastoma mais heterogêneos e carentes de estudo, o Grupo 3 e Grupo 4.

Semelhantemente, o ATRT, segundo tumor embrionários do SNC mais frequente e principal causa de morte associada à tumores sólidos em crianças de zero à dois anos, foi recentemente dividido em três subgrupos molecularmente distintos (JOHANN et al., 2016). A classificação molecular do ATRT representou um avanço promissor no tratamento e diagnóstico deste tumor devido à heterogeneidade inter-tumoral evidente. Clinicamente, o diagnóstico histopatológico do ATRT é realizado pela presença de células rabdóides, elementos neuroectodermais e mesenquimais, somado à expressão negativa do marcador proteíco SNF5 (*chromatin-remodeling complex subunit*), ocasionado por mutações presentes no gene *SMARCB1* ou *SMARCA4* (HASSELBLATT et al., 2014; HO et al., 2015) (Figura 5). Porém, cerca de 2 a 25% dos pacientes histopatologicamente diagnosticados como ATRT apresentam expressão positiva para SNF5 e nenhuma mutação em *SMARCB1* ou *SMARCA4* (HABERLER et al., 2006;

JACKSON et al., 2009). Além disso, apesar do ATRT ter uma sobrevida média de apenas 3 (BUSCARIOLLO et al., 2012) e 18 (GINN; GAJJAR, 2012) meses para os pacientes com e sem metástase, respectivamente, existe um pequeno grupo com prognóstico mais favorável e, se identificado com antecedência, poderia ser submetido à doses mais brandas de quimio- e radioterapia, evitando as sequelas cognitivas do tratamento.

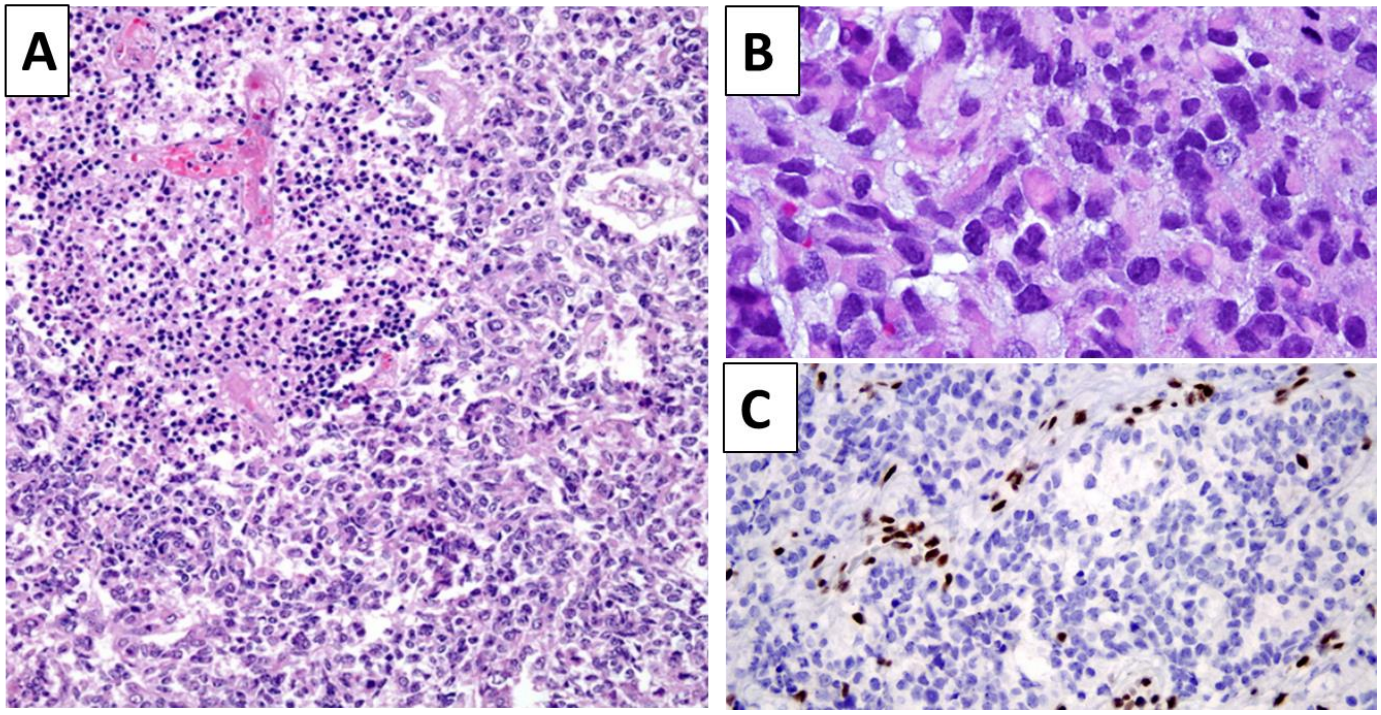


Figura 5: Histopatologia de ATRT. (A) Com perfil semelhante ao teratoma, o ATRT apresenta grande variedade no padrão histológico, composto por células grandes, com ou sem características rabdóides e presença de elementos mesenquimais e epiteliais. (B) Células rabdóides de ATRT. (C) Imunomarcação de SNF5. Células vasculares normais associadas ao tumor marcadas com SNF5 (marrom). Células tumorais negativas para SNF5 (azul). Adaptado de http://neuropathology-web.org.

Além da mutação recorrente de *SMARCB1*, nenhuma mutação adicional foi encontrada para diferenciar a heterogeneidade inter-tumoral após sequenciamento do genoma completo e transcriptoma de 192 amostras primárias de ATRT (JOHANN et al., 2016). De acordo com o estudo de Johann e colaboradores, apenas a análise epigenética global do genoma possibilitou a identificação de três subgrupos molecularmente distintos, associados às diferenças na localização do tumor, no tipo de mutação em *SMARCB1* e dados demográficos. Ou seja, os subgrupos

nomeados como ATRT-TYR, ATRT-SHH e ATRT-MYC, são geneticamente semelhantes, porém epigeneticamente distintos.

Como apresentado resumidamente na figura 6, o subgrupo ATRT-TYR, mais frequente na região infratentorial, é caracterizado pela superexpressão de genes melanossomais, como *MITF* e *TYR*. O subgrupo ATRT-SHH é caracterizado pela alteração na via SHH associada à alta expressão de *MYCN* e *GLI2*. Outros genes como *ASCL1*, *HES5/6* e *DLL1/3* também estão superexpressos em ATRT-SHH com alteração na via de NOTCH. A alta expressão do oncogene *MYC* caracteriza o subgrupo ATRT-MYC, associado também a altos níveis de *HOTAIR* e genes da família *HOX*. Todas essas alterações indicam possíveis marcadores oncogênicas que podem ser futuramente avaliados como alvos terapêuticos (JOHANN et al., 2016).

