

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

PATRÍCIA BENITES GONÇALVES DA SILVA



**Fator de pluripotência OCT4A e agressividade de
meduloblastoma humano**

***Pluripotency factor OCT4A and human
medulloblastoma aggressiveness***

**São Paulo
2016**

PATRÍCIA BENITES GONÇALVES DA SILVA

**Fator de pluripotência OCT4A e agressividade de
meduloblastoma humano**

***Pluripotency factor OCT4A and human
medulloblastoma aggressiveness***

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

Departamento:

Biologia e Genética Evolutiva

Área de Concentração:

Biologia (Genética)

Orientador:

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Silva, Patrícia Benites Gonçalves da

Fator de pluripotência OCT4A e agressividade de meduloblastoma humano / Patrícia Benites Gonçalves da Silva – São Paulo, 2016.

213 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Biologia (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto.

1. Meduloblastoma
2. Célula-Tronco Tumoral
3. OCT4A

I. Okamoto, Prof. Dr. Oswaldo Keith II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Programa de Pós-Graduação Biologia (Genética) III. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Patrícia Benites Gonçalves da

Título: Fator de pluripotência OCT4A e agressividade de meduloblastoma humano

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:	_____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEUA/IB/031/2011
Ref. 2011.1.658.41.6

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 21/06/2011, **APROVOU** o Projeto "Células-tronco mesenquimais e desenvolvimento de tumores intracraniais" – **Protocolo 132/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Mayana Zatz).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. OSWALDO KEITH OKAMOTO

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Fatores de pluripotência e agressividade de tumores malignos do sistema nervoso central**”, protocolo nº 220/2015, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, Colaboradoras: Patrícia Benites Gonçalves da Silva, Carolina Oliveira Rodini, Carolini Kaid e Aline Lopes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências, em reunião de 12 de maio de 2015.

Vigência de Projeto: 01/03/2015 a 01/03/2016

Espécie: *Mus musculus* (Camundongo isogênico) - **Linhagem:** BALB/c Nude

Nº de animais: 60

Peso: 15-20g – **Idade:** 8-12 semanas

Sexo: (M)

Origem dos animais: Biotério da Faculdade de Medicina - USP



Profa. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais





PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de culturas celulares pró-tumorigênicas

Pesquisador: oswaldo keith okamoto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46293315.0.0000.5464

Instituição Proponente: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IBUSP

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.133.432

Data da Relatoria: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

Caracterização de culturas celulares pró-tumorigênicas.

Objetivo da Pesquisa:

Avançar no entendimento dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de tumores malignos no sistema nervoso central.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há Riscos. Benefícios: estudar os mecanismos de origem dos tumores possibilita desenvolver estratégias para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tumores de prognóstico clínico desfavorável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Amostra a ser analisada: células comerciais de tumores malignos do sistema nervoso central obtidas da ATCC (American Type Culture Collection) e células de culturas armazenadas anteriormente obtidas mediante TCLE aprovado pelo CEP-IBUSP-121/2001; Infraestrutura: disponível nos laboratórios do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e no Centro de Estudos do Genoma Humano - IBUSP; Apoio financeiro: FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7624

Fax: (11)3091-7624

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



Continuação do Parecer: 1.133.432

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

SAO PAULO, 01 de Julho de 2015

Assinado por:
CELIA PRISZKULNIK KOIFFMANN
(Coordenador)

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7624

Fax: (11)3091-7624

E-mail: cepibusp@ib.usp.br

Aos meus pais, Jorge e Creusa, por todo o amor e carinho incondicional.

Amo vocês!

Ao meu namorado, Daniel, pela compreensão, carinho e cumplicidade. Te

amo!

A Vilma Gimenes, em memória. Sinto sua falta!

AGRADECIMENTOS



Aos meus pais, Jorge e Creusa. Me recordo como ontem quando pedia ajuda para estudar para as provas do dia seguinte e meu pai, mesmo sem tempo, despendia sua atenção em me auxiliar e me ensinar. Minha mãe sempre cobrando a tabuada. Minha paixão pelos estudos deve-se, principalmente, pelo incentivo e apoio de vocês. Essa conquista também é de vocês!

Ao meu noivo, Daniel Gimenes. Desde o primeiro semestre da graduação você é meu companheiro em absolutamente tudo na vida. Desde os trabalhos mirabolantes, as apresentações megalomaníacas, as madrugadas sem fim escrevendo manuscritos/relatórios, ou mesmo fazendo um zilhão de experimentos. Mas nem tudo se resume a trabalho e agradeço pelo companheirismo e amor que você me proporciona todos os dias.

Ao meu irmão, Rodrigo, e a minha tia, Tania, pelo carinho e suporte de sempre.

À minha segunda família de Londrina, que mesmo a 500 km de distância, consegue se fazer presente todos os dias!

Aos meus amigos de graduação que, apesar de formados, continuam me proporcionando momentos divertidos no decorrer desses quase 9 anos. Não importa a distância.

Às minhas amigas do colégio, Carol, Renata, Nay, Van e Catie. Os anos passam, mas a amizade e carinho continuam. :)

A todos os amigos da FMVZ, pelas conversas, churrascos e agradável convivência.

À Carol Rodini, minha companheira de todo o sempre no laboratório, dos perrengues, das padronizações, ideias e discussão de procedimentos. Sem você não teria atingido 1/10 desse trabalho! Muito obrigada pela ajuda, apoio e companheirismo.

À Kaidoca, louca, que ao mesmo tempo me alegra e pentelha todos os dias no laboratório, mas nos momentos de foco e concentração, me apoia e ajuda sempre que necessário.

À Marcia Santos que, assim como a Carol, se fez presente durante todo o período desse trabalho, me apoiou, me ensinou e me instigou a curiosidade. Mesmo distante, você nos EUA/Bélgica e eu aqui, sempre colaboramos da melhor maneira possível e sei que sentirei muito a sua falta nos caminhos da vida acadêmica.

À Gabriela Furukawa, meu pau para toda obra, que mesmo sem ter mais o que fazer no laboratório, fazia questão de ficar até tarde da noite só para me fazer companhia. Sinto um orgulho muito grande de ter contribuído de alguma forma para a sua formação e ver os seus objetivos serem atingidos. Da mesma forma, agradeço pelos ensinamentos que você me proporcionou durante estes anos.

Ao meu orientador, Keith. Foram 5 anos intensos, que você, de alguma forma, conseguiu me aguentar. Esse meu jeito hiperativo, sempre querendo fazer mais e mais experimento, e quase sem dar atenção aos manuscritos, relatórios.... Obrigada pela paciência e dedicação, pelos ensinamentos e discussões ético-científicas que só me fizeram crescer e instigaram a minha paixão pela ciência.

À todas as meninas do laboratório, Bia, Marina, Tamara, Aline e Amanda. No momento, algumas distante, mas agradeço pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos proporcionados dia-a-dia. Além de o dia ficar mais doce, literalmente, ao lado de vocês! ;)

A todos aqueles que passaram pelo laboratório e contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse projeto. Obrigada Marcia Pereira, Bruno, Adriana, Daniela, Daiana, Isabela, Joanna, Carol Seixas, Rosanna, Sheila, Lucas Sabá, Bruno, Lucas Price, Fábio, Mayara, Natália, Sarah e Thaís!

Ao Thiago Alegria pelos galhos quebrados, pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar. Junto com o Fernando, obrigada pelas risadas e discussões sobre futebol.

À Karina Griesi, pelo auxílio com a geração de vírus no momento em que não sabia nem como iniciar o protocolo. Muito obrigada pela ajuda e disposição.

A todos os alunos dos demais laboratórios do CEPID, por me ajudarem sempre que necessário. Em especial a Lucas Alvizi pela assistência nas análises de *microarray* e Clarissa Ribeiro, pelos incontáveis pedidos de socorro nessa reta final do doutorado.

Aos especialistas do CEPID que me ajudaram sempre. Obrigada Patrícia Semedo, Larissa Bomilcar, Simone Ferreira, Andressa Morales, Sílvia Costa, Lígia Vieira e Naila Lourenço.

À professora Dra. Carla Rosenberg, pela enorme contribuição nos experimentos de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos.

À Helo. Agradeço imensamente por não ficar louca de tantas reviravoltas na aquisição dos animais para a execução desse projeto. Obrigada também por me ajudar a manter os animais sempre nas melhores condições.

A todos os funcionários do IB/USP, por todo auxílio oferecido.

Às agências de fomento, FAPESP, FAPESP/CEPID, CNPq INCT e Capes. A realização desse projeto só foi possível com o suporte de vocês.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

“The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

SILVA, P. B. G. **Fator de Pluripotência OCT4A e agressividade de meduloblastoma humano** [Pluripotency factor OCT4A and aggressiveness of human medulloblastoma]. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016

O meduloblastoma é o tumor maligno do sistema nervoso central mais frequente na infância e adolescência. A expressão de genes tipicamente expressos em células-tronco está correlacionada com pior prognóstico em pacientes com meduloblastoma e a expressão de *POU5F1* se mostrou capaz de distinguir pacientes com desfecho clínico desfavorável e pior sobrevida. Apesar do seu valor prognóstico, não há evidências diretas da contribuição de OCT4 para a aquisição de fenótipos mais agressivos em meduloblastoma. Nesse contexto, o presente trabalho investigou o papel da isoforma OCT4A em características pró-tumorigênicas de meduloblastoma *in vitro* e *in vivo*, e também avaliou as alterações moleculares que podem ser responsáveis pela aquisição de fenótipo mais agressivo em células de meduloblastoma humano. Para tanto, foi realizada a superexpressão de OCT4A mediada por retrovírus em três linhagens celulares de meduloblastoma (Daoy, D283Med e USP-13-Med). As células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A exibiram maior proliferação e alterações no ciclo celular. Foram observados também aumentos na atividade clonogênica, geração de esferas tumorais e desenvolvimento tumoral em modelo subcutâneo, sendo esses efeitos dependentes dos níveis de OCT4A. A avaliação da mobilidade celular *in vitro* demonstrou diminuição na adesão celular e aumento da invasão celular de esferoide 3D. Em modelo ortotópico de meduloblastoma, as células com superexpressão de OCT4A geraram tumores mais desenvolvidos, com fenótipos mais agressivos, infiltrativos e metastáticos. A superexpressão de OCT4A foi associada a maior instabilidade genômica, entretanto, as aberrações em números de cópias variaram em frequência e tipo de alteração dependendo da linhagem celular, e sendo pouco associada com os genes diferencialmente expressos. De forma interessante, uma relevante expressão diferencial de RNAs não-codificadores de proteínas foi observada em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A, incluindo os recém descobertos e pouco caracterizados RNAs não codificadores longos, além de múltiplos RNAs pequenos nucleolares. Assim, os resultados aqui apresentados fundamentam a relevância de fatores envolvidos em pluripotência para o agravamento de traços associados com desfecho clínico desfavorável em meduloblastoma e destacam o valor prognóstico e terapêutico de OCT4A neste tumor pediátrico do sistema nervoso central.

Palavras-Chave: Meduloblastoma, Célula-Tronco Tumoral, OCT4A

ABSTRACT

SILVA, P. B. G. **Pluripotency factor OCT4A and aggressiveness of human medulloblastoma** [Fator de Pluripotência OCT4A e agressividade de medulloblastoma humano]. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in infants. The expression of typical pluripotency genes is correlated with poor prognosis in medulloblastoma and *POU5F1* expression was shown capable of discriminating patients with poor survival outcome. Despite this prognostic value, direct evidences of OCT4 contribution to more aggressive traits in medulloblastoma are missing. In this context, we investigated the role of OCT4A isoform on pro-tumorigenic features of medulloblastoma *in vitro* and *in vivo* and evaluated molecular alterations that could be responsible for acquisition of a more aggressive phenotype in medulloblastoma cells. Retroviral-mediated overexpression of OCT4A were performed in three medulloblastoma cell lines (Daoy, D283Med and USP-13-Med). Medulloblastoma cells overexpressing OCT4A displayed enhanced cell proliferation and cell cycle alterations. Increased clonogenic activity, tumorsphere generation capability and subcutaneous tumor development were also observed, and these effects were OCT4A expression level-dependent. Evaluation of cell mobility *in vitro* showed loss of cell adhesion and greater 3D-spheroid invasion. In an orthotopic model of medulloblastoma, OCT4A overexpressing cells generated more developed, aggressive, infiltrative and metastatic tumors. OCT4A overexpression was associated with chromosomal instability but copy number aberrations varied in frequency and type according to the cell line, with little association with differently expressed genes. Interestingly, marked differential expression of non-coding RNAs, including newly discovered, still poorly characterized, long non-coding RNAs and multiple small nucleolar RNAs were observed in medulloblastoma cells with OCT4A overexpression. 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.

Keywords: Medulloblastoma, Cancer Stem Cell, OCT4A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação histopatológica de meduloblastoma.....	33
Figura 2 - Classificação molecular de meduloblastoma.....	36
Figura 3 - Desenvolvimento cerebelar e meduloblastoma.....	38
Figura 4 - Células de origem do meduloblastoma e subgrupos moleculares. .	39
Figura 5 - Modelo de células-tronco tumorais.....	42
Figura 6 - Regulação de células-tronco tumorais.....	43
Figura 7 - Representação gráfica do gene <i>POU5F1</i> e os produtos derivados de <i>splicing</i> alternativo.....	46
Figura 8 - Fluxograma para análise de transcritos alternativos de <i>POU5F1</i> em células de meduloblastoma humano.....	70
Figura 9 - Posição final dos <i>primers</i> selecionados para amplificação dos diferentes transcritos alternativos do gene <i>POU5F1</i>	71
Figura 10 - Curva de dissociação dos produtos de amplificação dos transcritos alternativos de <i>POU5F1</i>	71
Figura 11 - Análise de <i>amplicons</i> correspondentes a transcritos alternativos de <i>POU5F1</i> , por eletroforese em gel de agarose.....	72
Figura 12 - Alinhamento global das sequências consenso dos <i>amplicons</i> de transcritos alternativos de <i>POU5F1</i> utilizando a plataforma pública <i>on-line</i> do NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.....	73
Figura 13 - Níveis basais de transcritos de <i>POU5F1</i> em células de meduloblastoma humano.....	74
Figura 14 - Fluxograma para superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano.....	75
Figura 15 - Superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano.....	76
Figura 16 - Detecção de isoformas de OCT4 em linhagens de meduloblastoma humano por microscopia de fluorescência.....	77
Figura 17 - Expressão de transcritos alternativos de <i>POU5F1</i> após a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano.....	78
Figura 18 - OCT4A altera a taxa de crescimento e diminui o tempo de dobra populacional de células de meduloblastoma humano.....	79
Figura 19 - Superexpressão de OCT4A afeta o ciclo celular de células de meduloblastoma humano.....	80

Figura 20 - Superexpressão de OCT4A aumenta a capacidade de crescimento independente de ancoragem de células de meduloblastoma humano.	81
Figura 21 - Superexpressão de OCT4A favorece a expansão de colônias de células de meduloblastoma humano em substrato de agarose.	81
Figura 22 - Superexpressão de OCT4A favorece a capacidade de geração de esferas tumorais de células de meduloblastoma humano.	82
Figura 23 - Esferas tumorais geradas por células de meduloblastoma humano com ou sem superexpressão de OCT4A.....	83
Figura 24 - Enriquecimento de células CD133 ^{Hi} em esferas tumorais derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma humano.	85
Figura 25 - Cultivo de esferas tumorais favorece o enriquecimento da população de células de meduloblastoma humano CD133 ^{Hi}	86
Figura 26 - Superexpressão de OCT4A diminuiu a capacidade de adesão celular de células de meduloblastoma humano.	87
Figura 27 - OCT4A não altera a capacidade migratória de células de meduloblastoma humano.	88
Figura 28 - OCT4A não altera significativamente a capacidade migratória de células de meduloblastoma humano.	89
Figura 29 - Superexpressão de OCT4A aumenta a capacidade de invasão de células de meduloblastoma humano.	90
Figura 30 - Curvas dose-resposta para determinação de LC ₅₀ para cisplatina em células de meduloblastoma humano.	91
Figura 31 - Superexpressão de OCT4A afeta a sensibilidade de células de meduloblastoma humano ao tratamento com cisplatina.	92
Figura 32 - Superexpressão de OCT4A favorece a tumorigênese <i>in vivo</i> de células de meduloblastoma humano.	94
Figura 33 - Tumores gerados por células com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia característica de tumores mais agressivos.	95
Figura 34 - Sobrevida de camundongos submetidos a inoculação ortotópica de células de meduloblastoma em modelo metastático.	98
Figura 35 - Tumores metastáticos gerados por células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A apresentam características histopatológicas associadas a alta agressividade.....	101
Figura 36 - Identificação de metástase M3 em coluna vertebral de camundongos inoculados ortotopicamente com células de meduloblastoma da linhagem D283Med.	102

Figura 37 - Superexpressão de OCT4A favorece a metástase de meduloblastoma no neuroeixo de camundongos.	103
Figura 38 - Expressão de <i>LIN28A</i> , <i>SOX2</i> e <i>NANOG</i> em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A.	105
Figura 39 - Crescimento de células de meduloblastoma humano sob condições de cultivo de células-tronco pluripotentes.....	106
Figura 40 - Níveis crescentes de expressão de OCT4A em culturas parentais e clonais de células de meduloblastoma da linhagem Daoy.	108
Figura 41 - Efeitos do nível de expressão de OCT4A sobre a formação de colônias e a capacidade de geração de esferas tumorais de células de meduloblastoma humano.	109
Figura 42 - Expressão de OCT4A afeta de forma nível-dependente o tamanho máximo de colônias de células de meduloblastoma com capacidade de crescimento independente de ancoragem.....	110
Figura 43 - Expressão de OCT4A afeta de forma nível-dependente a quantidade e o tamanho de esferas tumorais de meduloblastoma.	111
Figura 44 - Expressão de OCT4A favorece a tumorigênese de células de meduloblastoma humano de forma nível-dependente.....	112
Figura 45 - Superexpressão de OCT4A favorece o desenvolvimento de tumores com morfologia típica de tumores agressivos.....	113
Figura 46 – Aberrações em número de cópias cromossômicas detectadas em células de meduloblastoma humano com superexpressão de OCT4A.....	115
Figura 47 – Aberrações comuns em número de cópias cromossômicas detectadas em células tumorais das linhagens Daoy e USP-13-Med com superexpressão de OCT4A.....	116
Figura 48 - Gráfico tipo <i>Volcano Plot</i> para identificação de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A.....	120
Figura 49 - Gráfico tipo <i>Heatmap</i> de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma mediante superexpressão de OCT4A.....	121
Figura 50 - Gráfico tipo <i>Heatmap</i> de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A.	127
Figura 51 - Associação de redes de interações moleculares identificadas pela análise funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCTA.	132
Figura 52 – Avaliação da qualidade dos microarranjos de expressão gênica.	177
Figura 53 – <i>MvA Plot</i> dos microarranjos de expressão gênica.	180

Figura 54 – Gráfico de correlação de Pearson (r^2) entre os microarranjos de expressão gênica.	181
Figura 55 - Superexpressão de OCT4 em linhagem celular de AT/RT.	183
Figura 56 - Capacidade de crescimento independente de ancoragem e geração de esferas tumorais são afetadas após superexpressão de OCT4A em células de AT/RT.	184
Figura 57 - Superexpressão de OCT4A favorece o crescimento tumoral de células de AT/RT.	184
Figura 58 - Tumores gerados por células de AT/RT com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia semelhante a tumores gerados por células de AT/RT com expressão basal de OCT4A.	185
Figura 59 - Tumores com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia heterogênea.	186

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados.....	54
Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos dos produtos de amplificação gerados em reações de qRT-PCR para detecção de transcritos alternativos de <i>POU5F1</i> ..	72
Tabela 3 - Parâmetros clínicos e histopatológicos de camundongos BALB/C <i>Nude</i> submetidos a inoculação ortotópica de células de meduloblastoma para avaliação de metástases <i>in vivo</i>	97
Tabela 4 – Genes localizados em regiões contendo aberrações cromossômicas após a superexpressão de OCT4A e que foram comumente afetadas nas linhagens Daoy e USP-13-Med.....	117
Tabela 5 – Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e sua relação com funções celulares e moleculares	122
Tabela 6 - Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e sua correlação com doenças.	123
Tabela 7 – Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e redes de interações moleculares associadas.	124
Tabela 8 – Total de genes diferencialmente expressos e genes localizados em regiões com aberrações cromossômicas após a superexpressão de OCT4A.	124
Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos localizados em regiões com aberrações cromossômicas em células de meduloblastoma Daoy após a superexpressão de OCT4A.....	125
Tabela 10 – Grupo comum de genes diferencialmente expressos em linhagens de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A, das linhagens Daoy, D283Med e USP-13-Med.....	128
Tabela 11 - Anotação funcional do grupo comum de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A.	131
Tabela 12 - Parâmetros clínicos e histopatológicos de camundongos BALB/C <i>Nude</i> inoculados ortotopicamente para ensaio <i>in vivo</i> de metástase de AT/RT	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	Do inglês <i>7-Aminoactinomycin D</i>
<i>Amplicons</i>	Produtos de Amplificação
APC	Alofococianina, do inglês <i>Allophycocyanin</i>
AT/RT	Tumor Teratóide Rabdoide Atípico, do inglês <i>Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico, do inglês <i>Basic Fibroblast Growth Fator</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA Complementar do inglês <i>Complementary DNA</i>
CEFAP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa
CEGH-CEL	Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGE	Camada Granular Externa
CGI	Camada Granular Interna
CIOMS	Do inglês <i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CNA	Número Aberrante De Cópias
CO ₂	Dióxido De Carbono
CP	Células de Purkinje
CTT	Células-Tronco Tumorais, do inglês <i>Cancer Stem Cells</i>
CTE	Células-Tronco Embrionárias
Cy3	Cianina 3, do inglês <i>Cyanine 3</i> ,
Cy5	Cianina 5, do inglês <i>Cyanine 5</i>
dCTP	Do inglês <i>2'-deoxycytidine 5'-triphosphate</i>
DEPC	Dicarbonato de Dietila, do inglês <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMEM/F12	DMEM suplementado com F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitól, do inglês <i>Dithiothreitol</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
GSH	Glutathiona Redutase
GNP	Precursor de Neurônio Granular, do inglês <i>Granular Neuron Precursor</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
CTE	Célula-Tronco Embrionária Humana
IB/USP	Instituto de Biociências da USP
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da USP
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
iPSCs	Células-Tronco Pluripotente Induzidas, do inglês <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
LB	Do inglês <i>Lysogeny Broth</i>
LC ₅₀	Do inglês <i>Lethal Concentration 50</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
lncRNAs	RNAs Não-Codificadores Longos, do inglês <i>Long Non-Coding RNAs</i>
MEG3	Do inglês <i>Maternally Expressed 3</i>
MEM	Do inglês <i>Minimum Essential Medium</i>
MTT	Do inglês <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NaAc	Acetato de Sódio
ncRNAs	RNAs Não-Codificadores de Proteínas, do inglês <i>non-coding RNAs</i>
NE	Neuroepitélio
OMS	Organização Mundial de Saúde

P100	Placas de 100 mm de Diâmetro
P60	Placas de 60 mm de Diâmetro
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino, do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDL	Do inglês <i>Population Doubling Level</i>
PE	Ficoeritrina, do inglês <i>Phycoerythrin</i>
PEI	Poliétilenimina, do inglês <i>Polyethylenimine</i> ,
PFA	Paraformaldeído
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno, do inglês <i>Polyvinylidene Fluoride</i>
qRT-PCR	PCR em Tempo Real
RCE	Radioterapia Cranioespinhal Total
RMA	Do inglês <i>Robust Multichip Analysis</i>
RT	Transcriptase Reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>
sdRNAs	Do inglês <i>snoRNA-derived RNAs</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHH	Via de Sinalização <i>Sonic-Hedgehog</i>
siRNA	RNA Silenciador, do inglês <i>Silencing RNA</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
snoRNAs	Pequenos RNAs Não-Codificadores Nucleolares, do inglês <i>Small Nucleolar RNAs</i>
TBST	Do inglês <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TE	Tris-EDTA
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal, do inglês <i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i>
TME	Transição Mesenquimal-Epitelial, do inglês <i>Mesenchymal-to-Epithelial Transition</i>
ZFAS1	Do inglês <i>Zinc Finger Antisense 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. CÂNCER	26
1.2. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	27
1.3. MEDULOBLASTOMA	28
1.3.1. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO MEDULOBLASTOMA	30
1.3.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO MEDULOBLASTOMA.....	31
1.3.3. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO MEDULOBLASTOMA.....	33
1.3.4. DESENVOLVIMENTO CEREBELAR E MEDULOBLASTOMA	36
1.4. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	40
1.4.1. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E MEDULOBLASTOMA.....	43
1.5. FATOR DE PLURIPOTÊNCIA OCT4.....	44
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. CULTURA CELULAR	51
3.2. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	52
3.3. PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	53
3.4. WESTERN BLOT.....	55
3.5. CLONAGEM DE PLASMÍDEOS PARA TRANSFEÇÃO E TRANSDUÇÃO CELULAR.....	56
3.6. SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A	56
3.7. <i>POPULATION DOUBLING LEVEL</i>	57
3.8. CICLO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO.....	58
3.9. CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM EM SUBSTRATO DE AGAROSE	58
3.10. OBTENÇÃO DE CLONES DAS LINHAGENS CELULARES.....	59
3.11. FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS	59
3.12. CITOMETRIA DE FLUXO	60
3.13. ADESÃO CELULAR POR MEIO DO METABOLISMO DE MTT.....	60
3.14. MIGRAÇÃO CELULAR	61
3.15. INVASÃO CELULAR.....	61
3.16. INDUÇÃO DE APOPTOSE POR AGENTE QUIMIOTERÁPICO.....	62
3.17. TUMORIGÊNESE <i>IN VIVO</i> POR INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA.....	63
3.18. ENSAIO DE METÁSTASE <i>IN VIVO</i>	63
3.19. CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS EM CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS	65

3.20.	ANÁLISE DA INTEGRIDADE CROMOSSOMAL POR TÉCNICA DE CGH ARRAY.....	65
3.21.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL	67
3.22.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
4.	RESULTADOS	70
4.1.	NÍVEIS BASAIS DE TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>POU5F1</i> EM CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA	70
4.2.	SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A.....	74
4.3.	SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A FAVORECE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA <i>IN VITRO</i>	78
4.3.1.	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	78
4.3.2.	CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM	80
4.3.3.	FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS	82
4.3.4.	ADESÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO	86
4.3.5.	INDUÇÃO DE MORTE CELULAR POR QUIMIOTERÁPICO	90
4.4.	OCT4A FAVORECE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA <i>IN VIVO</i>	92
4.4.1.	MODELO SUBCUTÂNEO DE TUMORIGÊNESE	92
4.4.2.	MODELO ORTOTÓPICO DE METÁSTASE	96
4.5.	AUMENTO DE AGRESSIVIDADE PROVOCADA PELA SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A NÃO DEVE-SE A AQUISIÇÃO DE PROPRIEDADES DE CÉLULAS-TRONCO.....	104
4.5.1.	EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PLURIPOTÊNCIA	104
4.5.2.	MANUTENÇÃO EM CONDIÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	105
4.6.	EFEITOS DE DIFERENTES NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE OCT4A SOBRE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA.....	107
4.6.1.	EFEITOS <i>IN VITRO</i>	107
4.6.2.	EFEITOS <i>IN VIVO</i>	111
4.7.	ALTERAÇÕES MOLECULARES DECORRENTES DA SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A	114
4.7.1.	ANÁLISE DE GANHOS E PERDAS DE SEGMENTOS CROMOSSÔMICOS POR aCGH.....	114
4.7.2.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL	117
4.8.	SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A TAMBÉM AFETA PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE AT/RT	133
5.	DISCUSSÃO	135
6.	CONCLUSÃO	153
7.	REFERÊNCIAS	156
8.	APÊNDICES	174
9.	ANEXOS	187

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo e somente em 2012 foram diagnosticados 14,1 milhões de novos casos, além de ter sido responsável por 8,2 milhões de óbitos devido a complicações provocadas pelo câncer (FERLAY et al., 2015). Observa-se que a incidência de neoplasias em países desenvolvidos é maior que a de países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015) e dados publicados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos (EUA) indicam que mortes causadas por neoplasias em 2013 possuíam taxas muito semelhantes a de doenças cardiovasculares (22.5% e 23.5%, respectivamente) (XU et al., 2016). No Brasil, a proporção da mortalidade por câncer é similar aos dados mundiais, sendo a segunda principal causa de morte (17%) e inferior apenas a doenças cardiovasculares (31%) (WHO, 2014). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou a incidência de 596.070 novos casos de neoplasias em 2016 (INCA, 2015).

Apesar dos avanços em medidas profiláticas e terapêuticas para o câncer, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2030, aproximadamente 22 milhões de pessoas serão diagnosticadas com algum tipo de neoplasia e 13 milhões terão suas mortes associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral. Somente no Brasil, estima-se que a incidência e a mortalidade por câncer duplicarão até 2035 (WHO; IARC, 2012). Tal projeção evidencia o câncer como um dos principais problemas de saúde pública. Por se tratar de um conjunto de mais de 100 doenças que acometem diversos tipos celulares e tecidos, as abordagens clínicas costumam ser específicas para cada tipo tumoral. Com o intuito de aperfeiçoar os métodos diagnósticos, profiláticos e terapêuticos, grande atenção tem sido dada à classificação de subgrupos clínicos, bem como de subtipos histopatológicos e moleculares de tumores, visando a melhoria na qualidade de vida do paciente.

O câncer é uma doença complexa e, na maioria dos casos, de origem multifatorial, sob influência de diversos fatores como, por exemplo: idade, sexo, etnia, distribuição geográfica, estilo de vida e hábitos alimentares. Os tumores de pele não melanoma são os mais frequentes na população e comumente são excluídos das estatísticas devido a sua alta incidência e baixa letalidade. Após a sua exclusão, os tumores de próstata e mama são os mais frequentes na população, seguidos por câncer de pulmão e câncer colorretal (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). No Brasil, o câncer de próstata, pulmão e colorretal são os mais frequentes em homens, enquanto que, em mulheres, há maior incidência de tumores de mama, colorretal e de colo do útero (INCA, 2015).

1.2. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são relativamente raros, sendo o 14º tipo mais comum em homens e o 15º em mulheres (INCA, 2015). Pesquisas mais recentes estimaram para o ano de 2016, 23 mil novos casos de tumores do SNC nos EUA (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016) e 10 mil novos casos no Brasil (INCA, 2015). Apesar da baixa incidência, os tumores do SNC possuem alta letalidade, com expectativa de sobrevida em cinco anos de 35% dos casos diagnosticados (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Em crianças e adolescentes, as neoplasias do SNC apresentam um panorama ainda mais preocupante por representarem o segundo grupo de tumores mais frequentes (atrás apenas das leucemias) e o mais fatal a desenvolver-se nessa faixa etária (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; WARD et al., 2014). Além da alta mortalidade, os tratamentos comumente aplicados em pacientes com tumores do SNC podem ocasionar graves sequelas no cérebro em desenvolvimento, comprometendo a qualidade de vida desses pacientes (FOULADI et al., 2005; HOPPE-HIRSCH et al., 1995; KILTIE; LASHFORD; GATTAMANENI, 1997).

Tumores em geral benignos, que afetam as meninges (conhecidos como meningiomas), são os mais frequentemente encontrados no SNC (35.9%). Dentre os tumores malignos, o glioblastoma é o tumor mais frequente, representando 53,4% de todos os tumores malignos do SNC e 15,1% do total de diagnósticos.

Em crianças, no entanto, os tumores malignos compreendem a maioria dos tumores primários diagnosticados no SNC, com incidência de 3,73 casos em 100.000 habitantes, comparativamente aos tumores benignos que apresentam incidência estimada em 1,64 em 100.000 (OSTROM et al., 2015b). Os tumores embrionários são os principais tumores a desenvolverem-se no SNC de crianças até quatro anos de idade, e o segundo principal em crianças e adolescentes na faixa etária de 0-19 anos. Dentre os tumores embrionários, o meduloblastoma é o tumor mais frequente, correspondendo a 62,9% dos tumores embrionários diagnosticados em crianças de 0-14 anos, seguido pelo Tumor Teratóide Rabdóide Atípico (do inglês *Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor*, AT/RT) (15,5%) (OSTROM et al., 2015b). Apesar dos avanços recentes no diagnóstico e tratamento desses tumores, a sobrevida em 10 anos dos pacientes ainda é baixa para ambos os casos, sendo de 63% para meduloblastoma e 26% para AT/RT (OSTROM et al., 2015a, 2015b).

1.3. MEDULOBLASTOMA

O meduloblastoma é o tumor pediátrico maligno mais comum do SNC e a principal causa de morte por câncer em crianças. É um tumor de origem embrionária que desenvolve-se no cerebelo após a desregulação de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento do SNC (LETO et al., 2015). Seguindo a classificação da OMS, o meduloblastoma é um tumor altamente agressivo (Grau IV), com presença de células com morfologia anormal e alta taxa de proliferação, extensa vascularização e angiogênese, e presença de necrose no interior da massa tumoral (ABTA, 2015; LOUIS et al., 2007). Diferente de muitos tumores do SNC, o meduloblastoma possui elevada capacidade de disseminação dentro do neuroeixo, sendo observado a ocorrência de metástases em 40% dos casos diagnosticados. Nos casos mais raros, são observadas metástases na medula óssea, pulmão e linfonodos (WU et al., 2012).

Os primeiros sintomas observados em pacientes com meduloblastoma são letargia, irritabilidade, falta de apetite, dor de cabeça e vômito. Tais sintomas são comumente confundidos devido a sua inespecificidade e similaridade a outras doenças. A suspeita de meduloblastoma

ocorre, geralmente, a partir dos sintomas secundários, como tontura, perda de equilíbrio, visão dupla, nistagmo, rigidez da nuca, inclinação do pescoço e hidrocefalia. Os sintomas secundários geralmente ocorrem após a massa tumoral impedir o fluxo do líquido cefalorraquidiano (LCR) no 4º ventrículo e pela compressão do tronco encefálico e estruturas importantes no cerebelo (ABTA, 2015).

Em todos os casos diagnosticados de meduloblastoma, o paciente é submetido a ressecção cirúrgica. São utilizados tratamentos adicionais como quimioterapia e/ou radioterapia, baseado na possibilidade de recidiva tumoral e idade do paciente. Devido à localização primária desse tumor e o fato de o desenvolvimento do SNC ocorrer até a adolescência, evita-se a utilização de terapias agressivas que podem exercer efeitos adversos. Fouladi e colaboradores observaram que 90% das crianças com menos de três anos, submetidas a radioterapia cranioespinhal total (RCE), desenvolveram endocrinopatias, como deficiência na produção do hormônio do crescimento e hormônio adrenocorticotrófico, além de hipotireoidismo (FOULADI et al., 2005).

Os tratamentos também afetam parâmetros neurocognitivos que impactam a qualidade de vida do paciente. Foi reportado que os pacientes submetidos a RCE quando crianças não possuem independência para trabalhar (FOULADI et al., 2005) e não são casados quando atingem a idade adulta (FOULADI et al., 2005; KILTIE; LASHFORD; GATTAMANENI, 1997). Tais pacientes necessitam de educação especial durante a infância e adolescência (KILTIE; LASHFORD; GATTAMANENI, 1997) e, devido a agressividade do meduloblastoma, tal dependência de educação especial é maior do que a de pacientes diagnosticados com ependimoma, um outro tipo de tumor do SNC (HOPPE-HIRSCH et al., 1995). No entanto, a utilização de terapias mais brandas pode comprometer o tratamento de tumores muito agressivos, facilitando recidivas tumorais. Quase a totalidade dos pacientes com reaparecimento da doença falecem em até cinco anos (ZELTZER et al., 1999). Com o intuito de amenizar eventuais sequelas no SNC em desenvolvimento e aumentar a eficiência dos tratamentos, classificações de pacientes com meduloblastoma baseadas em parâmetros clínicos, histopatológicos e, mais recentemente,

moleculares têm sido exploradas para aperfeiçoar a escolha terapêutica mais indicada para cada caso clínico.

1.3.1. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO MEDULOBLASTOMA

Os pacientes com meduloblastoma são estratificados clinicamente em risco médio ou alto de ocorrência de recidiva tumoral. São utilizados parâmetros tais como: idade do paciente ao diagnóstico, tamanho residual do tumor após a ressecção cirúrgica e presença de metástase ao diagnóstico. As crianças com idade inferior a três anos costumam apresentar tumores mais agressivos e são então classificadas como pacientes com alto risco de recidiva. O mesmo ocorre para pacientes em qualquer idade que apresentam metástase no momento do diagnóstico inicial.

Durante a cirurgia, o médico pondera a extensão de excisão do tumor, podendo ser total, quase total e subtotal, de forma a evitar o comprometimento da função cerebelar. Em muitos casos, a invasão do tumor em estruturas do cerebelo e tronco encefálico impossibilita a ressecção total ou quase total do tumor. Uma ressecção subtotal, caracterizada pela presença de resíduo tumoral superior a 1,5 cm², é o outro parâmetro utilizado para estratificar os pacientes de alto risco de recidiva (THOMPSON et al., 2016). Pacientes com idade superior a três anos, sem a presença de metástase ao diagnóstico e que tiveram ressecção tumoral total ou quase total (tumor residual inferior a 1,5 cm²) são classificados como pacientes de médio risco de recidiva e submetidos a tratamentos menos agressivos.

Apesar desta classificação ser muito utilizada na clínica, seu poder prognóstico não é totalmente eficaz, sendo observada a progressão tumoral em cinco anos de 20% dos pacientes de médio risco e até 60% dos pacientes de alto risco (GAJJAR et al., 2006; PACKER et al., 2006; TAYLOR et al., 2005; ZELTZER et al., 1999). Neste sentido, o uso de indicadores moleculares de prognóstico tem sido sugerido para complementar esta estratificação clínica de rotina e melhor avaliar procedimentos terapêuticos a serem adotados. A detecção de expressão positiva do gene codificador do fator de pluripotência OCT4 em meduloblastoma, por exemplo, foi recentemente

proposta para identificar pacientes clinicamente classificados como de baixo risco, mas que podem não responder bem ao tratamento padrão e apresentar evolução clínica desfavorável, típica de pacientes de alto risco (RODINI et al., 2012). Como apontado adiante, outros indicadores de prognóstico têm sido discutidos para embasar a escolha da modalidade terapêutica mais indicada.

1.3.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO MEDULOBLASTOMA

Em 2007, a OMS classificou o meduloblastoma em cinco subtipos histológicos distintos: (1) clássico, (2) desmoplásico/nodular, (3) com extensa nodularidade, (4) anaplásico e (5) de células-grandes (LOUIS et al., 2007).

O perfil histopatológico de meduloblastoma clássico (Figura 1A), observado em aproximadamente 73% dos casos (ELLISON, 2010), é caracterizado pela presença de pequenas células redondas ou elipsoides com núcleos hipercromáticos redondos a ovais e alta razão núcleo-citoplasma (BOROWSKA; JÓŹWIAK, 2016; GILBERTSON; ELLISON, 2008). Podem também ser observadas estruturas como rosetas ou estruturas em paliçadas em alguns tumores clássicos de meduloblastoma (ELLISON, 2010).

Os tumores classificados como nodular/desmoplásico (Figura 1B) e meduloblastoma com extensa nodularidade (Figura 1D) são comumente classificados como um único grupo, geralmente denominado desmoplásico, caracterizados pela formação de duas estruturas histológicas distintas no interior do tumor: uma região internodular, formada por células indiferenciadas altamente proliferativas, e regiões nodulares, compostas por células neurocíticas diferenciadas com baixa taxa mitótica e podendo apresentar deposição de colágeno pericelular (desmoplasia) (BOROWSKA; JÓŹWIAK, 2016; GILBERTSON; ELLISON, 2008). Os tumores desmoplásicos correspondem a aproximadamente 10% dos diagnósticos de meduloblastomas e são considerados os de melhor prognóstico dentre esses subtipos histológicos, com sobrevida livre da doença em cinco anos de 82% (ELLISON, 2010) (MASSIMINO et al., 2013).

Os tumores anaplásicos e de células-grandes (Figura 1C) também são agrupados como um único subtipo, visto que todos os meduloblastomas de células-grandes apresentam anaplasia em seu perfil histológico (GILBERTSON; ELLISON, 2008). Os tumores de células-grandes/anaplásico representam 17% de todos os diagnósticos (ELLISON, 2010) e correspondem ao subtipo histológico com pior prognóstico, caracterizado por grande heterogeneidade celular, perfil indiferenciado (LAMONT et al., 2004; MASSIMINO et al., 2013) e maior propensão a metástase (BOROWSKA; JÓŹWIAK, 2016). A histopatologia desse subtipo tumoral é caracterizada pela presença de células grandes e redondas, pouco diferenciadas, com pleomorfismo nuclear e nucléolo proeminente, além de regiões com alta densidade de células poliédricas. As células apresentam maior índice mitótico e apoptótico que as células dos demais subtipos histológicos (BOROWSKA; JÓŹWIAK, 2016; GILBERTSON; ELLISON, 2008).

Apesar de muito utilizado na clínica, o perfil histopatológico ainda possui falhas quanto a classificação dos pacientes em relação ao prognóstico esperado. Com isso, a OMS em conjunto com os mais respeitados grupos de pesquisa neuro-oncológica definiram novas classificações para o meduloblastoma, considerando-se parâmetros clínicos e histopatológicos em associação com perfis moleculares (LOUIS et al., 2016) para a estratificação de riscos, definição de abordagens terapêuticas e desenho de novos testes clínicos (RAMASWAMY et al., 2016b).

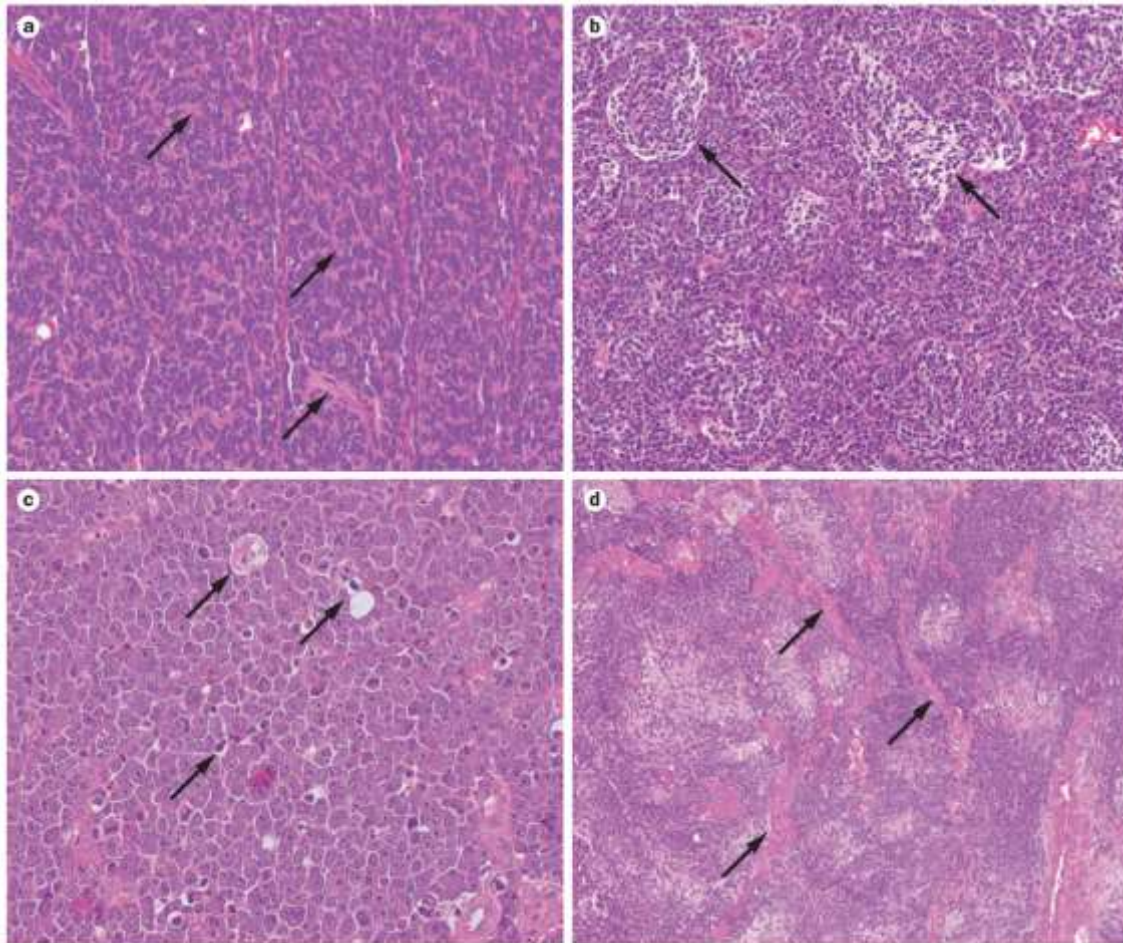


Figura 1 - Classificação histopatológica de meduloblastoma. (A) Meduloblastoma Clássico: composto por pequenas células arredondadas ou elipsoides com alta razão núcleo citoplasma. Organizam-se em linhas paralelas e podem apresentar estruturas em paliçadas ou rosetas de Homer-Wright (seta). **(B)** Meduloblastoma Nodular/Desmoplásico: formado por duas regiões distintas, uma região internodular de células hiper cromáticas, e região de estruturas em paliçadas composta por células neuronais em diferenciação (seta). **(C)** Meduloblastoma Anaplásico e de Células-Grandes: composto por células grandes, volume variável de citoplasma e pleomorfismo nuclear (seta). **(D)** Meduloblastoma com Extensa Nodularidade: Assim como o meduloblastoma nodular desmoplásico, apresenta região nodular e região internodular com a presença de fibras de colágeno (seta). Fonte: NORTHCOTT et al., 2012a.

1.3.3. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO MEDULOBLASTOMA

Evidências de alterações moleculares que favorecem a patogênese do meduloblastoma já eram descritas desde 1990, como a formação de isocromossomo 17p e amplificação de *C-MYC* (BIGNER; VOGELSTEIN, 1990), bem como a associação com doenças síndrômicas como Gorlin e Turcot (EVANS et al., 1991; MORI et al., 1994). No entanto, com o advento de novas tecnologias genômicas e o estabelecimento do projeto genoma do câncer de tumores do SNC, foi possível a identificação de subgrupos moleculares e suas correlações com parâmetros clínicos e prognósticos de meduloblastoma. Primeiramente sugerido em 2011, o meduloblastoma foi classificado em quatro

subgrupos moleculares: Grupo WNT, Grupo SHH, Grupo 3 e Grupo 4 (NORTHCOTT et al., 2011).

O grupo WNT, diagnosticado em 10% dos pacientes com meduloblastoma, é o subgrupo molecular com melhor prognóstico e raramente apresenta metástase. Molecularmente, os tumores do subgrupo WNT são caracterizados por mutações somáticas no gene *CTNNB1*, favorecendo o acúmulo de β -CATENINA nuclear e hiperativação da via de sinalização WNT. A análise citogenética de meduloblastoma WNT apresenta, principalmente, monossomia do cromossomo 6 e o subtipo histológico do tumor é predominantemente o da forma clássica (NORTHCOTT et al., 2012a). Pacientes com síndrome de Turcot possuem mutações germinativas em *APC*, cuja proteína truncada favorece a translocação de β -CATENINA citoplasmática para o núcleo e consequente ativação da via WNT. Tais pacientes apresentam maior predisposição a formação de pólipos que podem progredir à formação de câncer colorretal e também apresentam 92 vezes mais chances de desenvolvimento de meduloblastoma que a população em geral (HAMILTON et al., 1995).

Os pacientes diagnosticados com tumores do subgrupo SHH representam 30% dos casos, cujo prognóstico é intermediário com uma sobrevida média em cinco anos de 75% dos pacientes (NORTHCOTT et al., 2012b; TAYLOR et al., 2012) e, na maioria dos casos, sem metástase ao diagnóstico. Os tumores apresentam hiperativação da via de sinalização *Sonic-Hedgehog* (SHH) devido a mutações somáticas em genes codificadores de componentes importantes dessa via, como *PTCH1/2*, *SMO*, *GLI2* e *SUFU* (NORTHCOTT et al., 2012a; RAMASWAMY et al., 2016b). Os pacientes com síndrome de Gorlin, caracterizada pela perda de função do receptor transmembrana *PTCH*, apresentam manifestações clínicas como anomalias do desenvolvimento e maior incidência a neoplasias, dentre elas, o meduloblastoma (TAYLOR; MAINPRIZE; RUTKA, 2000). Citogeneticamente, os tumores do subgrupo SHH apresentam, em sua maioria, deleção de 9q e amplificação de *MYCN* (NORTHCOTT et al., 2012a). Devido aos conhecimentos recentes sobre a caracterização molecular de meduloblastoma, novas abordagens terapêuticas vêm sendo testadas, sendo o subgrupo SHH de tumores o mais estudado em

ensaios clínicos, com inibidores específicos de SMO (BERMAN et al., 2002; ROMER et al., 2004; SASAI et al., 2007)

Os subgrupos 3 e 4 são molecularmente mais heterogêneos quando comparados aos subgrupos WNT e SHH. Por esse motivo, em nova proposta de estratificação, ambos são agrupados e chamados como grupo não-SHH/WNT (LOUIS et al., 2016; RAMASWAMY et al., 2016b). Os pacientes do grupo 3 são os que apresentam o pior prognóstico, com presença de metástase em aproximadamente 50% dos casos (KOOL et al., 2012). Os tumores do subgrupo 3 apresentam amplificações de *MYC*, com consequente expressão aberrante deste oncogene, e alta instabilidade genômica, observada por grandes perdas e ganhos de segmentos cromossômicos, sendo perda de 10q, 11, 16q e 7p, e ganho de 1q, 7 e 17q as mais frequentes (KOOL et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012b).

O subgrupo 4 é o mais comum, representando aproximadamente 35% dos casos. No entanto, é o menos caracterizado em relação a alterações moleculares e fenotípicas. Os pacientes apresentam prognóstico intermediário, com sobrevida em cinco anos estimada de 75% e frequentemente apresentam metástase ao diagnóstico (31%). A principal alteração citogenética desse subgrupo é a presença de isocromossomo 17 e deleções de 17p (KOOL et al., 2012), além de amplificações de *MYCN* e *CDK6*, com predominante expressão de genes envolvidos no desenvolvimento neuronal (NORTHCOTT et al., 2012b).

Atualmente, muito se sabe sobre perfis de expressão gênica e alterações genéticas e moleculares do meduloblastoma. No entanto, o meduloblastoma é um tipo tumoral cujas taxas de mutações são relativamente baixas quando comparadas a outros tumores, como por exemplo, melanomas (JONES et al., 2012; PUGH et al., 2012). Foi observado que, apesar de baixas as taxas de mutações, muitas delas ocorrem em genes reguladores de cromatina (HOVESTADT et al., 2014; HUETHER et al., 2014; KOOL et al., 2014), indicando que alterações epigenéticas devem desempenhar papel importante na etiologia e patogênese do meduloblastoma (MILLER et al., 2011; SHI et al., 2014). De fato, o padrão de metilação do DNA pode ser utilizado para a identificação dos

subgrupos moleculares (HOVESTADT et al., 2014), sendo inclusive sugerido como método diagnóstico por neuro-oncologistas no momento da estratificação dos pacientes (RAMASWAMY et al., 2016b).

Um resumo das principais alterações moleculares e manifestações clínicas dos subgrupos moleculares de meduloblastoma é apresentado na Figura 2.

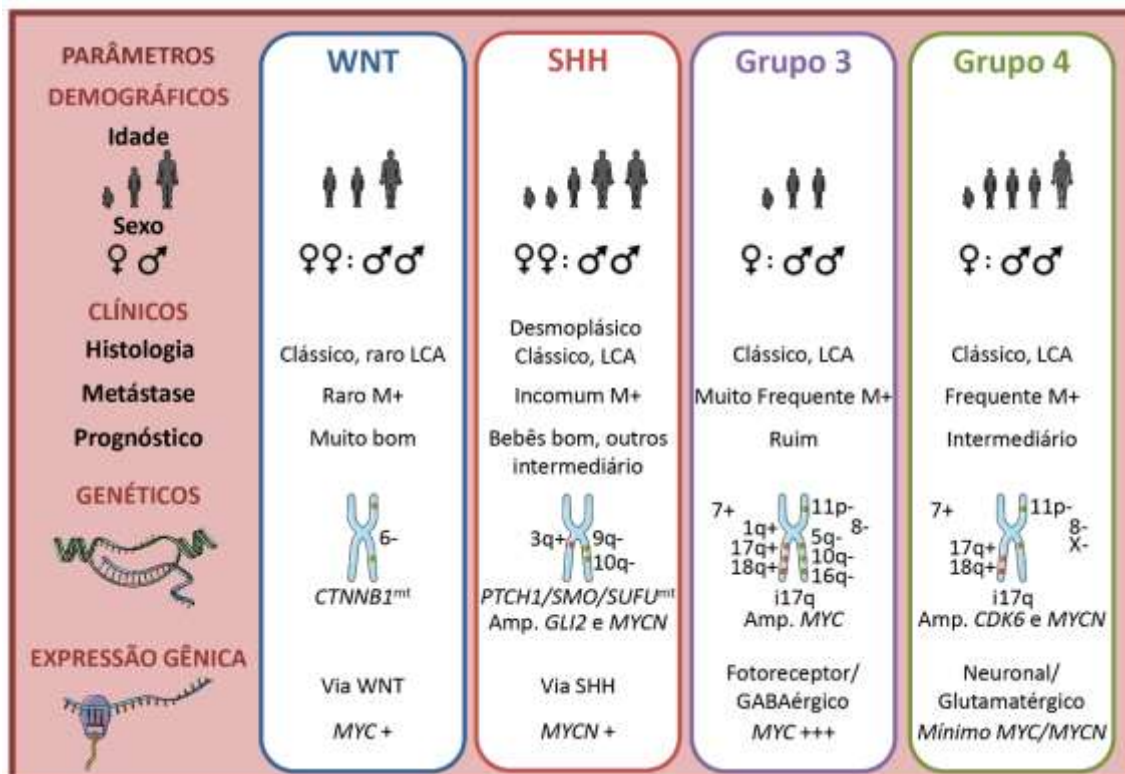


Figura 2 - Classificação molecular de meduloblastoma. Comparação de parâmetros demográficos, clínicos e genéticos dos subgrupos moleculares de meduloblastoma. LCA: Meduloblastoma Anaplásico/Células-Grandes. Adaptado de: TAYLOR et al., 2012.

1.3.4. DESENVOLVIMENTO CEREBELAR E MEDULOBLASTOMA

O meduloblastoma foi primeiramente descrito por Bailey e Cushing em 1925 como um tumor que se desenvolvia de pequenas células azuis no cerebelo (BAILEY; CUSHING, 1925). Desde essa época, acreditava-se que o meduloblastoma era formado pela transformação maligna de células-tronco multipotentes que faziam parte do tubo neural primitivo, denominadas meduloblastos (RUTKA; HOFFMAN, 1996). Hoje, sabe-se que o meduloblastoma é um tumor de origem embrionária, localizado supratentorialmente na fossa posterior e que possui desregulação de vias de

sinalização implicadas no desenvolvimento do SNC, particularmente atuantes em células progenitoras cerebelares. A combinação de diferentes vias de sinalização alteradas, bem como diferentes células de origem, contribui para a heterogeneidade intertumoral observada no meduloblastoma (LETO et al., 2015).

Durante o processo de desenvolvimento do cerebelo, inicia-se um processo complexo de neurogênese e movimentação celular para formar a estrutura laminar do cerebelo. A camada dorso medial da zona ventricular dá origem às células de Purkinje, neurônios cerebelares do núcleo e interneurônios cerebelares, e uma segunda camada, próxima aos lábios rômnicos, dará origem aos neurônios granulares cerebelares e uma subpopulação de neurônios do núcleo. Durante o período embrionário, células progenitoras presentes nos lábios rômnicos migram dorsalmente pela superfície do cerebelo para dar origem à camada granular externa. As células progenitoras granulares da camada granular externa iniciam um processo de expansão e intensa proliferação para dar origem aos neurônios granulares cerebelares, sendo que mitógenos como SHH e NOTCH2 desempenham papel fundamental durante esse processo de expansão clonal da camada granular externa. Já no início do período pós-natal, as células progenitoras granulares iniciam o processo de diferenciação e migram através da camada de células de Purkinje para dar origem a camada granular interna (Figura 3) (GILBERTSON; ELLISON, 2008; MARINO, 2005; ROUSSEL; HATTEN, 2011). Além das células precursoras granulares, outras populações de células-tronco neurais e células progenitoras já foram observadas em diferentes regiões do cerebelo e tronco encefálico (FINK et al., 2006; LEE et al., 2005; WANG; ROSE; ZOGHBI, 2005).

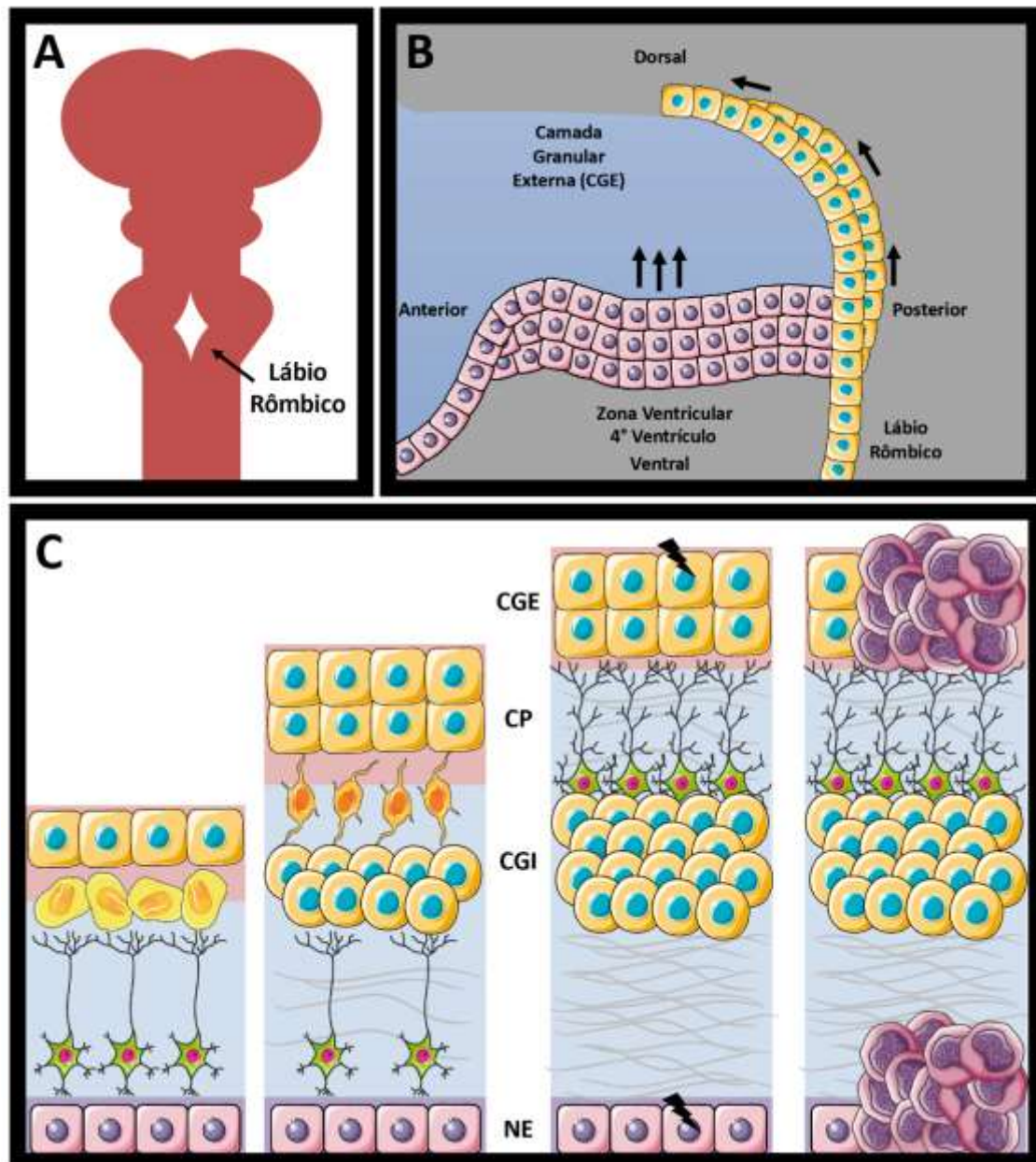


Figura 3 - Desenvolvimento cerebelar e meduloblastoma. (A-B) Durante o desenvolvimento embrionário, as células progenitoras localizadas na região ventricular do metencéfalo migram radialmente para dar origem às células de Purkinje (CP). As células progenitoras do lábio rômbico migram dorsalmente para dar origem à camada granular externa (CGE). (C) Durante o período pós-natal, as células granulares progenitoras da CGE proliferam intensivamente, diferenciam e migram através da camada de células de Purkinje para dar origem à camada granular interna (CGI). O meduloblastoma origina-se do desenvolvimento anormal de células granulares progenitoras da CGE ou do neuroepitélio (NE). Adaptado de: MARINO, 2005.

Sabe-se que o desenvolvimento anormal das células granulares cerebelares da camada granular externa está envolvido na tumorigênese de meduloblastoma do subgrupo molecular SHH (SCHÜLLER et al., 2008; YANG et al., 2008). Em relação aos tumores do subgrupo WNT, acredita-se que o seu surgimento decorra da transformação maligna de células-tronco neurais presentes na camada inferior do lábio rômbico e tronco encefálico, sugerindo

uma origem extracerebelar para o meduloblastoma (GIBSON et al., 2010). Os tumores identificados como do subgrupo molecular 3 demonstraram forte correlação com perfil de expressão gênica de células mais indiferenciadas, observado principalmente em células-tronco neurais, células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco pluripotente induzidas (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cells* iPSCs) (KAWAUCHI et al., 2012; PEI et al., 2012). A inoculação de células progenitoras granulares foi capaz de dar origem a tumores do subgrupo 3 após superexpressão de *MYC*. No entanto, as células tumorais apresentavam perda da expressão do marcador de diferenciação de células granulares *ATOH-1*, e passaram a expressar o marcador de células-tronco neurais CD133 (também conhecido como Prominina-1, do inglês *Prominin-1*), indicando que o processo de desdiferenciação dessas células pode ser um processo importante na tumorigênese de meduloblastoma do subgrupo 3 (Figura 4) (KAWAUCHI et al., 2012).

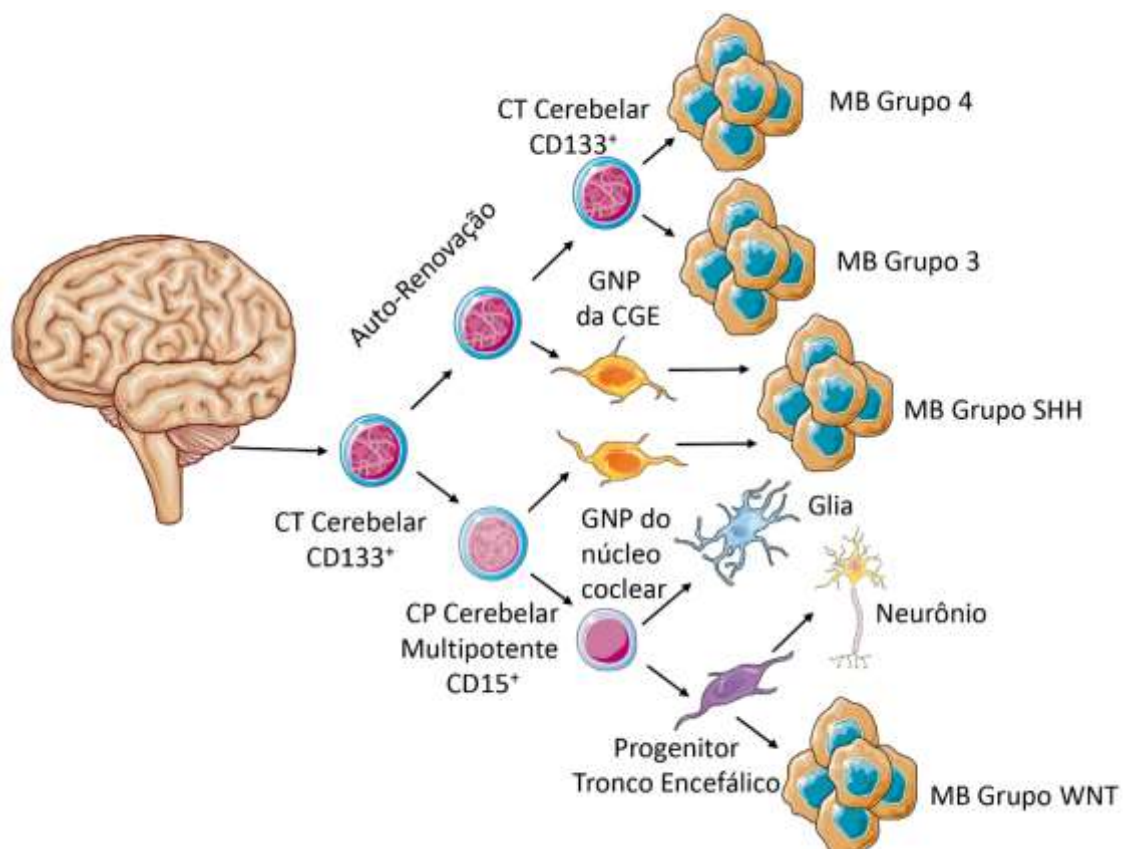


Figura 4 - Células de origem do meduloblastoma e subgrupos moleculares. O meduloblastoma ocorre a partir do desenvolvimento anormal de células-tronco e progenitoras do SNC. O esquema proposto por Manoranjan e colaboradores resume as recentes evidências das células de origem do meduloblastoma e sua correlação com subgrupos moleculares. CT: Célula-Tronco; CP: Célula Progenitora; MB: Meduloblastoma; GNP: Precursor de Neurônio Granular; CGE: Camada Granular Externa. Adaptado de: MANORANJAN et al., 2013.

1.4. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

O modelo estocástico ou clonal de tumorigênese propõe que alterações genéticas ocorrem em uma única célula normal do tecido, favorecendo sua expansão clonal e consequente formação do tumor. A heterogeneidade observada na massa tumoral pode ser explicada pela aquisição de novas mutações devido à instabilidade genômica e alta proliferação, com consequente formação de novos clones capazes de favorecer a progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, a heterogeneidade tumoral observada nesse modelo credita a pressão seletiva do ambiente e maior adaptação de subpopulações celulares para a formação da massa tumoral. Assim, subclones mais agressivos e mais bem adaptados às pressões microambientais moldariam a heterogeneidade inter e intratumoral (BURRELL et al., 2013; CAIRNS, 1975; NOWELL, 1976). Nesse modelo de evolução clonal, todas ou a maioria das células tumorais têm a mesma potencialidade para formar um novo tumor em um novo microambiente ou quando transplantado, por exemplo, em um animal de laboratório.

Um modelo alternativo de tumorigênese descrito mais recentemente propõe que as células tumorais diferem em sua capacidade de gerar e propagar tumores. Nesse modelo, uma pequena subpopulação de células, denominadas de células-tronco tumorais (CTT), são as principais células responsáveis pelo desenvolvimento tumoral. Tais células possuem propriedades semelhantes às de células-tronco normais dos respectivos tecidos primários em que os tumores residem, porém apresentam aberrações em processos como auto-renovação e diferenciação celular (REYA et al., 2001; CLARKE e FULLER, 2006; O'BRIEN et al., 2010). Por serem principalmente caracterizadas por sua alta tumorigenicidade, as CTT também são conhecidas como células iniciadoras de tumor. Além disso, as CTT também são capazes de originar os diversos subclones celulares que contribuem para a heterogeneidade tumoral (MANORANJAN *et al.*, 2012; VISVADER & LINDEMAN, 2012). A apresentação celular hierárquica de muitos tumores fundamenta esse modelo. As CTT foram inicialmente descritas em leucemias na década de 1970 (PIERCE; WALLACE, 1971) e isoladas somente duas décadas depois, em meados de 1990 (BONNET;

DICK, 1997; LAPIDOT et al., 1994). Em tumores sólidos, a identificação e isolamento de CTT ocorreu primeiramente em tumor de mama e em tumores do SNC (AL-HAJJ et al., 2003; SINGH et al., 2003). As estratégias iniciais para o isolamento de CTT baseavam-se na identificação e separação celular com o auxílio de marcadores de superfície específicos, como CD133 para tumores do SNC, e CD34 e CD38 para leucemia mieloide aguda (BONNET; DICK, 1997; SINGH et al., 2003). Além da capacidade de auto-renovação e diferenciação celular, as CTT possuem outras propriedades importantes para a progressão tumoral, como maior resistência a quimioterápicos e morte celular (BAO et al., 2006) e transição epitélio-mesenquimal (do inglês *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, TEM), favorecendo o processo de invasão tecidual e metástase (CHAFFER et al., 2013).

Vale destacar que a origem das CTT ainda é debatida. Muitos pesquisadores já apontaram as células-tronco e progenitores normais como células de origem para a transformação neoplásica. Reya e colaboradores inclusive postularam que a permanência de células-tronco por um longo período no tecido facilitaria o acúmulo de mutações necessárias para a sua transformação neoplásica (REYA et al., 2001). Alternativamente, em alguns tipos de tumores, as CTT podem se originar a partir de células diferenciadas do tecido de origem ou do próprio tumor que, após a aquisição de mutações genéticas, epigenéticas e estímulos do ambiente, podem sofrer um processo de desdiferenciação e, assim, adquirirem a capacidade de se dividirem assimetricamente e dar origem aos diferentes subclones tumorais (MANI et al., 2008; SCAFFIDI; MISTELI, 2011). Esse mecanismo foi sumarizado e proposto por Vermeulen e colaboradores como um modelo dinâmico da geração de CTT (Figura 5), enfatizando a ação de fatores intrínsecos e extrínsecos como ativação de vias importantes de sinalização celular e ação do microambiente tumoral (Figura 6) (VERMEULEN et al., 2008, 2012).

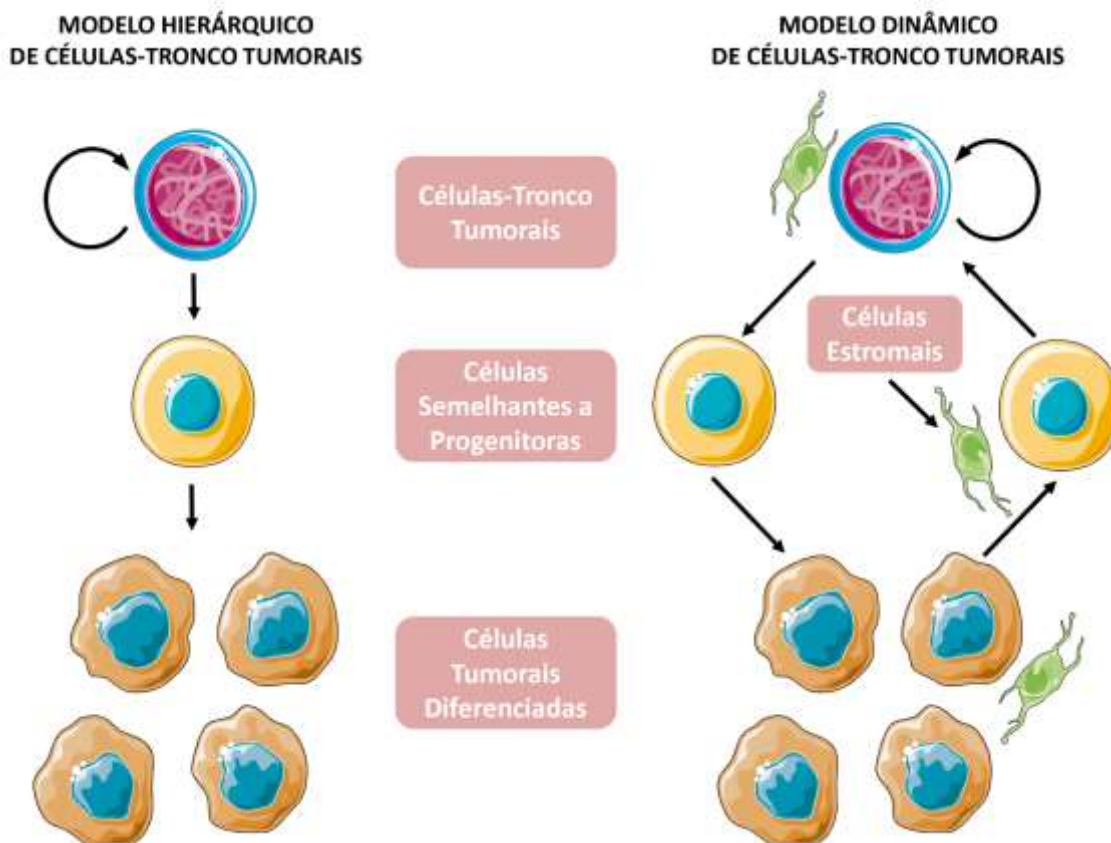


Figura 5 - Modelo de células-tronco tumorais. (A) Modelo hierárquico de CTT postula que um *pool* de CTT proliferam assimetricamente para dar origem a uma célula idêntica (auto-renovação) e uma célula progenitora. As células progenitoras iniciam o processo de diferenciação e dão origem às células tumorais diferenciadas que compõe a massa tumoral. **(B)** O modelo dinâmico de CTT postula que células e fatores do microambiente tumoral, aqui representado por células estromais, modulam o fenótipo celular e favorecem a des-diferenciação de células tumorais diferenciadas e/ou progenitoras ao estágio de CTT. Adaptado de: VERMEULEN et al., 2012.

Esse modelo dinâmico de geração de CTT tem implicações clínicas importantes com relação a resistência a tratamentos e recidivas tumorais. Visto que qualquer célula tumoral poderia sofrer o processo de des-diferenciação e, assim, tornar-se uma CTT, mesmo com a utilização de drogas específicas para a erradicação dessas células, novas CTT poderiam ser formadas após o tratamento e, dessa forma, contribuir para a recorrência tumoral (VERMEULEN et al., 2012). Portanto, é fundamental entender os mecanismos pelos quais células tumorais podem adquirir propriedades de CTT.

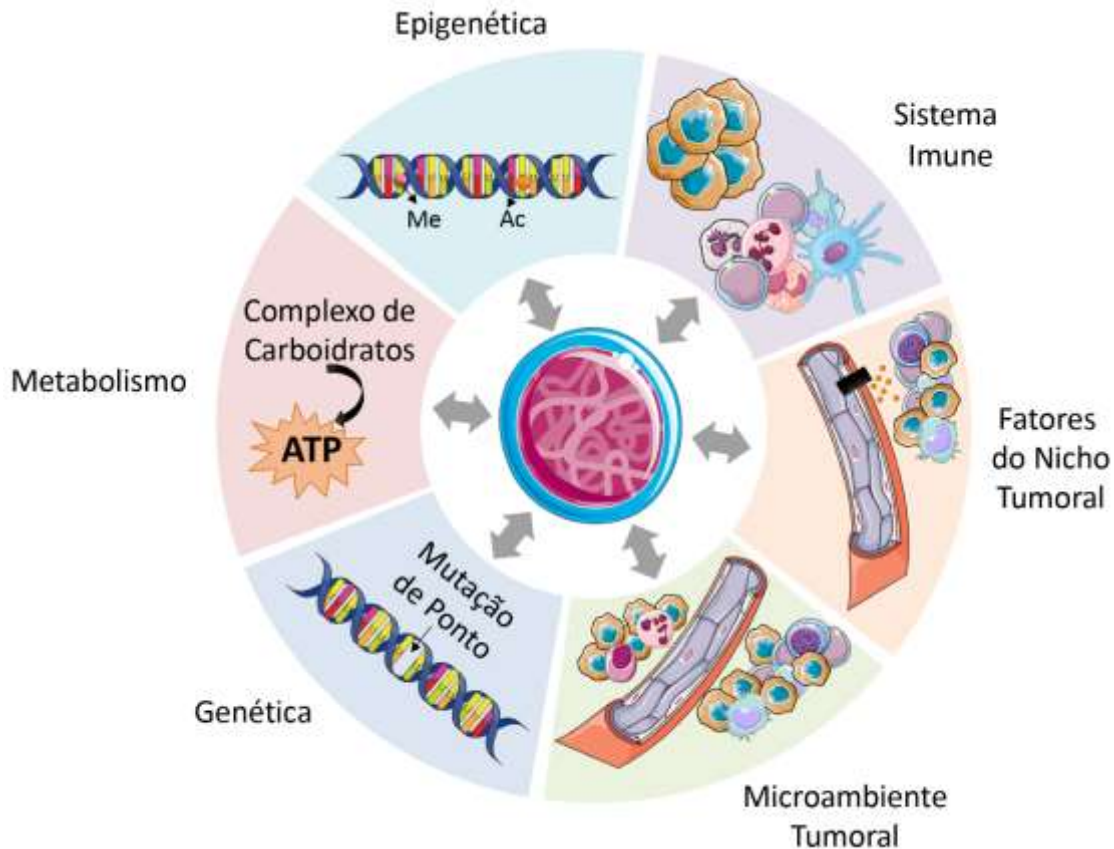


Figura 6 - Regulação de células-tronco tumorais. Fatores que influenciam e regulam o fenótipo de CTT. Fatores intrínsecos incluem a influência da genética, epigenética e metabolismo celular e fatores extrínsecos incluem a interação com o microambiente tumoral, fatores liberados no nicho tumoral e interação com células do sistema imune. Adaptado de: LATHIA et al., 2015.

1.4.1. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E MEDULOBLASTOMA

As CTT foram inicialmente identificadas em tumores do SNC por Singh e colaboradores (2003) com base na expressão do marcador de superfície CD133 (SINGH et al., 2003). As células positivas para CD133 derivadas de gliomas e meduloblastoma demonstraram capacidade de formação de esferas tumorais *in vitro* (SINGH et al., 2003) e maior tumorigenicidade quando transplantadas em camundongos imunodeficientes (SINGH et al., 2004).

Além da expressão de marcadores de superfície típicos de células-tronco normais, as CTT também são caracterizadas pela expressão de genes envolvidos na manutenção da pluripotência e em vias de sinalização implicadas no desenvolvimento do organismo (RODINI et al., 2010). Expressão aberrante de componentes da via NOTCH, SHH e WNT foram implicadas no aumento da tumorigênese e aquisição de fenótipo de CTT em câncer de pele

(MALANCHI et al., 2008), câncer de mama (MAJUMDER et al., 2016; YANG et al., 2016) câncer gástrico (XU et al., 2015), câncer de pulmão (BORA-SINGHAL et al., 2015; YAO et al., 2016), câncer colorretal (VERMEULEN et al., 2010), entre outros. Em meduloblastoma, o distúrbio no funcionamento normal de WNT e SHH estão envolvidos na tumorigênese e progressão tumoral (EVANS et al., 1991; HAMILTON et al., 1995; KIMURA et al., 2005; MACDONALD, 2012; MASCARO CORDEIRO et al., 2014; VALDORA et al., 2013).

A expressão de marcadores típicos de células-tronco pluripotentes, como *POU5F1*, *SOX2*, *LIN28* e *NANOG* também já foi correlacionada com pior prognóstico em diversos tipos tumorais (BEN-PORATH et al., 2008; NAKANO, 2015; SHAYKHIEV et al., 2013; SMITH et al., 2015; WONG et al., 2008), incluindo-se meduloblastoma (HOVESTADT et al., 2014; PICARD et al., 2012; RODINI et al., 2012; VANNER et al., 2014). De fato, a expressão aberrante de *POU5F1* em aproximadamente 50% de amostras de meduloblastoma evidenciou forte correlação com menor sobrevida global dos pacientes (RODINI et al., 2012). Tal correlação entre expressão aberrante de *POU5F1* e prognóstico desfavorável sugere funções pró-oncogênicas relevantes ao OCT4, justificando estudos funcionais detalhados que ainda inexistem na literatura corrente.

1.5. FATOR DE PLURIPOTÊNCIA OCT4

O OCT4, também conhecido como OCT3 ou OCT3/4, é um fator de transcrição membro da família POU, codificado pelo gene *POU5F1*. O OCT4 favorece a transcrição de certos genes alvos envolvidos na regulação dos processos de diferenciação celular e manutenção da pluripotência.

A expressão de OCT4 foi inicialmente observada em 1989 por Lenardo e colaboradores em amostras de carcinoma embrionário (LENARDO et al., 1989) e, em estudos posteriores, foi demonstrado que a expressão de OCT4 ocorre predominantemente em CTE (NICHOLS et al., 1998; PESCE; SCHÖLER, 2000). Para a manutenção da pluripotência e regulação do processo de diferenciação, os níveis de OCT4 devem ser finamente controlados: níveis normais mantêm as células em estado pluripotente, enquanto que a elevação

dos níveis favorece a diferenciação para linhagens da mesoderme ou endoderme, e a diminuição nos níveis de OCT4 favorece a diferenciação para células da trofotoderma (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000). O processo de regulação de pluripotência e diferenciação envolve a associação do OCT4 com diversos outros fatores de transcrição, em uma rede complexa de interações (PARDO et al., 2010; RIZZINO, 2013; SHI; JIN, 2010).

Além do seu papel na manutenção da pluripotência de CTE, o OCT4, em associação com outros fatores de transcrição, foi capaz de induzir pluripotência em células somáticas (TAKAHASHI et al., 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; YU et al., 2007). A superexpressão ectópica de apenas OCT4 também foi capaz de induzir pluripotência em células-tronco neurais (KIM et al., 2009).

O gene *POU5F1* pode gerar três transcritos por meio de *splicing* alternativo, denominados *Oct4A*, *Oct4B* e *Oct4B1* (TAKEDA; SEINO; BELL, 1992). O transcrito *Oct4B* possui um sítio alternativo de reconhecimento pelo ribossomo e, assim, é capaz de gerar três proteínas distintas a partir de um mesmo mRNA OCT4B-265, OCT4B-190 e OCT4B-164 (TAKEDA; SEINO; BELL, 1992; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2010). A proteína OCT4A difere das proteínas geradas por *Oct4B* e *Oct4B1* pela sua porção N-terminal, visto que apenas o transcrito *Oct4A* possui o éxon 1, enquanto o éxon 2A é comum a apenas os transcritos *Oct4B* e *Oct4B1* (Figura 7).

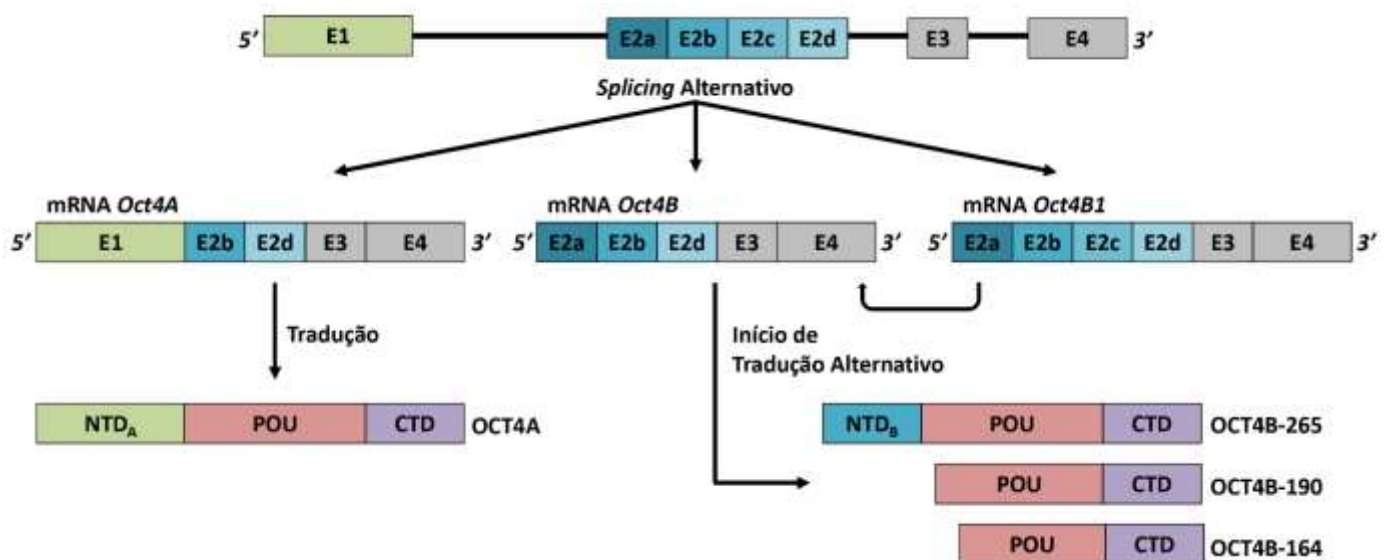


Figura 7 - Representação gráfica do gene *POU5F1* e os produtos derivados de *splicing* alternativo. O gene *POU5F1*, localizado no cromossomo 6, é composto por 4 éxons. O mRNA sofre processamento de *splicing* alternativo, dando origem a três transcritos alternativos: *Oct4A*, *Oct4B* e *Oct4B1*. O transcrito *Oct4A* é o único que possui o éxon E1. O transcrito *Oct4B1* difere de *Oct4B* por meio de da incorporação de um íntron, representado na figura como E2c. O transcrito *Oct4B* possui um sítio alternativo de início de tradução, capaz de gerar três proteínas distintas (Oct4B-164, Oct4B-190 e Oct4B265). O transcrito *Oct4B1* é relativamente novo, descrito por Atlasi e colaboradores em 2008 (ATLASI et al., 2008), e recentemente foi proposto que os produtos originados de *Oct4B1* são os mesmos de *Oct4B*. Adaptado de: JERABEK et al., 2014.

A isoforma mais bem conhecida e que desempenha funções de manutenção de pluripotência em CTE é a OCT4A, cuja localização subcelular é nuclear (LEE et al., 2006; TSAI et al., 2014b; ZHANG et al., 2010). As funções das isoformas codificadas por *Oct4B* e *Oct4B1* ainda são pouco conhecidas, mas já foram correlacionadas com estresse genotóxico e indução de apoptose (ASADI et al., 2011; FARASHAHI YAZD et al., 2011; GAO et al., 2012; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Devido às respectivas diferenças de funções, distinguir as diferentes isoformas de *POU5F1* em estudos se faz necessário para evitar associações incorretas entre expressão e fenótipo observado (WANG; DAI, 2010).

No câncer, diversos trabalhos correlacionaram a expressão de *POU5F1* com prognóstico de pacientes com diferentes tipos tumorais. A expressão aumentada de *POU5F1* foi correlacionada com pior sobrevida e maior agressividade em tumores de bexiga (HATEFI et al., 2012), carcinoma hepatocelular (DONG et al., 2012; YIN et al., 2013), mama (HASSIOTOU, et al., 2013), pâncreas (WEN et al., 2010; LU et al., 2013), gliomas (DU et al., 2009; GUO et al., 2010), entre outros. Mais recentemente, com uma maior

compreensão e atenção dada as isoformas de OCT4, alguns trabalhos correlacionaram a expressão específica desses transcritos alternativos com alguns tipos tumorais, como câncer colorretal (GAZOULI *et al.*, 2011), de próstata (SOTOMAYOR *et al.*, 2009; DE RESENDE *et al.*, 2013), carcinoma hepatocelular (HUANG *et al.*, 2011) e tumores de células germinativas (RIJLAARSDAM *et al.*, 2011).

Existem, portanto, evidências apontando a relevância do fator de transcrição OCT4 na malignidade de tumores, inclusive de meduloblastoma. No entanto, não se sabe qual a contribuição específica do transcrito alternativo *Oct4A* na agressividade de tumores do SNC e, em particular, no meduloblastoma. Considerando-se a origem embrionária do meduloblastoma, evidências da contribuição de CTT à fisiopatologia desse tipo tumoral e a correlação entre expressão de OCT4 e menor sobrevida dos respectivos pacientes, o presente trabalho propôs avaliar funcionalmente a contribuição do fator de transcrição OCT4A à agressividade de meduloblastoma.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo principal da presente tese foi compreender como a expressão aberrante de genes que controlam processos típicos de células-tronco pode favorecer o desenvolvimento do câncer. Em particular, o projeto avaliou funcionalmente a relevância do fator de pluripotência OCT4A à agressividade de meduloblastoma humano, tendo em vista sua correlação com prognóstico clínico desfavorável. Os objetivos específicos do trabalho foram:

- I. Avaliar se a superexpressão de OCT4A altera as propriedades tumorigênicas de células de meduloblastoma humano;
- II. Avaliar se a superexpressão de OCT4A é capaz de conferir propriedades típicas de células-tronco em células de meduloblastoma humano;
- III. Avaliar possíveis alterações moleculares em decorrência da superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURA CELULAR

As linhagens de meduloblastoma humano Daoy e D283Med foram adquiridas da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC – Manassas, VA, EUA). A linhagem celular USP-13-Med foi estabelecida em nosso laboratório a partir de amostra disponível no bioreservatório do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL). A amostra foi obtida em colaboração com o Dr. Hamilton Matushita (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) após ressecção tumoral de um paciente de três anos de idade do sexo masculino diagnosticado com meduloblastoma do tipo histopatológico clássico. A amostra foi lavada com solução tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate-buffered saline*, PBS) (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, EUA), e dissociada mecanicamente com auxílio de um bisturi até a obtenção de pequenos fragmentos que foram posteriormente submetidos a dissociação enzimática pela ação de colagenase I (0,1% em PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 60 minutos a 37°C.

As linhagens Daoy e USP-13-Med foram cultivadas com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *Low-Glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL Penicilina, 100 µg/mL Estreptomicina e 250 ng/mL *Fungizone*® (Lifetechnologies). As duas linhagens possuem características de crescimento em adesão e foram subcultivadas após atingirem 80% de confluência. A linhagem celular D283Med foi cultivada com meio *Minimum Essencial Medium* (MEM) (Lifetechnologies) suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL Penicilina, 100 µg/mL Estreptomicina e 250 ng/mL *Fungizone*®. Devido a sua propriedade de crescimento semiaderente, as células foram subcultivadas após atingirem 40-50% do volume total cultivado.

Células t-HEK 293 foram utilizadas para a produção de partículas retrovirais e foram cultivadas em meio DMEM *High-Glucose* suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL Penicilina, 100 µg/mL Estreptomicina

e 250 ng/mL *Fungizone*[®]. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Para dissociação de células aderentes, as células foram lavadas com PBS para remoção do meio residual e a dissociação ocorreu por ação da solução enzimática *Tryple Select* (Lifetechnologies) durante aproximadamente 5 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com a adição de meio de cultura suplementado com SFB e as células foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos.

Para a quantificação de expressão gênica, foi utilizada a linhagem celular H9 de CTE como controle positivo, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Stevens Rehen, do Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias - Rio de Janeiro (LaNCE-RJ). Para o cultivo de células H9, placas de 60 cm de diâmetro (P60) foram previamente tratadas por 30 minutos a temperatura ambiente ou por um período de 12-16 horas a 4°C com *BD Matrigel hESC-qualified Matrix* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) diluído em DMEM/F12 (DMEM suplementado com F12) (Lifetechnologies) seguindo as recomendações do fabricante. O excesso de matrigel foi descartado e as células foram adicionadas para subsequente cultivo celular com meio *mTeSR*[™] (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). O meio de cultura foi trocado diariamente e colônias em processo de diferenciação foram removidas para evitar contaminação das células que mantinham pluripotência. A dissociação celular para subcultivo foi realizada mecanicamente com auxílio de *cell scraper* (Corning, Corning, NY, EUA), seguida de lavagem com DMEM/F12 e centrifugação a 300 x g por 5 minutos. O precipitado celular foi suspenso em meio *mTeSR*[™] e as células replaqueadas em novas placas P60 previamente tratadas com matrigel.

3.2. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Ao atingirem uma confluência de 80%, as células foram lavadas com PBS e submetidas à extração de RNA total utilizando-se o kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Venlo, Holanda). Os procedimentos realizados seguiram as recomendações do fabricante. Para a eliminação de DNA

genômico, foi adicionado ao processo DNase I do kit comercial *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), também conforme indicações do fabricante.

A concentração de RNA total foi quantificada por leitura espectrofotométrica a 260 nm no aparelho Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A qualidade do RNA foi verificada pela razão 260 nm/280 nm e a integridade do RNA confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. O RNA extraído e quantificado foi armazenado em -80°C até o momento de seu uso.

Para síntese de DNA complementar (cDNA), foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra e adicionado 1 µL de Oligo dT a 50 µM (Lifetechnologies), 1 µL de dNTP Mix a 10 mM (Lifetechnologies) e completado para 13 µL com água tratada com Dicarbonato de Dietila (do inglês *Diethylpyrocarbonate*, DEPC) (Lifetechnologies). A solução foi incubada em termociclador por 5 minutos a 65°C e 1 minuto a 4°C. Após a incubação, foram adicionadas 40 unidades de *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Lifetechnologies), 200 unidades de *Superscript® II Reverse Transcriptase* (Lifetechnologies), 1 µL de ditioneitol (do inglês *Dithiothreitol*, DTT) a 0,1 M (Lifetechnologies) e 4 µL de *5X First-Strand Buffer* (Lifetechnologies). As amostras foram amplificadas seguindo o seguinte ciclo: 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 70°C e 1 minuto a 4°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

3.3. PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizadas as linhagens celulares de meduloblastoma previamente descritas (Daoy, D283Med e USP-13-Med) em diversas condições de cultivo. Como controle positivo, foi utilizada a linhagem celular H9 (CTE) para a quantificação relativa pelo método de curva padrão. Os cDNAs foram diluídos na razão 1:10 para a amplificação dos produtos *β-Actina*, *TBP*, *Gapdh*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28A*, *Oct4A*, *Oct4B* e *Oct4B1*. Para a curva padrão, foram preparados três pontos de diluição (1:10; 1:100 e 1:1000) da amostra H9.

A quantificação dos níveis de expressão foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, PCR) após reação de Transcriptase Reversa (do inglês *Reverse Transcriptase*, RT) e monitoradas pelo método de incorporação de *SYBR Green* (*Power SYBR Green Master Mix*, Lifetechnologies). Para a reação, foi utilizado 1 µL de cada primer a 10 µM, 2 µL de amostra, 8,5 µL de DEPC e 12,5 µL de *Power SYBR Green Master Mix 2X*. A Tabela 1 apresenta a lista de *primers* utilizados durante o estudo.

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados.

Nome	Sequência
OCT4A-Forward1	5'-TCGCAAGCCCTCATTTACCA-3'
OCT4A-Forward2	5'-GTGGAGAGCAACTCCGATGG-3'
OCT4A-Reverse 3	5'-GGACTCCTCCGGGTTTTGCT-3'
OCT4B-Forward	5'-GCACTTCTACAGACTATTCCTTG-3'
OCT4B-Reverse	5'-AATACCTTCCCAAATAGAACCC-3'
OCT4B1-Forward	5'-AAATCCAGTCCCAGGACATCA-3'
OCT4B1-Reverse	5'-CTGAATAACTTCCCTGGGGG-3'
LIN28A-Forward	5'-CCAGTGGATGTCTTTGTGCACC-3'
LIN28A-Reverse	5'-GTGACACGGATGGATTCCAGAC-3'
SOX2-Forward	5'-GCTACAGCATGATGCAGGACCA-3'
SOX2-Reverse	5'-TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT-3'
NANOG-Forward	5'-CCTGAAGAAAATCCATCC-3'
NANOG-Reverse	5'-CCTTGTCTTCCTTTTTTTCGA-3'
β-ACTINA-Forward	5'-CGACAGGATGCAGAAGGAG-3'
β-ACTINA-Reverse	5'-TCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'
TBP-Forward	5'-GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3'
TBP-Reverse	5'-TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'
GAPDH-Forward	5'-GCATCCTGGGCTACACTG-3'
GAPDH-Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGCTGTA-3'

A quantificação foi realizada pelo método de curva padrão utilizando-se a seguinte fórmula: $\frac{Gene\ Alvo: 10^{(Ct-b)}/-a}{Gene\ End\acute{o}geno: 10^{(Ct-b)}/-a}$, onde **Ct** é o ciclo dado pelo *threshold* definido na fase exponencial de amplificação, **b** é o valor de intersecção da reta no eixo y e **a** é o valor dado pela angulação da reta.

A confirmação da especificidade dos produtos de amplificação (*amplicons*) foi realizada por análise da curva de dissociação e verificação de seus tamanhos em gel de agarose a 2%. A especificidade dos *amplicons* dos

diferentes transcritos de *POU5F1* foi confirmada também por sequenciamento de DNA em colaboração com a *facility* do CEGH-CEL. Os produtos de PCR foram inicialmente clonados utilizando *TOPO® TA Cloning® Kit* (Thermo Fisher Scientific) e posteriormente submetidos ao sequenciamento de Sanger, utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Lifetechnologies), ambos seguindo as recomendações do fabricante.

3.4. WESTERN BLOT

Os níveis proteicos de OCT4A foram verificados pela técnica de *Western Blot*. Assim que as culturas celulares atingiram 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e dissociadas pela ação de *Tryple Select* (Lifetechnologies) por 5 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com a adição de meio de cultura suplementado com SFB e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O precipitado celular foi lavado duas vezes com PBS para retirada de todas as proteínas do SFB e as células lisadas com o tampão RIPA (Sigma Aldrich), a 4°C por 5 minutos para completa lise celular. O lisado foi clarificado por centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A quantificação proteica total foi obtida pelo método BCA (Thermo Fisher Scientific). Para o ensaio de *Western Blot*, foi utilizado 20 µg de proteína total de cada amostra. Estas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida de 1 mm para separação das proteínas. As proteínas foram transferidas para membrana de Fluoreto de Polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Fluoride*, PVDF) (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) pelo método de eletrotransferência úmida, e bloqueadas por um período de 12-16 horas em solução de 5% de Albumina Sérica Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*, BSA) em tampão TBST (do inglês *Tris-Buffered Saline and Tween 20*). Os anticorpos utilizados foram: *Mouse anti Human OCT4* (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA), *Goat anti Human OCT4* (Santa Cruz Biotechnologies), HRP anti *Mouse* (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, EUA), HRP anti *Goat* (ABCAM, Cambridge, Reino Unido), HRP – β -ACTINA (ABCAM).