Subtipos de AT/RT			TYR	SHH	MYC
Dados Clínicos	Localização do tumor	Supratentorial	23,4%	54%	61,1%
		Infratentorial	76,5%	45,9%	38,8%
Sequenciamento	Genoma	Principal alteração em *SMARCB1*	Perda do chr 22q	Sem alteração	Deleção focal
	RNA	Vias ativadas	Melanogenese	Via do SHH	-
		Alvos terapêuticos	*EZH2, DNMTs, CCND1, VEGFA, ERBB2*	*EZH2, DNMTs, CDK6*	*MYC*, família *HOX, EZH2, DNMTs, ERBB2*
	Bisulfito	Perfil de metilação	Hipermetilação (sem PMDs)	Hipermetilação (alguns PMDs)	Hipometilação (muitos PMDs)
		Fatores de transcrição enriquecidos	OTX2, LMX1A	GLI2, FOXK1	MYC, REST
	ChIP	*Enhancers* específicos	*TYR, MITF, CCND1*	*GLI2, PTCH2*	*MYC, HOXC*
		Análise de interações de vias	*OTX2 e MITF*	*SOX11, MN1, GLI2*	*MYC, RARG, PLXND1*

Figura 6: Sumário dos 3 subtipos moleculares de ATRT. Dados clínicos de localização supra- e infratentorial do tumor representados em porcentagem referente à cada subtipo. As diferentes características genéticas foram identificadas após sequenciamento do Genoma e RNA/transcriptoma (SNV/variantes estruturais). Características epigenéticas foram identificadas após sequenciamento de bissulfito (níveis de metilação e elementos regulatórios) e imunoprecipitação de cromatina (ChIP) (*enhancer*, analise específica de interação entre vias). (Adaptado de Johann et al. 2016)

Adicionalmente, analisando conjuntamente as classificações moleculares de meduloblastoma e ATRT, é possível identificar a importância de alteração de vias do desenvolvimento neural, como via Wnt e SHH, para o surgimento do tumor.

A via Wnt e SHH estão ativas em fases mais iniciais do desenvolvimento e são silenciadas durante a diferenciação neural (CORDEIRO et al., 2014). Acredita-se que a célula-de-origem de alguns subgrupos de tumores embrionários do SNC podem ser células progenitoras que adquirem mutações impedindo a inibição dessas vias, acarretando ao evento de transformação neoplásica, como seria o caso dos subgrupos WNT e SHH de meduloblastoma e ATRT-SHH (MARSHALL et al., 2014). Porém, os subgrupos mais agressivos são acrescidos de alterações genéticas e epigenéticas que acarretam na alta expressão de genes tipicamente presentes em células-tronco embrionárias (CTE) como, por exemplo, o gene MYC nos grupos 3 e 4 de meduloblastoma e ATRT-MYC.

Outros genes tipicamente expressos em CTE também foram correlacionados ao pior prognóstico de muitos tumores, como por exemplo a alta expressão de OCT4A (DA SILVA et al., 2017; RODINI et al., 2010), *SOX2* (MANSOURI et al., 2016), *c-MYC* (ROUSSEL; ROBINSON, 2013) e *L1TD1* (SANTOS et al., 2015) em meduloblastoma, e *LIN28B* tanto em ATRT (CHOI et al., 2016; WEINGART et al., 2015) como também em meduloblastoma (HOVESTADT et al., 2014). Esses fatores de transcrição, além de serem importantes para a manutenção do estado pluripotente de CTEs, também são capazes de realizar a reprogramação de uma célula somática para um estado indiferenciado, gerando as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Portanto, a expressão anormal de fatores de pluripotência em células tumorais pode induzir a dediferenciação e formação da CTT com alta capacidade proliferativa e auto-renovação, atribuindo maior agressividade aos tumores (FRIEDMANN-MORVINSKI; VERMA, 2014).

Na tentativa de encontrar expressão alterada de fatores de pluripotência correlacionados ao pior prognóstico de paciente com meduloblastoma erroneamente classificados como de médio

risco, estudo realizado por nosso grupo de pesquisa encontrou uma correlação positiva entre a expressão de OCT4A e a sobrevida desfavorável dos pacientes (RODINI et al., 2010). Posteriormente, experimentos funcionais demostraram que a superexpressão estável de OCT4A em linhagens celulares de meduloblastoma humano aumentou a agressividade *in vitro* e *in vivo* (DA SILVA et al., 2017). Esses resultados indicaram o OCT4A como possível marcador de pior prognóstico e alvo terapêutico. Porém, como o OCT4A é um fator de transcrição que regula diversos fatores e vias importantes na célula, incluindo modificadores epigenéticos e miRNAs, a concretização de terapias baseadas nesta abordagem requerem estudos que envolvam toda a sua complexidade regulatória.

Durantes as pesquisas de caracterização das células de tumores embrionários do SNC com superexpressão estável de OCT4A, foi identificado o aumento de expressão do miR-367 (KAID et al., 2015b). Este miRNA é altamente expresso em células embrionários e capaz de realizar a reprogramação ao estado pluripotente de uma célula diferenciada, com maior eficiência que a realizada com os fatores de Yamanaka (OCT4A, SOX2, KLF-4 e cMYC) apenas com a superexpressão da sua família de miRNAs (miR-302/367) (KUO et al., 2012). Em estudo funcional realizado pelo nosso grupo, foi visto que a superexpressão transiente de miR-367 aumentou a proliferação, invasão e características de células-tronco em linhagens celulares de meduloblastoma humano, apresentando efeito semelhante ao observado nas células com superexpressão de OCT4A (DA SILVA et al., 2017; KAID et al., 2015b).

Do ponto de vista terapêutico, existem diversas vantagens no uso de miRNAs como novos alvos para a fabricação de drogas antitumorais. Os miRNAs são oligonucleotídeos de tamanho reduzido (aproximadamente 24 pb) com atuação no citoplasma, sem haver a necessidade de integração no genoma, e amplo potencial de ação nas células com poder de regular simultaneamente até dois mil alvos (SHALABY et al., 2014a). A participação dos miRNAs na regulação da expressão gênica durante os estágios iniciais da embriogênese e sua correlação com a tumorigênese está bem estabelecido na literatura (BERARDI et al., 2012). Muitos miRNAs já

foram identificados como responsáveis pelo controle da proliferação e diferenciação de CTEs, como também correlacionados à progressão de CTTs (KAID et al., 2015b).

Nos tumores embrionários do SNC, diversos miRNAs foram identificados como potenciais indicadores de prognóstico, inclusive o miR-367 foi encontrado circulante no líquido cefaloraquidiano de pacientes com tumores pediátricos malignos sendo indicado como possível marcador de agressividade (MURRAY et al., 2016). Atualmente, existem aproximadamente 20 estudos clínicos baseados no uso de miRNAs como alvos terapêuticos e indicadores de prognóstico porém, até o momento, nenhum deles foi aplicado ao uso clínico dos tumores pediátricos, os que menos respondem às terapias atuais (CHAKRABORTY et al., 2017).