Os anticorpos primários foram incubados por 1 hora sob agitação e os anticorpos secundários foram incubados por 2 horas sob agitação,

ambos a temperatura ambiente. Após cada incubação com anticorpo, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos sob agitação com tampão TBST. A revelação foi realizada com o kit *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore, Billerica, MA, EUA) e detecção pelo Imagequant Las 4000 (GE Healthcare).

3.5. CLONAGEM DE PLASMÍDEOS PARA TRANSFEÇÃO E TRANSDUÇÃO CELULAR

Os plasmídeos retrovirais estruturais VSV-G e CMV-GP, bem como o plasmídeo para superexpressão estável de OCT4A, foram gentilmente cedidos pela pesquisadora do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Dra. Karina Griesi Oliveira. Os plasmídeos foram diluídos a uma concentração final de 100 ng/μL em água MilliQ. Foram adicionados 200 ng de plasmídeo à uma solução contendo aproximadamente 1×10^8 bactérias eletrocompetentes DH5α. As bactérias sofreram eletroporação a tensão de 2.500 V e 2,5 F e logo em seguida foi adicionado meio LB (do inglês *Lysogeny Broth*) a temperatura ambiente. As amostras foram incubadas a 37° C por 1 hora e plaqueadas em meio sólido seletivo com ampicilina a 100 μg/mL (Amresco, Solon, OH, EUA). Após 16 horas de incubação, uma colônia foi coletada e suspensa em 2 mL de meio líquido seletivo e permitida a crescer por 16 horas a 37°C. Foi inoculado 1 mL da suspensão celular em 1 L de meio seletivo para expansão da cultura por um período de 12 a 16 horas a 37°C, sob agitação. Plasmídeos foram extraídos com o kit *NucleoBond® Xtra Maxi Plus* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

3.6. SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A

A superexpressão foi realizada em colaboração com a pesquisadora do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Dra. Karina Griesi Oliveira. Células t-HEK 293 foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro (P100) e mantidas a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem confluência de 70%, as células foram transfectadas com os plasmídeos CMV-GP, VSV-G e OCT4A (Addgene, Cambridge, MA, EUA)

(TAKAHASHI et al., 2007) com auxílio de Polietilenimina (do inglês *Polyethylenimine*, PEI) a 10% (m/v). As transfecções foram realizadas individualmente em um total de duas placas por plasmídeo. Após 48 horas da transfecção, as partículas retrovirais foram coletadas e concentradas por ultracentrifugação a 66.000 x g por 2 horas. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de meio foi adicionado ao precipitado. Este foi mantido por um período de 12-16 horas para suspensão. No dia seguinte, 600 µL de meio foi adicionado à solução contendo as partículas virais e esta última adicionada a um poço de uma placa de 6 poços contendo as células de interesse, a 50% de confluência. Os vírus foram mantidos em contato com as células por 24 horas e posteriormente o meio foi trocado para o meio convencional de cultivo da célula. As células foram então expandidas e congeladas em solução contendo 90% de SFB e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior realização dos experimentos.

3.7. POPULATION DOUBLING LEVEL

As células foram plaqueadas em frascos de cultivo celular de 75 cm² a baixa densidade celular (Inóculo inicial: Daoy: 1x10⁴ células; D283Med: 1x10⁵; USP13Med: 2x10⁴). Após atingirem 80% de confluência (aproximadamente 5-7 dias), as células foram dissociadas sob ação de tripsina, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e o precipitado celular suspenso em 1 mL de DMEM. As células foram contadas pelo método de exclusão de *Trypan Blue* com auxílio do contador automático *Countess* (Lifetechnologies) seguindo as recomendações do fabricante. As células foram novamente plaqueadas à baixa densidade e o mesmo procedimento foi realizado até a obtenção de 5-10 pontos de contagem.

O *Population Doubling Level* (PDL) foi calculado seguindo as recomendações da OMS, utilizando a seguinte fórmula: $PDL = \text{Log}_{10}(N/N_0) \times 3,33$, onde **N** é o número de células coletadas após período de crescimento celular e **N₀** é o número inicial de células plaqueadas a cada nova passagem (WHO, 2010). Para cálculo do *Doubling Time* (DT), foram seguidas

as recomendações da ATCC e foi calculado com o uso da seguinte fórmula:

$$DT = t \times \frac{\ln 2}{\ln(N/N_0)}, \text{ onde } t \text{ é o tempo de incubação (ATCC, 2014).}$$

3.8. CICLO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO

As células foram plaqueadas em poços de uma placa de seis poços e mantidas a 37°C e umidade de 5% por 24 horas até estabilização da cultura celular. No dia seguinte, as células foram carenciadas para a sincronização do ciclo celular. Para isso, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, foi adicionado meio de cultura sem SFB. Foi estabelecido um período de 24 horas de carenciamento. O SFB foi retomado na cultura após o período de incubação e as células permaneceram por mais 24 horas em estufa com controle da temperatura e umidade. Após essa incubação, as células foram lavadas com PBS e dissociadas sob ação de tripsina. As células foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e o precipitado celular lavado com PBS. As células foram fixadas com etanol 70% a 4°C por pelo menos 24 horas. As células já fixadas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 minutos com o reagente *Guava Cell Cycle* (Millipore). Após a incubação, foram adquiridos 5.000 eventos por amostra utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer* e *GuavaSoft 2.1 software* (Millipore). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FlowJo vX (FLOWJO, Ashland, OR, EUA).

3.9. CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM EM SUBSTRATO DE AGAROSE

Inicialmente, uma placa de 6 poços foi preparada para a realização do experimento. A etapa inicial consistiu em preparar a camada inferior de agarose adicionando 2 mL de solução de agarose a 0,6% (1 mL de DMEM 2 vezes concentrado suplementado com 20% SFB e 1 mL de agarose 1,2%). A agarose foi permitida a solidificar por pelo menos 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram plaqueadas a baixa densidade (500

células em 100 μL de inóculo). Foi verificado se as células encontravam-se isoladas uma das outras para, por fim, adicionar 4 mL de solução de agarose a 0,3% sobre as células já plaqueadas (2 mL de DMEM 2 vezes concentrado suplementado com 20% SFB e 2 mL de agarose 0,6%). Após solidificação desta última solução, a placa foi acomodada em estufa a 37°C e CO₂ a 5% por 24 horas. Após o período, foi adicionado 4 mL de meio suplementado em cada poço e este foi trocado a cada 3 dias, por um período de 15 dias. Após 15 dias, as colônias com tamanhos maiores que 50 μm de diâmetro foram contadas.

3.10. OBTENÇÃO DE CLONES DAS LINHAGENS CELULARES

Após os 15 dias para formação das colônias por meio do ensaio de crescimento independente de ancoragem em substrato de agarose, as três maiores colônias isoladas das células com superexpressão de OCT4A foram coletadas, enquanto que as três menores colônias da linhagem parental com expressão basal de OCT4A foram coletadas. Essas colônias foram transferidas para um poço de 24 poços contendo 500 μL de meio suplementado e dissociadas mecanicamente. As células derivadas das colônias foram mantidas em condições padrões de cultivo e subcultivadas constantemente para expansão da nova cultura celular. Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, foram obtidos extratos proteicos e de RNA para análise de expressão de OCT4.

3.11. FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS

As células foram plaqueadas em baixa densidade ($2,5 \times 10^4$ / mL) em um poço de placa de 96 poços *Ultra-Low Attachment* de fundo chato (Corning), mantidas com meio DMEM/F12 (Lifetechnologies), 20 ng/mL de Fator de Crescimento Epidermal (do inglês *Epidermal Growth Factor*, EGF - Lifetechnologies), 20 ng/mL de Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF - Lifetechnologies), *B27 supplement* (Lifetechnologies) e *N2 supplement* (Lifetechnologies). No 4º dia, foi adicionado meio novo à cultura celular. O número de esferas tumorais com tamanho superior a 50 μm (Daoy e D283Med) ou 100 μm (UPS13Med) de diâmetro foram contadas após 7 dias de cultivo. Foi realizada também aquisição de formação de esferas

tumorais em tempo real, por meio de *time-lapse*, com aquisições a cada 30 minutos por um período total de 4 dias, adquiridas junto ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) utilizando o sistema *IN Cell Analyzer 2200* (Ge Healthcare).

3.12. CITOMETRIA DE FLUXO

Para verificação dos marcadores típicos de neuroesferas, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços em meio de formação de neuroesferas (DMEM/F12 suplementado com 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF, *B27 supplement* e *N2 supplement*) e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 7 dias, com adição de meio no 4º dia de cultivo. Após a incubação, as esferas foram coletadas, lavadas com PBS e dissociadas pela ação de *Tryple Select*. A tripsina foi inativada e as células submetidas a centrifugação de 300 x g por 5 minutos. O precipitado celular foi lavado e então as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 3,7% por 10 minutos a temperatura ambiente, permeabilizadas com *Triton-X* a 0,1% (v/v) (Sigma Aldrich) por 5 minutos a temperatura ambiente e marcadas para análise de CD133 e NESTINA. Os anticorpos utilizados foram: anti-human CD133/1 conjugado a Ficoeritrina (do inglês *Phycoerythrin*, PE - Miltenyi, BergischGladbach, Alemanha) e anti-human Nestin conjugado a Aloficocianina (do inglês *Allophycocyanin*, APC – BD Biosciences). A porcentagem de células positivas e a intensidade de fluorescência foram determinadas utilizando-se o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer* e *GuavaSoft 2.1 software* (Millipore). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo vX (FLOWJO).

3.13. ADESÃO CELULAR POR MEIO DO METABOLISMO DE MTT

As células foram plaqueadas em alta densidade (1x10⁵ células/mL) em poços de uma placa de 24 poços e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 45 minutos. O meio contendo as células não aderidas foi descartado e foi adicionada uma solução de MTT (do inglês *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) a

concentração de 166,67 µg/mL. Após uma incubação de 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, a solução de MTT foi descartada e o cristal de formazan dissolvido em 500 µL de DMSO. A quantificação do metabolismo de MTT foi realizada em triplicata em leitor de microplacas por meio de leitura espectrofotométrica a 550 nm.

3.14. MIGRAÇÃO CELULAR

Para o ensaio de migração celular, foi utilizado o kit *Oris™ Cell Migration Assay - Collagen I Coated* (Platypus Technologies, Madison, WI, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram plaqueadas nos poços de 96 poços fornecido pelo fabricante, em alta densidade (1x10⁶ células/mL) e ao redor do dispositivo plástico denominado *stopper*. O *stopper* possui como função impedir que as células adiram na região central do poço e, ao ser retirado, forneça uma região circular com 2 mm de diâmetro para que as células aderidas ao redor possam migrar. Desta forma, é possível quantificar e calcular a distância migrada. Após o plaqueamento, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por um período de 12-16 horas para que pudessem aderir. No dia seguinte, o *stopper* foi retirado e fotos de cada poço foram tiradas para aferir a área central inicial sem células (t_0). Novas fotos foram tiradas após 12 (t_{12}) e 24 horas (t_{24}) para aferir a área central sem células. As fotos foram tiradas com o sistema de aquisição de imagens *EVOS XL Cell Imaging System* (Lifetechnologies) e quantificadas utilizando o software *ImageJ*. A área migrada foi calculada pela seguinte fórmula: $\text{Área Migrada} = \text{Área}_{t_0} - \text{Área}_{t_{12} \text{ ou } t_{24}}$.

3.15. INVASÃO CELULAR

A capacidade de invasão celular foi aferida tridimensionalmente utilizando-se o kit *Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay* (Trevigen, Gaithersburg, MD, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram suspensas em uma matriz de hidrogel *Spheroid Formation ECM* e plaqueadas em um poço de uma placa de 96 poços *Ultra-Low Attachment* com fundo arredondado (Corning). Após 24 horas para

formação dos esferóides em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂, foi adicionada a matriz de invasão e meio de cultura suplementado. Para a quantificação da invasão, fotomicrografias foram tiradas pelo sistema *EVOS XL Cell Imaging System* (Lifetechnologies) entre os dias 0 a 7 após a adição de matriz de invasão e as análises foram realizadas conforme recomendações do fabricante utilizando-se o software *ImageJ*.

3.16. INDUÇÃO DE APOPTOSE POR AGENTE QUIMIOTERÁPICO

As células foram previamente carenciadas por 24 horas com meio de cultura sem SFB para sincronização do ciclo celular. As células foram plaqueadas em poços de uma placa de 6 poços e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ para estabilização da cultura celular. Após a incubação, as células foram tratadas com LC₅₀ (do inglês *Lethal Concentration 50*) de cisplatina (Sigma Aldrich) por 48 horas, dose previamente estabelecida por experimentos dose-resposta. O meio de cultura (sobrenadante) foi reservado, as células foram lavadas com PBS, também reservado, e dissociadas com *Tryple Select*. A tripsina foi inativada com o meio de cultura reservado e as células foram submetidas a centrifugação de 300 x g por 5 minutos. O precipitado celular foi suspenso em 50 µL de ANEXINA V preparada conforme recomendações do fabricante (*Guava Nexin Reagent* – Millipore), transferido para um poço de 96 poços de fundo redondo e mantido a 37°C por 15 minutos. As células foram lavadas duas vezes com tampão fornecido pelo kit e suspensas em 100 µL de solução de *7-Aminoactinomycin D* (7-AAD). As células foram incubadas a temperatura ambiente e protegidas da luz por pelo menos 5 minutos, momento inicial da obtenção dos resultados pelo citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer* e *GuavaSoft 2.1 software* (Millipore). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software *FlowJo vX* (FLOWJO).

3.17. TUMORIGÊNESE *IN VIVO* POR INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA

As células tumorais foram suspensas a uma concentração de 2×10^7 células/mL em meio sem SFB. Com auxílio de uma seringa de insulina (19G, BD Biosciences), uma injeção subcutânea de 100 μ L dessa suspensão celular foi realizada no flanco direito de camundongos fêmeas BALB/C *Nude* com idade aproximada de 8-12 semanas. O crescimento tumoral foi aferido semanalmente, bem como possíveis complicações decorrentes do desenvolvimento do tumor. O volume tumoral foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $\frac{D_{menor} \times D_{maior}^2}{2}$, onde D_{menor} é o menor diâmetro da massa tumoral e D_{maior} é o maior diâmetro do tumor (EUHUS et al., 1986; TOMAYKO; REYNOLDS, 1989).

Ao atingir o volume máximo de 2.000 mm³, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico. O tumor foi coletado, fixado em PFA 3,7% e submetido a procedimentos padrões para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Esse procedimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP).

A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP (IB/USP) (Protocolo CEUA: 132/2011).

3.18. ENSAIO DE METÁSTASE *IN VIVO*

Para o ensaio de metástase *in vivo*, foi realizada transdução viral para superexpressão de LUCIFERASE em células tumorais, utilizando-se o sistema previamente descrito para superexpressão de OCT4A. Este procedimento foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, e executado cordialmente pela Dra. Clarissa Ribeiro Reily Rocha.

As células com superexpressão de LUCIFERASE foram suspensas a uma concentração de 1×10^6 células em 5-6 μ L de meio de cultura

sem SFB. Camundongos BALB/C *Nude* foram anestesiados com solução de 3% de cetamina e 0,4% de xilazina (Agener União, São Paulo, SP, Brasil), inoculada via intraperitoneal, a uma concentração de 6,5 $\mu\text{L/g}$ de peso do animal. Após confirmação da anestesia, o animal foi posicionado no equipamento estereotáxico (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e, com auxílio de um bisturi, foi realizada uma incisão no sentido anteroposterior da cabeça do animal e raspagem do periósteo. As suturas coronal e sagital foram evidenciadas com o uso de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10%. As coordenadas utilizadas foram 1 mm para a direita e 0,5 mm posterior ao bregma, e 2,2 mm de profundidade (STUDEBAKER et al., 2012). Com uma microseringa de alta precisão (701RN, Hamilton Company, Reno, NV, EUA) as células foram inoculadas a uma velocidade de 1 μL por minuto para evitar aumento repentino na pressão intracraniana. A retirada da microseringa ocorreu a uma velocidade de 1mm por minuto para evitar extravasamento das células inoculadas. Por fim, a incisão foi suturada com linha de seda 4-0 e os animais foram acondicionados em gaiolas com ventilação individual contendo maravalha. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos no biotério do CEGH-CEL, com condições padrões controladas, como temperatura (20 a 22°C), umidade (45-55%) e luz artificial (ciclo claro-escuro de 12 horas).

Os animais foram acompanhados diariamente e aquisições de imagens bioluminescentes para avaliação do crescimento tumoral foram realizadas semanalmente, por um período de 6 semanas. As aquisições foram realizadas junto ao CEFAP, utilizando-se o sistema de imageamento *in vivo* *IVIS Spectrum* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) para detecção de bioluminescência após 15 minutos da inoculação de 1,5 mg de D-Luciferina via intraperitoneal (15 mg/mL - Promega, Madison, WI, EUA). Durante todo o procedimento de aquisição, os animais permaneceram sedados por ação do anestésico isoflurano.

Os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico logo após a detecção de sintomas clínicos como perda de peso, letargia, piloereção, anormalidades da marcha, entre outros. Após a eutanásia, os encéfalos e colunas foram coletados e fixados com PFA a 3,7% e submetidos a procedimento padrão de HE.

Todos os procedimentos foram realizados com o cuidado de minimizar o sofrimento dos animais como proposto pelo *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS) no documento *International Guiding Principles For Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS, 2012). A realização dos experimentos foi aprovada pelo CEUA do IB/USP (Protocolo CEUA: 220/2015).

3.19. CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS EM CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Placas de 6 poços foram tratadas por um período de 12-16 horas com *BD Matrigel™ hESC-qualified Matrix* (BD Biosciences) a 4°C. As células foram então plaqueadas sobre a matriz de matrigel e mantidas em cultura com meio *mTeSR™1* (Stem Cell Technologies). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e meio de cultura novo foi adicionado às células no 3º dia de cultivo.

A cultura foi acompanhada por 6 dias e fotomicrografias foram tiradas pelo sistema *EVOS XL Cell Imaging System* (Lifetechnologies) no 6º dia. Concomitantemente, foi realizada a contagem do total de células após 6 dias de cultivo. Para isso, as células foram dissociadas com *Tryple Select* (Lifetechnologies), suspensas em meio DMEM/F12 suplementado com SFB e contadas imediatamente.

3.20. ANÁLISE DA INTEGRIDADE CROMOSSOMAL POR TÉCNICA DE CGH ARRAY

A análise de alterações cromossômicas foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Carla Rosenberg e com as Especialistas Sílvia Costa e Lígia Vieira.

A extração de DNA foi realizada pelo método padrão fenol/clorofórmio, no qual as amostras foram inicialmente submetidas a lise celular com a adição de SDS 10% e degradação de proteínas contaminantes

com a adição de proteinase K por um período de 12-16 horas a 37°C. A extração do DNA genômico ocorreu após adição de fenol (Lifetechnologies), solução de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Lifetechnologies) e clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com a adição de acetato de sódio a 3M (NaAc) e etanol. O DNA foi suspenso em tampão Tris-EDTA (TE) e quantificado por leitura espectrofotométrica a 260 nm, no aparelho *Nanodrop 2000* (Thermo Fisher Scientific).

A integridade cromossomal foi avaliada utilizando-se microarranjos de oligonucleotídeos de 4x180k produzidos pela *Oxford Gene Technology* (OGT, Oxford, Reino Unido), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, 800 ng de DNA genômico foram digeridos por ação das enzimas *Alu I* e *Rsa I* adicionadas a BSA e Tampão C. As enzimas foram inativadas por calor a 65°C por 20 minutos e o DNA fragmentado, também por calor, após incubação de 10 minutos a 95°C. As amostras foram marcadas utilizando-se o kit *Cytosure Genomic DNA Labelling kit* (OGT) após adição de *Random Primers*, uma mistura de dCTP (do inglês *2'-deoxycytidine 5'-triphosphate*) conjugado aos corantes Cianina 3 (do inglês *Cyanine 3*, Cy3) ou Cianina 5 (do inglês *Cyanine 5*, Cy5), e a enzima *Klenow*.

As amostras marcadas foram purificadas em colunas *Illustra Probequant G-50 Micro Columns* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificadas após leitura espectrofotométrica a 260 nm. A precipitação do DNA ocorreu após adição de *DNA Cot-1* (Lifetechnologies), NaAc 3M e etanol à uma mistura de DNA-teste e DNA-Controle.

Para a hibridização, o DNA precipitado foi suspenso em tampão TE e adicionadas as soluções de bloqueio e hibridização fornecidas pelo kit. As amostras foram cuidadosamente aplicadas nos microarranjos e a hibridização ocorreu por 16 horas a 65°C em forno de hibridização giratório da Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os microarranjos foram lavados e submetidos a escaneamento no equipamento *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies).

As análises foram realizadas no software *Feature Extraction Software* (Agilent Technologies) e o número aberrante de cópias (do inglês *Copy Number Aberrations*, CNAs) foi obtido utilizando-se o algoritmo ADM-2 com *threshold* de sensibilidade de 6,7. Deleções e ganhos cromossômicos foram considerados quando o Log_2 da razão de Cy3/Cy5 eram $<-0,3$ ou $>0,3$. Para a detecção de anomalias induzidas pela superexpressão de OCT4A, foi realizada hibridização na qual a amostra de DNA-Controle foi correspondente às células de meduloblastoma controle sem superexpressão de OCT4A e o DNA-teste às células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A.

3.21. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

Para a análise de expressão gênica global, foram selecionados 2-3 clones de cada linhagem celular analisada, com ou sem superexpressão de OCT4A. Os RNAs foram extraídos conforme descrito em 3.2, utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e submetido a eliminação de DNA genômico utilizando *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). A concentração de RNA total foi quantificada por leitura espectrofotométrica a 260 nm, no aparelho *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). A qualidade do RNA foi verificada pela razão 260 nm/280 nm e a integridade do RNA confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% para análise das bandas ribossomais 18 e 28 S.

Uma vez confirmada a integridade e qualidade do RNA, as amostras foram submetidas aos protocolos dos kits *Ambion® WT Expression Kit* (Lifetechnologies) para amplificação e purificação, e *GeneChip® WT Terminal Labeling and Controls Kit* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) para adição dos controles da reação e marcação das amostras, ambos seguindo-se as recomendações dos fabricantes. As amostras foram aplicadas nos microarranjos *GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array* (Affymetrix) e a hibridização, lavagem e uma segunda etapa de marcação foram realizadas com o kit *GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit* (Affymetrix). O escaneamento foi realizado no equipamento *GeneChip® Scanner 3000* (Affymetrix) utilizando-se o programa *Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC)* (Affymetrix).

A qualidade dos *arrays* e normalização dos dados para RMA (*Robust Multichip Analysis*) foi realizada utilizando-se *Affymetrix® Expression Console Software* (Affymetrix). Os genes diferencialmente expressos foram identificados após a análise de variância *One-way ANOVA* no software *Transcriptome Analysis Console v3.0* (Affymetrix) e analisados com a plataforma *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA – Qiagen – Disponível em: <http://www.ingenuity.com>).

3.22. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas comparando o grupo com expressão basal de OCT4A (Controle) e o grupo com superexpressão de OCT4A (OCT4A) e apresentados graficamente como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Diferenças estatísticas foram obtidas após análise de *t* de *Student* e consideradas significativas quando $p < 0,05$. As comparações entre os grupos com diferentes níveis de expressão de OCT4A foram realizadas por análise de variância *One-way ANOVA* seguido de teste Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$. As análises e gráficos foram gerados pelo software *GraphPad Prism 6*.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. NÍVEIS BASAIS DE TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *POU5F1* EM CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA

Durante a realização da presente tese, poucos trabalhos analisavam separadamente a expressão dos transcritos alternativos do gene *POU5F1*, codificadores das diferentes isoformas de OCT4. Devido às evidências de ação do OCT4 na tumorigênese e progressão tumoral, faz-se necessária a distinção dos diferentes transcritos alternativos para verificar efeitos transcrito-específicos. Para tanto, a análise desses transcritos alternativos seguiu o fluxograma apresentado na Figura 8. Os *primers* para amplificação por qRT-PCR foram desenhados em junções éxon-éxon para evitar amplificações oriundas de DNA genômico e de forma a manter a especificidade de detecção de cada transcrito. A Figura 9 apresenta um esquema da estrutura do gene *POU5F1* e seus respectivos transcritos, bem como a posição final dos pares de *primers* desenhados e utilizados experimentalmente.

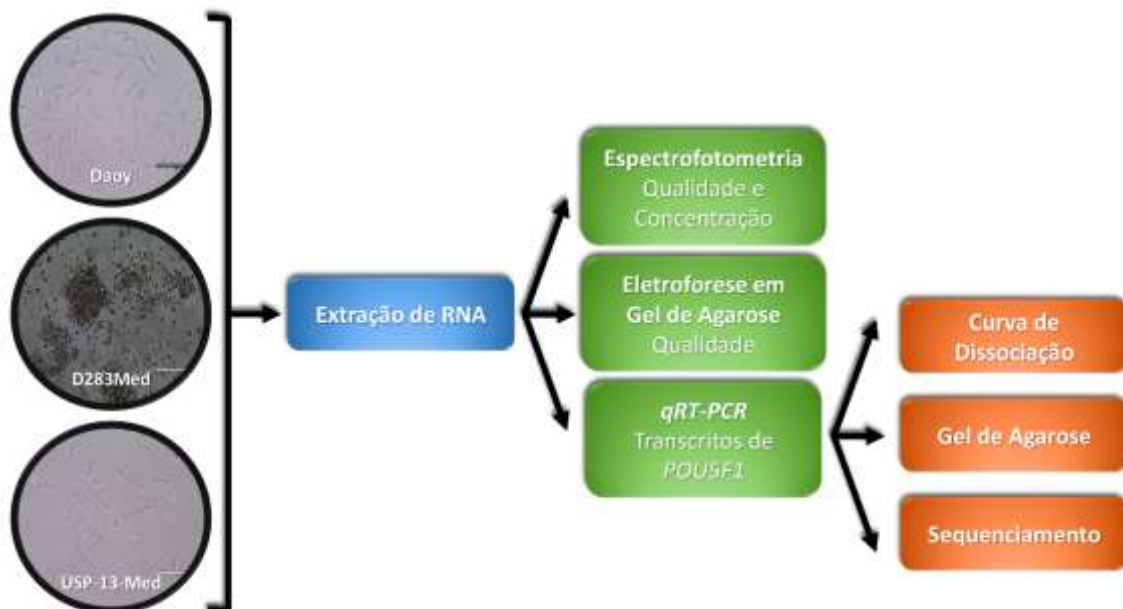


Figura 8 - Fluxograma para análise de transcritos alternativos de *POU5F1* em células de meduloblastoma humano. Amostras de RNA total foram extraídas das células de meduloblastoma Daoy, D283Med e USP-13-Med. Após a confirmação da qualidade dos RNAs totais e subsequente síntese de cDNA, níveis de transcritos de *POU5F1* foram quantificados por qRT-PCR. A especificidade das reações de qRT-PCR foi confirmada após (1) avaliação de pico único obtida na curva de dissociação dos produtos de amplificação; (2) avaliação de banda única após separação dos *amplicons* por eletroforese em gel de agarose e (3) avaliação da sequência de nucleotídeos dos produtos de amplificação por procedimento padrão de sequenciamento de Sanger.

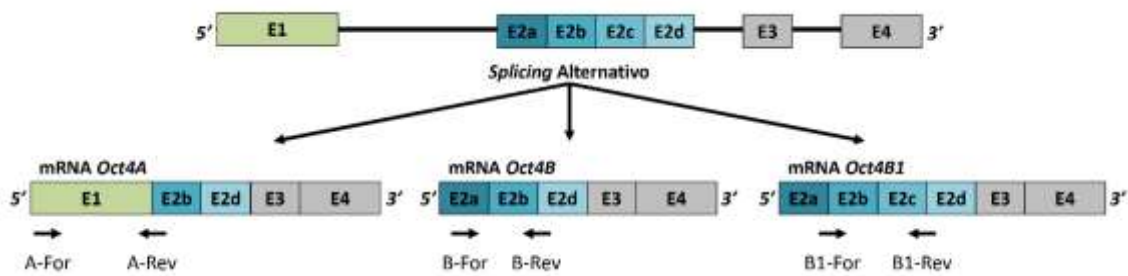


Figura 9 - Posição final dos *primers* selecionados para amplificação dos diferentes transcritos alternativos do gene *POU5F1*. Representação esquemática da estrutura do gene *POU5F1*, com destaques em verde: éxon específico do transcrito *Oct4A*; Azul: éxon específico dos transcritos *Oct4B* e *Oct4B1*. São representadas também as estruturas finais dos transcritos *Oct4A*, *Oct4B* e *Oct4B1* e as localizações dos respectivos pares de *primers* utilizados para amplificação específica desses transcritos.

A especificidade dos produtos de amplificação foi verificada por três métodos distintos: (1) análise de pico único na curva de dissociação, (2) tamanho dos *amplicons* em gel de agarose e (3) análise da sequência de nucleotídeos dos *amplicons* após sequenciamento.

Como é possível observar pela Figura 10, todas as reações de qRT-PCR apresentaram um pico único em suas respectivas curvas de dissociação de *amplicons*, indicando especificidade.

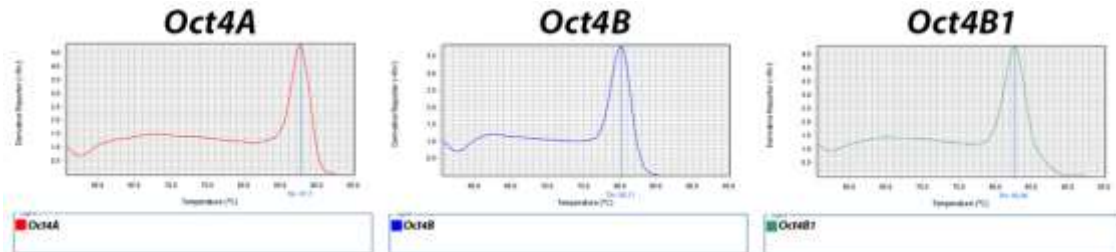


Figura 10 - Curva de dissociação dos produtos de amplificação dos transcritos alternativos de *POU5F1*. Vermelho: *Oct4A* ($T_m = 87,7$); Azul: *Oct4B* ($T_m = 80,11$); Verde: *Oct4B1* ($T_m = 82,5$).

Os produtos da amplificação dos transcritos de *POU5F1* foram então submetidos a separação em gel de agarose de forma a confirmar a presença de um único produto, bem como identificar o seu respectivo tamanho. Como é possível observar na Figura 11, em cada uma das reações de qRT-PCR foi detectada apenas uma banda com o peso molecular estimado para cada respectivo *amplicom* (*Oct4A*: 459 pb; *Oct4B*: 139 pb; *Oct4B1*: 375 pb).

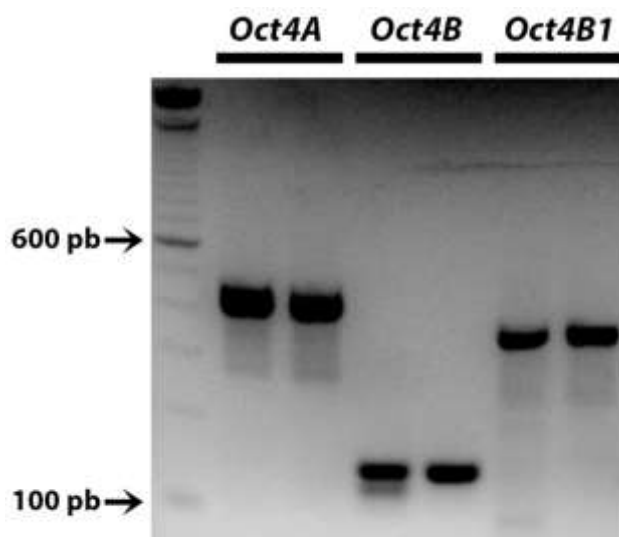


Figura 11 - Análise de *amplicons* correspondentes a transcritos alternativos de *POU5F1*, por eletroforese em gel de agarose. Produtos de amplificação foram gerados a partir de amostras de cDNA de células da linhagem de meduloblastoma Daoy. Tamanhos esperados dos respectivos *amplicons*: *Oct4A*: 459 pb. *Oct4B*: 139 pb. *Oct4B1*: 375 pb.

Os produtos de amplificação foram também submetidos a sequenciamento para a confirmação da especificidade das reações de qRT-PCR na detecção de transcritos alternativos de *POU5F1*. O sequenciamento foi realizado em triplicata para cada transcrito, nos dois *frames* de leitura, *Forward* e *Reverse*, e os resultados estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos dos produtos de amplificação gerados em reações de qRT-PCR para detecção de transcritos alternativos de *POU5F1*.

(CONTINUA)

Transcrito	Sequência
<i>Oct4A</i>	GGACTCCTCCGGGTTTTGCTCCAGCTTCTCCTTCTCCAGCTTCACGG CACCAGGGGTGACGGTGCAGGGCTCCGGGGAGGCCCCATCGGAGT TGCTCTCCACCCCGACTCCTGCTTCGCCCTCAGGCTGAGAGGTCTCC AAGCCGCCTTGGGGCACTAGCCCCACTCCAACCTGGAGCCCACAGT ACGCCATCCCCCACAGAACTCATACGGCGGGGGGCATGGGGGAAT CCCCACACCTCAGAGCCTGGCCCAACCCCGGCCCGATTCTGGC CCTCCAGGAGGGCCTTGAAGCTTAGCCAGGTCCGAGGATCAACCC AGCCCGGCTCCGGCCCCCCTGGCCATCACCTCCACCACCTGGAGG GGGGCGAGAAGGCGAAATCTGAAGCCAGGTGTCCC GCCATGGGGAA GGAAGGCGCCCCAAGCCGGGGGCCTGGTGAAATGAGGGCTTGCGA
<i>Oct4B</i>	GCACTTCTACAGACTATTCCTTGGGGCCACACGTAGGTTCTTGAATCC CGAATGGAAAGGGGAGATTGATAACTGGTGTGTTTATGTTCTTACAAG TCTTCTGCCTTTTAAAATCCAGTCCCAGGACATCAAAGCTCTGCAGAA AGAACTCGAGCAATTTGCCAAGCTCCTGAAGCAGAAGAGGATCACCC TGGGATATACACAGGCCGATGTGGGGCTCACCCCTGGGGGTTCTATTT GGGAAGGTATT

(CONCLUSÃO)

Oct4B1

```
CTGAATACCTTCCCTGGGGGAGGCCAGTCAAAGAGAAGCAAATGA
GGGAGCACGCAGGGCCCTTGTGACCCTGAGATCCAAGCTTACCACC
TCTTCCCAGAGGGAGCTCAAAGCATCTTCTCCCTCTCCCTACTCCTCT
TCATGGGTGAGGGTAGTCTGCCCTGCCCTCCCCACTAGGTTTCAG
GGATACCCCTCAGAGGGGAGATGCGGTCAGAATCTGCAGAGGGGAA
CCCACCAAATAGAACCCCCAGGGTGAGCCCCACATCGGCCTGTGTAT
ATCCCAGGGTGATCCTCTTCTGCTTCAGGAGCTTGGCAAATTGCTCG
AGTTCTTTCTGCAGAGCTTTGATGTCCTGGGACTGGATT
```

As sequências obtidas de cada *frame* de leitura foram sobrepostas e as sequências consenso foram submetidas a alinhamento global na plataforma pública *on-line* do NCBI *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* (Figura 12). As sequências obtidas nessa análise apresentaram 100% de cobertura de alinhamento (*Query Cover*) com os seus respectivos transcritos, confirmando então a especificidade das respectivas reações de qRT-PCR.

Oct4A

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA	832	832	100%	0.0	99%	NM_002701.5
Human sapiens POU class 5 homeobox 1B (POU5F1B), mRNA	737	737	96%	0.0	96%	NM_001108942.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 3 (POU5F3), non-coding RNA	673	673	89%	0.0	96%	NR_038449.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 4 (POU5F4), non-coding RNA	645	645	88%	0.0	95%	NR_034189.1

Oct4B

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 5, mRNA	460	460	100%	3e-127	100%	NM_001283987.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 2, mRNA	460	460	100%	3e-127	100%	NM_203289.3
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 6, mRNA	444	444	96%	3e-122	100%	NM_001283986.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 3 (POU5F3), transcript variant 2, mRNA	248	248	53%	2e-63	100%	NM_001173531.2
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA	248	248	53%	6e-63	100%	NM_002701.5
Human sapiens POU class 5 homeobox 1B (POU5F1B), mRNA	235	235	52%	2e-59	99%	NM_001108942.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 pseudogene 4 (POU5F4), non-coding RNA	230	230	62%	6e-58	96%	NR_034189.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 3 pseudogene 3 (POU5F3), non-coding RNA	228	228	52%	3e-57	98%	NR_038449.1

Oct4B1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 4, mRNA	662	662	100%	0.0	99%	NM_001283986.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 5, mRNA	241	241	36%	6e-61	100%	NM_001283987.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 2, mRNA	241	241	36%	6e-61	100%	NM_203289.3
Human sapiens POU class 5 homeobox 3 (POU5F3), transcript variant 2, mRNA	231	231	34%	3e-58	100%	NM_001173531.2
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA	230	230	33%	1e-57	100%	NM_002701.5
Human sapiens POU class 5 homeobox 1B (POU5F1B), mRNA	224	224	33%	6e-56	99%	NM_001108942.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 1 pseudogene 4 (POU5F4), non-coding RNA	219	219	33%	3e-54	98%	NR_034189.1
Human sapiens POU class 5 homeobox 3 pseudogene 3 (POU5F3), non-coding RNA	217	217	33%	1e-53	98%	NR_038449.1

Figura 12 - Alinhamento global das sequências consenso dos *amplicons* de transcritos alternativos de *POU5F1* utilizando a plataforma pública *on-line* do NCBI *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. Os produtos de amplificação dos transcritos alternativos de *POU5F1* tiveram 100% de cobertura de alinhamento apenas com seus respectivos transcritos. *Oct4A*: transcrito variante 1; *Oct4B*: transcritos variantes 2 e 5; *Oct4B1*: transcrito variante 4.

Após essa confirmação, prosseguiu-se com a análise de expressão gênica por qRT-PCR nas células das linhagens de meduloblastoma humano Daoy, D283Med e USP-13-Med. A expressão do gene-alvo foi normalizada pela expressão do gene endógeno β -ACTINA, o qual apresentou expressão mais estável nas linhagens celulares, dentre os genes endógenos analisados (*GAPDH* e *TBP* – Dado não apresentado). Os dados são apresentados como expressão relativa à amostra de CTE, utilizada como controle positivo.

Como é possível observar na Figura 13, o transcrito *Oct4A* apresentou o menor nível de expressão dentre os três transcritos avaliados, em todas as linhagens celulares.

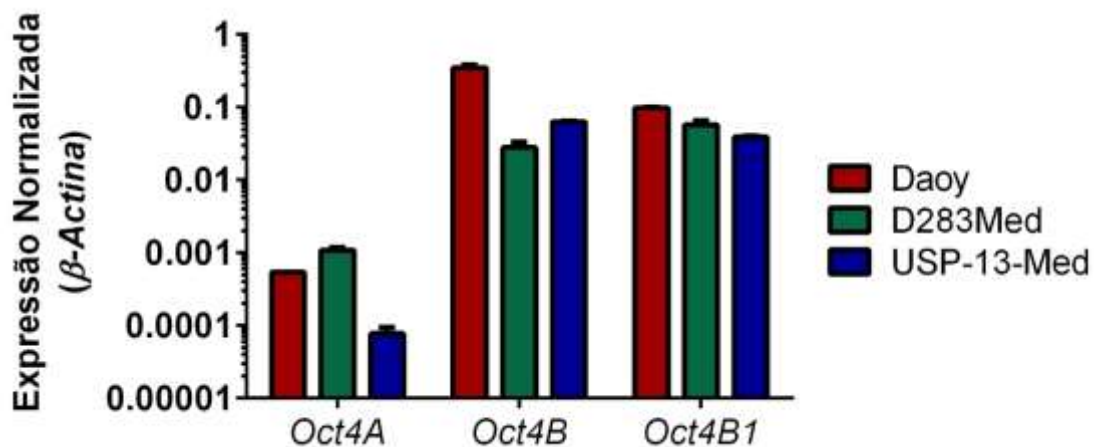


Figura 13 - Níveis basais de transcritos de *POU5F1* em células de meduloblastoma humano. Dados de qRT-PCR normalizados pela expressão do gene endógeno β -ACTINA e apresentados como expressão relativa à amostra de CTE, utilizada como controle positivo.

4.2. SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A

Considerando-se os baixos níveis relativos de transcritos *Oct4A* detectados nas linhagens celulares de meduloblastoma humano, a estratégia do trabalho escolhida para o estudo funcional de OCT4A foi baseada em superexpressão gênica, seguindo as etapas descritas no fluxograma apresentado a seguir (Figura 14):

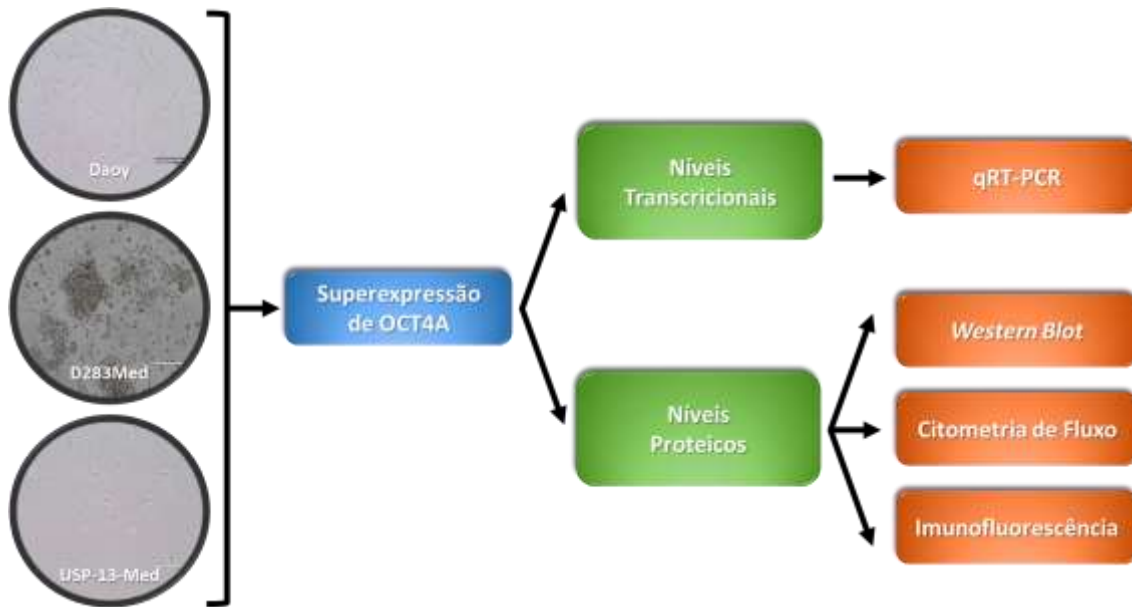
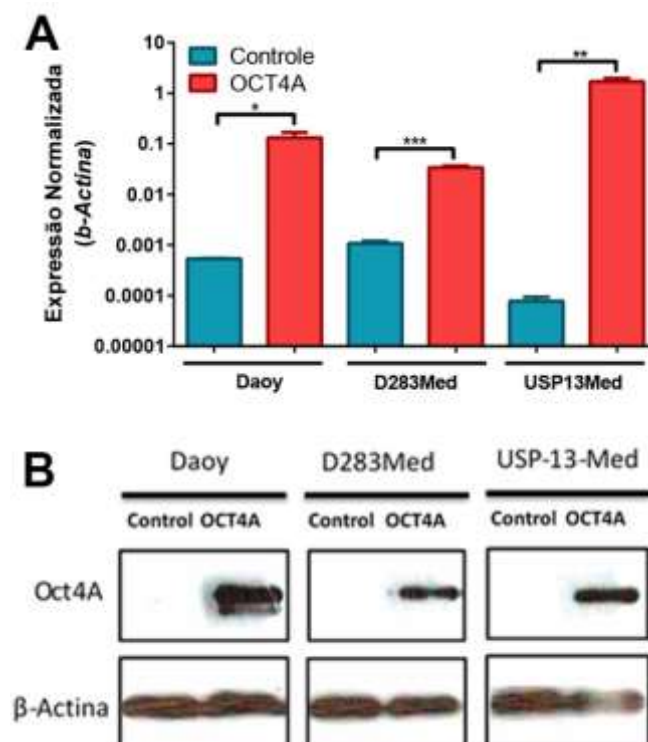


Figura 14 - Fluxograma para superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano. As células das linhagens de meduloblastoma humano Daoy, D283Med e USP-13-Med foram mantidas por 24 horas em contato com partículas retrovirais para a superexpressão de OCT4A, a qual foi confirmada tanto em nível transcricional, por qRT-PCR, quanto proteico, pelas técnicas de *Western Blot* e citometria de fluxo. A localização subcelular de OCT4A após superexpressão foi avaliada por imunofluorescência.

A confirmação da superexpressão de OCT4A nas diferentes linhagens de meduloblastoma se deu por avaliação dos respectivos níveis transcricionais e proteicos, utilizando-se métodos distintos e complementares (Figura 15).

(CONTINUA)



(CONCLUSÃO)

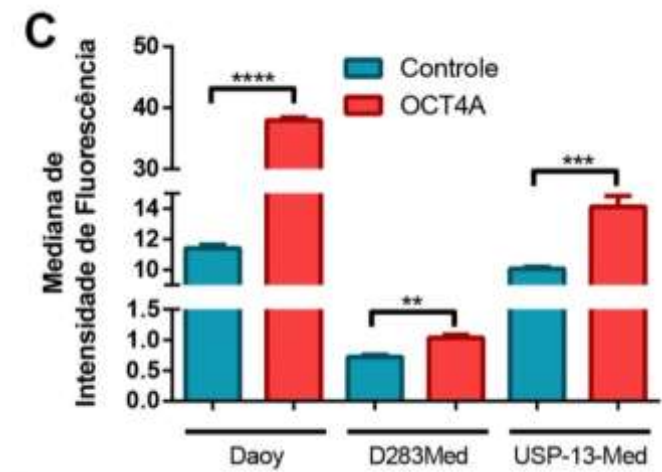


Figura 15 - Superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano. (A) Quantificação de transcritos *Oct4A* por qRT-PCR em células de meduloblastoma humano. Dados normalizados pela expressão do gene endógeno β -*ACTINA* e apresentados como expressão relativa à amostra de CTE, utilizada como controle positivo. Respective níveis proteicos de OCT4A detectados por (B) *Western Blot* e (C) mediana da intensidade de fluorescência de células marcadas com anti-OCT4A por citometria de fluxo. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Outro ponto a ser mencionado é que, apesar de existirem diferentes anticorpos para detecção de OCT4, a grande maioria dos mesmos não é capaz de distinguir suas diferentes isoformas. Entretanto, análises por imunofluorescência revelaram que a superexpressão realizada nas células tumorais influenciou apenas a expressão de OCT4A. Como previamente mencionado, a isoforma OCT4A é nuclear, enquanto a isoforma OCT4B é presente exclusivamente no citoplasma. A isoforma OCT4B1 foi descoberta mais recentemente e ainda não existem informações precisas quanto a sua localização subcelular. Como é possível observar na Figura 16, a imunomarcção celular observada após a superexpressão de OCT4A foi exclusivamente nuclear. As imagens para células da linhagem D283Med não foram disponibilizadas pois, apesar de superexpressas para OCT4A, os níveis foram muito baixos para detecção por imunofluorescência.

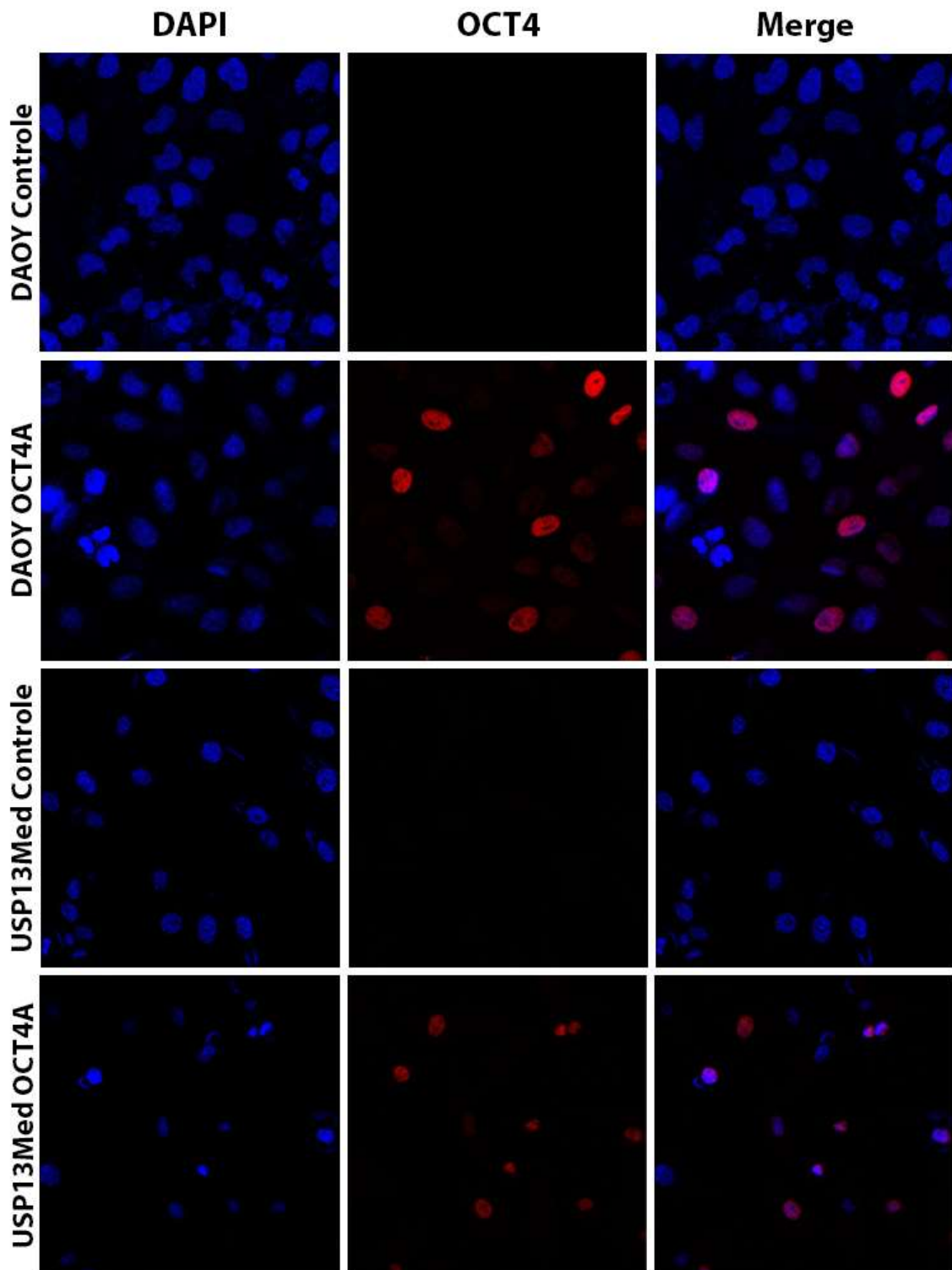


Figura 16 - Detecção de isoformas de OCT4 em linhagens de meduloblastoma humano por microscopia de fluorescência. Avaliação da expressão proteica de OCT4A e sua localização subcelular, avaliada por imunofluorescência, em células de meduloblastoma após superexpressão de OCT4A. O núcleo foi marcado com DAPI (Azul) e OCT4A marcado com anticorpo secundário conjugado com Cy3 (Vermelho). OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A.

Verificou-se ainda que a superexpressão de OCT4A causou alterações pontuais na expressão de *Oct4B* em células da linhagem Daoy e *Oct4B1* em células da linhagem USP-13-Med (Figura 17).

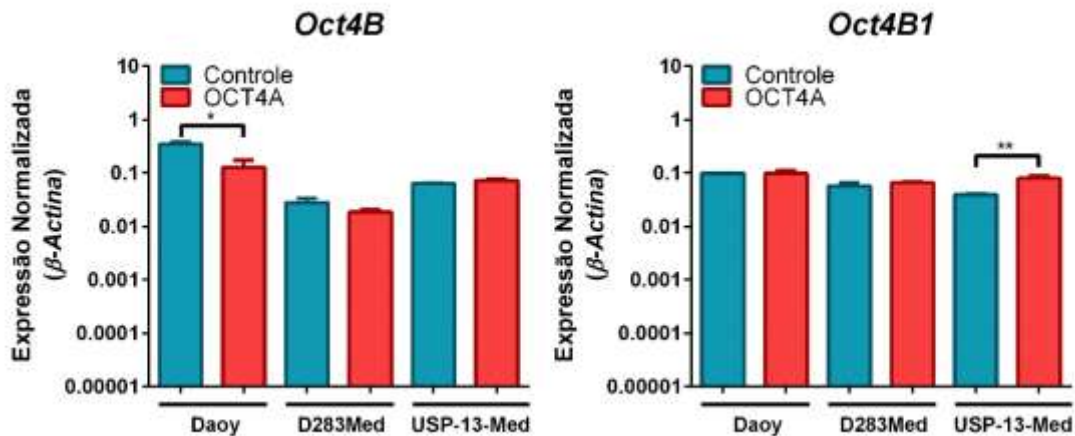


Figura 17 - Expressão de transcritos alternativos de *POU5F1* após a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano. Detecção do transcrito *Oct4B* e *Oct4B1* em células de meduloblastoma humano por qRT-PCR. Dados apresentados como expressão relativa à amostra de CTE, utilizada como controle positivo. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3. SUPEREXPRESSION DE OCT4A FAVORECE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA *IN VITRO*

4.3.1. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar o efeito da superexpressão de OCT4A na capacidade proliferativa de células de meduloblastoma humano, foi realizado o ensaio de *Population Doubling Level*, no qual as células foram avaliadas por um longo período de tempo (30 a 80 dias) e observada a sua capacidade proliferativa durante várias gerações, por meio do acúmulo de dobras populacionais. Como é possível observar na Figura 18A-C, as células das linhagens Daoy e D283Med apresentaram maior quantidade de dobras populacionais após a superexpressão de OCT4A. No entanto, em células da linhagem USP-13-Med, a quantidade de dobras populacionais manteve-se inalterada.

A partir dos dados obtidos no ensaio de PDL, foi estimado o tempo para dobra populacional das culturas de células tumorais. Como

esperado, após a superexpressão de OCT4A, as células Daoy e D283Med apresentaram uma diminuição no tempo necessário para a ocorrência de uma dobra populacional, enquanto o tempo de dobra populacional de células da linhagem USP-13-Med não foi alterado significativamente (Figura 18D).

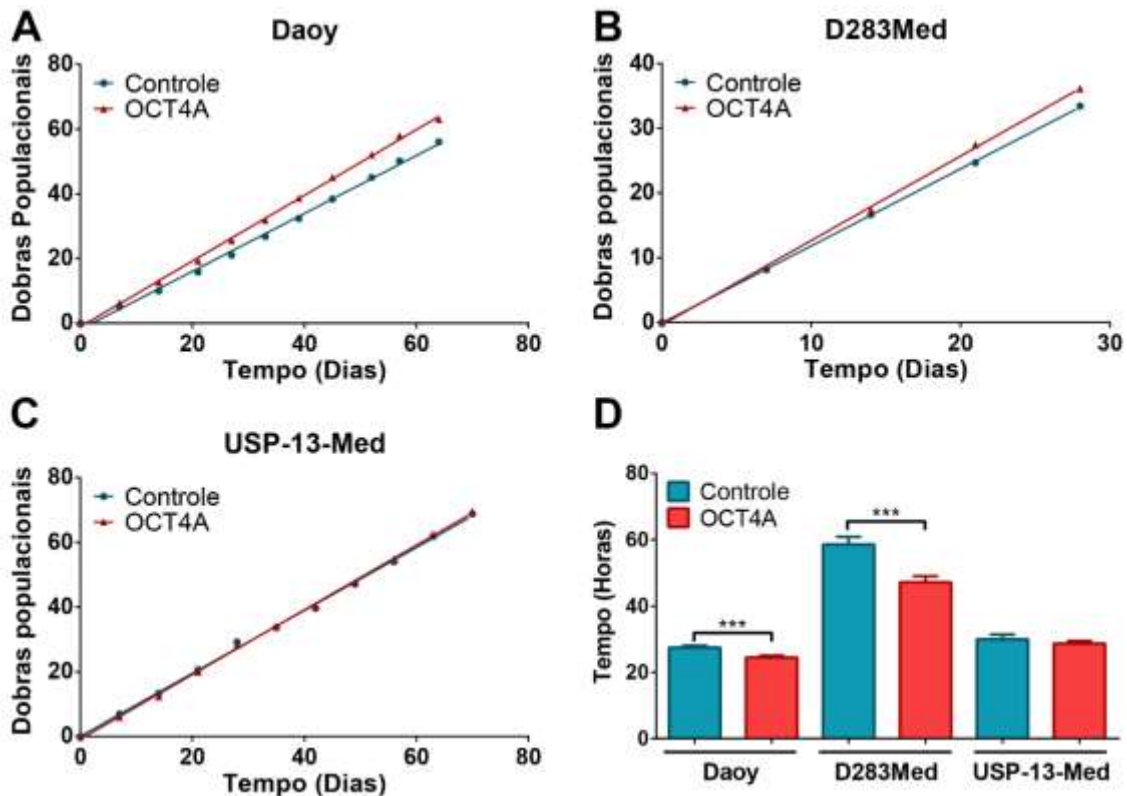


Figura 18 - OCT4A altera a taxa de crescimento e diminui o tempo de dobra populacional de células de meduloblastoma humano. Análise comparativa de dobras populacionais de células de meduloblastoma humano por mais de 30 gerações em cultura. **(A)** Daoy; **(B)** D283Med; **(C)** USP-13-Med **(D)** Análise do tempo necessário para a ocorrência de uma dobra populacional (*Doubling Time*), em células de meduloblastoma humano. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: *** $p < 0,001$.

A capacidade proliferativa de células de meduloblastoma humano também foi avaliada por análise do ciclo celular baseada na incorporação de iodeto de propídeo. Mediante superexpressão de OCT4A, observou-se em culturas das linhagens Daoy e USP-13-Med uma diminuição da população de células em G1, e um aumento nas populações contidas em S e G2/M. Similarmente, para as células da linhagem D283Med, observou-se também uma diminuição da população de células em G1 e aumento em G2/M após superexpressão de OCT4A, no entanto, detectou-se também uma diminuição de células na fase S do ciclo celular (Figura 19). Esses resultados

indicam, portanto, que a superexpressão de OCT4A contribui positivamente para a proliferação de células de meduloblastoma humano.

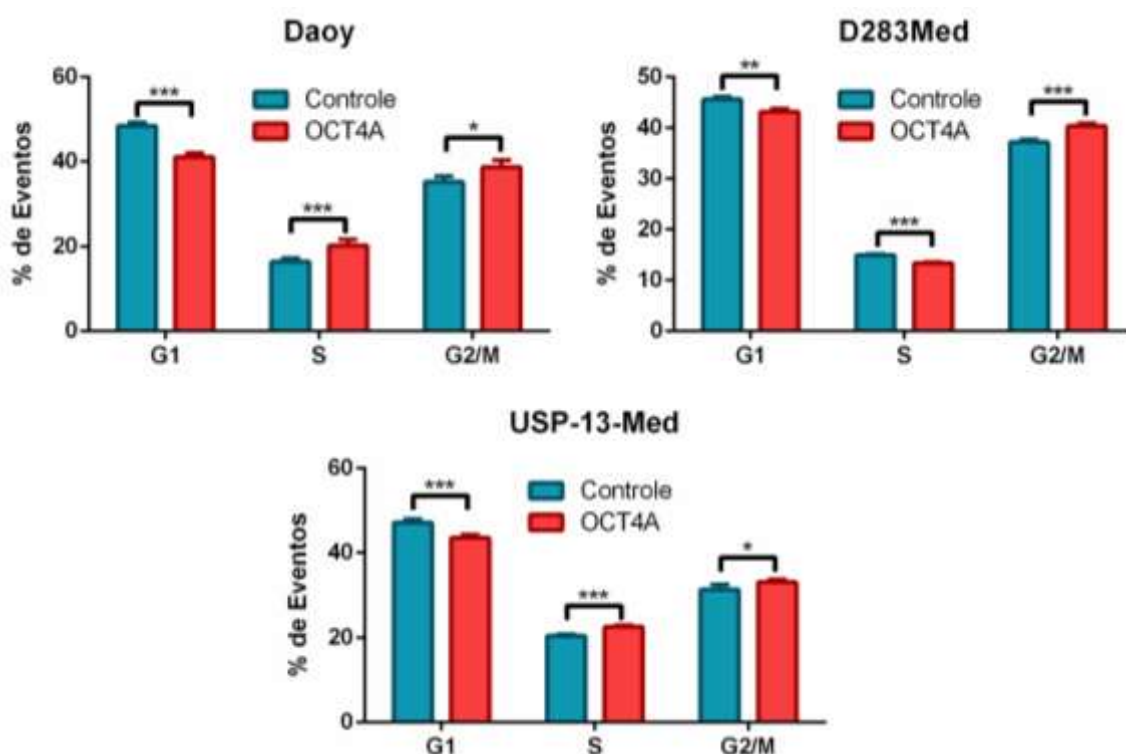


Figura 19 - Superexpressão de OCT4A afeta o ciclo celular de células de meduloblastoma humano. Células tumorais com níveis basais (Controle) ou superexpressão de OCT4A (OCT4A) foram submetidas a incorporação de iodo de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Significância estatística: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.3.2. CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM

Células tumorais possuem capacidade de proliferar e sobreviver em ambiente inóspito, como o proporcionado no ensaio de crescimento independente de ancoragem. Este ensaio é muito utilizado para avaliação prévia de tumorigênese *in vitro* e é comumente associado a maior agressividade tumoral. Como observado na Figura 20, culturas celulares de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A apresentaram maior capacidade de crescimento independente de ancoragem e formação de colônias. Além do aumento significativo na quantidade de colônias, células com superexpressão de OCT4A também geraram colônias com tamanho máximo superior ao tamanho observado das colônias controles nas linhagens celulares Daoy e D283Med (Figura 21).

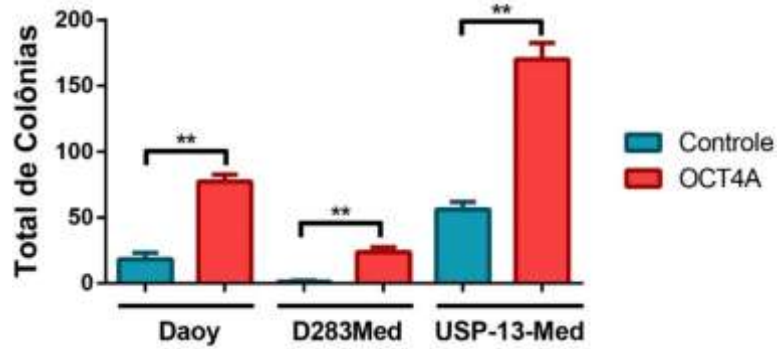


Figura 20 - Superexpressão de OCT4A aumenta a capacidade de crescimento independente de ancoragem de células de meduloblastoma humano. Número total de colônias com tamanho superior a 50 µm de diâmetro, obtidas após 15 dias de crescimento independente de ancoragem. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: **p<0,01.

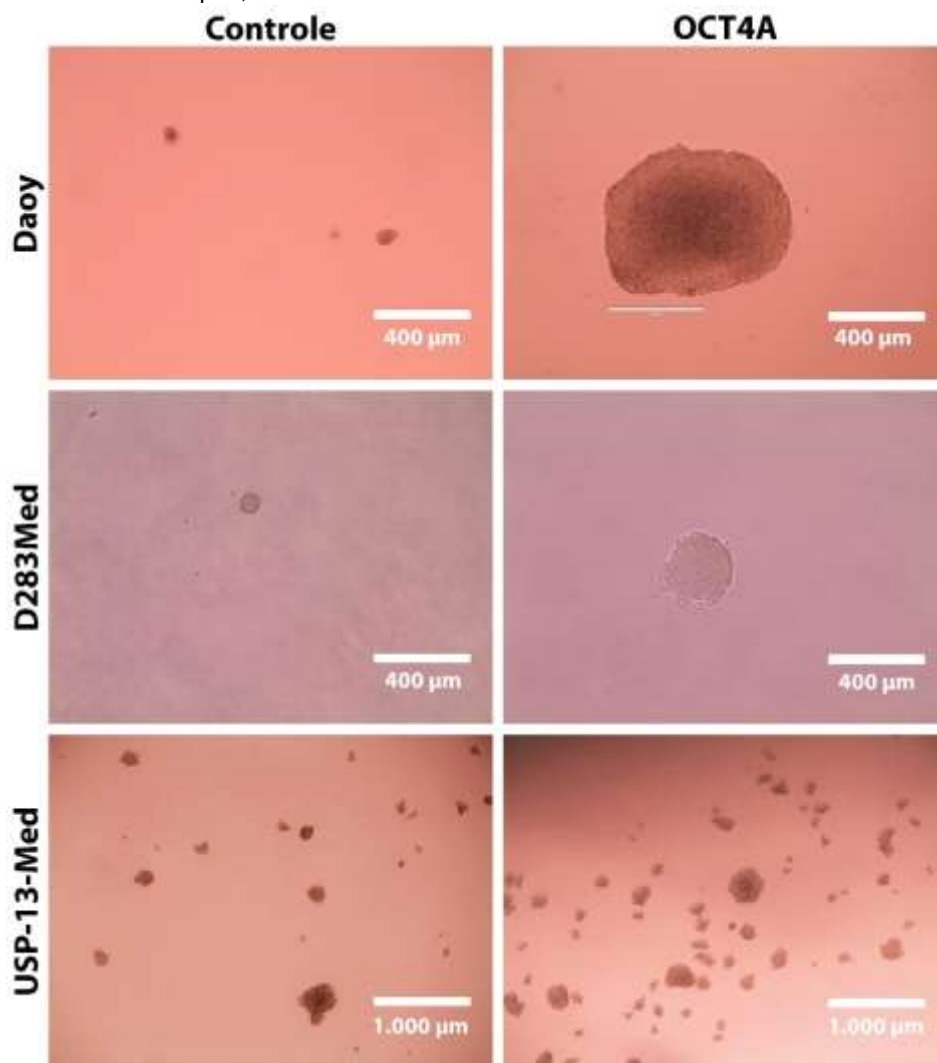


Figura 21 - Superexpressão de OCT4A favorece a expansão de colônias de células de meduloblastoma humano em substrato de agarose. Fotomicrografias representativas de colônias obtidas após 15 dias de crescimento independente de ancoragem de células de meduloblastoma humano. As fotomicrografias mostram que as colônias de células Daoy e D283Med com superexpressão de OCT4A possuem tamanho máximo maior que as colônias geradas por suas respectivas células controles, com expressão basal de OCT4A (Controle). Com relação à linhagem celular USP-13-Med, células controles e com superexpressão de OCT4A geraram colônias de tamanho semelhantes. Barra: Daoy e D283Med: 400 µm; USP-13-Med: 1.000 µm.

4.3.3. FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS

Em ensaios de crescimento tumoral em três dimensões, células que conseguem crescer em condições de baixa adesão e em meio definido enriquecido com mitógenos geram estruturas esferóides chamadas de esferas tumorais (do inglês, *Tumorspheres*). Tais esferas tumorais são enriquecidas quanto à presença de células com expressão de marcadores típicos de células neuroprogenitoras (ex: NESTINA e CD133), as quais apresentam alta capacidade de gerar tumores *in vivo*.

Nessas condições, observou-se que a superexpressão de OCT4A em células de diferentes linhagens de meduloblastoma aumentou significativamente a capacidade dessas células em gerar esferas tumorais (Figura 22). Na linhagem celular D283Med, as células com superexpressão de OCT4A também geraram esferas tumorais de tamanho superior ao das esferas geradas por células controles (Figura 23).

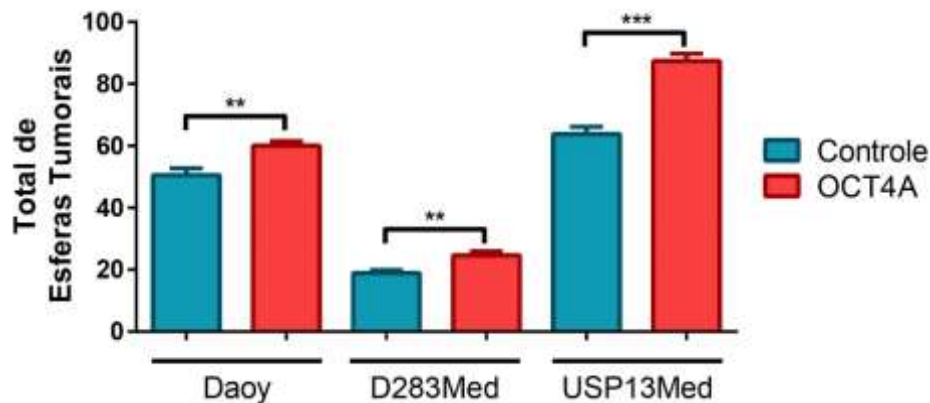


Figura 22 - Superexpressão de OCT4A favorece a capacidade de geração de esferas tumorais de células de meduloblastoma humano. Número total de esferas tumorais com diâmetro superior a 50 μm , após sete dias de cultivo em condições de enriquecimento de células neuroprogenitoras/esferas tumorais. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O perfil de expressão de marcadores de células neuroprogenitoras (CD133 e NESTINA) foi avaliado em células tumorais controles (i.e., com expressão basal de OCT4A), mantidas em condições de esferas tumorais, comparativamente à condição de cultura normal aderente. A Figura 24 apresenta os gráficos de histogramas gerados por análises de citometria de fluxo, onde é possível observar que todas as linhagens celulares geram esferas tumorais compostas por células com alta expressão de CD133

(CD133^{Hi}). Observa-se um enriquecimento de células CD133^{Hi} em esferas tumorais comparativamente à condição de cultivo padrão aderente e semiaderente, sendo esse enriquecimento mais acentuado em células de D283Med. Ainda nesta linhagem celular, a proporção de células com alta expressão de NESTINA também é maior nas esferas tumorais. Para as demais linhagens, o perfil de expressão de NESTINA é praticamente inalterado em ambas as condições de cultivo.

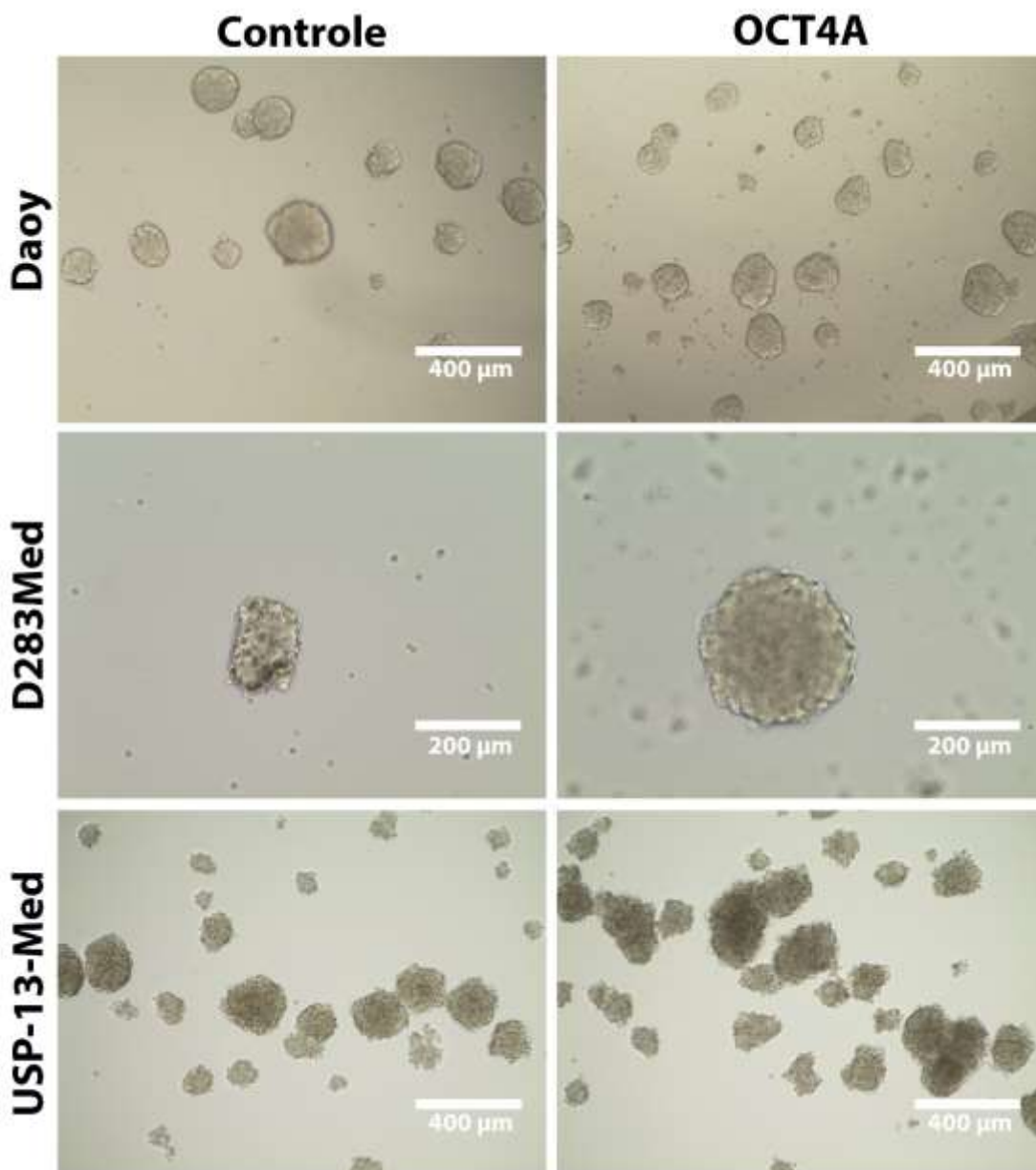
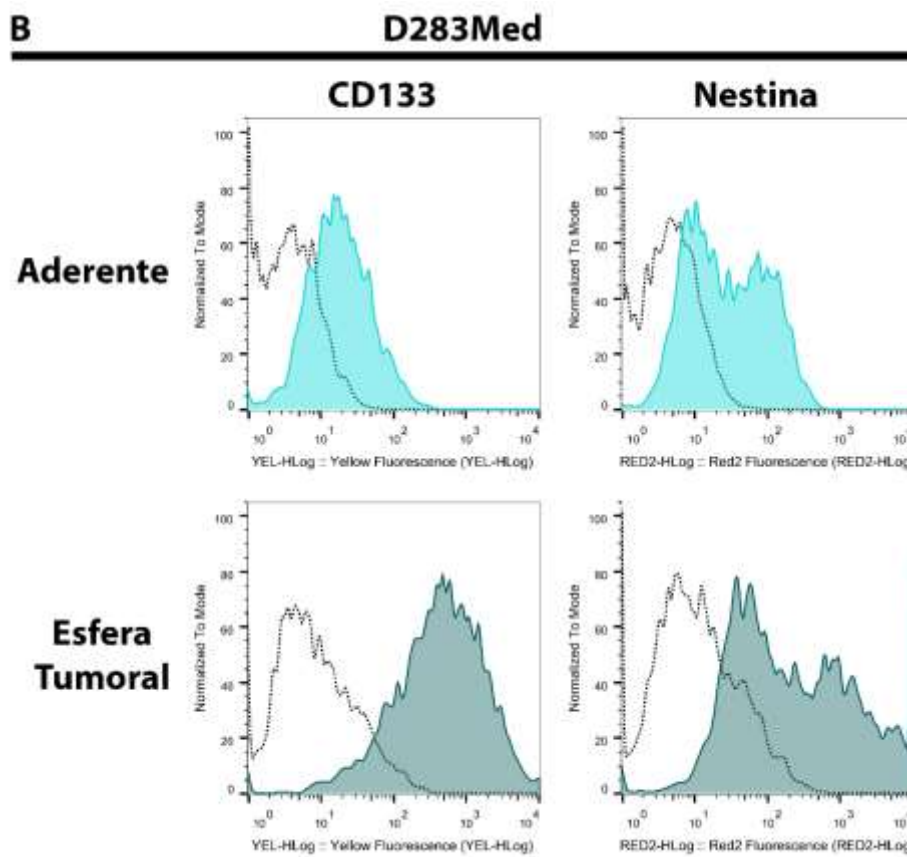
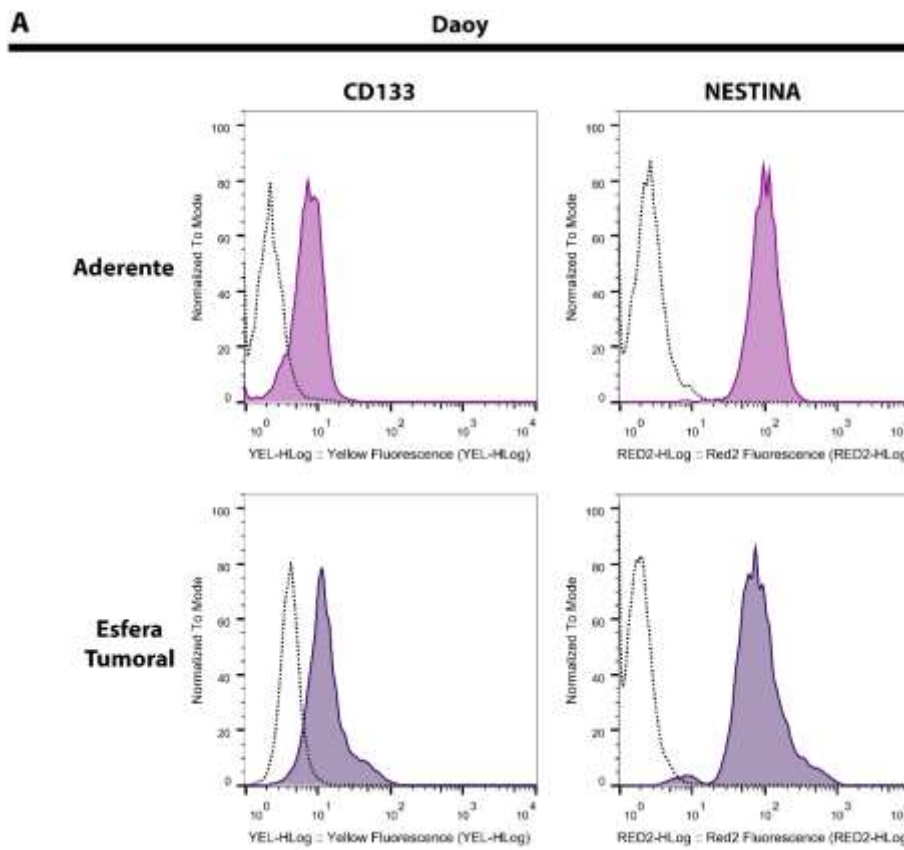


Figura 23 - Esferas tumorais geradas por células de meduloblastoma humano com ou sem superexpressão de OCT4A. Fotomicrografia representativa das esferas tumorais obtidas após o cultivo de sete dias em condições de enriquecimento de células neuroprogenitoras/esferas tumorais. O tamanho das esferas tumorais foi afetado na linhagem celular D283Med. Barra: Daoy e USP-13-Med: 400 μ m, D283Med: 200 μ m. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A.

(CONTINUA)



(CONCLUSÃO)

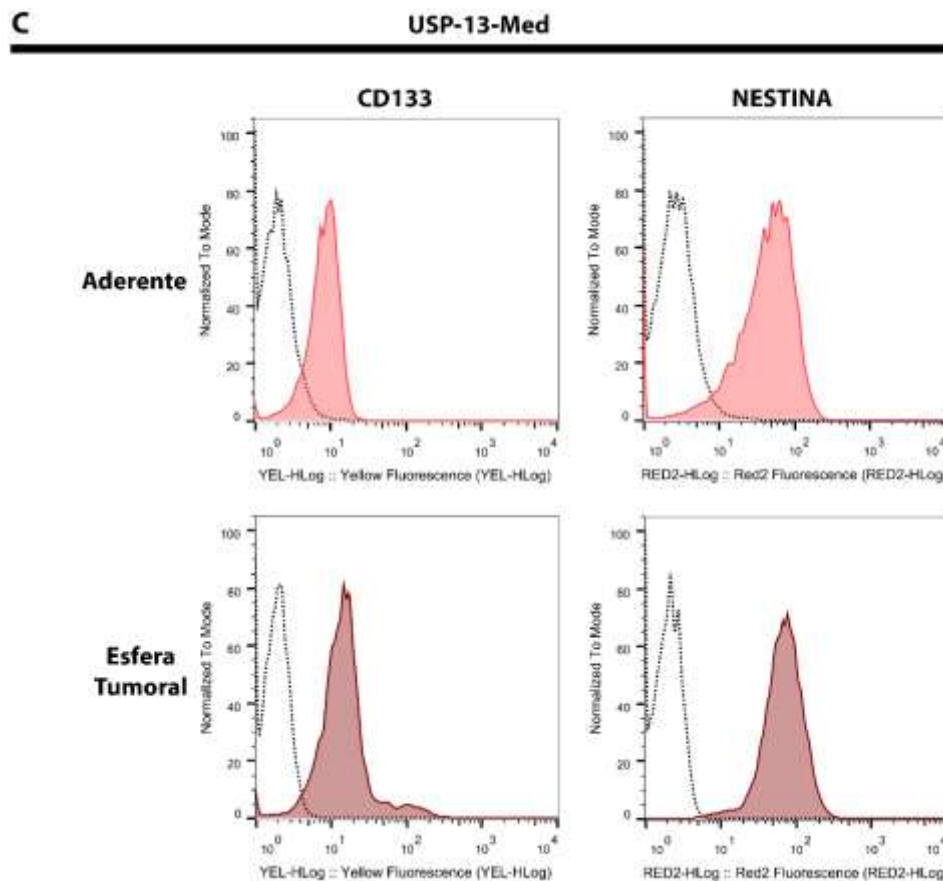


Figura 24 - Enriquecimento de células CD133^{Hi} em esferas tumorais derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma humano. Análise de expressão dos marcadores CD133 e NESTINA por citometria de fluxo em células de diferentes linhagens de meduloblastoma submetidas a cultivo padrão (aderente e semiaderente) ou cultivo para obtenção de esferas tumorais. A curva de linha pontilhada apresenta as células sem marcação (Controle Negativo) e a curva preenchida apresenta as células marcadas com os respectivos anticorpos (Amostra Teste). **(A)** Daoy; **(B)** D283Med; **(C)** USP-13-Med.

Uma análise quantitativa (Figura 25), detectou nas culturas celulares das linhagens D283Med e USP-13-Med uma quantidade significativamente maior de células CD133⁺ sob condições de cultivo de esferas tumorais. Apesar da tendência, não se encontrou diferença estatisticamente significativa na proporção de células CD133⁺ em culturas da linhagem Daoy, provavelmente devido à alta porcentagem de células CD133⁺ verificadas em condição padrão de cultivo na forma de monocamada (aderentes). Perfil semelhante foi observado quanto a expressão de NESTINA, em que aproximadamente 100% das células aderentes de Daoy e USP-13-Med já apresentavam expressão positiva para esse marcador.

Com relação aos efeitos da superexpressão de OCT4A, detectou-se um enriquecimento significativo da população de células CD133⁺ na linhagem celular D283Med, tanto na condição padrão de cultivo (semiaderente) quanto em esferas tumorais, indicando um possível efeito linhagem-dependente.

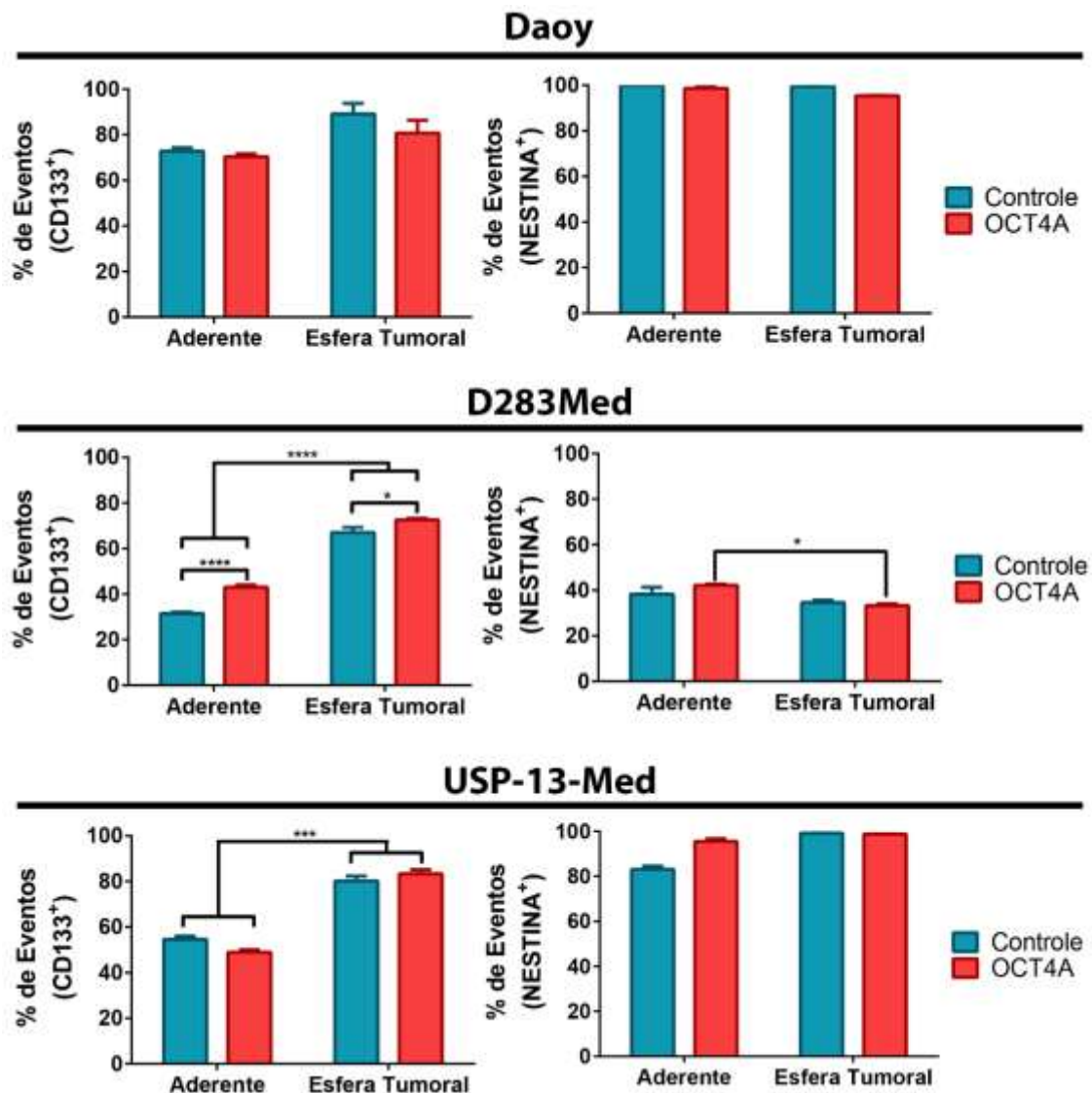


Figura 25 - Cultivo de esferas tumorais favorece o enriquecimento da população de células de meduloblastoma humano CD133^{Hi}. Os gráficos apresentam a porcentagem da população de células positivas para os marcadores CD133 e NESTINA em culturas celulares das linhagens de meduloblastoma Daoy, D283Med e USP-13-Med, sob condições padrão (aderente e semiaderente) e condições para enriquecimento de células neuroprogenitoras/esferas tumorais. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001.

4.3.4. ADESÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO

As capacidades migratórias e invasivas das células tumorais estão intimamente relacionadas a maior agressividade em diversos tipos de

tumores. Células com pouca adesão e com maior capacidade migratória e invasiva tendem a metastatizar da massa tumoral primária para tecidos vizinhos ou até mesmo para sítios distantes. Os perfis de adesão, migração e invasão celular são, portanto, bons parâmetros para avaliar um fenótipo mais agressivo das células de meduloblastoma e os possíveis efeitos da superexpressão de OCT4A nesses comportamentos.

Conforme é possível observar na Figura 26, uma proporção significativamente inferior de células aderidas foi encontrada em cultura de células com superexpressão de OCT4A, quando comparado a cultura de células tumorais controle.

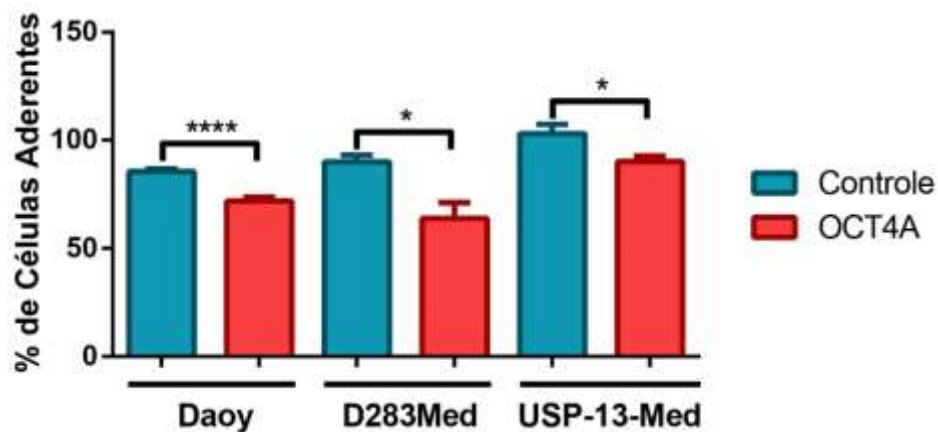


Figura 26 - Superexpressão de OCT4A diminuiu a capacidade de adesão celular de células de meduloblastoma humano. As células foram permitidas a aderir ao plástico por 45 minutos e as células não aderentes foram removidas. A adesão foi avaliada por metabolismo de MTT e apresentada como porcentagem de células aderidas após 45 minutos do plaqueamento. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: * $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Para avaliar a ação do OCT4A na propriedade de migração de células de meduloblastoma humano, foi realizado ensaio semelhante ao *Scratch/Wound Healing Assay*, utilizando-se um sistema comercializado por *Platypus Technologies (Oris™ Cell Migration Assay)*. As células foram plaqueadas em alta densidade e permitidas a aderir por um período de 12-16 horas. A área migrada foi registrada (Figura 27) e calculada (Figura 28) após 12 e 24 horas após a retirada dos *stoppers* (tempo 0). Nesse ensaio, foram utilizadas as linhagens celulares Daoy e USP-13-Med. Devido às propriedades semiaderentes e formação de *clusters* da linhagem celular D283Med, não foi possível avaliar a capacidade migratória dessas células.

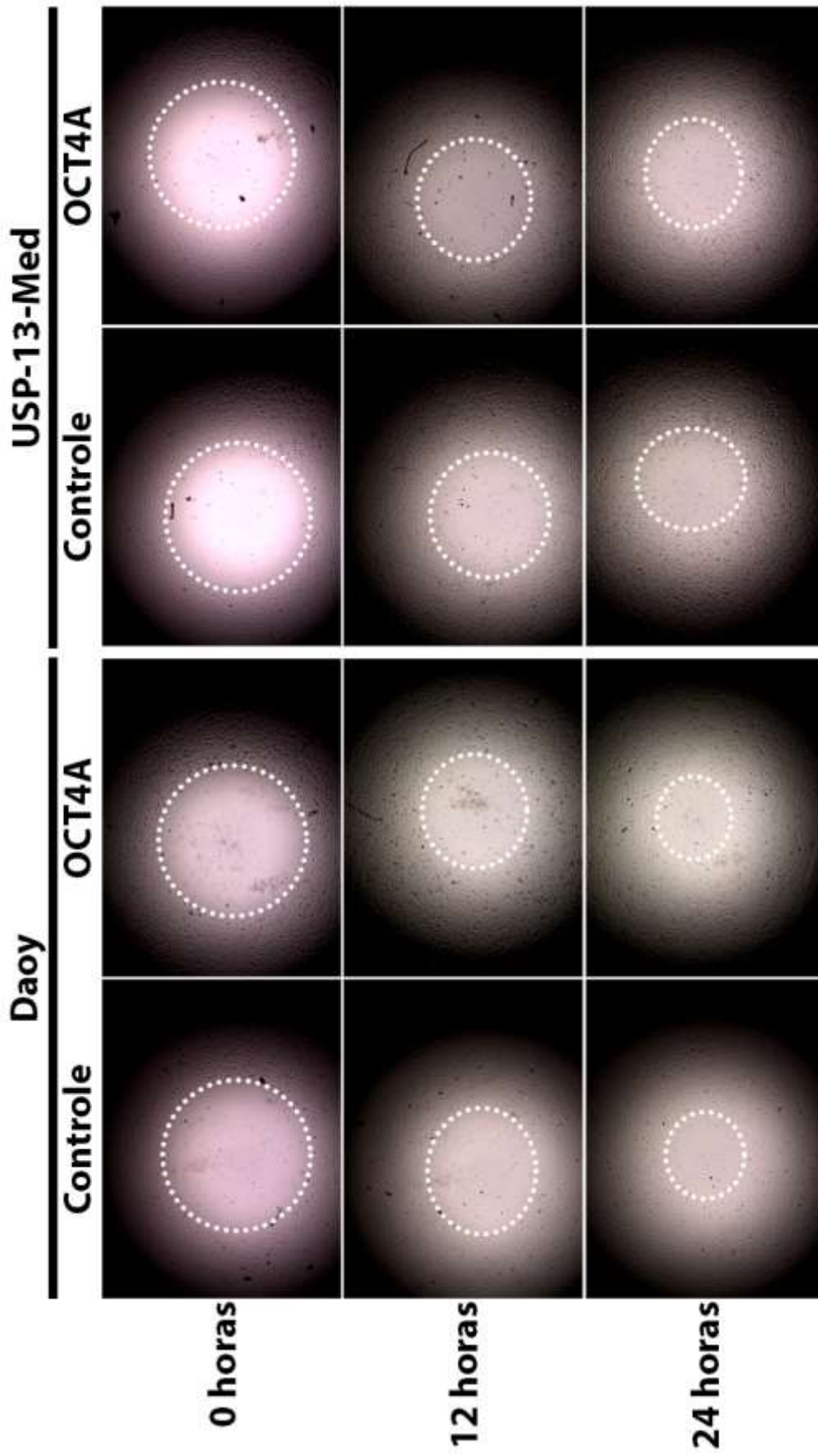


Figura 27 - OCT4A não altera a capacidade migratória de células de meduloblastoma humano. Fotomicrografias representativas do ensaio de migração celular. O interior do círculo pontilhado indica a região livre de migração celular nos tempos 0, 12 e 24 horas após a retirada dos *stoppers*. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A.

A quantificação da área migrada após 12 e 24 horas indicou que a superexpressão de OCT4A não alterou significativamente as propriedades migratórias de células das linhagens Daoy e USP-13-Med, avaliada pelo ensaio de *Scratch/Wound Healing Assay*.

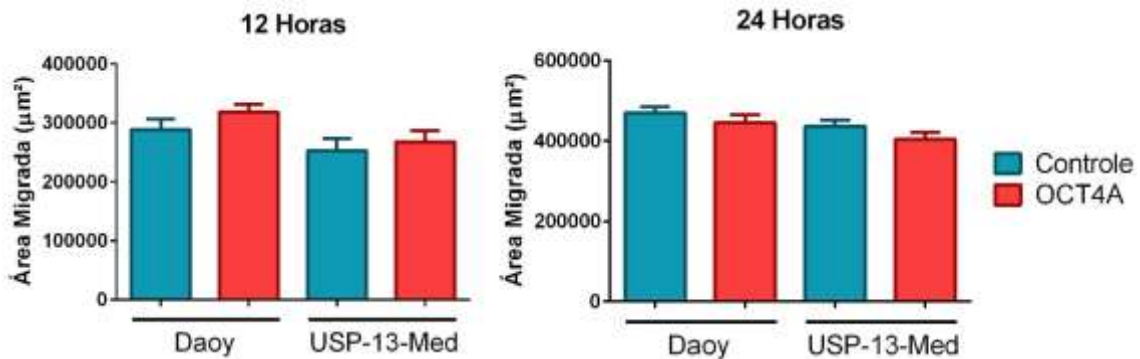


Figura 28 - OCT4A não altera significativamente a capacidade migratória de células de meduloblastoma humano. Quantificação da área migrada após 12 e 24 horas. A quantificação foi realizada subtraindo-se a área inicial ($t = 0$ h) da área migrada ($t = 12$ h ou $t = 24$ h) pelo ensaio de *Scratch/Wound Healing*. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A.

A capacidade invasiva de células de meduloblastoma foi avaliada pelo método de invasão 3D em matriz de hidrogel, um ensaio que mais se aproxima e mimetiza o ambiente tumoral. Nesse ensaio, foi possível observar que as células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A apresentaram maior capacidade de invasão, evidenciado pelo aumento significativo de quantidade de protrusões emitidas na matriz de hidrogel (Figura 29A). A cinética de invasão celular foi avaliada diariamente, pela aferição da área da esfera e suas protrusões, por um período de sete dias. A superexpressão de OCT4A causou efeito mais precoce em células da linhagem Daoy, nas quais observou-se um aumento significativo de invasão a partir do 2º dia de ensaio (Figura 29B). Células da linhagem USP-13-Med também tiveram sua capacidade de invasão afetada, apresentando aumento significativo a partir do 4º dia de ensaio. Embora células da linhagem D283Med tenham sido submetidas aos mesmos procedimentos experimentais, estas não se mostraram capazes de gerar esferoide tumoral inicial em 3D e de invadir a matriz de hidrogel (dado não apresentado).