Infelizmente, os tratamentos disponíveis para esse tipo de tumor cerebral maligno com alta mortalidade não são efetivos e as terapias aplicadas causam inúmeros efeitos adversos naqueles que sobrevivem, afetando significativamente a qualidade de vida dos pacientes (FISCHER-VALUCK et al., 2017; JOHNSTON et al., 2018). O tratamento de pacientes diagnosticados com tumor embrionário do SNC inicia com a cirurgia para ressecção total ou parcial do tumor e confirmação histopatológicos seguido de quimioterapia e radioterapia para pacientes maiores de 3 anos. Para os pacientes menores de 3 anos não é indicado inicialmente a radioterapia devido efeitos adversos da radiação no desenvolvimento cerebral, que incluem debilitação do desenvolvimento neurológico e cognitivo, crescimento e funções endócrinas (LAUGHTON et al., 2008). Mesmo que a criança não seja submetida as doses de radioterapia, a maioria dos pacientes apresentam efeitos colaterais pós-cirúrgicos como atraso na fala, paralisia supranuclear, ataxia, hipotonia e labilidade emocional causados pela lesão cerebral e hidrocefalia relacionadas ao crescimento do tumor (STARGATT et al., 2007). A longo prazo, os sobreviventes são afetados com deficiências intelectuais, neurológicas e físicas, bem como óbito causado por recidiva tumoral, disfunção neurocognitiva, derrames cerebrais e acidentes cardiovasculares (RALEIGH et al., 2017).

Nos casos de tumores recorrentes, os pacientes que já esgotaram todas as opções de tratamentos tradicionais são encaminhados às terapias moleculares e tratamentos em fase de experimentação clínica. Mesmo após todo o conhecimento molecular gerado sobre os tumores embrionários do SNC, um único medicamento chamado de Vismodegibe (Erivedge® Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.), inibidor do gene *PTCH1* da via SHH, é utilizado atualmente, porém apenas nos pacientes com meduloblastoma classificados no subgrupo SHH com altos níveis de *PTCH1* ou *SMO* (ROBINSON et al., 2015). Para aumentar a aplicação clínica de alvos moleculares, que geralmente não apresentam efeitos colaterais aos pacientes, mais estudos clínicos e pré-clínicos devem ser iniciados.

Diante do exposto, é possível identificar duas problemáticas no estudo dos tumores embrionários do SNC: 1- Identificação de biomarcadores de agressividade para melhor estratificação clínica dos pacientes, tendo em vista a expressão alterada de fatores de pluripotência, inclusive o OCT4A, no grupo que apresenta evolução desfavorável da doença; 2- Identificação de novos alvos terapêuticos para um tratamento mais efetivo aos pacientes com pior prognóstico, levando em consideração às características heterogênicas da doença atribuídos pela célula-de-origem, que culminou na iniciação do câncer, como também pela presença de CTTs e sua participação na progressão mais agressiva do tumor. O presente estudo investigou os principais desafios abordados até o momento, e apresenta duas potentes abordagens terapêuticas; além de possíveis biomarcadores de diagnóstico para esse tipo de tumor pediátrico tão agressivo.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Identificação de possíveis biomarcadores de agressividade e novos alvos terapêuticos em tumores embrionários do SNC.

Objetivos Específicos:

1- Identificar miRNAs e proteínas expressas em MVs derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma humano, com e sem superexpressão estável de OCT4A, como marcadores de agressividade. (Capítulo 1)

2- Avaliar em um modelo pré-clínico o potencial do miR-367 como possível alvo terapêutico em linhagens celulares de tumores embrionários do SNC com expressão alterada de OCT4A. (Capítulo 2)

3- Avaliar o possível efeito oncolítico do vírus ZIKA em linhagens celulares de tumores embrionários do SNC. (Capítulo 3)

CONCLUSÕES

1. A técnica de ultracentrifugação aplicada no estudo foi capaz de isolar vesículas celulares com características morfológicas e marcadores de superfície típicos de MVs. A análise de proteomica e sequenciamento de miRNAs presentes nas MVs derivadas de quatro linhagens celulares de meduloblastoma (DAOY, CHLA-01-MED, D283-MED e USP13-MED) identificou 464 proteínas e 10 miRNAs comumente expressos nas células tumorais com superexpressão de OCT4A. O estudo global de interação dessas proteínas e miRNAs exclusivamente expressas nas MVs derivadas das células tumorais com superexpressão de OCT4A revelaram alteração em vias de sinalização como ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGF/EGFR, e principalmente vias envolvidas com a auto renovação de CTE como o gene TRIM71. Dentre os fatores encontrados expressos nas MVs derivadas de células com maior agressividade, quatro proteínas (UBE2M, HNRNPCL2, HNRNPCL3, HNRNPCL4) e cinco miRNAs (miR-4449, miR-500b, miR-3648, miR-1291, miR-3607) nunca foram associados às amostras de tecidos normais, plasma ou soro sanguíneo.
2. O miR-367 foi encontrado expresso em MVs derivadas de linhagens celulares de tumores embrionários do SNC. A superexpressão de OCT4A aumentou os níveis do miR-367 nas MVs derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma. A inibição do miR-367 diminuiu significativamente a proliferação e invasão celular, a atividade clonogênica e a capacidade de gerar neuroesferas em todas as linhagens celulares de tumores embrionários do SNC. Em modelo pré-clínico de camundongos Balb/C Nude submetido ao xenoenxerto de tumores embrionários com superexpressão de OCT4A, injeções seriadas do miR-367 *inhibitor* diretamente no líquido cefaloraquidiano foram capazes de inibir a progressão tumoral e aumentar significativamente a

sobrevida *in vivo.* Foi comprovado através do ensaio clássico de “luciferase repórter” que o SUZ12 é alvo direto do miR-367.

3. O ZIKV é capaz de infectar e causar morte por necrose de células de tumores embrionários do SNC. O ZIKV infecta a linhagem de próstata DU-145, porém sem causar 100% de morte na cultura celular. O ZIKV é incapaz de infectar a linhagem celular de tumor de mama (MCF-7) e tumor de cólon-retal (HCT-8). Em ensaio de cultura 3D, o vírus ZIKA destrói as esferas de tumores embrionários do SNC com mais eficiência quando comparado com neuroesferas normais formadas a partir de NPCs. Em ensaio *in vivo*, uma única injeção intracerebroventricular contendo mil partículas virais do ZIKV é capaz de aumentar significativamente a sobrevida de camundongos com tumores embrionários de origem humana, diminuir o tamanho do tumor, os sítios metastáticos, e apresentar remissão completa do tumor em vários animais. O ZIKV oriundo do meio de cultura, pós infecção das células tumorais, apresenta baixa viabilidade e incapaz de infectar NPCs normais. Células tumorais com fenótipo molecular similar às NPCs e com ativação anormal da via de sinalização Wnt apresentaram maior suscetibilidade aos efeitos oncolíticos do ZIKV. A modulação da via Wnt altera significativamente a infecção e morte celular causada pelo ZIKV.