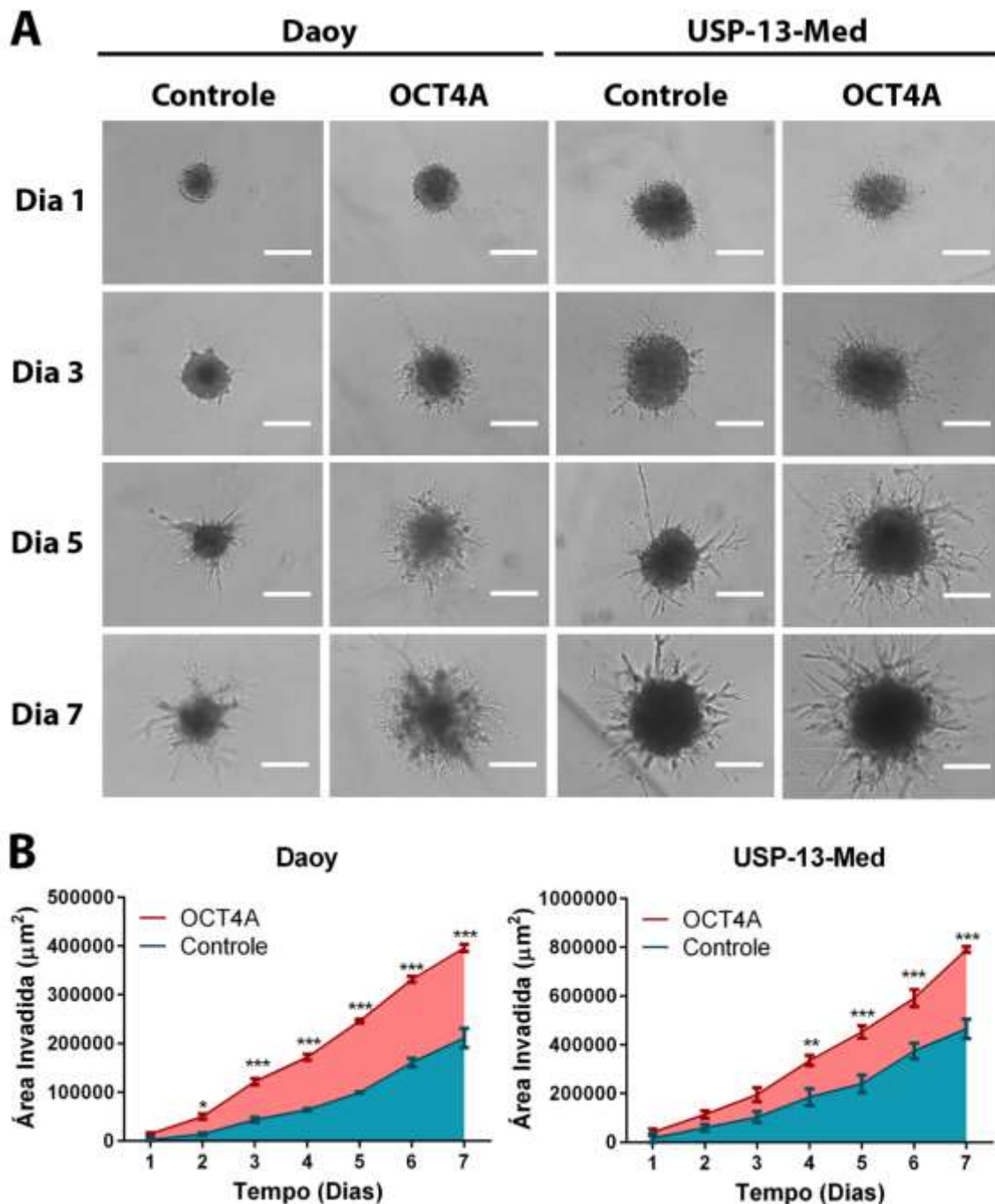


Figura 29 - Superexpressão de OCT4A aumenta a capacidade de invasão de células de meduloblastoma humano. (A) Fotomicrografias representativas das esferas tumorais após 1, 3, 5 e 7 dias da adição de matriz de invasão. Ao invadir a matriz de hidrogel, as células invasivas geram protrusões crescentes a partir da esfera tumoral. Barra: 400 μm . (B) Quantificação de área invadida ao longo de sete dias de ensaio. A quantificação foi realizada diariamente, subtraindo-se a área inicial ($t = 0$ h) da área invadida. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.5. INDUÇÃO DE MORTE CELULAR POR QUIMIOTERÁPICO

Maior resistência a quimioterápicos é outra propriedade observada em CTT e que favorece a recidiva tumoral após tratamentos

convencionais. Para avaliar se a superexpressão de OCT4A afeta essa propriedade, células tumorais foram expostas a doses crescentes do quimioterápico cisplatina, agente comumente utilizado na clínica para o tratamento de pacientes com meduloblastoma. A dose equivalente a LC_{50} foi determinada por meio de uma curva de dose resposta em ensaio de morte celular por apoptose. Os valores de LC_{50} obtidos em nosso laboratório foram de 2,7 μM para células da linhagem Daoy, 16,4 μM para D283Med e 126,4 μM para USP-13-Med (Figura 30).

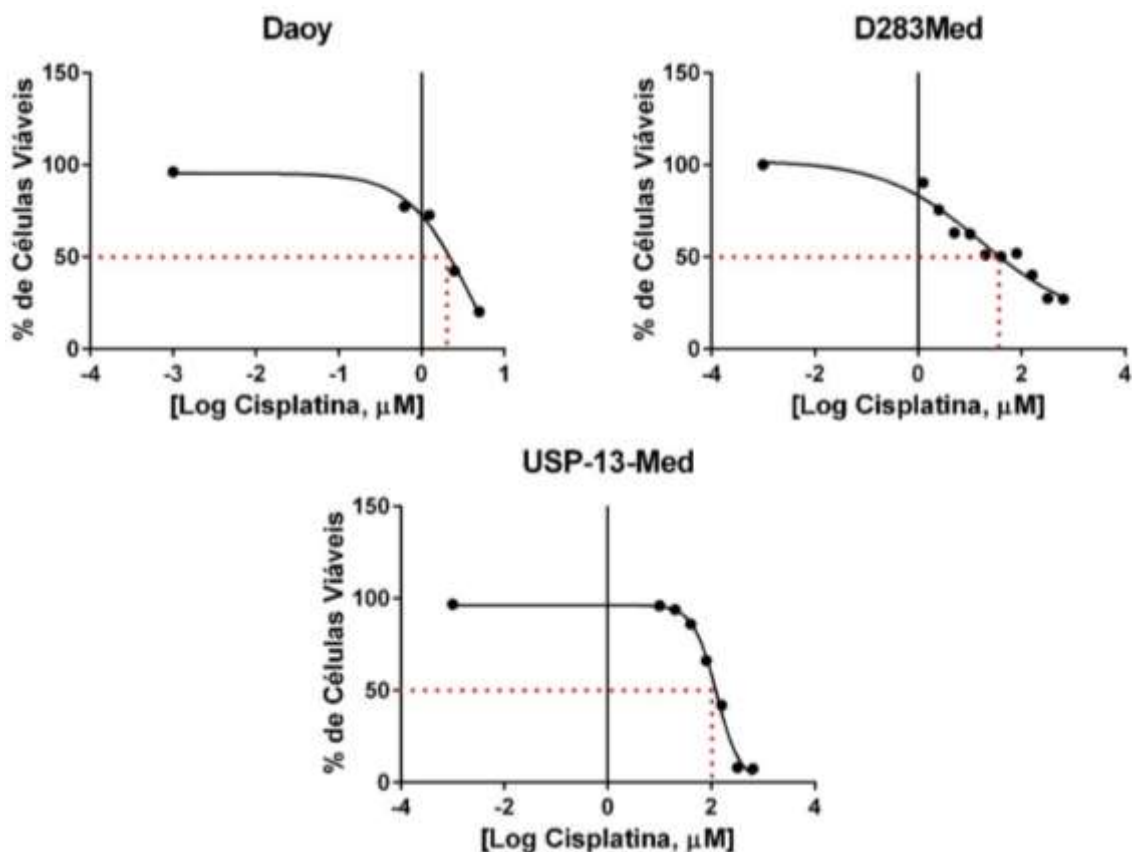


Figura 30 - Curvas dose-resposta para determinação de LC_{50} para cisplatina em células de meduloblastoma humano. Dados apresentados como porcentagem de células viáveis em relação ao controle, após 48 horas de tratamento com cisplatina.

Essas doses encontradas foram então utilizadas para verificar se a superexpressão de OCT4A altera a sensibilidade de células de meduloblastoma ao quimioterápico, após tratamento de 48 horas. Nesse experimento, as células com superexpressão de OCT4A apresentaram um padrão de resposta distinto do controle nas linhagens celulares testadas. Células das linhagens comerciais Daoy e D283Med apresentaram-se mais quimiossensíveis após a superexpressão de OCT4A, enquanto as células da linhagem USP-13-Med mostraram-se mais quimiorresistentes (Figura 31). Tal

resultado indica efeitos linhagem-dependentes, impossibilitando uma conclusão segura sobre a ação do OCT4A na quimiorresistência à cisplatina em células de meduloblastoma.

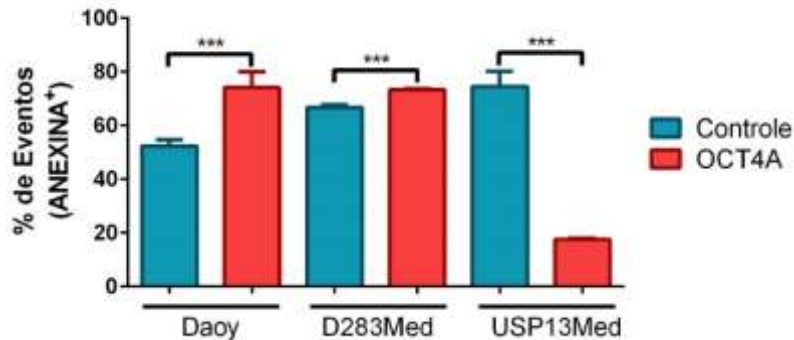


Figura 31 - Superexpressão de OCT4A afeta a sensibilidade de células de meduloblastoma humano ao tratamento com cisplatina. Porcentagem de células apoptóticas (ANEXINA⁺) após tratamento com doses subletais de cisplatina (LC₅₀) por 48 horas. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: ***p<0,001.

4.4. OCT4A FAVORECE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA *IN VIVO*

4.4.1. MODELO SUBCUTÂNEO DE TUMORIGÊNESE

Os ensaios *in vitro* demonstraram que a superexpressão de OCT4A contribuiu para um fenótipo mais agressivo das linhagens de meduloblastoma. No entanto, os ensaios *in vitro* não conseguem mimetizar em todas as extensões o comportamento tumoral pois ignoram componentes importantes como propriedade de crescimento e interação com os componentes do microambiente tumoral. Sendo assim, no presente trabalho, acrescentamos a abordagem de avaliação da tumorigênese *in vivo*. No modelo de avaliação de crescimento tumoral após inoculação subcutânea de células de meduloblastoma no flanco direito de animais imunodeficientes (BALB/C *Nude*), detectou-se um efeito significativo da superexpressão de OCT4A. Em células da linhagem Daoy com superexpressão de OCT4A, houve diminuição da latência para o desenvolvimento tumoral, sendo observada a formação de tumor palpável e mensurável a partir de 67 dias da inoculação inicial, enquanto que células Daoy com expressão basal de OCT4A (Controle) geraram tumores mensuráveis a

partir de 74 dias (Figura 32A). Além disso, a cinética de crescimento tumoral revelou um desenvolvimento mais acentuado de tumores gerados por células Daoy com superexpressão de OCT4A, comparativamente ao controle (Figura 32B).

Em experimentos com a linhagem celular USP-13-Med, as células controles não foram capazes de gerar tumores subcutâneos durante o período experimental analisado (125 dias). Entretanto, células USP-13-Med com superexpressão de OCT4A geraram tumores a partir do 63º dia após a inoculação inicial (Figura 32A). Notadamente, esses tumores desenvolvidos apresentaram aspecto macroscópico típico de tumores agressivos, com a presença de alta vascularização e áreas de necrose (Figura 32B). As células da linhagem D283Med controle e com superexpressão de OCT4A só conseguiram gerar tumor em um dos cinco animais testados, sendo então impossível obter uma avaliação estatística. Por esse motivo os dados dessa linhagem celular não estão apresentados.

Os tumores desenvolvidos por células da linhagem Daoy com expressão basal de OCT4A (Controle) apresentaram um padrão histológico mais uniforme quando comparado aos tumores desenvolvidos pelas células Daoy com superexpressão de OCT4A (Figura 33). Estes últimos apresentaram um fenótipo típico de tumores mais agressivos, evidenciado por uma morfologia mais heterogênea, células com alta razão núcleo-citoplasma, presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose. Perfil semelhante foi observado nos tumores gerados por células da linhagem USP-13-Med com superexpressão de OCT4A, os quais apresentaram extensa área hemorrágica no interior do tumor (Figura 33).

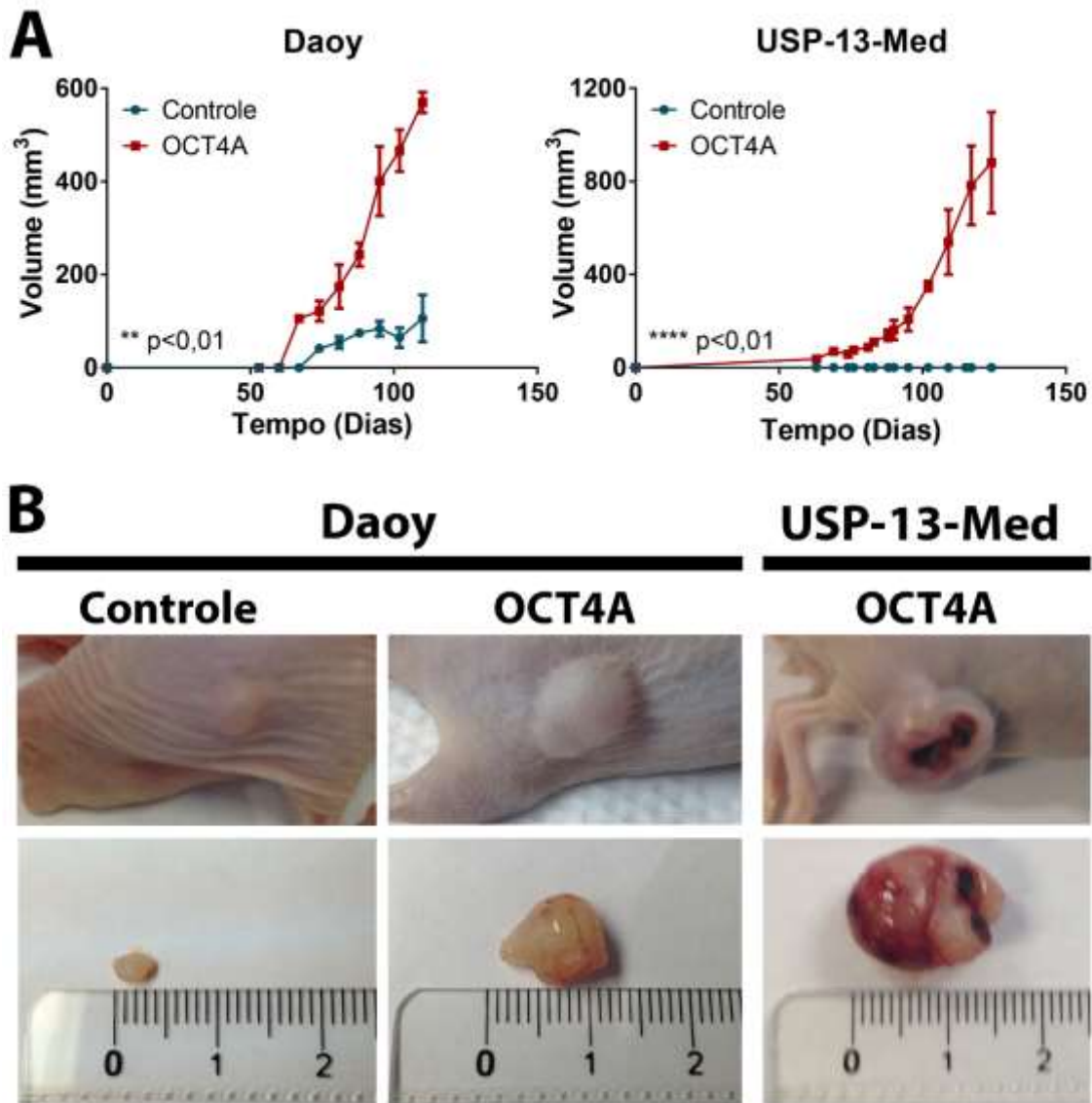


Figura 32 - Superexpressão de OCT4A favorece a tumorigênese *in vivo* de células de meduloblastoma humano. (A) Cinética de crescimento tumoral em modelo experimental subcutâneo. Dados representam média \pm SEM dos volumes tumorais. **(B)** Fotografias representativas de tumores desenvolvidos por células de meduloblastoma humano com níveis basais (Controle) ou superexpressão de OCT4A (OCT4A), após 110-125 dias de inoculação subcutânea. Imagens de animais USP-13-Med do grupo Controle não são apresentadas, pois as células tumorais com expressão basal de OCT4A não foram capazes de gerar tumores subcutâneos nas condições experimentais testadas.

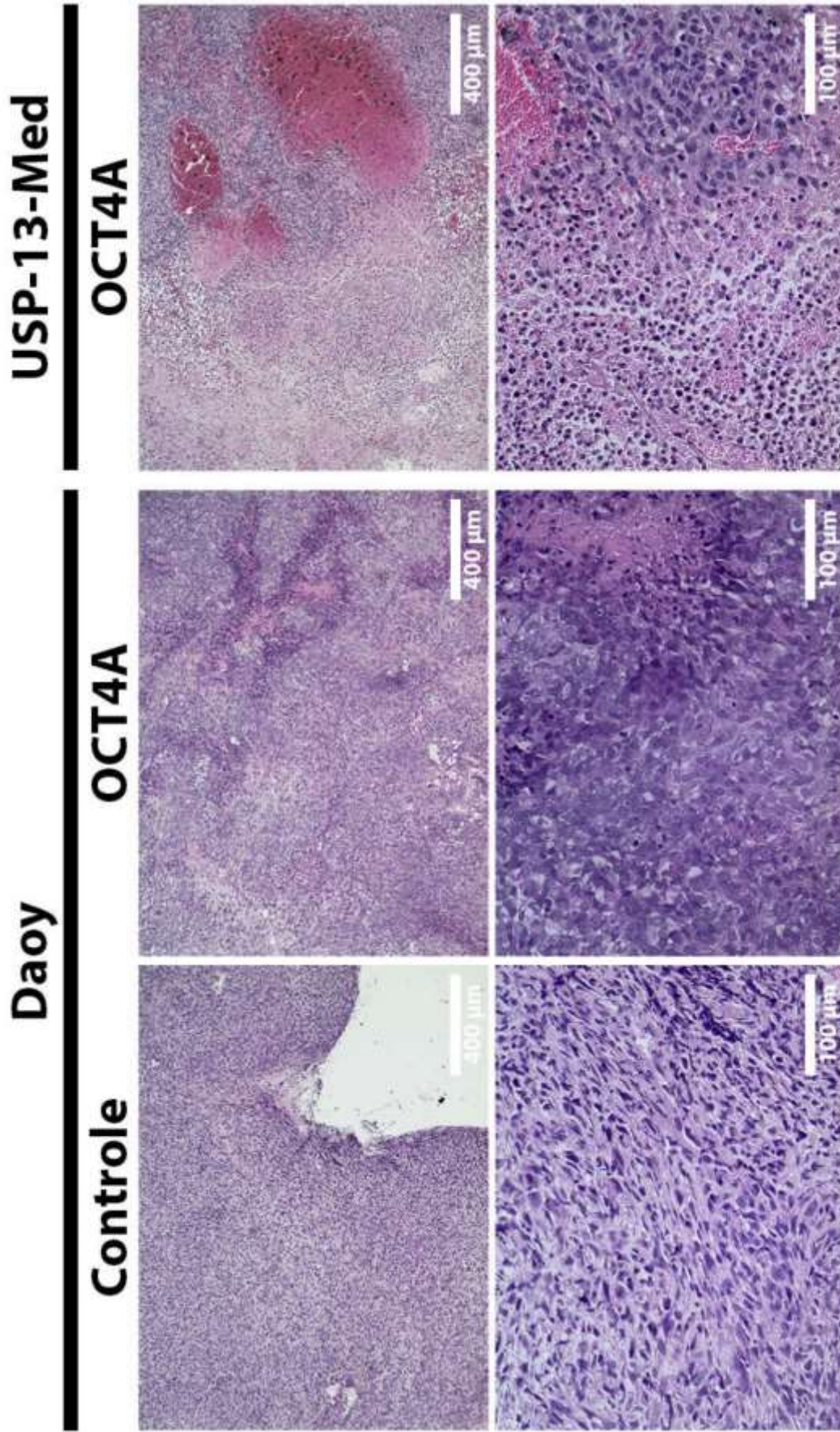


Figura 33 - Tumores gerados por células com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia característica de tumores mais agressivos. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos submetidos a procedimento padrão de H.E. em diferentes magnificações. Infiltração inflamatória, necrose tumoral e extensa área hemorrágica são evidentes em tumores gerados a partir de células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A, comparativamente aos tumores gerados por células com expressão basal de OCT4A (Controle).

4.4.2. MODELO ORTOTÓPICO DE METÁSTASE

O meduloblastoma é um tumor agressivo e que possui alta capacidade metastática, em geral para outras regiões do SNC e, em casos mais graves, para regiões fora do neuroeixo. Para avaliar se a superexpressão de OCT4A é capaz de alterar a capacidade metastática de células de meduloblastoma, foi realizado um ensaio de inoculação ortotópica de células tumorais no ventrículo lateral direito, mimetizando uma condição de metástase equivalente ao estágio M1 (células tumorais no LCR). Os animais foram acompanhados diariamente até o desenvolvimento de sintomas clínicos, momento no qual foram submetidos a eutanásia e coleta do neuroeixo para processamento histológico. Os animais inoculados com células com superexpressão de OCT4A apresentaram sintomas mais precocemente e/ou mais frequentemente que os animais do grupo Controle (inoculados com células tumorais com expressão basal de OCT4A) (Tabela 3). Os animais inoculados com células das linhagens celulares Daoy e D283Med, com superexpressão de OCT4A, também apresentaram uma menor sobrevida quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 34).

Os encéfalos e colunas vertebrais foram submetidos a análise histológica e foram classificados em M2 (presença de metástase no espaço subaracnóide do cérebro ou cerebelo, ou no sistema ventricular supratentorial) ou M3 (metástase no espaço subaracnóide espinhal). Os camundongos submetidos a inoculação de células USP-13-Med com superexpressão de OCT4A apresentaram tumores mais agressivos, apesar de não terem sido detectadas diferenças quanto a sobrevida e dias para aparecimento de sintomas no período analisado. Esse fato pode ser evidenciado por uma proporção maior de animais com tumores M2 em relação aos camundongos inoculados com células USP-13-Med Controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros clínicos e histopatológicos de camundongos BALB/C *Nude* submetidos a inoculação ortotópica de células de meduloblastoma para avaliação de metástases *in vivo*.

	Daoy		D283Med		USP-13-Med	
	Controle	OCT4A	Controle	OCT4A	Controle	OCT4A
No de animais com sintomas clínicos	3/5	5/5	4/4	3/3	7/8	8/10
Dias para o surgimento dos sintomas clínicos	40.7 ± 2.3	24.4 ± 9.9*	73.8 ± 6.5	37.6 ± 5.3*	49.4 ± 9.4	50.0 ± 9.1
No de animais com M2	2/3	2/3	2/4	0/3	1/4	3/5
No de animais com M3	0/5	4/5	2/4	3/3	1/4	1/5

*M2 e M3 correspondem ao sistema de estadiamento de metástase proposto por Chang (1989).

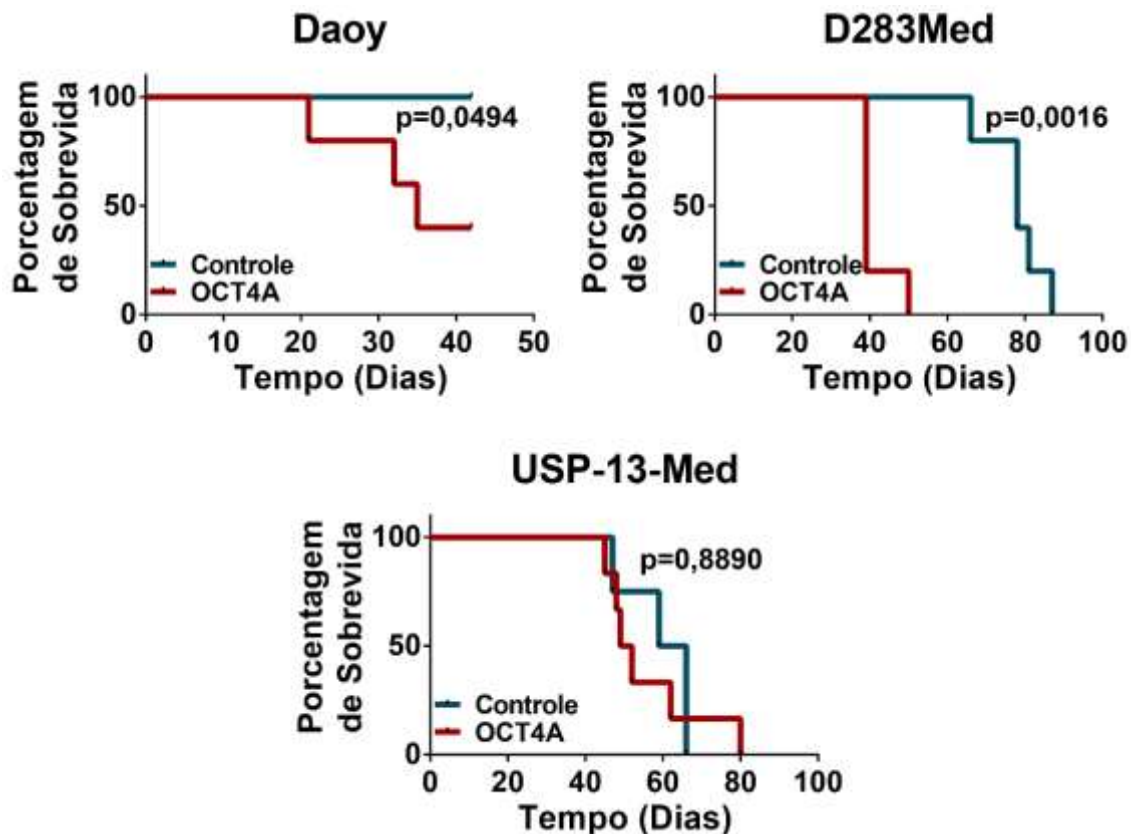
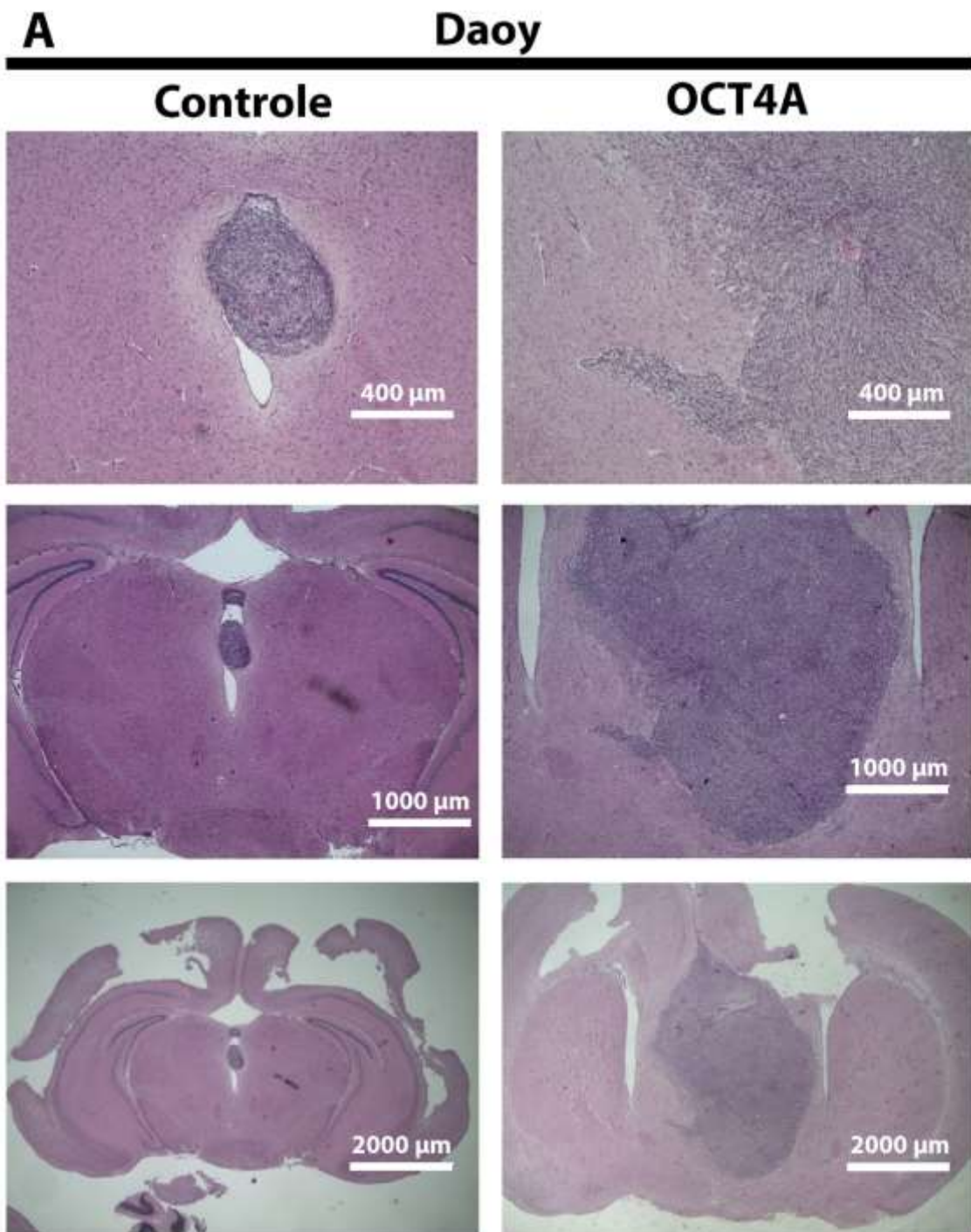


Figura 34 - Sobrevida de camundongos submetidos a inoculação ortotópica de células de meduloblastoma em modelo metastático. Curva de Kaplan-Meyer de animais BALB/C *Nude* após inoculação ortotópica de células de meduloblastoma humano com níveis basais (Controle) ou superexpressão de OCT4A. Os animais foram eutanasiados após o surgimento de sintomas clínicos ou perda excessiva de peso.

A análise histológica dos tumores gerados por células com superexpressão de OCT4A revelou a presença de indicadores de alta agressividade, uma vez que esses tumores apresentavam-se mais bem desenvolvidos, com presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose, além de alta capacidade invasiva no parênquima cerebral adjacente (Figura 35). Foram observadas metástases M3 em cortes histológicos apenas dos camundongos submetidos a inoculação de células D283Med, acentuadamente em animais inoculados com células com superexpressão de OCT4A. Nesse ensaio, todos os tumores desenvolvidos pelas células D283Med com superexpressão de OCT4A foram capazes de metastatizar para a coluna vertebral enquanto que apenas 50% dos tumores com expressão basal de OCT4A (Controle) apresentaram metástase do tipo M3 (Tabela 3). Tais metástases são apresentadas na Figura 36.

(CONTINUA)



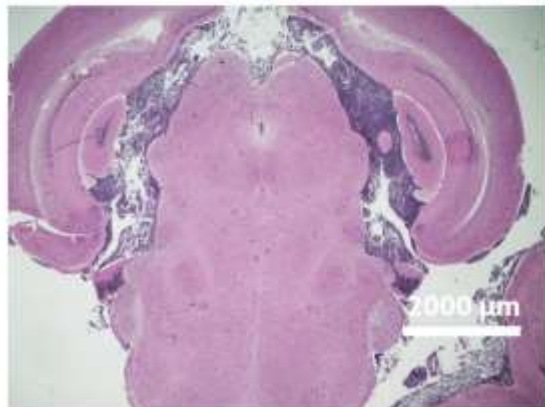
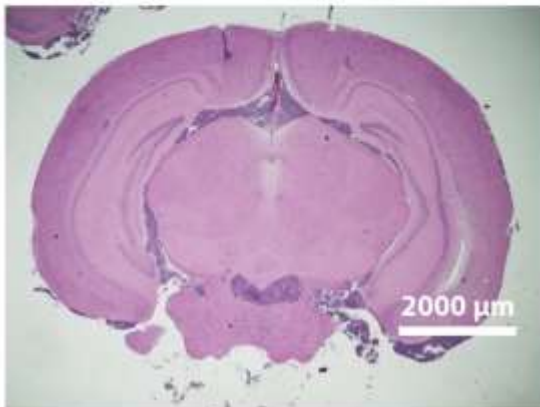
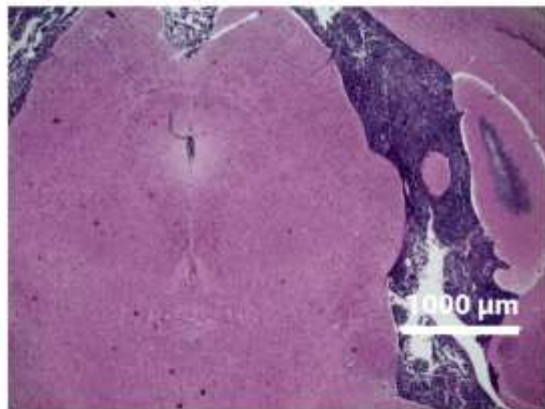
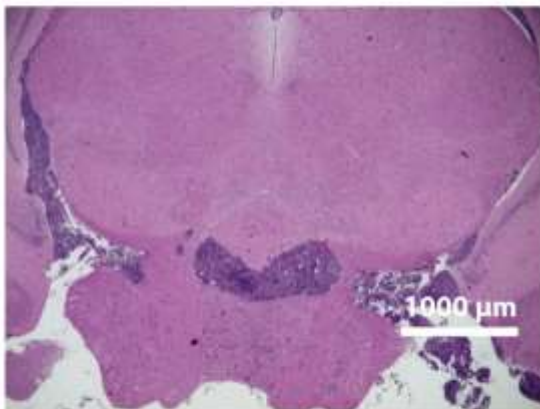
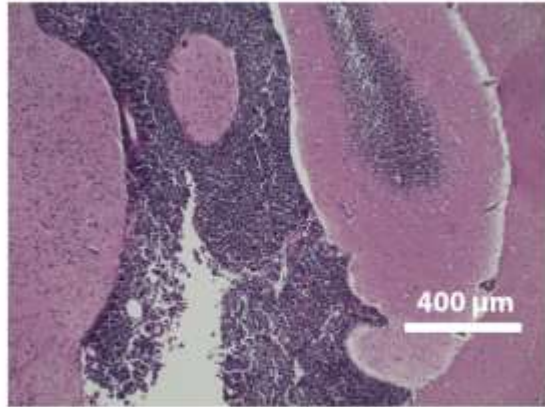
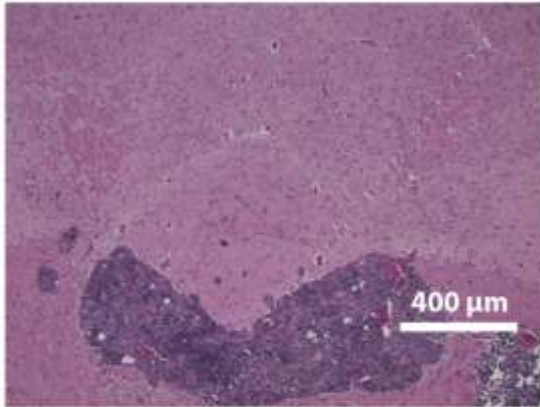
(CONTINUAÇÃO)

B

D283Med

Controle

OCT4A



(CONCLUSÃO)

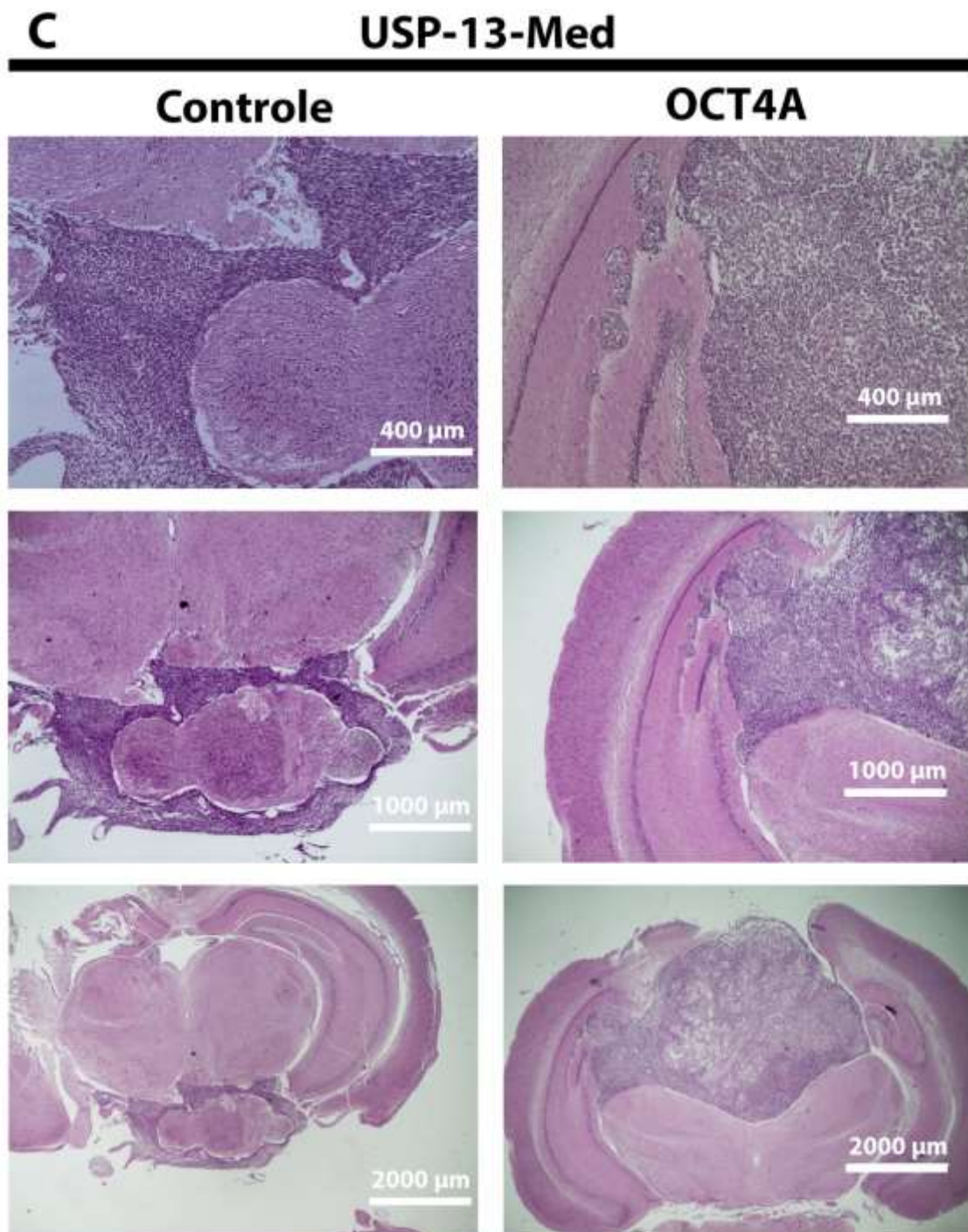


Figura 35 - Tumores metastáticos gerados por células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A apresentam características histopatológicas associadas a alta agressividade. Fotomicrografias representativas de encéfalos de camundongos BALB/C *Nude* em diferentes magnificações. Os cortes histológicos apresentam os tumores derivados de células de meduloblastoma humano após ensaio de metástase. (A) Daoy; (B) D283Med; (C) USP-13-Med. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A.

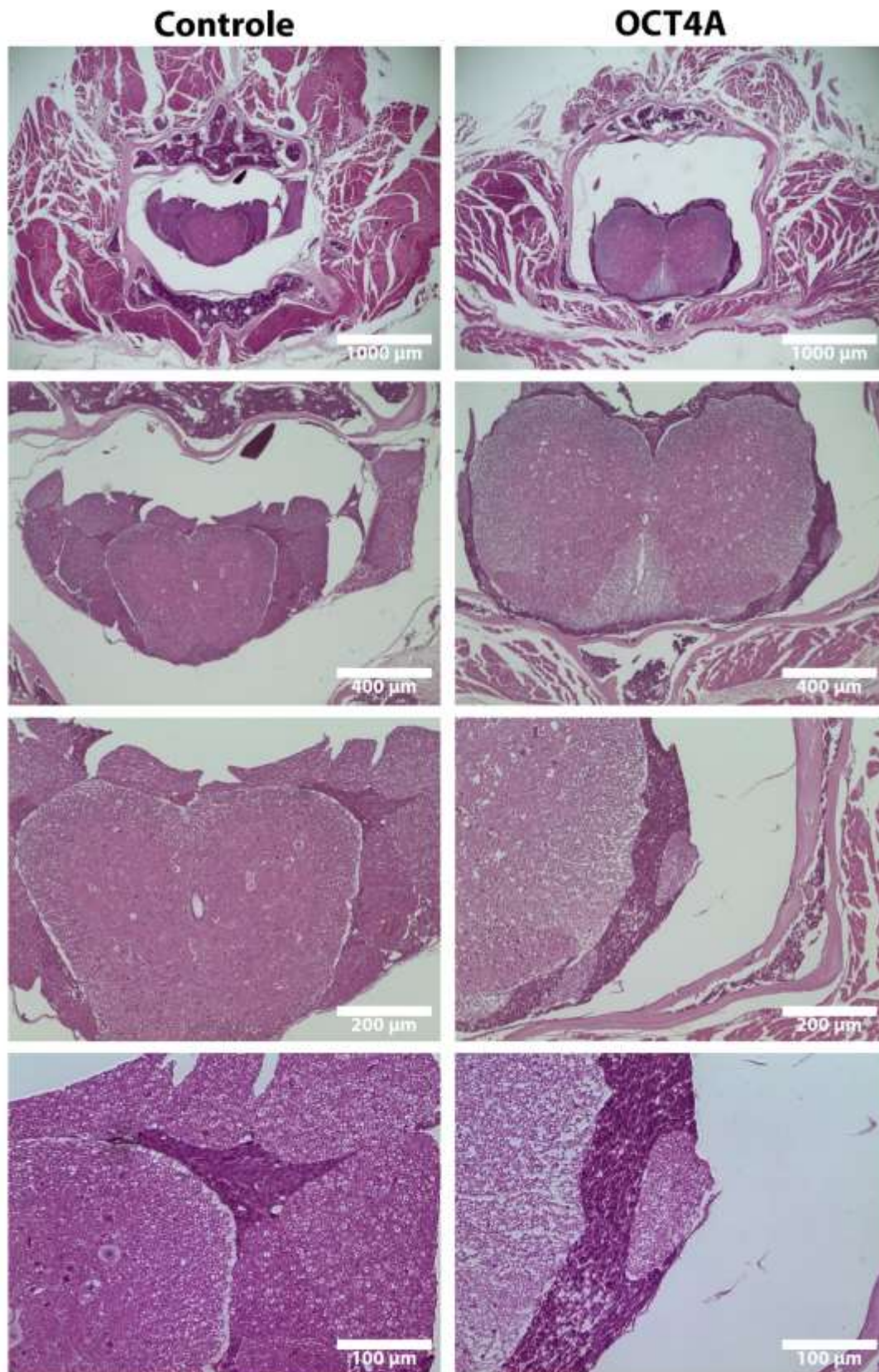


Figura 36 - Identificação de metástase M3 em coluna vertebral de camundongos inoculados ortotopicamente com células de meduloblastoma da linhagem D283Med. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de coluna vertebral de camundongos BALB/C *Nude* submetidos a inoculação ortotópica de células D283Med com níveis basais (Controle) e com superexpressão de OCT4A, em ensaio de metástase *in vivo*.

Em virtude da dificuldade em se detectar metástases M3 por avaliação histológica convencional no modelo experimental adotado, foi realizado o mesmo ensaio de metástase com as mesmas células tumorais expressando a enzima LUCIFERASE, para avaliação de desenvolvimento tumoral *in vivo* por detecção de imagem bioluminescente. Como é possível observar na Figura 37, em estudo longitudinal com avaliação semanal, os camundongos inoculados com células Daoy com superexpressão de OCT4A apresentaram metástases M3 após três semanas de inoculação, não sendo observadas nesse mesmo período metástases semelhantes em camundongos inoculados com células Daoy Controle. Os tumores de USP-13-Med apresentaram padrões semelhantes de metástases M3, no entanto, os tumores gerados por células com superexpressão de OCT4A se apresentaram mais desenvolvidos, com focos de metástase M2 mais evidentes no parênquima cerebral, corroborando os dados obtidos por análise histológica.

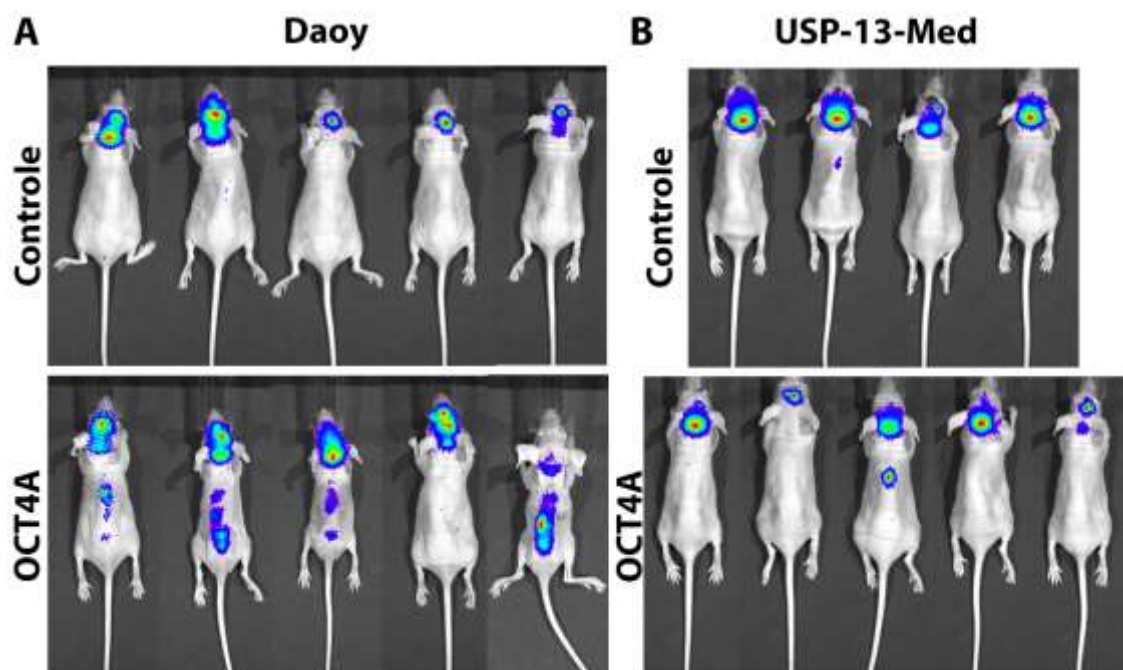


Figura 37 - Superexpressão de OCT4A favorece a metástase de meduloblastoma no neuroeixo de camundongos. Imageamento *in vivo* por meio de detecção de bioluminescência após inoculação ortotópica de células de meduloblastoma humano em camundongos BALB/C *Nude*. Maior frequência de focos tumorais e/ou metástase para coluna vertebral foram observadas em tumores com superexpressão de OCT4A. **(A)** Daoy – 3 semanas pós-inoculação; **(B)** USP-13-Med – 4 semanas pós-inoculação.

4.5. AUMENTO DE AGRESSIVIDADE PROVOCADA PELA SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A NÃO DEVE-SE A AQUISIÇÃO DE PROPRIEDADES DE CÉLULAS-TRONCO

4.5.1. EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PLURIPOTÊNCIA

Por se tratar de um fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotência em CTE e indução de pluripotência em células somáticas, foram avaliadas possíveis correlações entre a superexpressão de OCT4A nas células tumorais e a expressão de outros fatores de pluripotência tipicamente ativos em CTE. Enfatizou-se a análise de SOX2 e NANOG, por serem importantes parceiros proteicos de OCT4, e de LIN28A, por ser um regulador pós-transcricional de OCT4. As análises por qRT-PCR mostraram alterações significativas na expressão de *LIN28A* e *NANOG* em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A. Entretanto, o tipo de alteração não foi consistente em todas as linhagens celulares, visto que tanto níveis aumentados (em Daoy e USP-13-Med) quanto diminuídos (em D283Med) de transcritos de *LIN28A* foram detectados, e a expressão de *NANOG* foi afetada apenas em células da linhagem Daoy (Figura 38). Não foram encontradas alterações significativas nos níveis transcricionais de *SOX2* após superexpressão de OCT4A.