ANEXOS

ANEXO 1

Revista Científica: *Cancer Science*

Data de Publicação: 06 de agosto de 2015

Fator de Impacto: 4.372

Número de Citações: 13

Cancer Science

Japanese Cancer Association JCA

Open Access

miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells

Carolini Kaid, Patrícia B. G. Silva, Beatriz A. Cortez, Carolina O. Rodini, Patricia Semedo-Kuriki and Oswaldo K. Okamoto

Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

Key words

Cancer stem cell, medulloblastoma, microRNA, miR-367, pluripotency

Correspondence

Oswaldo K. Okamoto, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil.
Tel: (55 11) 3091-7501; Fax: (55 11) 3091-7553;
E-mail: keith.okamoto@usp.br

Funding Information

This work was supported by funds from FAPESP-CEPID (2013/08028-1), FAPESP (2010/52686-5), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). CK, PBGS, COR, and BAC were recipients of FAPESP fellowships (2013/02983-1; 2011/10001-9; 2013/17566-7; 2014/10519-6).

Received February 25, 2015; Revised June 10, 2015; Accepted June 30, 2015

Cancer Sci **106** (2015) 1188–1195

doi: 10.1111/cas.12733

In medulloblastoma, abnormal expression of pluripotency factors such as LIN28 and OCT4 has been correlated with poor patient survival. The miR-302/367 cluster has also been shown to control self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, but there is limited, mostly correlational, information about these pluripotency-related miRNA in cancer. We evaluated whether aberrant expression of such miRNA could affect tumor cell behavior and stem-like traits, thereby contributing to the aggressiveness of medulloblastoma cells. Basal expression of primary and mature forms of miR-367 were detected in four human medulloblastoma cell lines and expression of the latter was found to be upregulated upon enforced expression of ***OCT4A***. Transient overexpression of miR-367 significantly enhanced tumor features typically correlated with poor prognosis; namely, cell proliferation, 3-D tumor spheroid cell invasion and the ability to generate neurosphere-like structures enriched in CD133 expressing cells. A concurrent downregulation of the miR-367 cancer-related targets ***RYR3***, ***ITGAV*** and ***RAB23***, was also detected in miR-367-overexpressing cells. Overall, these findings support the pro-oncogenic activity of miR-367 in medulloblastoma and reveal a possible mechanism contributing to tumor aggressiveness, which could be further explored to improve patient stratification and treatment of this important type of pediatric brain cancer.

ANEXO 2

Revista Científica: *Cytotechnology*

Data de Publicação: 10 de setembro de 2015

Fator de Impacto: 1.461

Número de Citações: 2

Cytotechnology
DOI 10.1007/s10616-015-9914-5

ORIGINAL ARTICLE

Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells

Patrícia Benites Gonçalves da Silva · Carolina Oliveira Rodini · Carolini Kaid · Adriana Miti Nakahata · Márcia Cristina Leite Pereira · Hamilton Matushita · Silvia Souza da Costa · Oswaldo Keith Okamoto

Received: 6 May 2015 / Accepted: 2 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Medulloblastoma is a highly aggressive brain tumor and one of the leading causes of morbidity and mortality related to childhood cancer. These tumors display differential ability to metastasize and respond to treatment, which reflects their high degree of heterogeneity at the genetic and molecular levels. Such heterogeneity of medulloblastoma brings an additional challenge to the understanding of its physiopathology and impacts the development of new therapeutic strategies. This translational effort has been the focus of most pre-clinical studies which invariably employ experimental models using human tumor cell lines. Nonetheless, compared to other cancers, relatively few cell lines of human medulloblastoma are available in central repositories, partly due to the rarity of these tumors and to the intrinsic difficulties in establishing continuous cell lines from pediatric brain tumors. Here, we report the establishment of a new human medulloblastoma cell line which, in comparison with the commonly used and well-established cell line Daoy, is characterized by enhanced proliferation and invasion capabilities, stem cell properties, increased chemoresistance, tumorigenicity in an orthotopic metastatic model, replication of original medulloblastoma behavior in vivo, strong chromosome structural instability and deregulation of genes involved in neural development. These features are advantageous for designing biologically relevant experimental models in clinically oriented studies, making this novel cell line, named USP-13-Med, instrumental for the study of medulloblastoma biology and treatment.

Keywords Brain tumor · Cancer · Cell line · Medulloblastoma · Stemness

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10616-015-9914-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. B. G. Silva · C. O. Rodini · C. Kaid · M. C. L. Pereira · S. S. Costa · O. K. Okamoto (✉)
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-090, Brazil
e-mail: keith.okamoto@usp.br

ANEXO 3

Revista Científica: *Oncotarget*

Data de Publicação: 10 de setembro de 2015

Fator de Impacto: 5.168

Número de Citações: 2

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 12), pp: 19192-19204

Research Paper

High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells

Patrícia Benites Gonçalves da Silva[1], Márcia Cristina Teixeira dos Santos[1], Carolina Oliveira Rodini[1], Carolini Kaid[1], Márcia Cristina Leite Pereira[1], Gabriela Furukawa[1], Daniel Sanzio Gimenes da Cruz[2], Mauricio Barbugiani Goldfeder[3], Clarissa Ribeiro Reily Rocha[4], Carla Rosenberg[1], Oswaldo Keith Okamoto[1]

[1]Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[2]Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[3]Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

[4]Departmento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to: Oswaldo Keith Okamoto, **email:** keith.okamoto@usp.br

Keywords: *OCT4A, POU5F1, LIN28A, medulloblastoma, aggressiveness*

Received: *May 26, 2016* ***Accepted:*** *January 22, 2017* ***Published:*** *February 07, 2017*

ABSTRACT

Medulloblastoma is a highly aggressive pediatric brain tumor, in which sporadic expression of the pluripotency factor OCT4 has been recently correlated with poor patient survival. However the contribution of specific OCT4 isoforms to tumor aggressiveness is still poorly understood. Here, we report that medulloblastoma cells stably overexpressing the OCT4A isoform displayed enhanced clonogenic, tumorsphere generation, and invasion capabilities. Moreover, in an orthotopic metastatic model of medulloblastoma, OCT4A overexpressing cells generated more developed, aggressive and infiltrative tumors, with tumor-bearing mice attaining advanced metastatic disease and shorter survival rates. Pro-oncogenic OCT4A effects were expression-level dependent and accompanied by distinct chromosomal aberrations. OCT4A overexpression in medulloblastoma cells also induced a marked differential expression of non-coding RNAs, including poorly characterized long non-coding RNAs and small nucleolar RNAs. Altogether, our findings support the relevance of pluripotency-related factors in the aggravation of medulloblastoma traits classically associated with poor clinical outcome, and underscore the prognostic and therapeutic value of OCT4A in this challenging type of pediatric brain cancer.

ANEXO 4

Revista Científica: *Stem Cells Internacional*

Data de Publicação: 03 de maio de 2017

Fator de Impacto: 3.989

Número de Citações: 1

Hindawi
Stem Cells International
Volume 2017, Article ID 4972078, 10 pages
https://doi.org/10.1155/2017/4972078

Research Article

Inhibition of Lysyl Oxidases Impairs Migration and Angiogenic Properties of Tumor-Associated Pericytes

Aline Lopes Ribeiro, Carolini Kaid, Patrícia B. G. Silva, Beatriz A. Cortez, and Oswaldo Keith Okamoto

Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, Cidade Universitária, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Oswaldo Keith Okamoto; keith.okamoto@usp.br

Received 18 October 2016; Accepted 5 March 2017; Published 3 May 2017

Academic Editor: Dominique Bonnet

Copyright © 2017 Aline Lopes Ribeiro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pericytes are important cellular components of the tumor microenviroment with established roles in angiogenesis and metastasis. These two cancer hallmarks are modulated by enzymes of the LOX family, but thus far, information about LOX relevance in tumor-associated pericytes is lacking. Here, we performed a comparative characterization of normal and tumoral pericytes and report for the first time the modulatory effects of LOX enzymes on activated pericyte properties. Tumoral pericytes isolated from childhood ependymoma and neuroblastoma specimens displayed angiogenic properties in vitro and expressed typical markers, including CD146, NG2, and PDGFRβ. Expression of all LOX family members could be detected in both normal and tumor-associated pericytes. In most pericyte samples, LOXL3 was the family member displaying the highest transcript levels. Inhibition of LOX/LOXL activity with the inhibitor β-aminopropionitrile (βAPN) significantly reduced migration of pericytes, while proliferation rates were kept unaltered. Formation of tube-like structures in vitro by pericytes was also significantly impaired upon inhibition of LOX/LOXL activity with βAPN, which induced more prominent effects in tumor-associated pericytes. These findings reveal a novel involvement of the LOX family of enzymes in migration and angiogenic properties of pericytes, with implications in tumor development and in therapeutic targeting tumor microenvironment constituents.

ANEXO 5

Revista Científica: *Molecular Neurobiology*

Data de Publicação: 11 de novembro de 2017

Fator de Impacto: 5.075

Número de Citações: 1

Mol Neurobiol
https://doi.org/10.1007/s12035-017-0818-6

Down Syndrome iPSC-Derived Astrocytes Impair Neuronal Synaptogenesis and the mTOR Pathway In Vitro

Bruno H. S. Araujo[1,2] · Carolini Kaid[3] · Janaina S. De Souza[4] · Sérgio Gomes da Silva[5,6] · Ernesto Goulart[3] · Luiz C. J. Caires[3] · Camila M. Musso[3] · Laila B. Torres[7] · Adriano Ferrasa[8,9] · Roberto Herai[9] · Mayana Zatz[3] · Oswaldo K. Okamoto[3] · Esper A. Cavalheiro[1]

Received: 17 June 2017 / Accepted: 2 November 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract Several methods have been used to study the neuropathogenesis of Down syndrome (DS), such as mouse aneuploidies, post mortem human brains, and in vitro cell culture of neural progenitor cells. More recently, induced pluripotent stem cell (iPSC) technology has offered new approaches in investigation, providing a valuable tool for studying specific cell types affected by DS, especially neurons and astrocytes. Here, we investigated the role of astrocytes in DS developmental disease and the impact of the astrocyte secretome in neuron mTOR signaling and synapse formation using iPSC derived from DS and wild-type (WT) subjects. We demonstrated for the first time that DS neurons derived from hiPSC recapitulate the hyperactivation of the Akt/mTOR axis observed in DS brains and that DS astrocytes may play a key role in this dysfunction. Our results bear out that 21 trisomy in astrocytes contributes to neuronal abnormalities in addition to cell autonomous dysfunctions caused by 21 trisomy in neurons. Further research in this direction will likely yield additional insights, thereby improving our understanding of DS and potentially facilitating the development of new therapeutic approaches.

Keywords Down syndrome · Induced pluripotent stem cell · mTOR pathway · Astrocyte

Introduction

Down syndrome (DS) is the most common cause of genetic intellectual disability (ID), and its worldwide

ANEXO 6

Revista Científica: *Cancer Research*

Data de Publicação: 15 de junho de 2018

Fator de Impacto: 9.130

Capa da Revista – edição junho/2018

Translational Science

Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells *In Vitro* and *In Vivo*

Carolini Kaid, Ernesto Goulart, Luiz C. Caires-Júnior, Bruno H.S. Araujo, Alessandra Soares-Schanoski, Heloisa M.S. Bueno, Kayque A. Telles-Silva, Renato M. Astray, Amanda F. Assoni, Antônio F.R. Júnior, Daniella C. Ventini, Ana L.P. Puglia, Roselane P. Gomes, Mayana Zatz, and Oswaldo K. Okamoto

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3201 Published June 2018 Check for updates

Article | Figures & Data | Info & Metrics | PDF

Abstract

Zika virus (ZIKV) is largely known for causing brain abnormalities due to its ability to infect neural progenitor stem cells during early development. Here, we show that ZIKV is also capable of infecting and destroying stem-like cancer cells from aggressive human embryonal tumors of the central nervous system (CNS). When evaluating the oncolytic properties of Brazilian Zika virus strain ($ZIKV^{BR}$) against human breast, prostate, colorectal, and embryonal CNS tumor cell lines, we verified a selective infection of CNS tumor cells followed by massive tumor cell death. $ZIKV^{BR}$ was more efficient in destroying embryonal CNS tumorspheres than normal stem cell neurospheres. A single intracerebroventricular injection of $ZIKV^{BR}$ in BALB/c nude mice bearing orthotopic human embryonal CNS tumor xenografts resulted in a significantly longer survival, decreased tumor burden, fewer metastasis, and complete remission in some animals. Tumor cells closely resembling neural stem cells at the molecular level with activated Wnt signaling were more susceptible to the oncolytic effects of $ZIKV^{BR}$. Furthermore, modulation of Wnt signaling pathway significantly affected $ZIKV^{BR}$-induced tumor cell death and viral shedding. Altogether, these preclinical findings indicate that $ZIKV^{BR}$ could be an efficient agent to treat aggressive forms of embryonal CNS tumors and could provide mechanistic insights regarding its oncolytic effects.