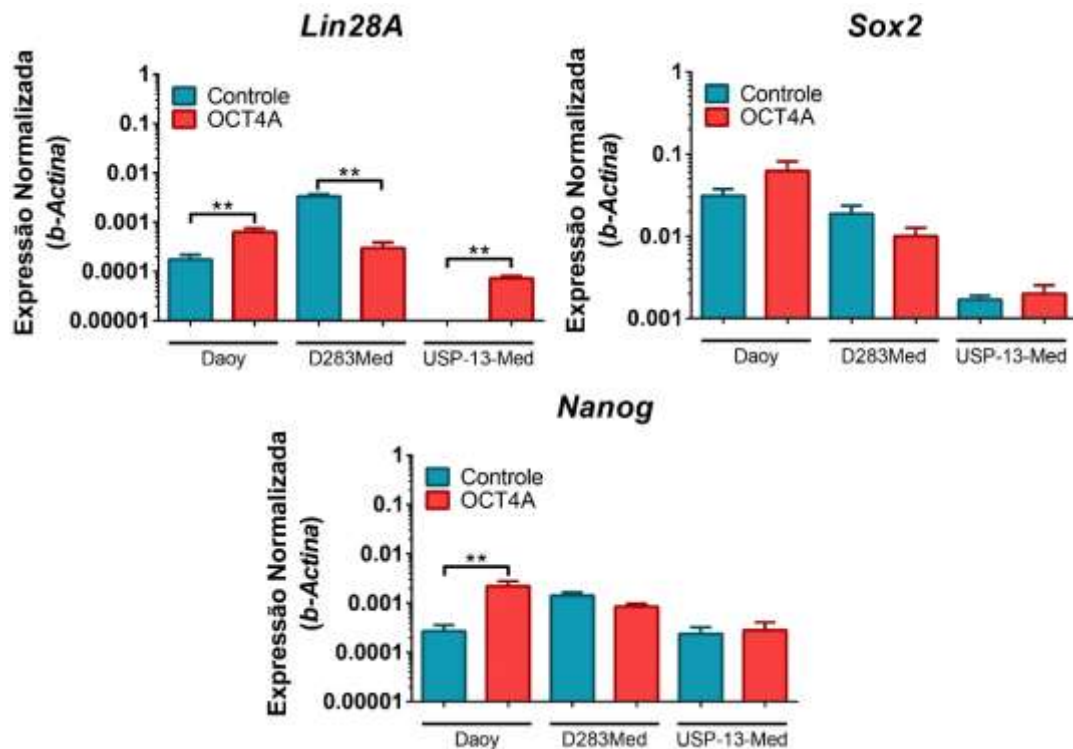


Figura 38 - Expressão de *LIN28A*, *SOX2* e *NANOG* em células de meduloblastoma com superexpressão de *OCT4A*. Quantificação dos níveis transcricionais de *LIN28A*, *SOX2* e *NANOG* por qRT-PCR. Dados normalizados pela expressão do gene endógeno β -*ACTINA* e apresentados como expressão relativa à amostra de CTE, utilizada como controle positivo. *OCT4A*: células tumorais com superexpressão de *OCT4A*; Controle: células tumorais com expressão basal de *OCT4A*. Significância estatística: ** $p < 0,01$.

4.5.2. MANUTENÇÃO EM CONDIÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

O efeito da superexpressão de *OCT4A* sobre a capacidade de crescimento de células tumorais em meio condicionado específico para a manutenção de CTE também foi avaliado. Para tanto, as células de meduloblastoma foram mantidas por 6 dias em meio mTeSR™1 e em placas tratadas com *BD Matrigel™ hESC-qualified Matrix*. Como é possível observar pela Figura 39A, apenas células da linhagem Daoy tiveram a sua capacidade de manutenção e crescimento em condições de cultivo de CTE aumentada após a superexpressão de *OCT4A*, enquanto que células das linhagens D283Med e USP-13-Med tiveram suas capacidades reduzidas nas mesmas condições. Entretanto, como indicado pelas fotomicrografias na Figura 47B, não houve formação de colônias de células indiferenciadas tipicamente observadas quando CTE e iPSCs são cultivadas nessas mesmas condições experimentais.

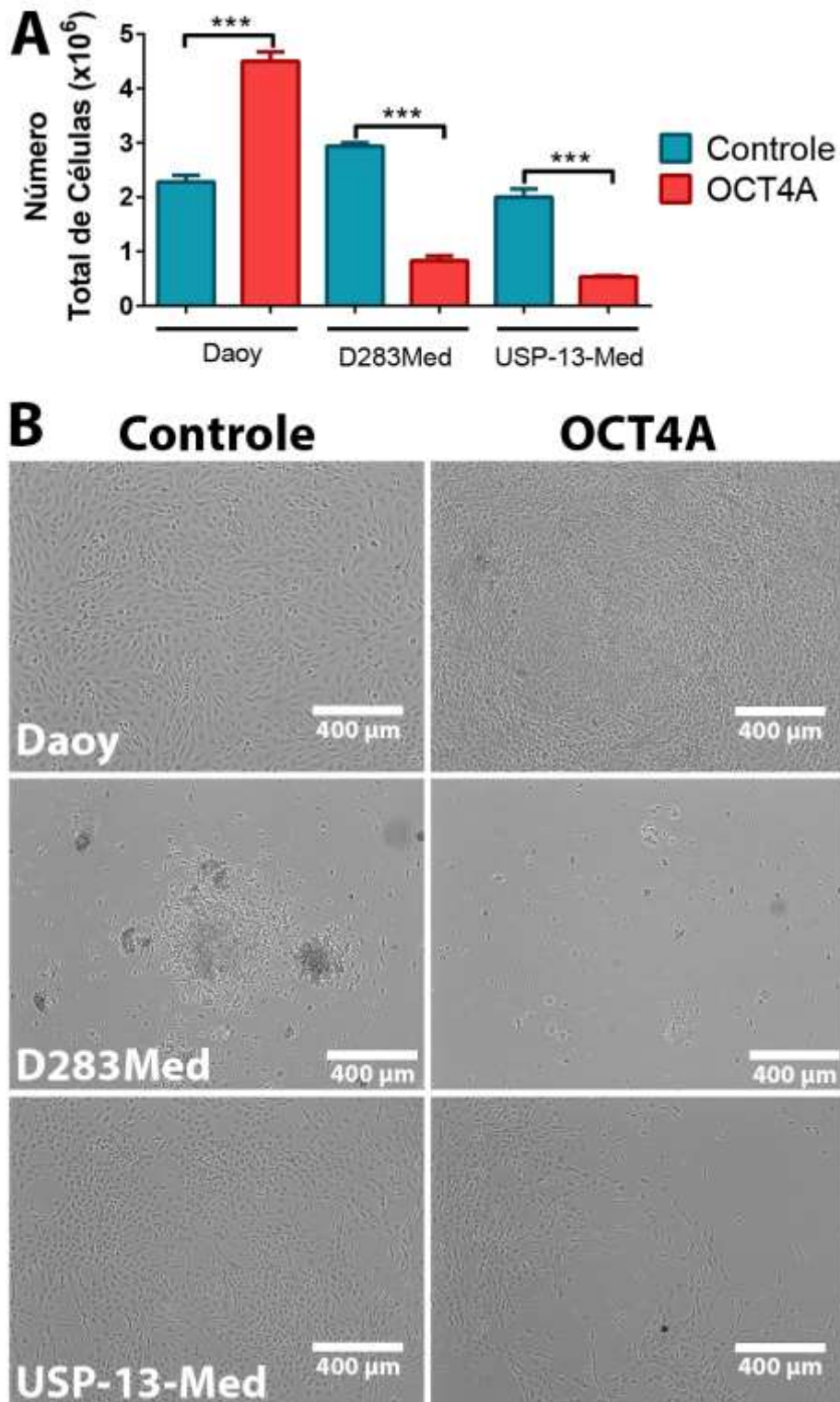


Figura 39 - Crescimento de células de meduloblastoma humano sob condições de cultivo de células-tronco pluripotentes. (A) Número total de células ao final de seis dias de cultivo em condições de manutenção de CTE e iPSCs. **(B)** Fotomicrografias representativas de células de meduloblastoma cultivadas em condições de manutenção de células-tronco pluripotentes mostram variações na densidade celular após superexpressão de OCT4A. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância estatística: *** $p < 0,001$.

4.6. EFEITOS DE DIFERENTES NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE OCT4A SOBRE PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS DE MEDULOBLASTOMA

4.6.1. EFEITOS *IN VITRO*

Já foi descrito que o controle fino da expressão de OCT4A influencia na manutenção da pluripotência e diferentes níveis de expressão de OCT4A podem contribuir para destino celular de CTE (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000).

No presente trabalho, os efeitos de diferentes níveis de expressão de OCT4A sobre parâmetros de agressividade de meduloblastoma também foram avaliados. Nesse estudo, foi utilizada a linhagem Daoy por ser a mais bem descrita na literatura. Foi realizada uma transdução retroviral e obtida uma linhagem celular com nível de expressão de OCT4A intermediário entre a linhagem celular Daoy Controle, cuja expressão é basal, e a linhagem celular Daoy OCT4A. Nesta sessão, para maior clareza, a linhagem celular Daoy OCT4A será chamada de Daoy OCT4A^{Hi} e a linhagem celular com nível intermediário de superexpressão será chamada de Daoy OCT4A^{Me}. Para cada uma dessas linhagens celulares, foram também obtidos três clones, selecionados após crescimento independente de ancoragem. A expressão de OCT4A nessas células, em nível transcricional e proteico, é apresentada na Figura 40.

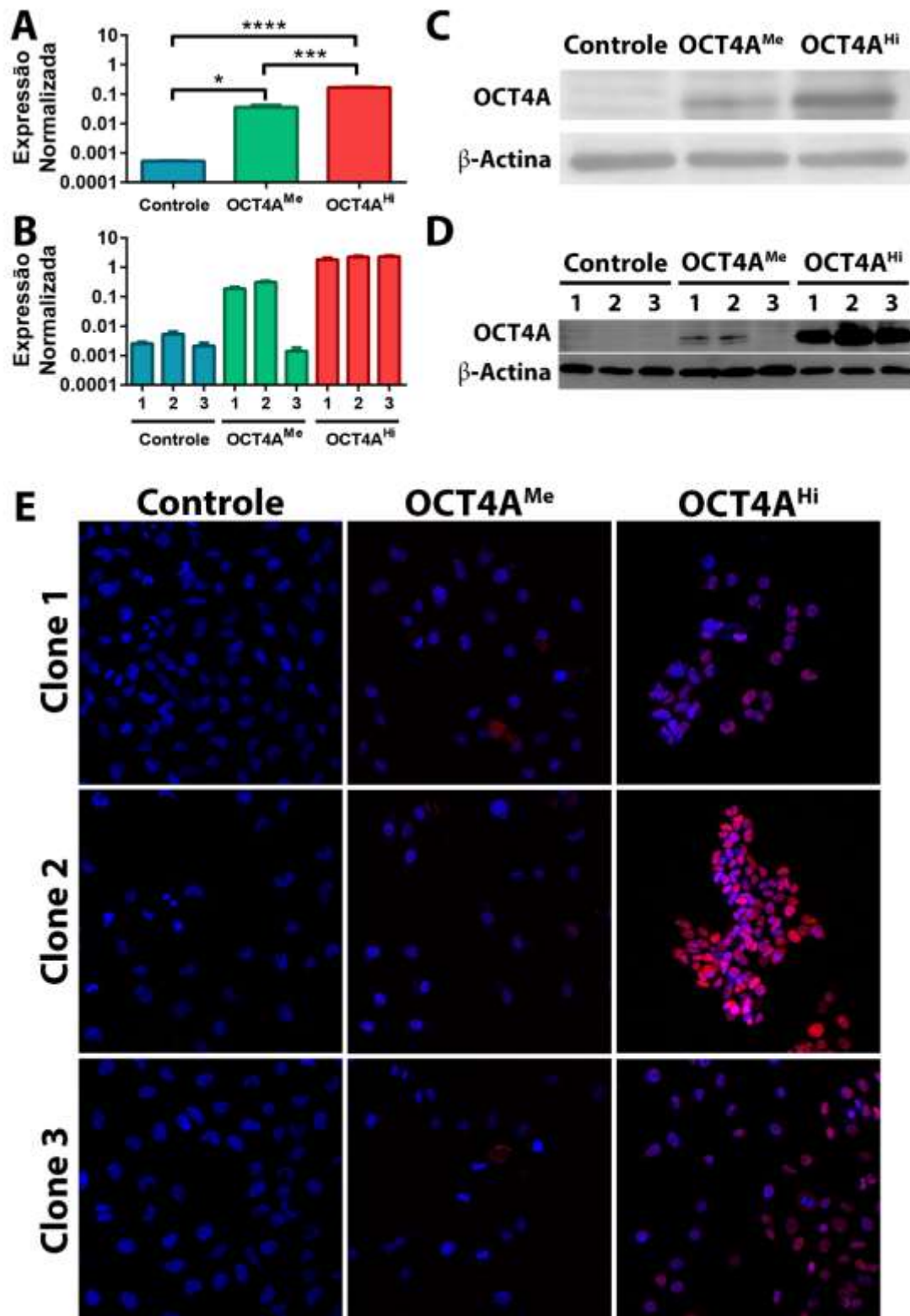


Figura 40 - Níveis crescentes de expressão de OCT4A em culturas parentais e clonais de células de meduloblastoma da linhagem Daoy. (A) Quantificação da expressão do transcrito *Oct4A* por qRT-PCR em células de linhagens parentais e **(B)** respectivos clones derivados. Dados normalizados pela expressão do gene endógeno β -ACTINA e apresentados de forma relativa à quantificação em CTE. **(C)** Avaliação dos níveis proteicos de OCT4A por *Western Blot* em linhagens parentais e **(D)** seus clones. **(E)** Expressão e localização subcelular de OCT4A em células de meduloblastoma, avaliada por imunofluorescência. O núcleo foi marcado com DAPI (Azul) e OCT4A marcado com anticorpo secundário Cy3 (Vermelho). Controle: Nível basal de OCT4A; OCT4A^{Me}: Nível intermediário de superexpressão de OCT4A; OCT4A^{Hi}: Nível alto de superexpressão de OCT4A. Significância estatística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Os efeitos dependentes do nível de superexpressão de OCT4A foram observados *in vitro* por ensaio clonogênico de crescimento independente de ancoragem (Figura 41A) e por ensaio de capacidade de geração de esferas tumorais (Figura 41B-C). Em ambos os ensaios, foi observado um aumento na capacidade de geração de colônias e de esferas tumorais de forma nível-dependente em relação à expressão de OCT4A. O tamanho das colônias e das esferas tumorais também sofreu aumento de acordo com os níveis de OCT4A (Figura 42 e Figura 43).

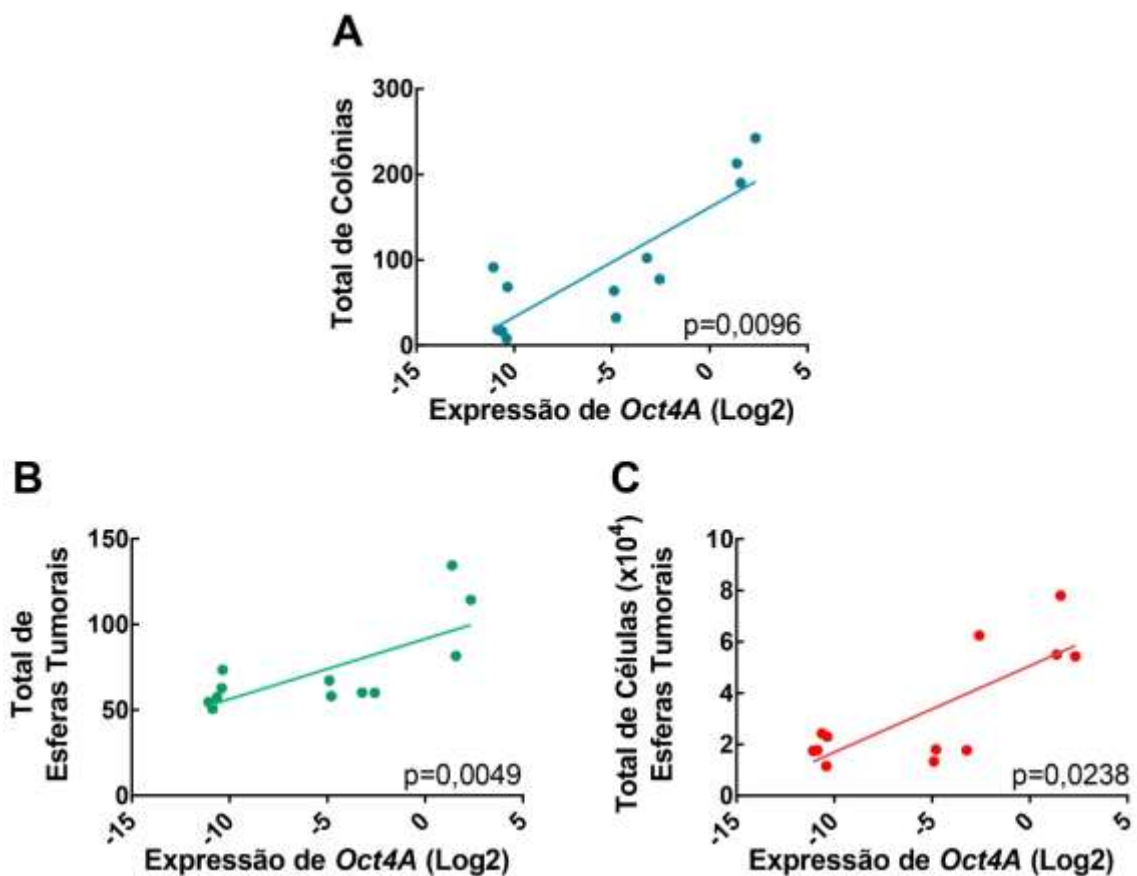


Figura 41 - Efeitos do nível de expressão de OCT4A sobre a formação de colônias e a capacidade de geração de esferas tumorais de células de meduloblastoma humano. (A) Correlação entre número total de colônias e o nível de expressão de Oct4A; (B) Correlação entre o número total de esferas tumorais e o nível de expressão de Oct4A; (C) Correlação entre o número total de células após dissociação de esferas tumorais e o nível de expressão de Oct4A. São apresentados os valores obtidos das culturas de células parentais e seus respectivos clones, da linhagem Daoy.

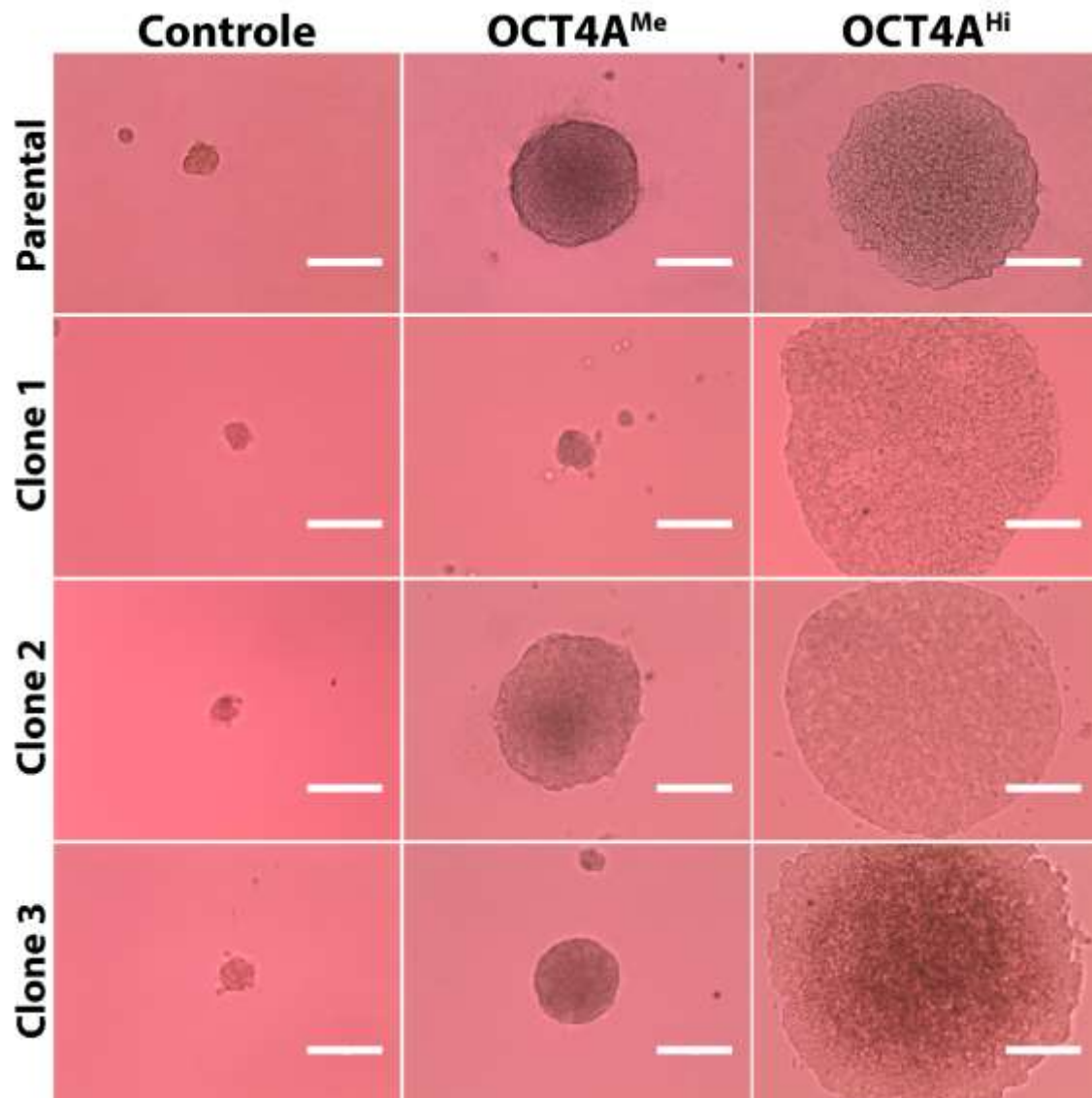


Figura 42 - Expressão de OCT4A afeta de forma nível-dependente o tamanho máximo de colônias de células de meduloblastoma com capacidade de crescimento independente de ancoragem. Fotomicrografias representativas do tamanho máximo observado de colônias de células de meduloblastoma da linhagem Daoy (Parental e Clones) após superexpressão de OCT4A. Controle: Nível basal de OCT4A; OCT4A^{Me}: Nível intermediário de superexpressão de OCT4A; OCT4A^{Hi}: Nível alto de superexpressão de OCT4A. Barra: 200 μ m.

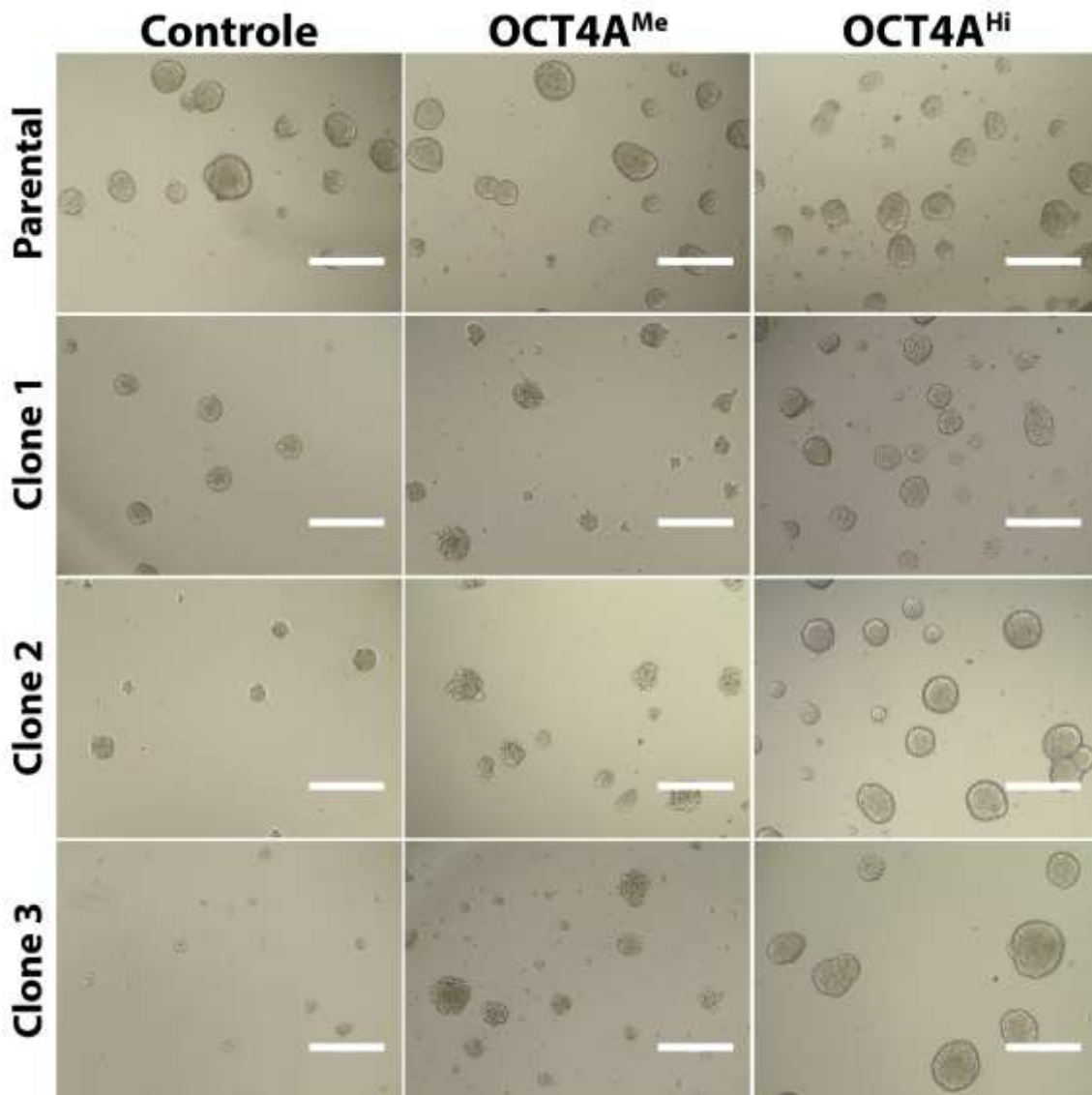


Figura 43 - Expressão de OCT4A afeta de forma nível-dependente a quantidade e o tamanho de esferas tumorais de meduloblastoma. Fotomicrografias representativas do tamanho médio observado de esferas tumorais geradas por células da linhagem Daoy (Parental e Clones) após superexpressão de OCT4A. Controle: Nível basal de OCT4A; OCT4A^{Me}: Nível intermediário de superexpressão de OCT4A; OCT4A^{Hi}: Nível alto de superexpressão de OCT4A. Barra: 400 μ m.

4.6.2. EFEITOS *IN VIVO*

Foi avaliado também se o nível de superexpressão de OCT4A interfere no crescimento tumoral *in vivo*. Para tanto, foram inoculadas de forma subcutânea 1×10^6 células no flanco direito dos animais e avaliado o crescimento tumoral. Como é possível observar pela Figura 44, a cinética de crescimento tumoral foi afetada de forma nível-dependente, no qual os tumores derivados de células OCT4A^{Hi} apresentaram um maior volume ao final de 135 dias, em relação

tanto aos tumores derivados de células OCT4A^{Me} e quanto aos de células do grupo Controle.

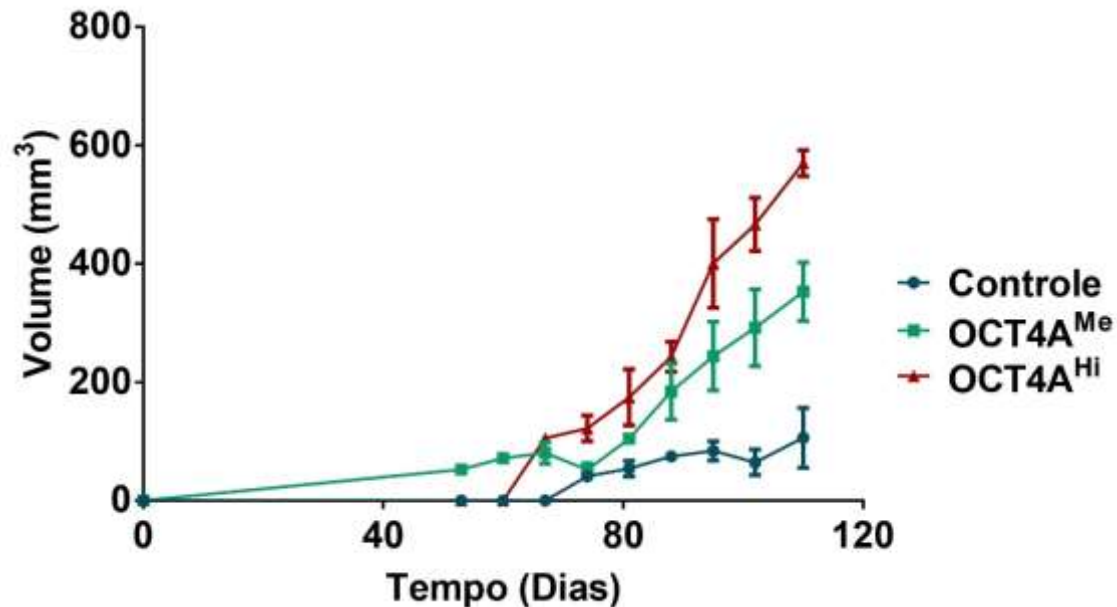


Figura 44 - Expressão de OCT4A favorece a tumorigênese de células de meduloblastoma humano de forma nível-dependente. Cinética de crescimento tumoral avaliada por mensuração periódica do volume de tumores subcutâneos derivados da injeção de células de meduloblastoma da linhagem Daoy com níveis crescentes de expressão de OCT4A. Dados representam a média \pm SEM dos volumes tumorais dos animais de cada grupo experimental. Controle: Nível basal de OCT4A; OCT4A^{Me}: Nível intermediário de superexpressão de OCT4A; OCT4A^{Hi}: Nível alto de superexpressão de OCT4A.

A análise histológica desses tumores subcutâneos revelou que tumores gerados por células com superexpressão de OCT4A (OCT4^{Hi} e OCT4A^{Me}) são mais semelhantes entre si do que com os tumores desenvolvidos pelas células Daoy Controle, caracterizados principalmente por uma maior heterogeneidade celular, presença de necrose, regiões de hemorragia e infiltrado inflamatório (Figura 45). Comparativamente, os tumores gerados pelas células Daoy Controle apresentaram-se menores e mais homogêneos. Os dados indicam então que níveis crescentes de expressão de OCT4A causam efeitos proporcionalmente maiores sobre propriedades pró-tumorigênicas de meduloblastoma, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

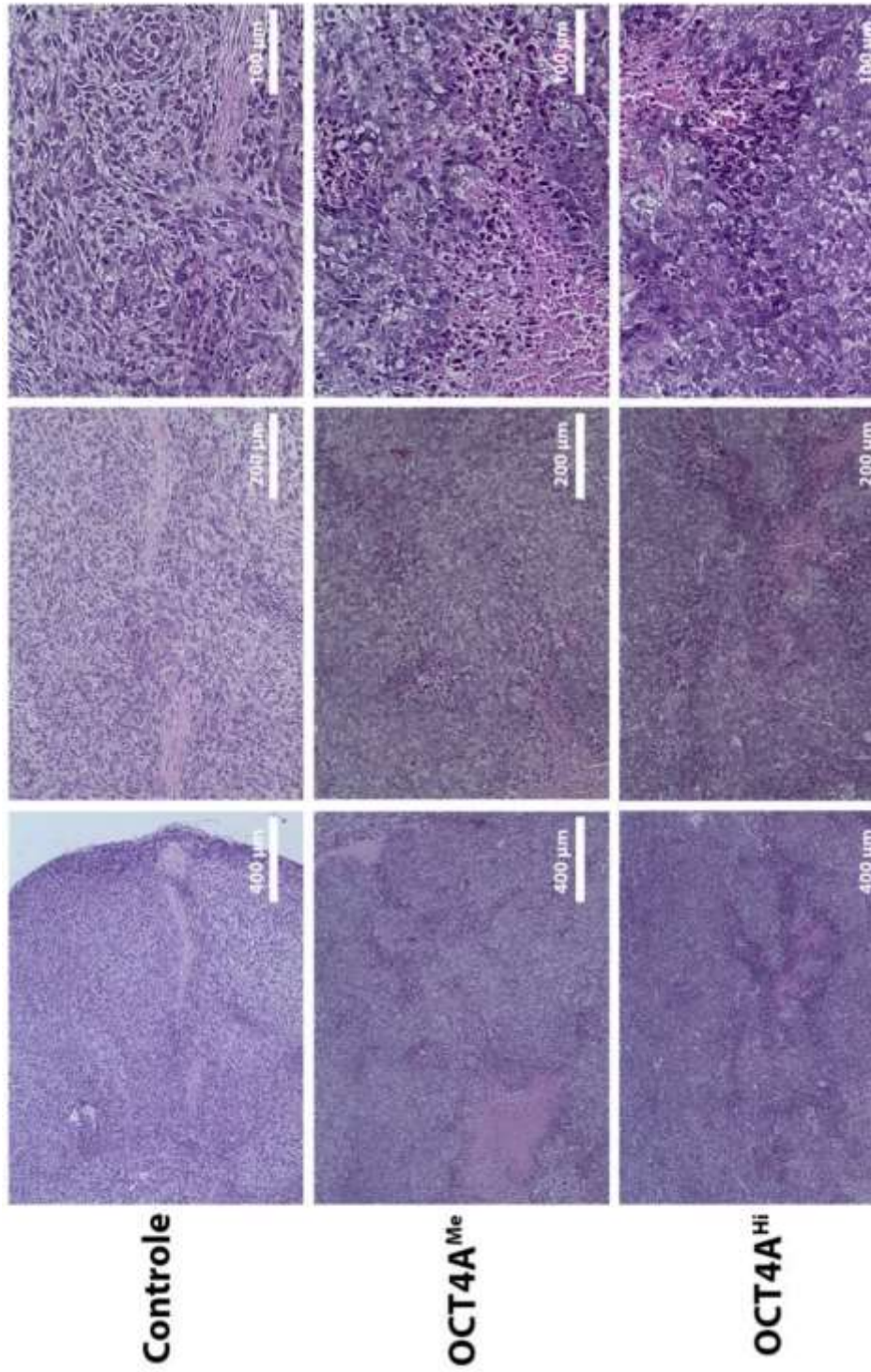


Figura 45 - Superexpressão de OCT4A favorece o desenvolvimento de tumores com morfologia típica de tumores agressivos. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos submetidos a procedimento padrão de H.E., em diferentes magnificações, de tumores subcutâneos derivados de células Daoy com níveis distintos de superexpressão de OCT4A. Maior heterogeneidade celular, presença de infiltrado inflamatório e necrose tumoral são mais evidentes em tumores gerados por células OCT4A^{Me} e OCT4A^{Hi}. Controle: Nível basal de OCT4A; OCT4A^{Me}: Nível intermediário de superexpressão de OCT4A; OCT4A^{Hi}: Nível alto de superexpressão de OCT4A.

4.7. ALTERAÇÕES MOLECULARES DECORRENTES DA SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A

4.7.1. ANÁLISE DE GANHOS E PERDAS DE SEGMENTOS CROMOSSÔMICOS POR aCGH

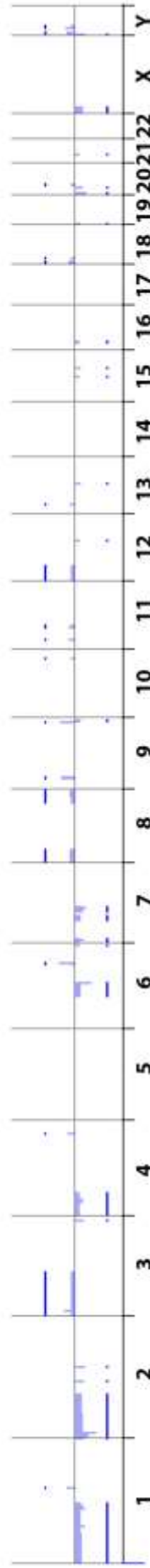
Outro fator crucial à progressão do câncer é a crescente instabilidade genômica das células tumorais. Sabe-se que a expressão ectópica de fatores de transcrição envolvidos na reprogramação celular ao estado pluripotente é capaz de ocasionar instabilidade genômica (BEN-DAVID, 2015; PASI et al., 2011). Considerando-se que a superexpressão de OCT4A favoreceu a aquisição de fenótipo mais agressivo em células de meduloblastoma, verificou-se a possível ocorrência de ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos nessas células.

A Figura 46 apresenta esquematicamente as novas aberrações cromossômicas encontradas após a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma. De forma interessante, a maior quantidade de alterações no número de cópias de segmentos cromossômicos foi observada em células Daoy, nas quais a superexpressão de OCT4A atingiu os maiores níveis dentre as linhagens celulares utilizadas no presente trabalho. Uma quantidade pequena de novas aberrações cromossômicas foi observada em células da linhagem USP-13-Med, enquanto que nenhuma aberração adicional foi detectada em células da linhagem D283Med.

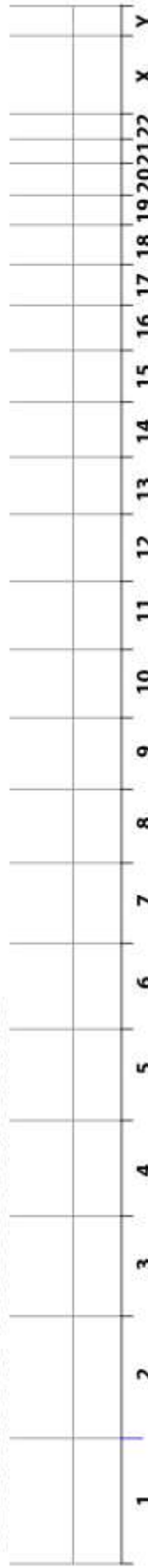
No total, foram detectadas 39 perdas e 23 ganhos na linhagem celular Daoy, e 6 ganhos na linhagem celular USP-13-Med decorrentes da superexpressão de OCT4A, as quais estão sumarizadas nos Apêndices 1 e 2, respectivamente.

A análise comparativa identificou duas regiões cromossômicas que foram afetadas em ambas as linhagens (Daoy e USP-13-Med) após a superexpressão de OCT4A, 1p32.3 e 9p21.3 (Figura 47). A citobanda 1p32.3 foi encontrada deletada em Daoy e amplificada em USP-13-Med, enquanto que a citobanda 9p21.3 foi amplificada em ambas as linhagens celulares. No total, foram observados 28 genes localizados nessas regiões cromossômicas comuns, os quais estão listados na Tabela 4.

Daoy OCT4A x Daoy Controle



D283Med OCT4A x D283Med Controle



USP-13-Med OCT4A x USP-13Med Controle

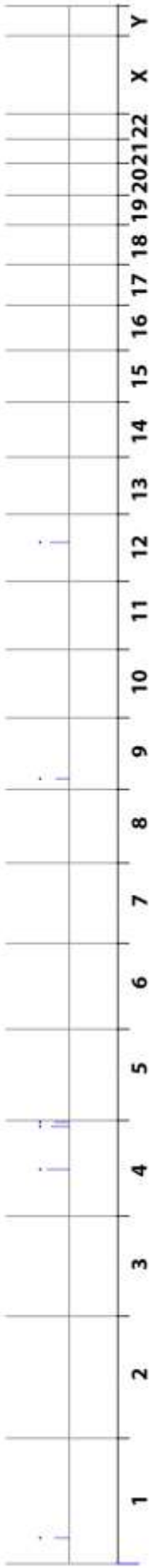


Figura 46 – Aberrações em número de cópias cromossômicas detectadas em células de meduloblastoma humano com superexpressão de OCT4A. Resumo esquemático de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A, quando comparadas aos seus respectivos controles (respectivas células tumorais com níveis basais de expressão de OCTA). A Figura apresenta as aberrações adquiridas em todos os cromossomos autossômicos (1 a 22) e sexuais (X e Y). As barras azuis indicam os ganhos (acima da linha média) e perdas (abaixo da linha média) no número de cópias, adquiridos após a expressão ectópica de OCT4A.

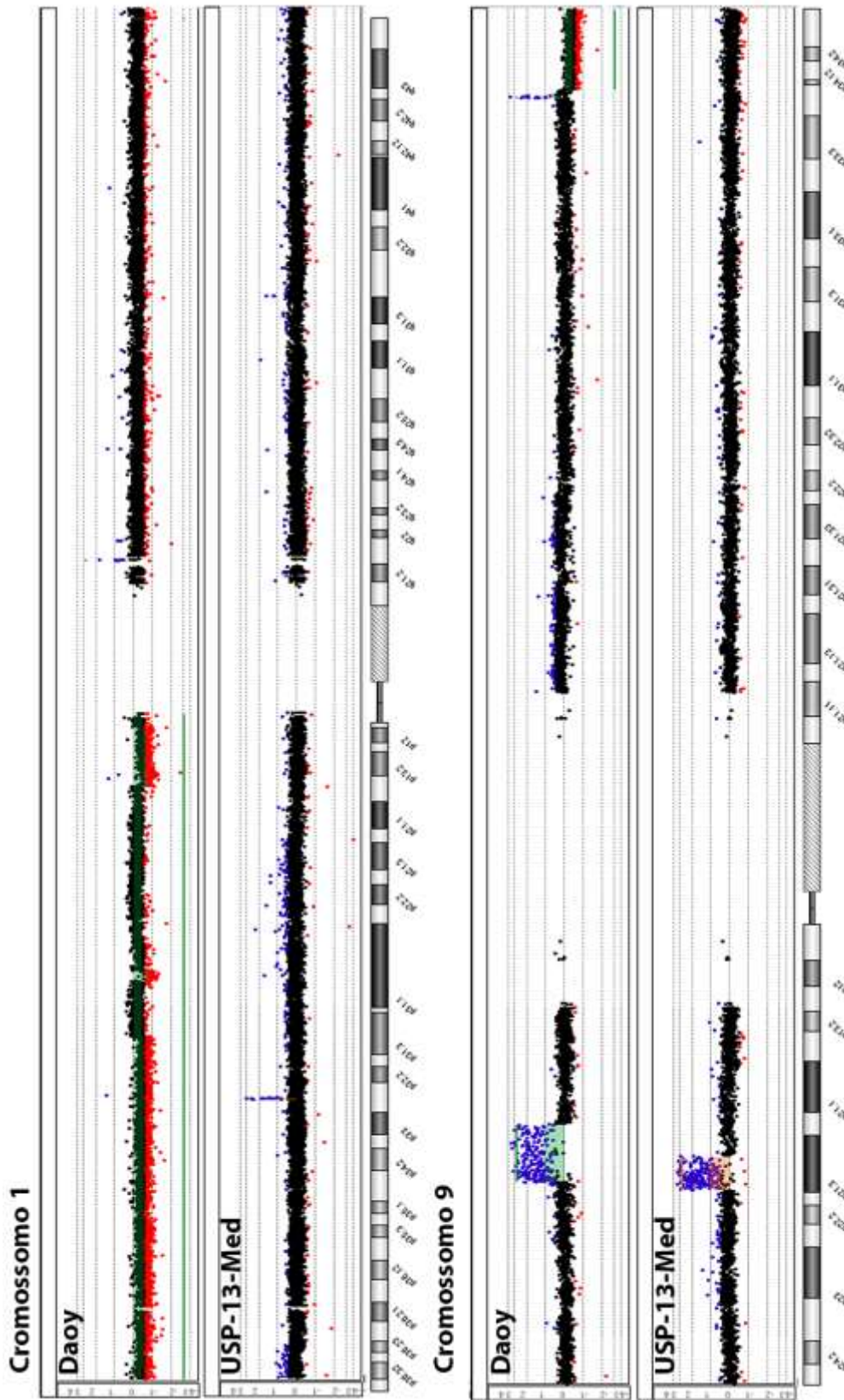


Figura 47 – Aberrações comuns em número de cópias cromossômicas detectadas em células tumorais das linhagens Daoy e USP-13-Med com superexpressão de OCT4A. Esquema destacando novas aberrações no número de cópias de segmentos dos cromossomos 1 e 9. As citobandas 1p32.3 e 9p21.3 foram afetadas em células tumorais com superexpressão de OCT4A de ambas as linhagens celulares, comparativamente as respectivas células tumorais com níveis basais de expressão de OCT4A (Controle). As diferenças observadas em células da linhagem Daoy estão destacadas em verde e as alterações em células da linhagem USP-13-Med, destacadas em laranja.

Tabela 4 – Genes localizados em regiões contendo aberrações cromossômicas após a superexpressão de OCT4A e que foram comumente afetadas nas linhagens Daoy e USP-13-Med

Gene	Citobanda	Condição em Daoy	Condição em USP-13-Med
FAF1	1p32.3	Deletado	Amplificado
CDKN2C	1p32.3	Deletado	Amplificado
MIR548H2	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNB1	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNW1	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA21	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA4	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA7	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA10	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA16	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA17	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA14	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA5	9p21.3	Amplificado	Amplificado
KLHL9	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA6	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA13	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA2	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA8	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNA1	9p21.3	Amplificado	Amplificado
LOC554202	9p21.3	Amplificado	Amplificado
IFNE	9p21.3	Amplificado	Amplificado
MIR31	9p21.3	Amplificado	Amplificado
MTAP	9p21.3	Amplificado	Amplificado
C9orf53	9p21.3	Amplificado	Amplificado
CDKN2A	9p21.3	Amplificado	Amplificado
CDKN2BAS	9p21.3	Amplificado	Amplificado
CDKN2B	9p21.3	Amplificado	Amplificado
DMRTA1	9p21.3	Amplificado	Amplificado

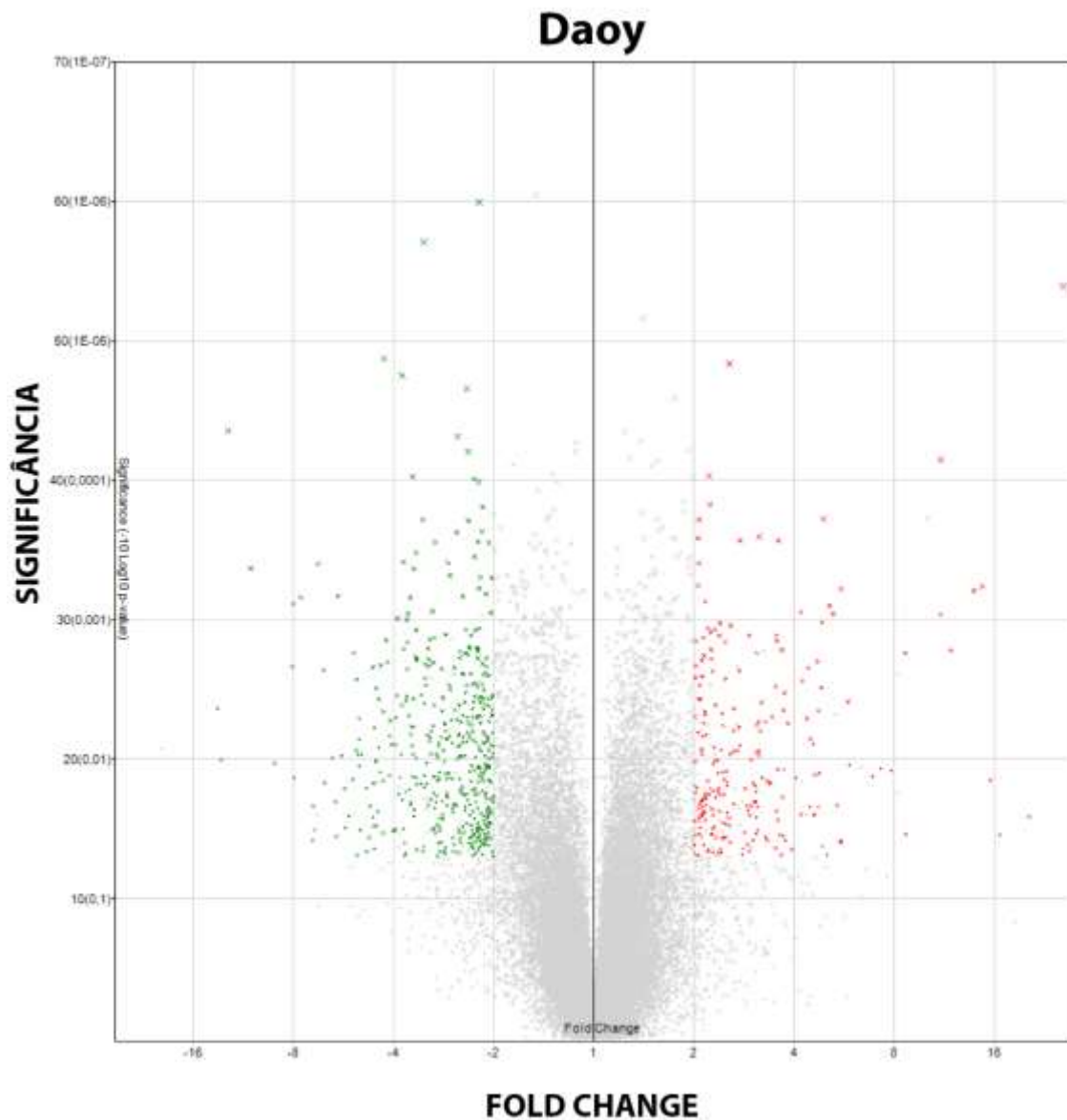
4.7.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

Por se tratar de um fator de transcrição, o OCT4A age principalmente regulando a expressão de diversos genes-alvos, favorecendo assim a manutenção da pluripotência em células CTE e iPSCs. Entretanto, pouco se sabe sobre os genes regulados por esse fator em células tumorais. Assim, alterações no perfil de expressão gênica global de células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A foram avaliadas com o intuito de identificar possíveis mecanismos envolvidos na aquisição da maior agressividade tumoral verificada preliminarmente nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

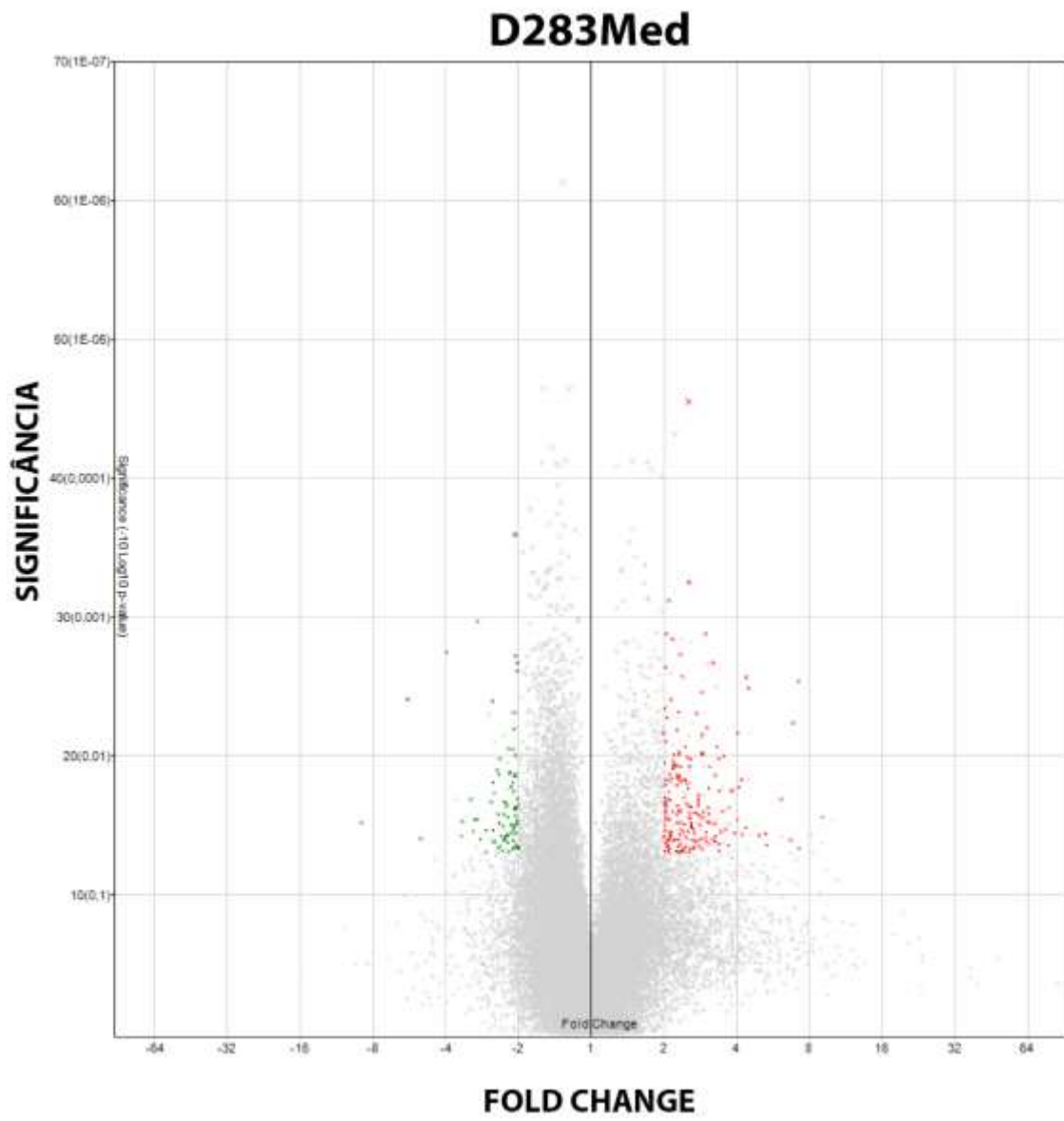
Para a identificação dos genes diferencialmente expressos, foram utilizados de 2 a 3 clones de cada linhagem Controle e com

superexpressão de OCT4A. Genes com um *fold-change* de expressão maior ou igual a 2 e significância estatística de $p < 0,05$ foram identificados como genes diferencialmente expressos. A Figura 56 apresenta a distribuição desses genes diferencialmente expressos após a superexpressão de OCT4A. Os parâmetros de qualidade dos microarranjos encontram-se disponíveis nos Apêndices 3 -5.