June 2018
Volume 78, Issue 12

Table of Contents
Table of Contents (PDF)
About the Cover
Index by Author
Editorial Board (PDF)

Search this issue

Sign up for alerts

View this article with *LENS*

ANEXO 7

Premiação: **3 finalistas do I Prêmio Cientista e Empreendedor do Ano – Instituto Nanocell**

I PRÊMIO CIENTISTA E EMPREENDEDOR DO ANO INSTITUTO NANOCELL

- ANO 2016 -

Instituto Nanocell

CERTIFICADO

Em reconhecimento do grande público pelas suas atividades sociais e da Academia pela sua produção científica certificamos que

CAROLINI KAID DÁVILA

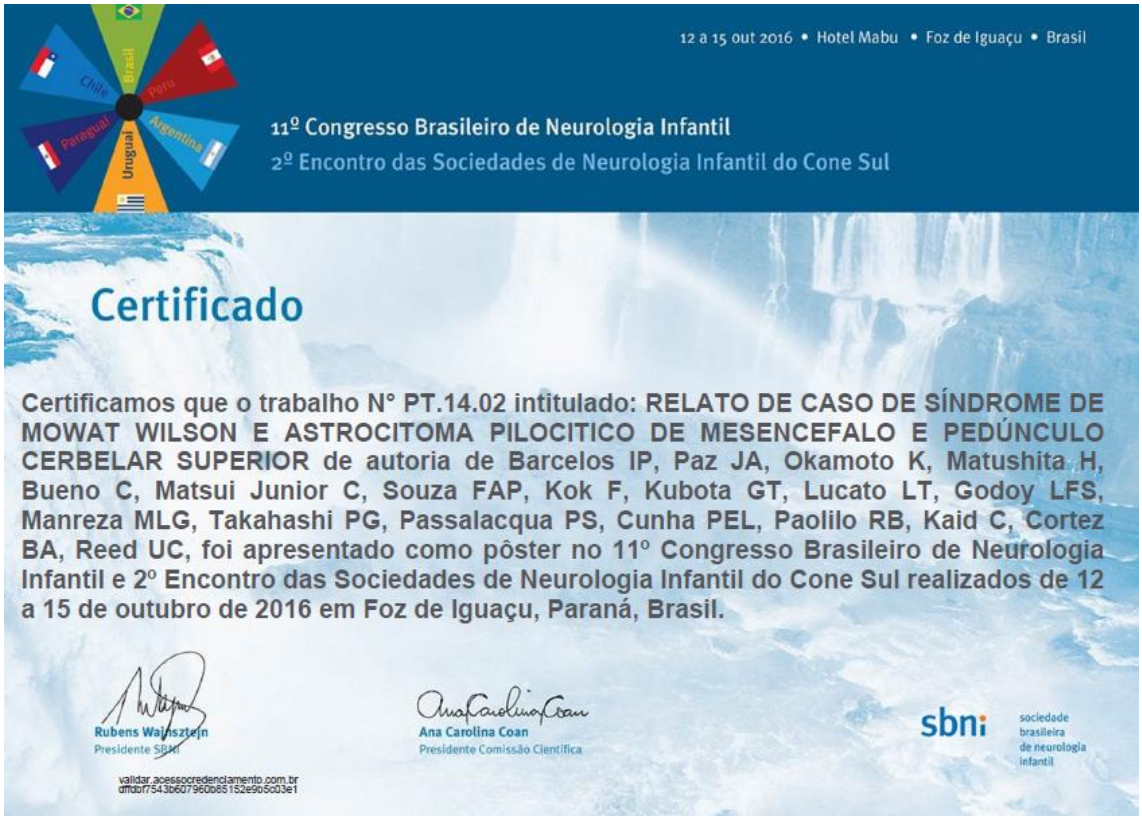
foi um dos 3 finalistas ao I Prêmio Cientista e Empreendedor do ano Instituto Nanocell na categoria de **Aluno** na área de **Pesquisas com células-tronco humanas**

Rodrigo Ribeiro Resende
Presidente do Instituto Nanocell

ANEXO 8

Certificado de Apresentação de trabalho científico em Congresso Nacional:

“RELATO DE CASO DE SÍNDROME DE MOWAT-WILSON E ASTROCITOMA PILOCÍSTICO DE MESENCEFALO E PEDÚNCULO CEREBELAR SUPERIOR.”



12 a 15 out 2016 • Hotel Mabu • Foz de Iguaçu • Brasil

11º Congresso Brasileiro de Neurologia Infantil

2º Encontro das Sociedades de Neurologia Infantil do Cone Sul

Certificado

Certificamos que o trabalho N° PT.14.02 intitulado: RELATO DE CASO DE SÍNDROME DE MOWAT WILSON E ASTROCITOMA PILOCITICO DE MESENCEFALO E PEDÚNCULO CERBELAR SUPERIOR de autoria de Barcelos IP, Paz JA, Okamoto K, Matushita H, Bueno C, Matsui Junior C, Souza FAP, Kok F, Kubota GT, Lucato LT, Godoy LFS, Manreza MLG, Takahashi PG, Passalacqua PS, Cunha PEL, Paolilo RB, Kaid C, Cortez BA, Reed UC, foi apresentado como pôster no 11º Congresso Brasileiro de Neurologia Infantil e 2º Encontro das Sociedades de Neurologia Infantil do Cone Sul realizados de 12 a 15 de outubro de 2016 em Foz de Iguaçu, Paraná, Brasil.

Rubens Wajnsztejn
Presidente SBNI

Ana Carolina Coan
Presidente Comissão Científica

sbni sociedade brasileira de neurologia infantil

validar.acessocredenciamento.com.br
dffdbf7543b607960b85152e9b5c03e1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; XIE, X.; PARADA, L. F. Cell of Origin and Cancer Stem Cells in Tumor Suppressor Mouse Models of Glioblastoma. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, p. 31–36, 2016.

BERARDI, E. et al. miRNAs in ESC differentiation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 303, n. 8, p. H931-9, 15 out. 2012.

BRAOUDAKI, M. et al. Microrna expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms. **Journal of hematology & oncology**, v. 7, n. 1, p. 96, jan. 2014.

BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. **The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control**. [s.l: s.n.].

BUDHU, A.; JI, J.; WANG, X. W. The clinical potential of microRNAs. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, p. 37, 6 out. 2010.

BUSCARIOLLO, D. L. et al. Survival outcomes in atypical teratoid rhabdoid tumor for patients undergoing radiotherapy in a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. **Cancer**, v. 118, n. 17, p. 4212–4219, 1 set. 2012.

BÜSSING, I.; SLACK, F. J.; GROSSHANS, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 14, n. 9, p. 400–9, set. 2008.

CABRERA, M. C.; HOLLINGSWORTH, R. E.; HURT, E. M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 27, 26 jan. 2015.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2 dez. 2018.

CAVALLI, F. M. G. et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 737–754.e6, 12 jun. 2017.

CHAFFER, C. L. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7950–5, 10 maio 2011.

CHAKRABORTY, C. et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 8, p. 132–143, 15 set. 2017.

CHAKRAVADHANULA, M. et al. Wnt pathway in atypical teratoid rhabdoid tumors. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 4, p. 526–35, abr. 2015.

CHOI, S. A. et al. LIN28B is highly expressed in atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) and suppressed through the restoration of SMARCB1. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 1, p. 32, 18 dez. 2016.

CHULPANOVA, D. S. et al. Therapeutic Prospects of Extracellular Vesicles in Cancer Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1534, 3 jul. 2018.

CLEVERS, H. Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469–480, 3 nov. 2006.

CORDEIRO, B. M. et al. SHH, WNT, and NOTCH pathways in medulloblastoma: when cancer stem cells maintain self-renewal and differentiation properties. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 30, n. 7, p. 1165–72, jul. 2014.

CURTIS, C. D.; GRIFFIN, C. T. The Chromatin-Remodeling Enzymes BRG1 and CHD4

Antagonistically Regulate Vascular Wnt Signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 7, p. 1312–1320, 1 abr. 2012.