(CONTINUA)



(CONTINUAÇÃO)



(CONCLUSÃO)

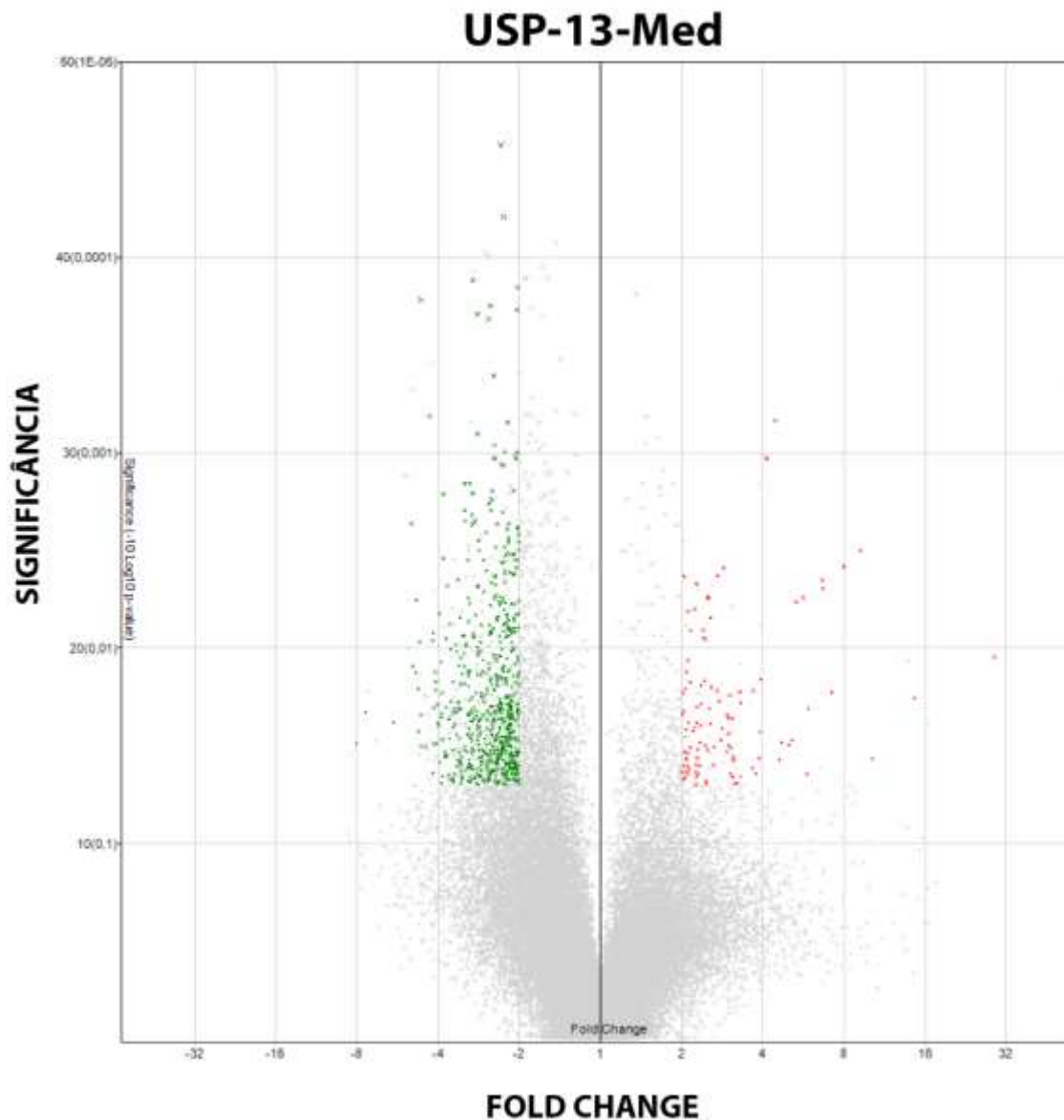


Figura 48 - Gráfico tipo *Volcano Plot* para identificação de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A. Os genes diferencialmente expressos foram identificados considerando-se *fold-change* superior a 2 e significância estatística de $p < 0,05$. Pontos vermelhos e verdes indicam genes hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente.

A superexpressão de OCT4A afetou a expressão de 852 genes em células Daoy, 736 genes em células D283Med e 710 genes em células USP-13-Med. As respectivas análises de agrupamento gênico por similaridade de perfil de expressão diferencial (*clusters*) são apresentados na Figura 49.

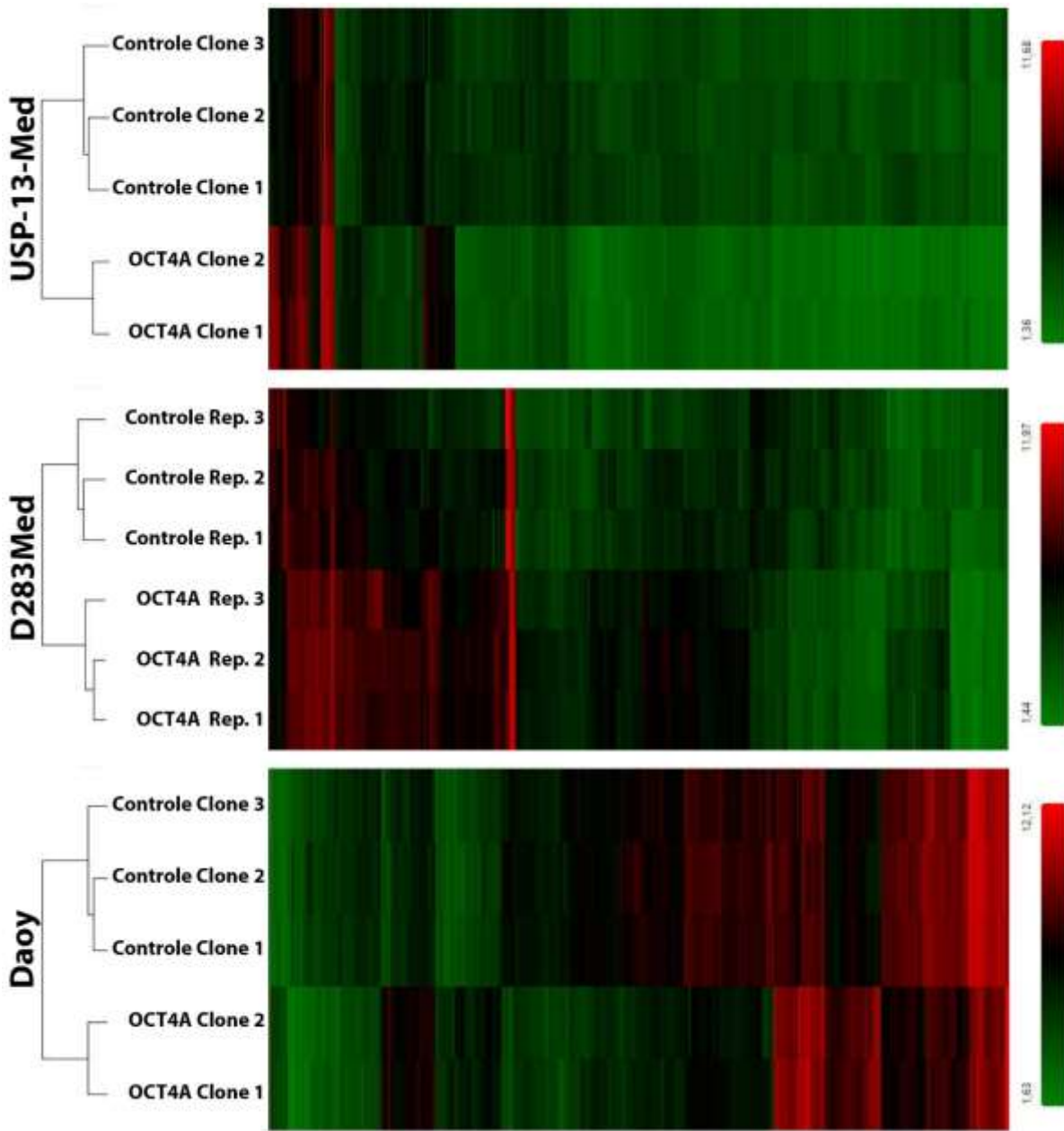


Figura 49 - Gráfico tipo Heatmap de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma mediante superexpressão de OCT4A. Dados apresentados como Log_2 da média de intensidade fluorescente normalizada. OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: respectivas células tumorais com expressão basal de OCT4A.

A análise funcional dos genes diferencialmente expressos identificou funções celulares e moleculares (Tabela 5), bem como as doenças significativamente correlacionadas com os genes diferencialmente expressos (Tabela 6). Alterações de funções importantes para a formação e progressão tumoral foram detectadas nas células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A, como por exemplo, crescimento celular e proliferação, movimento celular, morte celular e sobrevivência, e metabolismo de drogas. Como esperado, foram observadas diferenças na expressão de genes envolvidos no câncer e em injúrias e anomalias do organismo. Uma análise integrada de redes de interações moleculares também revelou correlações com resposta inflamatória e replicação, recombinação e reparo do DNA, funções extremamente importantes para o desenvolvimento tumoral (Tabela 7). Apenas em células da linhagem Daoy foram observadas alterações em desenvolvimento embrionário e do organismo, provavelmente devido aos seus maiores níveis de expressão de OCT4A em relação às demais linhagens de meduloblastoma.

Tabela 5 – Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e sua relação com funções celulares e moleculares

Linhagem	Funções Celulares e Moleculares		
	Nome	<i>p-value</i>	# Moléculas
Daoy	Crescimento Celular e Proliferação	4,04E-03 - 1,21E-08	137
	Sinalização Célula-a-Célula	5,22E-03 - 1,80E-08	82
	Organização Celular	2,06E-03 - 1,80E-08	17
	Manutenção e Função Celular	4,22E-03 - 1,80E-08	67
	Movimento Celular	5,12E-03 - 2,19 E-08	90
D283Med	Movimento Celular	4,98E-02 - 9,83E-05	16
	Metabolismo de Carboidrato	4,98E-02 - 1,81E-04	5
	Metabolismo de Lipídio	4,98E-02 - 1,81E-04	6
	Bioquímica de Pequenas Moléculas	4,98E-02 - 1,81E-04	10
	Morte Celular e Sobrevivência	3,96E-02 - 5,41E-04	26
USP-13-Med	Movimento Celular	4,29E-02-1,28E-04	26
	Metabolismo de Carboidrato	3,45E-02 - 4,50E-04	5
	Interação e Sinalização Célula-a-Célula	4,29E-02 - 4,50E-04	19
	Metabolismo de Drogas	2,60E-02 - 4,50E-04	7
	Transporte Molecular	3,45E-02 - 4,50E-04	9

* Análise feita pela plataforma *Ingenuity Pathway Analysis* - IPA

Tabela 6 - Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e sua correlação com doenças.

Linhagem	Doenças		
	Nome	<i>p-value</i>	# Genes
Daoy	Câncer	5,27E-03 - 5,77E-12	449
	Injúrias e Anomalias do Organismo	5,27E-03 - 5,77E-12	449
	Doenças do Sistema Reprodutivo	4,44E-03 - 3,31E-11	278
	Doenças Gastrointestinais	4,62E-03 - 2,47E-09	400
	Doenças do Sistema Hepático	4,30E-03 - 2,47E-09	226
D283Med	Injúrias e Anomalias do Organismo	4,98E-02 - 2,3E-07	64
	Doenças do Sistema Reprodutivo	4,98E-02 - 2,3E-07	49
	Câncer	4,98E-02 - 1,96E-06	55
	Doenças Gastrointestinais	4,71E-02 - 1,96E-06	18
	Resposta Inflamatória	4,71E-02 - 9,83E-05	12
USP-13-Med	Injúrias e Anomalias do Organismo	4,29E-02 - 3,01E07	107
	Doenças do Sistema Reprodutivo	4,27E-02 - 3,01E08	38
	Desordens de Tecido Conjuntivo	3,49E-02 - 5,36E-07	31
	Doenças Inflamatórias	3,94E-02 - 5,36E-07	37
	Desordens Esqueléticas e Musculares	3,49E-02 - 5,36E-07	33

* Análise feita pela plataforma *Ingenuity Pathway Analysis* - IPA

Foi realizada também uma análise comparativa dos genes diferencialmente expressos e sua correlação com ganhos e perdas de segmentos cromossômicos previamente detectados nas mesmas células de meduloblastoma após superexpressão de OCT4A. Em células da linhagem Daoy, verificou-se que aproximadamente 8,1% dos genes diferencialmente expressos (Tabela 8) encontram-se em regiões cromossômicas com número de cópias aberrante, cuja alteração (ganho ou perda) é compatível com o tipo de expressão gênica diferencial (hiperexpressão ou hipoexpressão). A lista desses genes correlacionados está sumarizada na Tabela 9. Correlações dessa natureza não foram encontradas nas células tumorais das demais linhagens celulares incluídas no estudo.

Tabela 7 – Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e redes de interações moleculares associadas.

Linhagem	Funções de Redes Associadas	
	Nome	Score
Daoy	Movimento Celular, Transporte Molecular, Morte Celular e Sobrevivência	38
	Movimento Celular, Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento do Organismo	32
	Doença Gastrointestinal, Doença Imunológica, Doença Oftálmica	28
	Morfologia Tecidual, Desenvolvimento e Função do Sistema Cardiovascular, Morte Celular e Sobrevivência	26
	Câncer, Injúria e Anormalidades do Organismo, Desordens do Desenvolvimento	24
D283Med	Câncer, Desordens do Sistema Endócrino, Injúria e Anormalidades do Organismo	36
	Desenvolvimento Celular, Crescimento Celular e Proliferação, Desenvolvimento e Função de Pele e Cabelo	24
	Câncer, Injúria e Anormalidades do Organismo, Doenças Renais e Urológicas	12
	Desordens do Desenvolvimento, Doenças Hereditárias, Doenças Oftálmicas	5
	Desenvolvimento e Função do Sistema Cardiovascular, Morfologia Celular, Resposta Imune Mediada por Célula	2
USP-13-Med	Resposta Inflamatória, Movimento Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Digestivo	29
	Produção de Energia, Metabolismo de Lipídio, Bioquímica de Pequenas Moléculas	19
	Replicação, Recombinação e Reparo do DNA, Interação e Sinalização de Célula-a-Célula, Morfologia Celular	17
	Doença Cardiovascular, Injúria e Anormalidades do Organismo, Doenças do Sistema Reprodutivo	17
	Organização Celular, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA, Ciclo Celular	17

* Análise feita pela plataforma *Ingenuity Pathway Analysis* - IPA

Tabela 8 – Total de genes diferencialmente expressos e genes localizados em regiões com aberrações cromossômicas após a superexpressão de OCT4A.

	Daoy	USP-13-Med	D283Med
Total de Genes Diferencialmente Expressos (DEGs)	852	710	736
Total de Genes em Regiões com Aberrações Cromossômicas (CNA)	3063	40	0
Total de DEGs correlacionados com perfil de CNA	69	0	0

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos localizados em regiões com aberrações cromossômicas em células de meduloblastoma Daoy após a superexpressão de OCT4A.

(CONTINUA)

Gene	Expressão (<i>Fold-Change</i>)	Mutação
C8orf31	2,02	Amplificado
TRIM35	2,02	Amplificado
EMG1	2,04	Amplificado
CLU	2,08	Amplificado
SLC25A37	2,08	Amplificado
PSD3	2,09	Amplificado
EXOSC4	2,11	Amplificado
MRPS25	2,24	Amplificado
SH2D4A	2,28	Amplificado
MFSD3	2,36	Amplificado
FBXL6	2,39	Amplificado
SCARNA12	2,55	Amplificado
TUBA3C	3,54	Amplificado
CST3	4,73	Amplificado
SLC25A24	-2,03	Deletado
PTPRA	-2,04	Deletado
PHTF1	-2,05	Deletado
MRAP2	-2,06	Deletado
NCOA1	-2,06	Deletado
LCA5	-2,07	Deletado
MAGI3	-2,08	Deletado
DENND2C	-2,10	Deletado
FAM102B	-2,10	Deletado
MID1	-2,10	Deletado
PIGK	-2,11	Deletado
PCNA	-2,13	Deletado
SORT1	-2,13	Deletado
PTGFRN	-2,14	Deletado
MANEA	-2,15	Deletado
PRDM2	-2,15	Deletado
ITGB1BP1	-2,16	Deletado
CRIM1	-2,18	Deletado
C4orf19	-2,23	Deletado
WDR47	-2,23	Deletado
PLEKHH2	-2,24	Deletado
PAX7	-2,27	Deletado
C20orf96	-2,30	Deletado
BMP2	-2,32	Deletado
ELOVL4	-2,34	Deletado
CD38	-2,36	Deletado
C20orf194	-2,37	Deletado
WBSCR17	-2,37	Deletado

		(CONCLUSÃO)
RASSF2	-2,48	Deletado
ASAP2	-2,49	Deletado
TP73	-2,51	Deletado
ASXL2	-2,54	Deletado
MBOAT2	-2,61	Deletado
TBC1D19	-2,68	Deletado
VIPR1	-2,69	Deletado
KIDINS220	-2,71	Deletado
WNT2B	-2,71	Deletado
NBPF4	-2,79	Deletado
TNS3	-2,80	Deletado
ADAM17	-2,91	Deletado
STK17A	-3,04	Deletado
CD101	-3,07	Deletado
XYLT1	-3,07	Deletado
AK5	-3,11	Deletado
IAH1	-3,11	Deletado
SOD3	-3,15	Deletado
CPSF3	-3,18	Deletado
CSF1	-3,43	Deletado
TRIB2	-3,48	Deletado
CYTL1	-3,63	Deletado
IFI44L	-3,68	Deletado
LEPREL1	-3,72	Deletado
C7orf69	-4,59	Deletado
MXRA5	-7,96	Deletado
PROM1	-7,99	Deletado

*Genes diferencialmente expressos em uma razão maior de 2 *fold-change* foram comparados com genes localizados em regiões cromossômicas com número de cópias alterados após superexpressão de OCT4A. Foi considerada correlação quando genes em regiões amplificadas foram hiperexpressos ou genes em regiões deletadas foram encontrados hipoeexpressos.

Devido a correlação entre expressão gênica e aberrações cromossômicas ter sido observada em uma única linhagem celular e em índice relativamente baixo, bem como a ausência de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos em D283Med indicam que os possíveis efeitos do OCT4A na agressividade de meduloblastoma deve-se principalmente a alteração da expressão de genes-alvos.

Quando as linhagens celulares de meduloblastoma foram analisadas conjuntamente, encontrou-se em comum 141 genes diferencialmente expressos após superexpressão de OCT4A (Figura 58). Esse grupo comum é composto, em sua maioria, por genes não codificadores de proteínas (do inglês

non-coding RNAs, ncRNAs), compreendendo aproximadamente 69,5% do total de genes diferencialmente expressos identificados (Tabela 10).

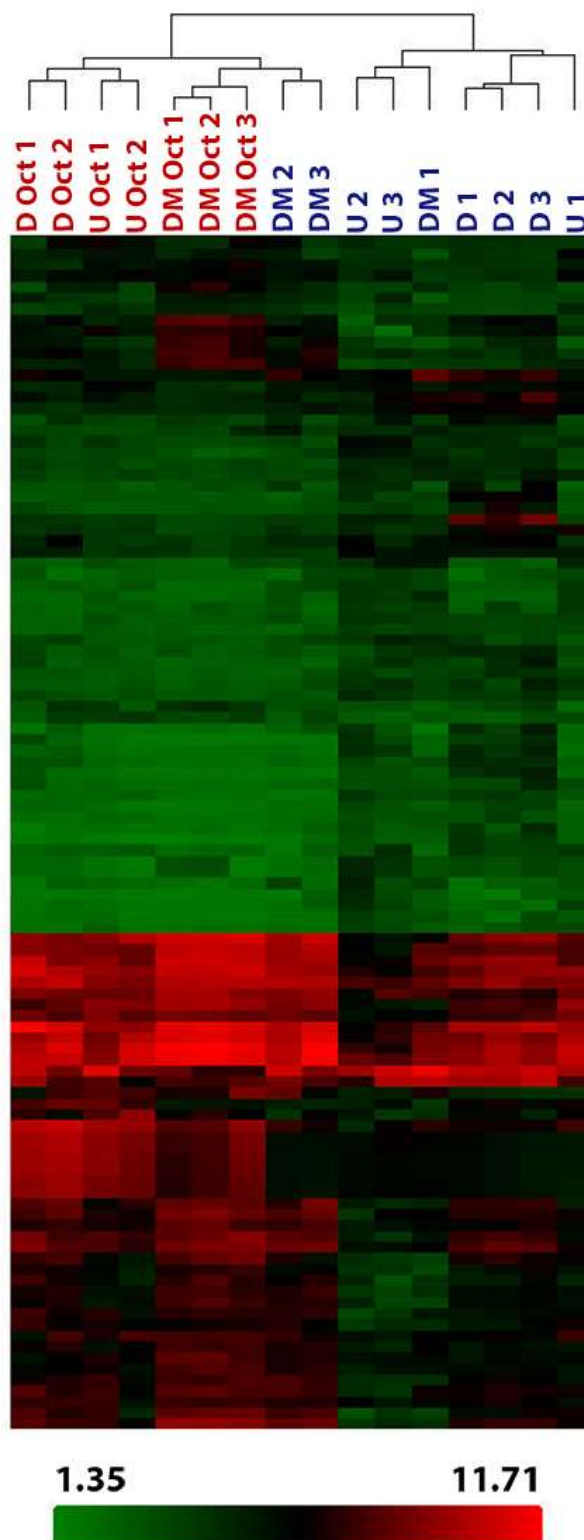


Figura 50 - Gráfico tipo *Heatmap* de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A. Dados apresentados como \log_2 da média de intensidade fluorescente normalizada. D = Daoy Controle; D Oct = Daoy OCT4A; DM = D283Med Controle; DM Oct = D283Med OCT4A; U = USP-13-Med Controle; U Oct= USP-13-Med OCT4A.

Tabela 10 – Grupo comum de genes diferencialmente expressos em linhagens de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A, das linhagens Daoy, D283Med e USP-13-Med.

(CONTINUA)

Símbolo do Gene	Tipo de Gene (Ensembl)	Fold-Change
LOC100508408	-	2,04
LOC100653057	-	2,34
RP11-433A23.1	-	-2,01
ACTA2	Codificador de Proteína	-2,13
ADAT2	Codificador de Proteína	2,02
AGAP4	Codificador de Proteína	2,26
AGAP6	Codificador de Proteína	2,26
BOC	Codificador de Proteína	-2,24
C6orf48	Codificador de Proteína	3,07
CEP164	Codificador de Proteína	2,30
CES1	Codificador de Proteína	2,31
DDX21	Codificador de Proteína	2,19
DKC1	Codificador de Proteína	3,52
FAM216A	Codificador de Proteína	2,04
GNB2L1	Codificador de Proteína	2,02
GNL3	Codificador de Proteína	3,19
HSPA8	Codificador de Proteína	2,53
ID1	Codificador de Proteína	-2,80
ITPKB	Codificador de Proteína	-2,41
LUM	Codificador de Proteína	-2,21
MAEL	Codificador de Proteína	-2,15
POU5F1	Codificador de Proteína	7,15
POU5F1B	Codificador de Proteína	7,15
RASA4	Codificador de Proteína	2,85
RASA4B	Codificador de Proteína	2,85
RPL17	Codificador de Proteína	2,46
RPL23A	Codificador de Proteína	2,96
RPL4	Codificador de Proteína	3,16
RPS13	Codificador de Proteína	2,04
SEMA3E	Codificador de Proteína	-2,27
SLC25A16	Codificador de Proteína	2,11
SLC9A7	Codificador de Proteína	2,45
SPIN3	Codificador de Proteína	2,16
SULT1C4	Codificador de Proteína	-2,27
TAF1D	Codificador de Proteína	3,35
TATDN1	Codificador de Proteína	2,18
TNKS	Codificador de Proteína	2,44
TSPAN31	Codificador de Proteína	2,05
TUBE1	Codificador de Proteína	2,48
UBD	Codificador de Proteína	-2,06
UNC13A	Codificador de Proteína	2,20
USP17L13	Codificador de Proteína	-2,12
USP17L15	Codificador de Proteína	-2,12
RPSA	Codificador de Proteína	2,48
CHDC2	Codificador de Proteína	-2,09
LOC101060581	Codificador de Proteína	2,26

(CONTINUAÇÃO)

AC010967.2	lincRNA	-2,13
AC069277.2	lincRNA	-2,84
CASC20	lincRNA	-2,20
CTD-2331D11.2	lincRNA	-2,06
GTSCR1	lincRNA	-2,01
LINC00401	lincRNA	-3,21
LOC101927230	lincRNA	-2,35
RP11-893F2.6	lincRNA	-2,35
LOC101928509	lincRNA	-2,17
MEG3	lincRNA	-2,46
RNU11	lincRNA	-2,84
RP11-171N4.1	lincRNA	-2,14
RP11-199O14.1	lincRNA	-2,20
RP11-23D5.1	lincRNA	-2,64
RP11-344F13.1	lincRNA	-2,71
RP11-398M15.1	lincRNA	-2,26
RP11-459J23.1	lincRNA	-3,21
RP4-660H19.1	lincRNA	-2,28
RP5-1021I20.2	lincRNA	-2,05
SNHG8	lincRNA	2,28
LOC100506498	lincRNA	-2,05
LINC00849	lincRNA	2,11
HELLPAR	macro lincRNA	-2,01
MIR1304	miRNA	2,06
MIR4719	miRNA	-2,15
MIR664B	miRNA	3,52
MIR642B	miRNA	-2,30
AC010974.3	ncRNA Antisense	-2,02
RP11-555M1.3	ncRNA Antisense	-2,40
RP11-634B7.4	ncRNA Antisense	-2,02
RP11-649A16.1	ncRNA Antisense	-2,22
RP1-65P5.3	ncRNA Antisense	3,04
TPT1-AS1	ncRNA Antisense	3,04
ZFAS1	ncRNA Antisense	2,52
CES1P1	Pseudogene não Processado	2,34
FAM86FP	Pseudogene não Processado	2,28
SDHAP1	Pseudogene não Processado	2,43
SDHAP2	Pseudogene não Processado	2,43
CES1P2	Pseudogene não Processado	2,34
POU5F1P3	Pseudogene Processado	7,15
POU5F1P4	Pseudogene Processado	7,15
RNA5SP157	rRNA	-2,68
RNA5SP236	rRNA	-2,03
AC107072.2	Sense Intrônico	-2,13
RP11-138H8.6	Sense Intrônico	2,23
SNORA33	snoRNA	3,49
SNORA56	snoRNA	3,52
SNORD101	snoRNA	2,33
SNORD114-10	snoRNA	-2,63

		(CONCLUSÃO)
SNORD114-18	snoRNA	-2,72
SNORD114-24	snoRNA	-2,23
SNORD114-29	snoRNA	-3,12
SNORD14A	snoRNA	2,14
SNORD14B	snoRNA	2,04
SNORD14C	snoRNA	2,53
SNORD14D	snoRNA	2,53
SNORD16	snoRNA	3,16
SNORD18A	snoRNA	3,16
SNORD18B	snoRNA	3,16
SNORD18C	snoRNA	3,16
SNORD19B	snoRNA	3,19
SNORD42A	snoRNA	2,96
SNORD42B	snoRNA	2,30
SNORD4B	snoRNA	2,96
SNORD5	snoRNA	3,35
SNORD58A	snoRNA	2,46
SNORD58B	snoRNA	2,46
SNORD58C	snoRNA	2,46
SNORD59A	snoRNA	4,30
SNORD63	snoRNA	2,87
SNORD69	snoRNA	2,36
SNORD96A	snoRNA	2,02
SNORA6	snoRNA	2,48
SNORA24	snoRNA	2,28
SNORA1	snoRNA	3,35
SNORA18	snoRNA	2,06
SNORA32	snoRNA	2,66
SNORA40	snoRNA	2,09
SNORA8	snoRNA	2,32
SNORD95	snoRNA	2,02
SNORA62	snoRNA	2,48
RNU1-23P	snRNA	-2,52
RNU2-57P	snRNA	-2,14
RNU2-62P	snRNA	-2,64
RNU6-1053P	snRNA	2,07
RNU6-1061P	snRNA	-2,07
RNU6-344P	snRNA	-2,20
RNU6-431P	snRNA	2,60
RNU6-505P	snRNA	-2,08
RNU6-658P	snRNA	-2,30
RNU6-759P	snRNA	2,59
RNU6-951P	snRNA	-2,14
RNU7-95P	snRNA	-2,02
LINC00173	Transcrito Processado	2,28
VTRNA2-1	vaultRNA	3,09

*Dados obtidos após análise conjunta de todas as linhagens celulares de meduloblastoma.

A análise funcional dos genes diferencialmente expressos em comum demonstra o enriquecimento de genes envolvidos com proliferação e movimento celular, metabolismo de drogas e morte/sobrevivência celular (Tabela 11). Vale salientar que a maioria dos genes observados ainda não possui função conhecida. Por este motivo, a anotação funcional realizada contempla apenas genes previamente descritos na literatura. Ainda assim, as funções moleculares e biológicas obtidas são importantes para a iniciação e progressão tumoral. Uma análise conjunta das duas principais redes de interações moleculares identificou a possível interação entre as respectivas proteínas identificadas e alvos *upstream* e *downstream* (Figura 51).

Tabela 11 - Anotação funcional do grupo comum de genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A.

Funções Biológicas e Moleculares		
Nome	<i>p-value</i>	#Genes
Organização Celular	4.18E-02 - 9.10E-04	6
Manutenção e Função Celular	3.10E-02 - 9.10E-04	6
Crescimento Celular e Proliferação	1.56E-02 - 2.25E-03	5
Movimento Celular	3.39E-02 - 2.25E-03	6
Metabolismo de Drogas	8.95E-03 - 2.25E-03	3
Funções de Redes Associadas		
Nome	Score	
Morte Celular e Sobrevivência, Síntese Proteica e Câncer	19	
Ciclo Celular, Câncer, Injúria e Anomalias do Organismo	14	
Câncer, Fibrose Cardíaca, Proliferação Cardíaca	2	
Doenças Cardiovasculares, Injúrias e Anomalias do Organismo, Doenças do Sistema Reprodutivo	2	
Desordens do Desenvolvimento, Doenças Hematológicas, Doenças Hereditárias	2	

* Análise feita com a plataforma *Ingenuity Pathway Analysis* – IPA. As principais redes associadas utilizadas para geração de rede de interações estão destacadas em negrito.

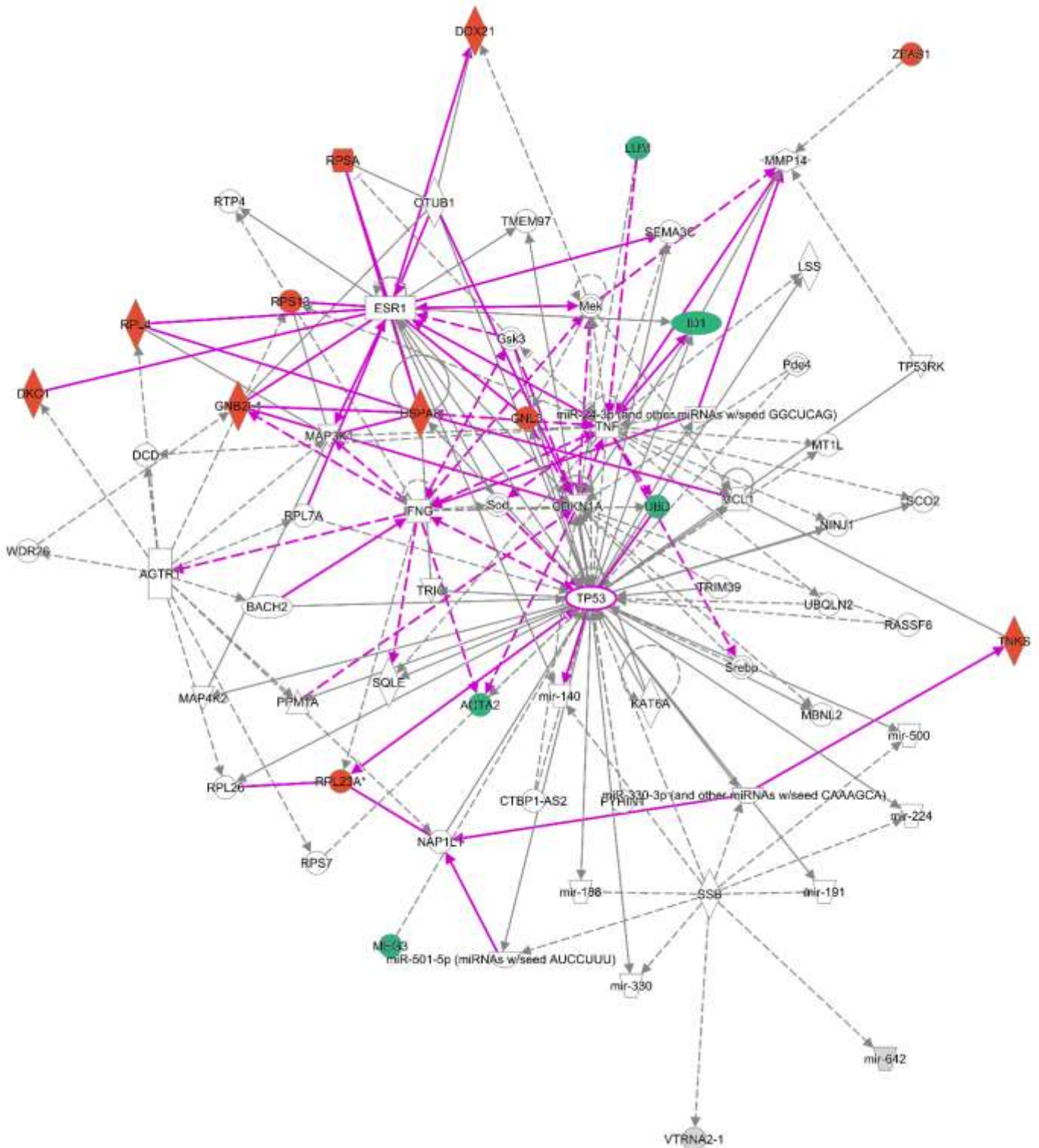


Figura 51 - Associação de redes de interações moleculares identificadas pela análise funcional dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCTA. Figura gerada pela plataforma *Ingenuity Pathway Analysis*. Os genes diferencialmente expressos encontram-se coloridos na figura (Vermelho: hiperexpresso; Verde: hipoexpresso). As duas principais redes associadas utilizadas para identificação de interações encontram-se destacadas em negrito na Tabela 10.

4.8. SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A TAMBÉM AFETA PROPRIEDADES TUMORIGÊNICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE AT/RT

Assim como o meduloblastoma, o AT/RT é um tumor neuropediátrico de origem embrionária. Esse tumor foi, por muitos anos, considerado um tipo de meduloblastoma devido a sua similaridade. No entanto, mais recentemente, foi descoberto que o AT/RT possui características distintas que o classifica como um novo tipo tumoral. O AT/RT é um tumor altamente agressivo e um dos tumores pediátricos mais fatais de ocorrência em crianças muito jovens.

No presente trabalho, estabelecemos uma linhagem celular a partir de amostra de AT/RT obtida em colaboração com o Dr. Hamilton (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP), denominada USP-07-Med. Devido suas similaridades com o meduloblastoma, também investigamos os efeitos da superexpressão de OCT4A na tumorigênese e agressividade dessa linhagem celular de AT/RT. Por se tratar de um tipo tumoral distinto ao meduloblastoma, os resultados obtidos foram analisados à parte e apresentados no Apêndice 6.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Apesar de alterações nos níveis de OCT4 terem sido observadas em diversos tipos de tumores sólidos, poucos estudos avaliaram sua expressão em tumores do SNC. Em gliomas, níveis elevados de OCT4 já foram correlacionados com o grau do tumor (DU et al., 2009; ELSIR et al., 2014; GUO et al., 2011; HOLMBERG et al., 2011; SHI et al., 2013), no entanto, não foi observada correlação significativa com a sobrevida dos pacientes (ELSIR et al., 2014). Em neuroblastoma, um tumor sólido derivado de células da crista neural que desenvolve-se na infância, trabalhos já reportaram a detecção positiva de OCT4, no entanto, a associação com prognóstico foi controversa (KANEKO et al., 2015; MONAJEMZADEH et al., 2014; YANG et al., 2012) e os pacientes com neuroblastoma apresentaram menor sobrevida apenas quando OCT4 e MYCN eram detectados concomitantemente (KANEKO et al., 2015). A expressão elevada do respectivo gene *POU5F1* foi descrita como um marcador preditivo de pior prognóstico em pacientes com meduloblastoma, e sugerida como marcador molecular para a estratificação de pacientes considerados de baixo risco de recidiva que apresentam menor sobrevida (RODINI et al., 2012). Apesar da detecção de OCT4 já ter sido observada e correlacionada com parâmetros clínicos desfavoráveis em tumores do SNC, pouco se sabe sobre suas ações para a aquisição de fenótipo mais agressivo (SEYMOUR; TWIGGER; KAKULAS, 2015). Na presente tese, propusemos avaliar e melhor compreender as alterações funcionais e moleculares decorrentes do aumento dos níveis de OCT4 na tumorigênese e patogênese de meduloblastoma. Os dados aqui apresentados apontam que a superexpressão do fator de pluripotência OCT4A favorece a aquisição de fenótipo mais agressivo em células de meduloblastoma humano e, pela primeira vez, indicam a regulação de ncRNAs, especialmente RNAs não-codificadores longos (do inglês *long non-coding RNAs*, lncRNAs) e pequenos RNAs não codificadores nucleolares (do inglês *small nucleolar RNAs*, snoRNAs), como possível mecanismo para o aumento de agressividade provocado por OCT4A em meduloblastoma.

Outro fator importante que propusemos avaliar é a contribuição específica da isoforma OCT4A na tumorigênese de meduloblastoma. Isto porque as contribuições das isoformas codificadas por *POU5F1* na tumorigênese e progressão tumoral são ainda menos conhecidas, e poucos trabalhos correlacionaram a expressão diferencial dos transcritos de *POU5F1* com prognóstico de pacientes (DE RESENDE et al., 2013; HUANG et al., 2011). As isoformas de OCT4 já foram associadas a diversas funções celulares em condições fisiológicas e patológicas, como auto-renovação e pluripotência (LEE et al., 2006; TSAI et al., 2014a; ZHANG et al., 2010), proliferação celular (ZHAO et al., 2014), estresse genotóxico (FARASHAHI YAZD et al., 2011; GAO et al., 2012) e morte celular programada por apoptose (ASADI et al., 2011; ASADZADEH et al., 2012; CORTES-DERICKS et al., 2013; LI et al., 2015a; MIRZAEI et al., 2014). O conhecimento sobre os transcritos alternativos e isoformas codificadas por *POU5F1* foi primeiramente relatado em 1992 (TAKEDA; SEINO; BELL, 1992), no entanto, pouca atenção para suas diferentes funções foi dada no decorrer do tempo. Uma melhor compreensão e caracterização das diferentes isoformas de OCT4 poderá contribuir para a elucidação dos resultados controversos observados na patogênese do câncer (WANG; DAI, 2010). De fato, alguns trabalhos prévios descreveram OCT4 como fator de transcrição envolvido nas características de pluripotência e auto-renovação de células-tronco e correlacionaram sua expressão aberrante em tumores com a presença de CTT, entretanto, a imunomarcação de OCT4 foi encontrada principalmente no citoplasma (ONG et al., 2015; YANG et al., 2012), localização subcelular da isoforma OCT4B, cuja principal função descrita até o momento é seu envolvimento em estresse genotóxico (GAO et al., 2012; ZHANG et al., 2010) sem correlação com a manutenção da auto-renovação e fenótipo pluripotente (ATLASI et al., 2008; LEE et al., 2006; LI et al., 2015a).

Os resultados aqui apresentados mostram que linhagens celulares de meduloblastoma expressam os três transcritos de *POU5F1* e que os transcritos *Oct4B* e *Oct4B1* são os mais expressos em todas as linhagens celulares analisadas. Em relação ao transcrito *Oct4A*, os níveis transcricionais foram os mais baixos dentre os três transcritos de *POU5F1*, valores estes inferiores de 1.000 a 2.000 vezes ao observado em uma CTE pluripotente. Os

resultados corroboram com o que é descrito na literatura, em que os transcritos *Oct4B* e *Oct4B1* são mais expressos em células diferenciadas e amostras tumorais (DE RESENDE et al., 2013; LI et al., 2015a; WEZEL et al., 2013) e que a expressão de *Oct4A* encontra-se elevada em células indiferenciadas (ATLASI et al., 2008; RIJLAARSDAM et al., 2011). Todavia, vale ressaltar que, apesar da baixa expressão de *Oct4A* em tumores, sua expressão está comumente associada a pior prognóstico dos pacientes (DE RESENDE et al., 2013). Considerando-se então que a detecção de OCT4, principalmente do fator de transcrição OCT4A, é correlacionada com menor sobrevida e pior prognóstico em pacientes com meduloblastoma, além da expressão diferencial ter sido proposta como marcador molecular para identificar pacientes clinicamente classificados como de baixo risco mas que podem não responder adequadamente ao tratamento padrão e, assim, apresentar evolução clínica desfavorável, entender a contribuição de OCT4A na tumorigênese e patogênese dessa doença se faz necessária e foi objetivo do presente trabalho.

A aquisição de fenótipos característicos de células-tronco já foi proposta como fator importante na tumorigênese de diversos tumores. Aumento da proliferação celular, capacidade de diferenciação e resistência a drogas são fenótipos associados a células-tronco que contribuem para a progressão e agressividade tumoral (REYA et al., 2001; VISVADER; LINDEMAN, 2012). No presente trabalho, a superexpressão do fator de pluripotência OCT4A afetou propriedades previamente associados a fenótipos de CTT. Dentre elas, a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma contribuiu para o aumento da proliferação celular, observado pela diminuição do tempo necessário para uma dobra populacional e promovendo a transição da fase G1 para S e G2/M do ciclo celular. Já foi descrito previamente como uma característica de células-tronco pluripotentes o encurtamento da fase G1 e transição para a fase S do ciclo celular (BECKER et al., 2006; LI; BALLABENI; KIRSCHNER, 2012; WHITE; DALTON, 2005), favorecendo intensa proliferação celular para o crescimento do embrião em desenvolvimento. Células-tronco adultas, no entanto, apresentam-se mais quiescentes e possuem taxas proliferativas menores quando comparadas a células precursoras, e são importantes na homeostase tecidual no decorrer da vida do organismo (CHENG, 2004; LI;

BHATIA, 2011). Assim como em condições fisiológicas, acredita-se que as CTT obedecem uma hierarquia celular, com poucas CTT quiescentes e quimiorresistentes capazes de se diferenciarem em células progenitoras proliferativas que compõem a maior parte da massa tumoral e que, posteriormente, darão origem as células tumorais diferenciadas com baixa taxa proliferativa (DRIESSENS et al., 2012; VESCOVI; GALLI; REYNOLDS, 2006). Considerando-se que a superexpressão de *POU5F1* foi capaz de reprogramar células neuroprogenitoras em células pluripotentes (KIM et al., 2009), a expressão ectópica de OCT4A em células tumorais de origem neuronal poderia recapitular processos importantes de células-tronco e CTT em amostras de meduloblastoma e, assim, favorecer a aquisição de fenótipos de CTT, como aumento da proliferação celular, de forma a contribuir para o crescimento da massa tumoral e progressão da doença. De fato, resultados semelhantes foram observados em diversos tipos tumorais após a manipulação da expressão de *POU5F1*, demonstrando seus efeitos na promoção da proliferação celular e encurtamento da fase G1/transição para as fases S/G2/M do ciclo celular (CAO et al., 2013; KUMAR et al., 2012; LI et al., 2014; TANG et al., 2015; TSAI et al., 2014a).

Os dados de expressão gênica aqui obtidos indicam possíveis genes alvos de OCT4A e os mecanismos que podem estar envolvidos na regulação e progressão do ciclo celular. Um exemplo é a proteína LUM, também conhecida como *Lumican*, encontrada hipoexpressa após a superexpressão de OCT4A em linhagens celulares de meduloblastoma. LUM é uma glicoproteína cuja principal função é o modelamento de matriz de colágeno extracelular (GROVER et al., 1995). No entanto, LUM pode interagir com proteínas intracelulares e, assim, interferir na progressão do ciclo celular (IOZZO, 1997). De fato, a diminuição dos níveis de LUM em células de osteosarcoma já foi correlacionada com aumento da proliferação celular (NIKITOVIC et al., 2008). Outro exemplo de molécula alvo é TNKS, também conhecida como *Tankyrase*, uma enzima que catalisa a poli-ADP-ribosilação e que desempenha funções importantes na manutenção dos telômeros e formação do fuso mitótico, duas atividades importantes no controle do ciclo celular (LEHTIÖ; CHI; KRAUSS, 2013). Em estudo de Lu e colaboradores (2013), a inibição de TNKS em células

de adenocarcinoma de pulmão foi capaz de inibir a proliferação celular, além de alterar a expressão de MCL-1S e MCL-1L, induzindo apoptose. A diminuição da proliferação e indução de apoptose provocada pelo silenciamento de TNKS afetaram o crescimento tumoral, evidenciado pela diminuição do volume tumoral (LU et al., 2013).