DA SILVA, P. B. G. et al. High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, 2017.

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275–284, 1 abr. 2005.

DELSIN, L. E. A. et al. Downregulated Adhesion-Associated microRNAs as Prognostic Predictors in Childhood Osteosarcoma. **Pathology & Oncology Research**, 25 set. 2017.

DOLECEK, T. A et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro-oncology**, v. 14 Suppl 5, p. v1-49, nov. 2012.

DONG, S. et al. The Human SRCAP Chromatin Remodeling Complex Promotes DNA-End Resection. **Current Biology**, v. 24, n. 18, p. 2097–2110, 22 set. 2014.

DU, W.; ELEMENTO, O. Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. **Oncogene**, v. 34, n. 25, p. 3215–3225, 15 jun. 2015.

ETHERIDGE, A. et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 85–90, 1 dez. 2011.

FIDLER, M. M.; BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. The global cancer burden and human development: A review. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 46, n. 1, p. 27–36, fev. 2018.

FISCHER-VALUCK, B. W. et al. Assessment of the treatment approach and survival outcomes in a modern cohort of patients with atypical teratoid rhabdoid tumors using the National Cancer Database. **Cancer**, v. 123, n. 4, p. 682–687, 15 fev. 2017.

FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; VERMA, I. M. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. **EMBO reports**, v. 15, n. 3, p. 244–53, mar. 2014.

GINN, K. F.; GAJJAR, A. Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor: Current Therapy and Future Directions. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 114, 2012.

GONG, C. et al. Up-regulation of *miR-21* Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy for Breast Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 21, p. 19127–19137, 27 maio 2011.

GRIFFIN, C. T. et al. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 modulates vascular Wnt signaling at two levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2282–7, 8 fev. 2011.

GUERREIRO STUCKLIN, A. S. et al. Review of molecular classification and treatment implications of pediatric brain tumors. **Current opinion in pediatrics**, v. 30, n. 1, p. 3–9, fev. 2018.

HABERLER, C. et al. Immunohistochemical Analysis of INI1 Protein in Malignant Pediatric CNS Tumors: Lack of INI1 in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors and in a Fraction of Primitive Neuroectodermal Tumors without Rhabdoid Phenotype. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 11, p. 1462–1468, nov. 2006.

HAMILTON, S. R. et al. The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 13, p. 839–847, 30 mar. 1995.

HASSELBLATT, M. et al. SMARCA4-mutated atypical teratoid/rhabdoid tumors are associated with inherited germline alterations and poor prognosis. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 3, p. 453–456, 25 set. 2014.

HENNCHEN, M. et al. Lin28B and Let-7 in the Control of Sympathetic Neurogenesis and Neuroblastoma Development. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16531–44, 16 dez. 2015.

HO, D. M.-T. et al. Integrated genomics has identified a new AT/RT-like yet INI1-positive brain tumor subtype among primary pediatric embryonal tumors. **BMC medical genomics**, v. 8, p. 32, 25 jun. 2015.

HO, D. M. et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a comparative study with primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. **Acta neuropathologica**, v. 99, n. 5, p. 482–8, maio 2000.

HOVESTADT, V. et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 537–41, 26 jun. 2014.

HSIEH, T.-H. et al. Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced malignancy in central nervous system embryonal tumors. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2164–2174, out. 2014.

HUANG, R.; ROFSTAD, E. K. Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 35351–35367, 23 maio 2017.

HUANG, Z. et al. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. **Protein & cell**, v. 1, n. 7, p. 638–55, jul. 2010.

HÜBNER, J.-M. et al. Epidemiology, molecular classification and WHO grading of ependymoma. **Journal of neurosurgical sciences**, v. 62, n. 1, p. 46–50, fev. 2018.

JACKSON, E. M. et al. Genomic Analysis Using High-Density Single Nucleotide Polymorphism-Based Oligonucleotide Arrays and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Provides a Comprehensive Analysis of INI1/SMARCB1 in Malignant Rhabdoid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 1923–1930, 10 mar. 2009.

JOHANN, P. D. et al. Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 379–393, 14 mar. 2016.

JOHNSTON, D. L. et al. Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, p. 1, 9 fev. 2018.

JONES, D. T. W. et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 100–5, 2 ago. 2012.

KAID, C. et al. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. **Cancer Science**, v. 106, n. 9, 2015a.

KAID, C. et al. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. **Cancer science**, 6 jul. 2015b.

KAID, C. et al. Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, p. canres.3201.2017, 26 abr. 2018.

KONGKHAM, P. N. et al. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. **Oncogene**, v. 29, n. 20, p. 3017–3024, 8 maio 2010.

KUNDER, R. et al. Real-time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. **Neuro-Oncology**, v. 15, n. 12, p. 1644–1651, dez. 2013.

KUO, C.-H. et al. A novel role of miR-302/367 in reprogramming. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 1, p. 11–6, 6 jan. 2012.

LAUGHTON, S. J. et al. Endocrine Outcomes for Children With Embryonal Brain Tumors After Risk-Adapted Craniospinal and Conformal Primary-Site Irradiation and High-Dose Chemotherapy With Stem-Cell Rescue on the SJMB-96 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1112–1118, 1 mar. 2008.

LEE, K. et al. ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of β-catenin. **Oncogene**, v. 34, n. 50, p. 6055–6065, 9 dez. 2015.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

MANSOURI, S. et al. Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. **CNS Oncology**, v. 5, n. 3, p. 159–173, jul. 2016.

MARGARITI, A. et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13793–13798, 21 ago. 2012.

MARSHALL, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 4, p. 277–89, abr. 2014.

MELTON, C.; BLELLOCH, R. MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 695, p. 105–17, jan. 2010.

MORA-BLANCO, E. L. et al. Activation of β-catenin/TCF targets following loss of the tumor suppressor SNF5. **Oncogene**, v. 33, n. 7, p. 933–938, 25 fev. 2014.

MURRAY, M. J. et al. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 151–162, 15 jan. 2016.

MURRAY, M. J.; HUDDART, R. A.; COLEMAN, N. The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 12, p. 715–725, 18 dez. 2016.

NANA-SINKAM, S. P.; CROCE, C. M. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 1, p. 98–104, 5 jan. 2013.

NASSER, M. W. et al. Down-regulation of Micro-RNA-1 (miR-1) in Lung Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33394–33405, 28 nov. 2008.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, 1 mar. 2010.

NETH, P. et al. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. **Stem cell reviews**, v. 3, n. 1, p. 18–29, jan. 2007.

NGUYEN, D. T. T. et al. The ubiquitin ligase LIN41/TRIM71 targets p53 to antagonize cell death and differentiation pathways during stem cell differentiation. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 6, p. 1063–1078, 21 jun. 2017.

NGUYEN, L. V et al. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 2, p. 133–43, fev. 2012.

NORTHCOTT, P. A. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 871–84, jul. 2012a.

NORTHCOTT, P. A et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 818–34, dez. 2012b.

OBIER, N. et al. Polycomb Protein EED is Required for Silencing of Pluripotency Genes upon ESC Differentiation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 1, p. 50–61, 19 fev. 2015.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. suppl_5, p. v1–v75, 1 out. 2016.

OZTURK, S. et al. *Epab* and *Pabpc1* Are Differentially Expressed During Male Germ Cell Development. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 9, p. 911–922, 18 set. 2012.

PANOSYAN, E. H. et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. **Pediatric blood & cancer**, v. 55, n. 4, p. 644–51, out. 2010.

PARSONS, D. W. et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6016, p. 435–9, 28 jan. 2011.

PAVLAKIS, E. et al. Interaction between transcription factors PAX6/PAX6-5a and specific members of miR-183-96-182 cluster, may contribute to glioma progression in glioblastoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1579–1592, mar. 2017.

PFISTER, S. M. et al. Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 5, p. 553–66, nov. 2010.

PIETSCH, T. et al. Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. **Acta neuropathologica**, v. 128, n. 1, p. 137–49, jul. 2014.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 1 nov. 2013.

RALEIGH, D. R. et al. Survival after chemotherapy and stem cell transplant followed by delayed craniospinal irradiation is comparable to upfront craniospinal irradiation in pediatric embryonal brain tumor patients. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 131, n. 2, p. 359–368, 24 jan. 2017.

RAMASWAMY, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 821–831, 4 jun. 2016.

RAO, P.; BENITO, E.; FISCHER, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 6, p. 39, 26 nov. 2013.

RIBEIRO, A. L. et al. Inhibition of Lysyl Oxidases Impairs Migration and Angiogenic Properties of Tumor-Associated Pericytes. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

ROBINSON, G. W. et al. Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog–Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 24, p. 2646–2654, 20 ago. 2015.

ROCHA, C. R. R. et al. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1505, jan. 2014.

RODINI, C. O. et al. Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 68, n. 6, p. 947–52, dez. 2010.

RODINI, C. O. et al. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 106, n. 1, p. 71–79, jan. 2012.

RODINI, C. O. et al. Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms. **Oncotarget**, v. 9, n. 37, p. 24766–24777, 15 maio 2018.

ROUSSEL, M. F.; ROBINSON, G. W. Role of MYC in Medulloblastoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 11, p. a014308–a014308, 1 nov. 2013.

SANTOS, M. C. T. et al. Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. **Stem cells and development**, v. 24, n. 22, p. 2700–8, 15 nov. 2015.

SCHREY, D. et al. Multimodal therapy in children and adolescents with newly diagnosed atypical teratoid rhabdoid tumor: individual pooled data analysis and review of the literature. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 1, p. 81–90, 25 jan. 2016.

SCHÜLLER, U. et al. Acquisition of Granule Neuron Precursor Identity Is a Critical Determinant of

Progenitor Cell Competence to Form Shh-Induced Medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 123–134, 12 ago. 2008.

SHAH, H.; UBHALE, B.; SHAH, J. Demographic and histopathologic profile of pediatric brain tumors: A hospital-based study. **South Asian Journal of Cancer**, v. 4, n. 3, p. 146, 2015.

SHALABY, T. et al. Significance and Therapeutic Value of miRNAs in Embryonal Neural Tumors. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5821–5862, 6 maio 2014a.

SHALABY, T. et al. MicroRNA Signatures as Biomarkers and Therapeutic Target for CNS Embryonal Tumors: The Pros and the Cons. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 21554–21586, 24 nov. 2014b.

SHIH, A. H. et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p. 599–612, 17 set. 2012.

SILVA, P. B. G. et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, 2016.

SINGH, M. et al. Brain metastasis-initiating cells: survival of the fittest. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9117–33, jan. 2014.

SINGH, S. K. et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 18, p. 5821–5828, 15 set. 2003.

SNUDERL, M. et al. Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1065–76, 28 fev. 2013.

SREDNI, S. T. et al. Upregulation of mir-221 and mir-222 in atypical teratoid/rhabdoid tumors: potential therapeutic targets. **Child's Nervous System**, v. 26, n. 3, p. 279–283, 10 mar. 2010.

STARGATT, R. et al. Multiple Factors Contribute to Neuropsychological Outcome in Children With Posterior Fossa Tumors. **Developmental Neuropsychology**, v. 32, n. 2, p. 729–748, 3 set. 2007.

STUPP, R.; ROILA, F.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Malignant glioma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 20, n. Supplement 4, p. iv126-iv128, 1 maio 2009.

SUKI, D. et al. Brain metastases in patients diagnosed with a solid primary cancer during childhood: experience from a single referral cancer center. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 14, n. 4, p. 372–385, out. 2014.

SUVA, M. L.; RIGGI, N.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic Reprogramming in Cancer. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1567–1570, 29 mar. 2013.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.

TAKEBE, N. et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch and Hedgehog pathways. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 2, p. 97–106, 14 fev. 2011.

TAYLOR, M. D. et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. **Cancer cell**, v. 8, n. 4, p. 323–35, out. 2005.

TAYLOR, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 465–72, abr. 2012.

TEPLYUK, N. M. et al. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 268–287, 1 mar. 2016.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 1 jan. 2016.

TUKACHINSKY, H. et al. Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand. **Cell Reports**, v. 2, n. 2, p. 308–320, 30 ago. 2012.

VAN ROOIJ, E.; PURCELL, A. L.; LEVIN, A. A. Developing MicroRNA Therapeutics. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 496–507, 3 fev. 2012.

VERMEULEN, L. et al. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. **The lancet oncology**, v. 13, n. 2, p. e83-9, fev. 2012.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–322, 20 jan. 2011.

VITANZA, N. A.; PARTAP, S. Pediatric Ependymoma. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n. 12, p. 1354–1366, 20 out. 2016.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 29 mar. 2013.

WEINGART, M. F. et al. Disrupting LIN28 in atypical teratoid rhabdoid tumors reveals the importance of the mitogen activated protein kinase pathway as a therapeutic target. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3165–77, 20 fev. 2015.

XIA, Z. et al. AURKA Governs Self-Renewal Capacity in Glioma-Initiating Cells via Stabilization/Activation of -catenin/Wnt Signaling. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 1101–1111, 1 set. 2013.

XU, J. et al. Disseminated Medulloblastoma in a Child with Germline BRCA2 6174delT Mutation and without Fanconi Anemia. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 191, 27 ago. 2015.

YANG, Z.-J. et al. Medulloblastoma Can Be Initiated by Deletion of Patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 135–145, 12 ago. 2008.

YOO, J. K. et al. Discovery and Characterization of Novel MicroRNAs During Endothelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 11, p. 2049–2057, 20 jul. 2012.

ZHAO, Y.; XU, K.; LIU, P. Post-Transcriptional Control of Angiotensin II Type 1 Receptor Regulates Osteosarcoma Cell Death. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1581–1589, 2018.

ZHAO, Z. et al. Nestin positively regulates the Wnt/β-catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. **Breast cancer research : BCR**, v. 16, n. 4, p. 408, jan. 2014.

ZHI, F. et al. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 3, p. 383–391, mar. 2015.