Dois processos importantes e característicos de CTT são a maior resistência à terapia e evasão da morte celular. No presente trabalho, foi avaliada se a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma afeta a quimiorresistência à ação da cisplatina, um quimioterápico muito utilizado para o tratamento de meduloblastoma em combinação com outros quimioterápicos, como vincristina, lomustina e/ou ciclofosfamida (GOTTARDO et al., 2014). A cisplatina possui dois grupamentos cloro que são substituídos por água no citoplasma da célula, em um evento denominado aquação, tornando-a altamente reativa. Dentre os mecanismos de ação, a cisplatina pode interagir com glutathione redutase (GSH) e metalotioninas e, assim, promover o estresse oxidativo, além de ser capaz de ligar-se ao DNA nuclear e mitocondrial favorecendo a formação de adutos de DNA. As lesões no DNA causadas pela cisplatina, se em pouca quantidade, podem ser reconhecidas e reparadas pelo sistema de reparo de DNA. Quando os danos são irreversíveis, a célula recebe sinais de parada do ciclo celular ou de indução de apoptose para morte celular. No presente trabalho, apesar do OCT4A ter sido capaz de afetar a quimiorresistência à cisplatina em células de meduloblastoma, o resultado não foi consistente nas três linhagens celulares avaliadas, indicando mecanismos linhagem-dependentes que podem afetar a resistência a drogas. Existem diversos mecanismos que podem interferir na resistência a cisplatina, como resistência *pre-target* (impede a ligação da cisplatina ao alvo), resistência *on-target* (diretamente relacionada aos danos provocados pela cisplatina), resistência *post-target* (alteração de vias de sinalização de morte celular ativadas pelos danos no DNA) e resistência *off-target* (mecanismos moleculares independentes que podem ou não estar associados a cisplatina) (GALLUZZI et al., 2012, 2014). Todas as linhagens celulares de meduloblastoma apresentaram alterações de vias importantes para morte celular e metabolismo de drogas que,

no contexto individual das alterações observadas em cada linhagem celular, podem favorecer mecanismos distintos de resistência à cisplatina.

Outro possível mecanismo que pode afetar a quimiorresistência de células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A é a alteração da expressão de outros transcritos alternativos de *POU5F1*. As isoformas OCT4B e OCT4B1 foram correlacionadas com processos anti-apoptóticos (ASADI et al., 2011; ASADZADEH et al., 2012; CORTES-DERICKS et al., 2013; MIRZAEI et al., 2014) e poderiam explicar os resultados conflitantes de resistência à cisplatina, visto que as células da linhagem Daoy apresentaram diminuição nos níveis de *Oct4B* após a superexpressão de OCT4A, podendo conferir sinais pró-apoptóticos e indução da morte celular, diferentemente da quimiorresistência observada em USP-13-Med, cuja expressão de *Oct4B1* foi aumentada após a superexpressão de OCT4A.

A capacidade de propagar em condições adversas como os proporcionados por crescimento 3D em ensaio de crescimento independente de ancoragem e formação de esferas tumorais possui implicações na agressividade tumoral e está correlacionada a maior tumorigênese *in vivo* (DI MAYORCA et al., 1973; MOYER; AUST, 1984; SINGH et al., 2004) e pior prognóstico em tumores embrionários do SNC (PANOSYAN et al., 2010). Tais propriedades são importantes no contexto tumoral, visto que o crescimento 3D tenta mimetizar condições do microambiente observado *in vivo* em condições de cultura *in vitro* (YAMADA; CUKIERMAN, 2007), além de estar associada a uma das principais características das células-tronco e CTT: a auto renovação (HAZELTINE; SELEKMAN; PALECEK, 2013; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Os dados aqui apresentados indicam que a superexpressão de OCT4A aumentou a capacidade de crescimento independente de ancoragem e formação de esferas tumorais, e que tais efeitos foram dependentes dos níveis de OCT4A. Em neuroblastoma e glioma, foram observadas diminuições na geração de esferas tumorais quando a expressão de *POU5F1* foi silenciada (IKUSHIMA et al., 2011; KANEKO et al., 2015) e, inversamente, quando superexpresso em carcinoma hepatocelular, as células apresentaram maior eficiência na formação de esferas tumorais (WU et al., 2015a). Li e colaboradores demonstraram em modelo de carcinoma cervical que OCT4A é a isoforma que tem capacidade de

modular a auto-renovação das esferas tumorais, sendo esse efeito praticamente nulo após a manipulação de OCT4B (LI et al., 2015a). Um dado interessante observado em nossos experimentos foi que a manipulação da expressão de OCT4A teve efeitos ainda mais evidentes quando as células de meduloblastoma foram cultivadas em condições de crescimento tridimensional. Células USP-13-Med praticamente não apresentaram alteração no tempo necessário para dobra populacional quando mantidas em condições de crescimento aderente em duas dimensões, entretanto, a superexpressão de OCT4A afetou positivamente a capacidade de formação de esferas tumorais e crescimento independente de ancoragem, apontando um efeito pró-tumorigênico de OCT4A em situações que mimetizam o microambiente tumoral.

A correlação entre o crescimento tridimensional *in vitro* e maior tumorigênese *in vivo* também foi observado em meduloblastoma após a superexpressão de OCT4A e o crescimento tumoral mostrou-se dependente dos níveis de OCT4A. Esses resultados vão ao encontro com dados obtidos em câncer de próstata (KOSAKA et al., 2013) e carcinoma esofágico (LI et al., 2014), cuja a formação de tumor em ensaio subcutâneo foi aumentada após a superexpressão de *POU5F1* e diminuída quando a expressão de *POU5F1* foi inibida. Em meduloblastoma, a presença de necrose e/ou apoptose no interior do tumor já foram correlacionadas com pior prognóstico (GIANGASPERO et al., 2006; VERMA; TAVARÉ; GILLES, 2008) e características mais agressivas do tumor, como maior proliferação celular (MAURER et al., 2015). Eberthart e Burger (2003) mencionam em seu trabalho que a progressão do meduloblastoma está correlacionada com a aquisição de fenótipos histopatológicos mais agressivos, como aumento dos índices mitóticos e apoptóticos, e lesões focais no interior do tumor, evidenciadas por atipia ou anaplasia em relação ao restante da massa tumoral (EBERHART; BURGER, 2003). No presente trabalho, os tumores derivados de células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A apresentaram morfologia semelhante ao previamente descrito como características histológicas agressivas, como extensa área de necrose/apoptose e aquisição de anaplasia/atipia no interior do tumor, sendo que a aquisição desses fenótipos está correlacionada com a expressão de OCT4A, tanto em níveis intermediários

quanto em níveis altos. Efeito semelhante foi observado por Stearns e colaboradores (2006) após a superexpressão do oncogene *C-MYC* em linhagens de meduloblastoma, no qual os autores sugerem o envolvimento entre a aquisição de tal fenótipo anaplásico com a progressão de tumores embrionários malignos (STEARNS et al., 2006).

Outro fenótipo correlacionado por Eberthart e Burger (2003) com a progressão da doença e histopatologia de meduloblastoma é a capacidade de metástase elevada em tumores cujo perfil histopatológico apresentam tais lesões de atipia/anaplasia. Um processo importante para o desenvolvimento de metástases é a TEM. Durante a TEM, as células perdem o seu fenótipo epitelial, a adesão célula-célula e a polaridade celular para adquirir um fenótipo mesenquimal, com maior capacidade de migração e invasão (THIERY et al., 2009). A TEM é um processo imprescindível para o desenvolvimento do organismo, e que possui implicações na malignidade tumoral (JOLLY, 2015). Além disso, a TEM é fundamental para a indução de pluripotência. Høffding e colaboradores (2015) verificaram que a transição mesenquimal-epitelial (do inglês *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*, TME) também ocorre durante o processo de reprogramação de fibroblastos (HØFFDING; HYTTEL, 2015), no entanto, Liu e colaboradores (2013) demonstraram que a indução da TEM no início do processo de reprogramação seguido pela TME é etapa importante para aumentar a eficiência na geração de iPSCs. Esse processo inicial de TEM foi ativado por OCT4 utilizando um mecanismo de introdução sequencial dos fatores de reprogramação e contribuiu para um aumento de 600% na eficiência na geração de células iPSCs (LIU et al., 2013). Outra evidência da colaboração entre TEM e indução de pluripotência com conseqüente envolvimento de OCT4A foi observada por Nori e colaboradores (2015). Eles identificaram que um clone de células iPSCs utilizado como modelo de terapia de dano medular sofreu transformação maligna a longo-termo e que, durante o processo oncogênico, ocorreu a superexpressão do transgene OCT4A e enriquecimento de componentes responsáveis pela TEM, contribuindo para a tumorigênese das células transplantadas (NORI et al., 2015). Vale ressaltar também que, durante o desenvolvimento embrionário, diferentes vias de sinalização envolvidas na morfogênese como WNT, SHH e NOTCH contribuem para a TEM e afetam a

capacidade de migração celular durante a formação tecidual (POLYAK; WEINBERG, 2009). Em meduloblastoma, alterações em componentes das vias supracitadas são geralmente utilizadas para estratificar pacientes em subgrupos moleculares com diferenças em parâmetros clínicos, como por exemplo em prognóstico e presença de metástase (MASCARO CORDEIRO et al., 2014; RAMASWAMY et al., 2016a).

No câncer a perda de adesão celular permite que as células se soltem da massa tumoral e iniciem o processo de metástase por meio da invasão de tecidos vizinhos, bem como vasos linfáticos e sanguíneos, até que consigam atingir e colonizar sítios distantes do foco primário. Recentemente, foi demonstrado que as células de câncer de mama e câncer colorretal com menor capacidade de adesão e mais sensíveis a ação da tripsina compõem uma subpopulação celular com características de CTT, como maior proliferação celular, maior eficiência na geração de esferas tumorais, maior tumorigênese *in vivo* e também apresentavam níveis elevados de CD133 e OCT4. Como esperado, tais células exibiram alteração em fatores importantes na regulação da TEM e foram capazes de gerar mais metástases em modelo murino, indicando que a menor adesão celular está correlacionado com fenótipo de CTT e maior agressividade tumoral (MORATA-TARIFA et al., 2016). No presente trabalho, a superexpressão de OCT4A diminuiu a adesão celular, bem como aumentou a capacidade de invasão *in vitro* das células de meduloblastoma quando cultivadas em condição de esferoide 3D em matriz de hidrogel. Tais efeitos *in vitro* podem explicar o aumento de focos metastáticos no neuroeixo de camundongos BALB/C *Nude*, observados após a superexpressão de OCT4A, sendo, inclusive, mais frequente a colonização tumoral da coluna espinhal, representado pelo grau mais agressivo de metástase no neuroeixo em meduloblastoma. Estudos independentes também demonstram que OCT4A favorece a TEM, migração, invasão e potencial metastático de células de câncer colorretal (DAI et al., 2013), câncer de mama (BELTRAN et al., 2011) e melanoma (KUMAR et al., 2012).

Apesar da compreensão das alterações fenotípicas associadas a superexpressão de *POU5F1* em modelos tumorais descobertas e divulgadas no período da elaboração da presente tese, pouco se sabe sobre as alterações

moleculares decorrentes do aumento específico dos níveis da isoforma OCT4A que podem contribuir para a aquisição de fenótipo tumoral mais agressivo.

A instabilidade genômica é um processo muito importante durante o processo oncogênico e descrita como um evento promotor da transformação maligna ao favorecer a aquisição de mutações que conferem ao tumor vantagens seletivas para que ocorra a progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A instabilidade genômica já foi observada durante a reprogramação de células somáticas ao estado pluripotente (PASI et al., 2011). A aquisição de aberrações cromossômicas em iPSCs pode ocorrer por diversos mecanismos como: ocorrência de mutações pré-existentes na célula de origem, alterações durante a expansão e adaptação das células em condições de cultivo *in vitro* ou pela integração dos fatores de reprogramação em *frames* de leitura de genes importantes para o processo tumorigênico. No entanto, Taapken e colaboradores (2011) demonstraram que o uso de métodos não-integrativos não apresentou diferença quanto a aquisição de aberrações cromossômicas durante a indução de pluripotência em células somáticas (TAAPKEN et al., 2011), além de já ter sido observado que aproximadamente 60% das alterações cromossômicas presentes em iPSCs independem da fonte ou origem celular (MAYSHAR et al., 2010; RONEN; BENVENISTY, 2012), indicando que o processo de reprogramação pode favorecer a instabilidade genômica. Em células de meduloblastoma, níveis elevados de OCT4A contribuíram para a aquisição de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos, porém, a quantidade e o tipo de aberração variaram entre as linhagens celulares e, aparentemente, em um perfil nível-dependente, visto que a linhagem celular que apresentou os maiores níveis de superexpressão de OCT4A (Daoy) foi a linhagem celular com maior aquisição de mutações detectadas, seguida pela linhagem celular USP-13-Med (níveis intermediários de superexpressão de OCT4A) enquanto que nenhuma aberração foi adquirida por células de D283Med após superexpressão de OCT4A, sendo esta a linhagem celular cujos níveis de OCT4A foram os menores observados dentre as linhagens celulares utilizadas no presente trabalho.

Dentre os segmentos cromossômicos que foram encontrados alterados nas linhagens de meduloblastoma, apenas duas regiões foram

comuns: 1p32.3 e 9p23.1. De forma interessante, já foram descritos ganhos e perdas nos cromossomos 1 e 9 em células-tronco pluripotentes (embrionárias e iPSCs) (MAYSHAR et al., 2010). Entretanto, a análise comparativa de ganhos e perdas cromossômicas e expressão gênica indicou que a expressão aberrante de genes após superexpressão de OCT4A tem pouca ou nenhuma influência decorrente da instabilidade cromossômica. Tal resultado sugere que a agressividade adquirida por células de meduloblastoma com altos níveis de OCT4A deve-se a mecanismos distintos aos ganhos e perdas de segmentos cromossômicos, mas que afetam a expressão de genes importantes para a formação e progressão tumoral.

A análise de expressão gênica global identificou a alteração predominantemente de ncRNAs após a superexpressão de OCT4A em linhagens celulares de meduloblastoma, como lncRNAs e snoRNAs. De forma interessante, Cawley e colaboradores (2004) demonstraram que 36% das regiões cromossômicas com *binding sites* para fatores de transcrição estavam significativamente correlacionadas com a transcrição de ncRNAs, valor superior aos 22% que favoreciam a transcrição de genes codificadores de proteínas. A análise foi feita para três fatores de transcrição, SP1, CMYC e P53, e indica que os ncRNAs são regulados por estímulos comuns aos RNAs codificadores de proteínas devido a ação dos fatores de transcrição, e devem desempenhar funções biológicas como processos transcricionais e remodelamento da cromatina (CAWLEY et al., 2004).

Até recentemente, pouco se sabia a respeito das funções dos ncRNAs, e estes eram considerados como *junk-RNAs* (HÜTTENHOFER; SCHATNER; POLACEK, 2005). No entanto, hoje sabe-se que ncRNAs desempenham papéis importantes no controle da expressão gênica de células normais, em processos envolvidos no desenvolvimento e homeostase do organismo, bem como possuem relevância clínica em diversas doenças, incluindo o câncer (LIZ; ESTELLER, 2015). Os ncRNAs com expressão aberrante após a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma, em sua maioria, foram recentemente catalogados e ainda pouco se sabe sobre suas funções biológicas, entretanto, alguns já foram correlacionados com a promoção e progressão tumoral. Um deles, o vaultRNA denominado VTRNA2-1 (também

conhecido como nc886) foi descrito como gene supressor tumoral em câncer gástrico (LEE et al., 2014b) e esofágico (LEE et al., 2014a), porém, em câncer cervical, VTRNA2-1 regula a expressão de P53 e está correlacionado com maior invasão e proliferação celular, além do aumento da tumorigênese (KONG et al., 2015).

Dentre as classes enriquecidas após a superexpressão de OCT4A em meduloblastoma, os lncRNAs também desempenham papel importante na regulação da expressão gênica, por meio de interações com macromoléculas como cromatina, proteínas e RNAs, favorecendo ou inibindo a transcrição gênica e promovendo a formação de complexos proteicos ou inibindo interações proteína-proteína (SCHMITT et al., 2016). Os lncRNAs possuem funções importantes no desenvolvimento do organismo (BERGMANN et al., 2015; FATICA; BOZZONI, 2013) e muitos trabalhos têm avaliado as funções de diversos lncRNAs no desenvolvimento do SNC (NG et al., 2013; RAMOS; ATTENELLO; LIM, 2016). O consórcio GENCODE identificou que os lncRNAs, apesar de expressos em níveis inferiores a mRNAs, apresentam perfil de expressão tecido-específico, sendo que 40% dos lncRNAs diferencialmente expressos são observados especificamente no SNC (DERRIEN et al., 2012). Devido a sua grande importância no SNC, era de se esperar que a alteração da expressão de lncRNAs contribui para o desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas e tumores do SNC. Em gliomas, a expressão aberrante de lncRNAs como MALAT1, H19 e HOTAIR está correlacionada com pior prognóstico e maior agressividade tumoral, além da regulação de fatores importantes para manutenção de fenótipo de CTT, como CD133, NANOG, SOX2, NESTINA e OCT4 (BALCI et al., 2016; HAN et al., 2016; JIANG et al., 2016; LI et al., 2016). Em diversos tipos de câncer, foram demonstrados que lncRNAs afetam a proliferação, motilidade, viabilidade, imortalidade e favorecem a angiogênese, indicando a importância dessa classe de ncRNAs para a promoção/progressão tumoral (SCHMITT et al., 2016) e correlação com propriedades de CTT (GUI et al., 2015).

Um dos lncRNAs mais bem descritos na literatura e que foi encontrado hipoexpresso no presente trabalho é o *MEG3* (do inglês *Maternally Expressed 3*). A expressão de *MEG3* foi também observada hipoexpressa em

tumores de mama, próstata e colorretal, e a diminuição dos níveis de *MEG3* contribuiu para a aquisição de fenótipo mais agressivo *in vitro*, com influências na proliferação celular, capacidade de geração de colônias e diminuição da morte celular (LIU et al., 2016; LUO et al., 2015; SUN; LI; YANG, 2016). Em tumores do SNC, a expressão de *MEG3* também encontrava-se diminuída em linhagens de gliomas (BALCI et al., 2016; KIANG; ZHANG; LEUNG, 2015) e amostras clínicas de meningioma (BALIK et al., 2013), gliomas (WANG; REN; SUN, 2012) e adenomas hipofisários (MEZZOMO et al., 2012). Uma análise funcional demonstrou que a superexpressão de *MEG3* afetou a proliferação e indução de morte celular em linhagens de glioma *in vitro* via interação com P53 (WANG; REN; SUN, 2012).

Outro lncRNA com expressão alterada em amostra de meduloblastoma com níveis elevados de OCT4A foi *ZFAS1* (do inglês *Zinc Finger Antisense 1*). Askarian-Amiri e colaboradores (2011) demonstraram que a expressão de *ZFAS1* estava correlacionada com o desenvolvimento mamário e a diminuição dos níveis por silenciamento do lncRNA afetou a proliferação celular e capacidade de auto-renovação em ensaio clonogênico de linhagem celular de epitélio mamário HC11. No contexto tumoral, os autores identificaram que os níveis de *Zfas1* em amostras de tumor de mama encontravam-se hipoexpressos em relação ao tecido normal adjacente, sugerindo que *ZFAS1* age como supressor tumoral (ASKARIAN-AMIRI et al., 2011). No entanto, trabalhos mais recentes em câncer colorretal (THORENOOR et al., 2016; WANG; XING, 2016), gástrico (NIE et al., 2016) e carcinoma hepatocelular (LI et al., 2015b) demonstraram que o aumento de expressão de *ZFAS1* em amostras clínicas está correlacionado com menor sobrevida e perfil metastático desses tumores, além de terem sido observados em ensaios funcionais os efeitos oncogênicos de *ZFAS1* na proliferação, migração e invasão celular, bem como tumorigênese e metástase *in vivo*.

Um dos resultados mais intrigantes observado no presente trabalho foi o enriquecimento de *snoRNAs*, uma classe de ncRNAs cuja principal função descrita é a biogênese e modificação de rRNAs (ESTELLER, 2011). Novas funções para *snoRNAs* foram observadas, como remodelamento da cromatina, ação em *splicing*, regulação da transcrição e tradução, além de serem

processados e darem origem a *snoRNA-derived RNAs (sdRNAs)*, pequenos ncRNAs que desempenham funções semelhantes a miRNAs (BRATKOVIČ; ROGELJ, 2014; MARTENS-UZUNOVA; OLVEDY; JENSTER, 2013). A expressão aberrante de snoRNAs já foi observada em diversas patologias, como doenças cardiovasculares, neurológicas e do desenvolvimento, bem como está envolvida no processo tumorigênico (ESTELLER, 2011; MCMAHON; CONTRERAS; RUGGERO, 2015). No presente trabalho, 25% dos genes diferencialmente expressos em células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A eram snoRNAs, sendo que do universo de ncRNAs, 36% correspondem a snoRNAs. Em trabalho recente, Martens-Uznova e colaboradores (2015) indicaram que aproximadamente um terço dos sncRNAs encontrados diferencialmente expressos em câncer de próstata são snoRNAs ou produtos de seu processamento (sdRNAs) e que o acúmulo na expressão de C/D-sdRNAs está correlacionado com a transformação maligna deste tipo tumoral (MARTENS-UZUNOVA et al., 2015).

Ensaio funcionais evidenciaram o potencial pró e anti-tumorigênico de snoRNAs em diversos tipos de neoplasias como snoRNA U3 e snoRNA U8 em câncer de mama (LANGHENDRIES et al., 2016), SNORA55 em câncer de próstata (CREA et al., 2016), SNORD50A/B em melanoma (SIPRASHVILI et al., 2016) e SNORD113-1 em carcinoma hepatocelular (XU et al., 2014). Em glioblastoma, a diminuição da expressão de SNORD76, um snoRNA constantemente correlacionado com agressividade de diversos tumores, foi capaz de agir como supressor tumoral ao inibir a proliferação celular, clonogenicidade e tumorigênese *in vivo* (CHEN et al., 2015).

Dos snoRNAs diferencialmente expressos após a superexpressão de OCT4A, apenas uma pequena fração já foi correlacionada com prognóstico de pacientes diagnosticados com outros tipos de neoplasias. O nível elevado de *SNORDC14* já foi descrito como marcador de pior prognóstico em carcinoma de células escamosas da laringe (MIRISOLA et al., 2011), enquanto que baixos níveis de *SNORDC59A*, *SNORD42*, *SNORA6*, *SNORA18* e *SNORA62* foram observados em amostras de próstata (CREA et al., 2016; HO et al., 2015). Além disso, alguns snoRNAs favorecem propriedades de CTT, principalmente na capacidade de auto-renovação e oncogenicidade de células

iniciadoras de tumor em câncer de pulmão (MANNOOR et al., 2014). De forma interessante, três dos 36 snoRNAs diferencialmente expressos no presente trabalho (SNORA18, SNORA62 e snoRD96A) foram previamente correlacionados como componentes de assinatura molecular de células iniciadoras de tumor em câncer de pulmão (MANNOOR et al., 2014).

Dentre os RNAs codificadores de proteína, foram observados níveis elevados de NUCLEOSTEMINA (também conhecida como NS ou GNL3) após a superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma. Coincidentemente, a NUCLEOSTEMINA é uma proteína de localização nucleolar e que já foi descrita com funções na auto-renovação de CTE (NOMURA et al., 2009; QU; BISHOP, 2012) e células neuroprogenitoras (MENG et al., 2013; NOMURA et al., 2009). A superexpressão de *GNL3* em células somáticas foi capaz de induzir o processo de reprogramação para células iPSCs (QU; BISHOP, 2012) e, no câncer, a NUCLEOSTEMINA já foi correlacionada com grau elevado de gliomas (MENG et al., 2013), aumento na capacidade de geração de tumores (LIN et al., 2010; OKAMOTO et al., 2011; TAMASE et al., 2009), bem como já foram relatadas alterações na proliferação celular, invasão e metástase após a manipulação da expressão de NUCLEOSTEMINA (BAO et al., 2015; LIN et al., 2010; OKAMOTO et al., 2011; WU et al., 2015b; YOSHIDA et al., 2011).

Para a avaliação da contribuição de NUCLEOSTEMINA na gênese do tumor de mama e sua correlação com o modelo de CTT, Lin e colaboradores (2010) utilizaram camundongos transgênicos com predisposição ao desenvolvimento de tumor de mama e condicionaram a expressão de GFP à região promotora de *GNL3*. Os autores verificaram que as células iniciadoras do tumor expressavam altos níveis de GFP e que a expressão de NUCLEOSTEMINA aumentava conforme a progressão tumoral. Além disso, a expressão elevada de NUCLEOSTEMINA estava correlacionada com a expressão de marcadores típicos de CTT, como CD133 e OCT4, e marcadores de progressão tumoral e metástase, como MMP2, MMP9 e CXCL12 (LIN et al., 2010). Ensaio semelhante foi conduzido por Tamase e colaboradores (2009) em tumor do SNC. Em um cérebro normal, as células com expressão aumentada de NUCLEOSTEMINA também apresentavam altos níveis de NESTINA, e baixos

níveis de TUJ1, indicando o fenótipo neuroprogenitor dessas células. A inoculação ortotópica de células NS^{Hi} por meio de cirurgia estereotáxica demonstrou que células com altos níveis de NUCLEOSTEMINA apresentavam maior eficiência na formação de tumor *in vivo* e maior agressividade tumoral, visto que os camundongos sucumbiram precocemente devido as complicações provocadas pelo desenvolvimento tumoral. Além disso, foi observada co-marcação de NUCLEOSTEMINA e marcadores moleculares de invasão tumoral em cortes histológicos quando comparados à amostras de camundongos submetidos a inoculação de células NS^{low} (TAMASE et al., 2009).

No presente trabalho, também foram observadas alterações na expressão de outros mRNAs envolvidos com o processamento de rRNA e com o processo oncogênico. É o caso de *RPSA* (SONG et al., 2012), *RPL4* (HE et al., 2016), *DKC1* (LIU et al., 2012) e *DDX21* (ZHANG et al., 2014). De forma interessante, alterações na expressão de proteínas ribossomais já foram sugeridas como assinatura molecular em câncer de pulmão (SBARRATO et al., 2016) e a diminuição dos níveis de *NUCLEOSTEMINA* já foi associada a manutenção da estrutura nucleolar e estabilidade cromossomal em associação com *DKC1* e *TERT* (ROMANOVA et al., 2009). Outro fato intrigante são as colaborações de proteínas nucleolares na manutenção do perfil pluripotente de CTE e funções no desenvolvimento do SNC. A proteína *DKC1* já foi descrita como membro de um complexo entre *OCT4* e *SOX2*, favorecendo a expressão de snoRNAs (FONG et al., 2014). Além disso, a expressão de proteínas ribossomais já foi descrita como componente importante no neurodesenvolvimento murino, sendo que a desregulação da expressão de riboproteínas estava associada ao desenvolvimento de patologias do SNC, como déficit cognitivo e microcefalia (SLOMNICKI et al., 2016).

Resumidamente, os resultados aqui apresentados indicam que a superexpressão de *OCT4A* favoreceu a aquisição de fenótipo mais agressivo por células de meduloblastoma, evidenciados por ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo*. Alterações na expressão de reguladores pós-transcricionais aparentam ser um importante mecanismo associado ao ganho de agressividade tumoral, com destaque à expressão aberrante de ncRNAs, como lncRNAs, miRNAs e

snoRNAs, além de genes codificadores de proteínas associadas a complexos ribonucleoproteicos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente trabalho nos possibilitou concluir que:

1. A superexpressão estável de OCT4A foi capaz de alterar significativamente propriedades tumorigênicas *in vitro* de células de meduloblastoma humano, tendo sido observado aumento da proliferação celular, aumento da capacidade de crescimento independente de ancoragem, aumento na capacidade de geração de esferas tumorais, diminuição na adesão celular, aumento na capacidade de invasão 3D em matriz de hidrogel e alterações de resistência a apoptose induzida por cisplatina;
2. A superexpressão de OCT4A também foi capaz de alterar propriedades tumorigênicas de células de meduloblastoma humano *in vivo*, conforme evidenciado pela alteração da cinética de desenvolvimento de tumores subcutâneos, geração de tumores com características anatomopatológicas de maior agressividade, e aumento da capacidade metastática no neuroeixo, em camundongos BALB/c *Nude*;
3. Em células de meduloblastoma da linhagem DAOY, os efeitos positivos sobre a capacidade de crescimento independente de ancoragem, formação de esferas tumorais e tumorigênese *in vivo* foram proporcionalmente maiores conforme o aumento do nível de superexpressão de OCT4A;
4. A superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano não alterou consistentemente a expressão dos genes *SOX2* e *LIN28A*, codificadores de fatores de pluripotência, e a capacidade de crescimento em condições de cultivo de CTE.

5. Aberrações adicionais no número de cópias cromossômicas foram observadas em algumas células de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A. No entanto, o padrão de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos variou conforme a linhagem celular e não houve correlação consistente com as respectivas alterações de expressão gênica global observadas após a superexpressão de OCT4A;
6. A superexpressão de OCT4A em células de meduloblastoma humano das linhagens Daoy, D283Med e USP-13-Med foi capaz de alterar, em comum, a expressão de um grupo de 141 genes envolvidos com propriedades importantes para a iniciação e progressão tumoral como crescimento celular e proliferação, movimento celular, metabolismo de drogas e morte celular. A maioria desses genes diferencialmente expressos não codifica proteínas, sendo principalmente representada por genes codificadores de *long-non coding RNAs* e *small nucleolar RNAs*.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABTA. **About Brain Tumors: a Primer for Patients and Caregivers**. [s.l: s.n.].
- AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 1 abr. 2003.
- ASADI, M. H. et al. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 128, n. 11, p. 2645–52, 1 jun. 2011.
- ASADZADEH, J. et al. A plausible anti-apoptotic role of up-regulated OCT4B1 in bladder tumors. **Urology journal**, v. 9, n. 3, p. 574–80, jan. 2012.
- ASKARIAN-AMIRI, M. E. et al. SNORD-host RNA Zfas1 is a regulator of mammary development and a potential marker for breast cancer. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 5, p. 878–91, maio 2011.
- ATCC. **ATCC® Animal Cell Culture Guide**. Disponível em: <http://www.atcc.org/guides/animal_cell_culture_guide.aspx>. Acesso em: 16 jul. 2014.
- ATLASI, Y. et al. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 12, p. 3068–74, dez. 2008.
- BAILEY, P.; CUSHING, H. Medulloblastoma Cerebelli: A Common Type of Midcerebellar Glioma of Childhood. **Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 192, 1 ago. 1925.
- BALCI, T. et al. Analysis of dysregulated long non-coding RNA expressions in glioblastoma cells. **Gene**, v. 590, n. 1, p. 120–122, 2016.
- BALIK, V. et al. MEG3: a novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 112, n. 1, p. 1–8, mar. 2013.
- BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 7 dez. 2006.
- BAO, Z. et al. Nucleostemin promotes the proliferation of human glioma via Wnt/ β -Catenin pathway. **Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, 26 nov. 2015.
- BECKER, K. A. et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. **Journal of cellular physiology**, v. 209, n. 3, p. 883–93, dez. 2006.
- BELTRAN, A. S. et al. Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription factor. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 5, p. R94, jan. 2011.
- BEN-DAVID, U. Genomic instability, driver genes and cell selection: Projections from cancer to stem cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1849, n. 4, p. 427–35, abr. 2015.

- BEN-PORATH, I. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nature genetics**, v. 40, n. 5, p. 499–507, maio 2008.
- BERGMANN, J. H. et al. Regulation of the ESC transcriptome by nuclear long non-coding RNAs. **Genome research**, v. 25, n. 9, p. 1336–46, 5 jun. 2015.
- BERMAN, D. M. et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5586, p. 1559–61, 30 ago. 2002.
- BIGNER, S. H.; VOGELSTEIN, B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 1, n. 1, p. 12–8, set. 1990.
- BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, jul. 1997.
- BORA-SINGHAL, N. et al. Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 7, p. 538–51, jul. 2015.
- BOROWSKA, A.; JÓŹWIĄK, J. Medulloblastoma: molecular pathways and histopathological classification. **Archives of medical science : AMS**, v. 12, n. 3, p. 659–66, 1 jun. 2016.
- BRATKOVIČ, T.; ROGELJ, B. The many faces of small nucleolar RNAs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 6, p. 438–443, 2014.
- BURRELL, R. A. et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338–345, 18 set. 2013.
- CAIRNS, J. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, n. 5505, p. 197–200, 15 maio 1975.
- CAO, L. et al. OCT4 increases BIRC5 and CCND1 expression and promotes cancer progression in hepatocellular carcinoma. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 82, jan. 2013.
- CAWLEY, S. et al. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 499–509, 20 fev. 2004.
- CHAFFER, C. L. et al. Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. **Cell**, v. 154, n. 1, p. 61–74, jul. 2013.
- CHEN, L. et al. SNORD76, a box C/D snoRNA, acts as a tumor suppressor in glioblastoma. **Scientific reports**, v. 5, p. 8588, 2015.
- CHENG, T. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7256–66, 20 set. 2004.
- CORTES-DERICKS, L. et al. Suppression of OCT4B enhances sensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells to cisplatin via increased apoptosis. **Anticancer research**, v. 33, n. 12, p. 5365–73, dez. 2013.

- CREA, F. et al. Integrated analysis of the prostate cancer small-nucleolar transcriptome reveals SNORA55 as a driver of prostate cancer progression. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 5, p. 693–703, 2016.
- DAI, X. et al. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. **Oncology reports**, v. 29, n. 1, p. 155–60, jan. 2013.
- DE RESENDE, M. F. et al. Prognostication of OCT4 isoform expression in prostate cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 2665–73, out. 2013.
- DERRIEN, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1775–1789, 1 set. 2012.
- DI MAYORCA, G. et al. Malignant transformation of BHK21 clone 13 cells in vitro by nitrosamines--a conditional state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 1, p. 46–9, jan. 1973.
- DRIESSENS, G. et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 527–30, 23 ago. 2012.
- DU, Z. et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. **Glia**, v. 57, n. 7, p. 724–33, maio 2009.
- EBERHART, C. G.; BURGER, P. C. Anaplasia and grading in medulloblastomas. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 13, n. 3, p. 376–85, jul. 2003.
- ELLISON, D. W. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 3, p. 305–16, set. 2010.
- ELSIR, T. et al. A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: Identification of Nanog as a predictor of survival. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 5, p. 1123–1131, 1 mar. 2014.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, 18 nov. 2011.
- EUHUS, D. M. et al. Tumor measurement in the nude mouse. **Journal of Surgical Oncology**, v. 31, n. 4, p. 229–234, abr. 1986.
- EVANS, D. G. et al. The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. **British journal of cancer**, v. 64, n. 5, p. 959–61, nov. 1991.
- FARASHAH YAZD, E. et al. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. **Cancer letters**, v. 309, n. 2, p. 170–5, 28 out. 2011.
- FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 1, p. 7–21, 3 dez. 2013.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 1 mar. 2015.

FINK, A. J. et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 11, p. 3066–76, 15 mar. 2006.

FONG, Y. W. et al. The dyskerin ribonucleoprotein complex as an OCT4/SOX2 coactivator in embryonic stem cells. **eLife**, v. 3, 2014.

FOULADI, M. et al. Intellectual and functional outcome of children 3 years old or younger who have CNS malignancies. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7152–60, 1 out. 2005.

GAJJAR, A. et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. **The lancet oncology**, v. 7, n. 10, p. 813–20, out. 2006.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–83, 12 abr. 2012.

GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1257, jan. 2014.

GAO, Y. et al. The novel function of OCT4B isoform-265 in genotoxic stress. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 30, n. 4, p. 665–72, abr. 2012.

GIANGASPERO, F. et al. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. **Acta neuropathologica**, v. 112, n. 1, p. 5–12, jul. 2006.

GIBSON, P. et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. **Nature**, v. 468, n. 7327, p. 1095–9, 23 dez. 2010.

GILBERTSON, R. J.; ELLISON, D. W. The origins of medulloblastoma subtypes. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 341–65, jan. 2008.

GOTTARDO, N. G. et al. Medulloblastoma Down Under 2013: a report from the third annual meeting of the International Medulloblastoma Working Group. **Acta neuropathologica**, v. 127, n. 2, p. 189–201, fev. 2014.

GROVER, J. et al. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21942–9, 15 set. 1995.

GUI, X. et al. Long Noncoding RNA CUDR Regulates HULC and β -Catenin to Govern Human Liver Stem Cell Malignant Differentiation. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 23, n. 12, p. 1843–53, dez. 2015.

GUO, Y. et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. **Histopathology**, v. 59, n. 4, p. 763–75, out. 2011.

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.

HAN, Y. et al. Downregulation of lncRNA-MALAT1 Affects Proliferation and the Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cell Line SHG139S. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 36, n. 7, p. 1097–107, out. 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HAZELTINE, L. B.; SELEKMAN, J. A.; PALECEK, S. P. Engineering the human pluripotent stem cell microenvironment to direct cell fate. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 7, p. 1002–19, 15 nov. 2013.

HE, X. et al. Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16217–16226, 2016.

HO, S.-M. et al. Exposure of Human Prostatespheres to Bisphenol A Epigenetically Regulates SNORD Family Noncoding RNAs via Histone Modification. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 3984–95, 6 nov. 2015.

HØFFDING, M. K.; HYTTEL, P. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 39–53, jan. 2015.

HOLMBERG, J. et al. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e18454, jan. 2011.

HOPPE-HIRSCH, E. et al. Intellectual outcome in children with malignant tumors of the posterior fossa: influence of the field of irradiation and quality of surgery. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 11, n. 6, p. 340-5-6, jun. 1995.

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.

HUANG, P. et al. Role of Sox2 and Oct4 in predicting survival of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. **Clinical biochemistry**, v. 44, n. 8–9, p. 582–9, jun. 2011.

HUETHER, R. et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. **Nature communications**, v. 5, p. 3630, jan. 2014.

HÜTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. Non-coding RNAs: hope or hype? **Trends in genetics : TIG**, v. 21, n. 5, p. 289–97, maio 2005.

IKUSHIMA, H. et al. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41434–41, 2 dez. 2011.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016**. [s.l.: s.n.].

IOZZO, R. V. The Family of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: Key Regulators of Matrix Assembly and Cellular Growth. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 141–174, 26 jan. 1997.

JERABEK, S. et al. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1839, n. 3, p. 138–54, mar. 2014.

JIANG, X. et al. Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. **Journal of Neurosurgery**, v. 124, n. 1, p. 129–136, jan. 2016.

- JOLLY, M. K. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 20 jul. 2015.
- JONES, D. T. W. et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 100–5, 2 ago. 2012.
- KANEKO, Y. et al. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. **Cancer science**, v. 106, n. 7, p. 840–7, jul. 2015.
- KAWAUCHI, D. et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 168–80, 14 fev. 2012.
- KIANG, K.; ZHANG, X.-Q.; LEUNG, G. Long Non-Coding RNAs: The Key Players in Glioma Pathogenesis. **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1406–1424, 29 jul. 2015.
- KILTIE, A. E.; LASHFORD, L. S.; GATTAMANENI, H. R. Survival and late effects in medulloblastoma patients treated with craniospinal irradiation under three years old. **Medical and pediatric oncology**, v. 28, n. 5, p. 348–54, maio 1997.
- KIM, J. B. et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. **Nature**, v. 461, n. 7264, p. 649–3, 1 out. 2009.
- KIMURA, H. et al. Gli1 is important for medulloblastoma formation in Ptc1+/- mice. **Oncogene**, v. 24, n. 25, p. 4026–36, 9 jul. 2005.
- KONG, L. et al. **Regulation of p53 expression and apoptosis by vault RNA2-1-5p in cervical cancer cells** *Oncotarget* Impact Journals, , 22 jul. 2015.
- KOOL, M. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 473–84, abr. 2012.
- KOOL, M. et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 393–405, 17 mar. 2014.
- KOSAKA, T. et al. Identification of drug candidate against prostate cancer from the aspect of somatic cell reprogramming. **Cancer science**, v. 104, n. 8, p. 1017–26, ago. 2013.
- KUMAR, S. M. et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. **Oncogene**, v. 31, n. 47, p. 4898–911, 22 nov. 2012.
- LAMONT, J. M. et al. Combined histopathological and molecular cytogenetic stratification of medulloblastoma patients. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5482–93, 15 ago. 2004.
- LANGHENDRIES, J.-L. et al. The human box C/D snoRNAs U3 and U8 are required for pre-rRNA processing and tumorigenesis. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, 2016.
- LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645–8, 17 fev. 1994.
- LATHIA, J. D. et al. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes & development**, v. 29, n. 12, p. 1203–17, 15 jun. 2015.

LEE, A. et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 723–9, jun. 2005.

LEE, H.-S. et al. **Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis** *Oncotarget Impact Journals*, , 28 abr. 2014a.

LEE, J. et al. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33554–65, 3 nov. 2006.

LEE, K.-S. et al. **nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer** *Oncotarget Impact Journals*, , 1 jun. 2014b.

LEHTIÖ, L.; CHI, N.-W.; KRAUSS, S. Tankyrases as drug targets. **FEBS Journal**, v. 280, n. 15, p. 3576–3593, ago. 2013.

LENARDO, M. J. et al. Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 243, n. 4890, p. 544–6, 27 jan. 1989.

LETO, K. et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. **Cerebellum (London, England)**, 6 out. 2015.

LI, L.; BHATIA, R. Stem cell quiescence. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 15, p. 4936–41, 1 ago. 2011.

LI, S.-W. et al. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0118033, jan. 2015a.

LI, T. et al. Amplification of Long Noncoding RNA ZFAS1 Promotes Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. **Cancer research**, v. 75, n. 15, p. 3181–91, 1 ago. 2015b.

LI, V. C.; BALLABENI, A.; KIRSCHNER, M. W. Gap 1 phase length and mouse embryonic stem cell self-renewal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12550–5, 31 jul. 2012.

LI, W. et al. Suppressing H19 Modulates Tumorigenicity and Stemness in U251 and U87MG Glioma Cells. **Cellular and molecular neurobiology**, 16 mar. 2016.

LI, Z. et al. Transcription factor OCT4 promotes cell cycle progression by regulating CCND1 expression in esophageal carcinoma. **Cancer letters**, v. 354, n. 1, p. 77–86, 1 nov. 2014.

LIN, T. et al. Tumor-initiating function of nucleostemin-enriched mammary tumor cells. **Cancer research**, v. 70, n. 22, p. 9444–52, 15 nov. 2010.

LIU, B. et al. Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43147, 2012.

LIU, B. et al. Expression and mechanisms of long non-coding RNA genes MEG3 and ANRIL in gallbladder cancer. **Tumor Biology**, p. 1–12, 26 jan. 2016.

LIU, X. et al. Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive

requirement for individual factors and a sequential EMT–MET mechanism for optimal reprogramming. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 829–838, 26 maio 2013.

LIZ, J.; ESTELLER, M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. **Biochimica et biophysica acta**, 4 jul. 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.

LU, H. et al. Silencing tankyrase and telomerase promotes A549 human lung adenocarcinoma cell apoptosis and inhibits proliferation. **Oncology reports**, v. 30, n. 4, p. 1745–52, out. 2013.

LUO, G. et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 2209–2220, 27 nov. 2015.

MACDONALD, T. J. Hedgehog Pathway in Pediatric Cancers: They're Not Just for Brain Tumors Anymore. **American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting**, p. 605–9, jan. 2012.

MAJUMDER, M. et al. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, 14 jun. 2016.

MALANCHI, I. et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 650–3, 3 abr. 2008.

MANI, S. A. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, maio 2008.

MANNOOR, K. et al. Small nucleolar RNA signatures of lung tumor-initiating cells. **Molecular cancer**, v. 13, p. 104, jan. 2014.

MANORANJAN, B. et al. Medulloblastoma stem cells: Modeling tumor heterogeneity. **Cancer Letters**, v. 338, n. 1, p. 23–31, 2013.

MARINO, S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 1, p. 17–22, jan. 2005.

MARTENS-UZUNOVA, E. S. et al. C/D-box snoRNA-derived RNA production is associated with malignant transformation and metastatic progression in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17430–44, 10 jul. 2015.

MARTENS-UZUNOVA, E. S.; OLVEDY, M.; JENSTER, G. Beyond microRNA – Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. **Cancer Letters**, v. 340, n. 2, p. 201–211, 2013.

MASCARO CORDEIRO, B. 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.

MASSIMINO, M. et al. Histological variants of medulloblastoma are the most powerful clinical prognostic indicators. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, n. 2, p. 210–216, fev. 2013.

MAURER, A. J. et al. Tumor necrosis-initiated complement activation stimulates proliferation of medulloblastoma cells. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 64, n. 3–4, p. 185–92, abr. 2015.

MAYSHAR, Y. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 7, n. 4, p. 521–31, 8 out. 2010.

MCCMAHON, M.; CONTRERAS, A.; RUGGERO, D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 6, n. 2, p. 173–189, mar. 2015.

MENG, L. et al. Nucleostemin deletion reveals an essential mechanism that maintains the genomic stability of stem and progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11415–20, 9 jul. 2013.

MEZZOMO, L. C. et al. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45γ is lost in most sporadic human pituitary adenomas. **Pituitary**, v. 15, n. 3, p. 420–7, set. 2012.

MILLER, C. P. et al. Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 514261, jan. 2011.

MIRISOLA, V. et al. A prognostic multigene classifier for squamous cell carcinomas of the larynx. **Cancer letters**, v. 307, n. 1, p. 37–46, 1 ago. 2011.

MIRZAEI, M. R. et al. Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 11 jul. 2014.

MONAJEMZADEH, M. et al. Expression and prognostic significance of Oct4 and Nanog in neuroblastoma. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 122, n. 9, p. 734–41, set. 2014.

MORATA-TARIFA, C. et al. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 18772, jan. 2016.

MORI, T. et al. Germ-line and somatic mutations of the APC gene in patients with Turcot syndrome and analysis of APC mutations in brain tumors. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 9, n. 3, p. 168–72, mar. 1994.

MOYER, M. P.; AUST, J. B. Human colon cells: culture and in vitro transformation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4656, p. 1445–7, 29 jun. 1984.

NAKANO, I. Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. **Journal of neurosurgery**, v. 122, n. 2, p. 324–30, 14 fev. 2015.

NG, S.-Y. et al. Long noncoding RNAs in development and disease of the central nervous system. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 8, p. 461–468, 2013.

NICHOLS, J. et al. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379–391, 1998.

NIE, F. et al. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer cells proliferation by epigenetically repressing KLF2 and NKD2 expression. **Oncotarget**, 26 maio 2016.

NIKITOVIC, D. et al. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. **FEBS Journal**, v. 275, n. 2, p. 350–361, jan. 2008.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature genetics**, v. 24, n. 4, p. 372–6, abr. 2000.

NOMURA, J. et al. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 5, p. 1066–76, maio 2009.

NORI, S. et al. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. **Stem cell reports**, v. 4, n. 3, p. 360–73, 10 mar. 2015.

NORTHCOTT, P. A. et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 1408–14, 10 maio 2011.

NORTHCOTT, P. A. et al. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 6, p. 340–51, jun. 2012a.

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

NOWELL, P. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23–28, 1 out. 1976.

OKAMOTO, N. et al. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 51, p. 20388–93, 20 dez. 2011.

ONG, C. W. et al. The prognostic value of the stem-like group in colorectal cancer using a panel of immunohistochemistry markers. **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 12763–73, 20 maio 2015.

OSTROM, Q. T. et al. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-oncology**, v. 16 Suppl 1, n. suppl_10, p. x1–x36, 1 jan. 2015a.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-oncology**, v. 17 Suppl 4, p. iv1-iv62, out. 2015b.

PACKER, R. J. et al. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 25, p. 4202–8, 1 set. 2006.

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.

PARDO, M. et al. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease. **Cell stem cell**, v. 6, n. 4, p. 382–95, 2 abr. 2010.

PASI, C. E. et al. Genomic instability in induced stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 5, p. 745–753, 11 fev. 2011.

PEI, Y. et al. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 155–67, 14 fev. 2012.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Molecular reproduction and development**, v. 55, n. 4, p. 452–7, abr. 2000.

PICARD, D. et al. Markers of survival and metastatic potential in childhood CNS primitive neuro-ectodermal brain tumours: an integrative genomic analysis. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 838–48, ago. 2012.

PIERCE, G. B.; WALLACE, C. Differentiation of malignant to benign cells. **Cancer research**, v. 31, n. 2, p. 127–34, fev. 1971.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265–73, abr. 2009.

PUGH, T. J. et al. Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 106–10, 2 ago. 2012.

QU, J.; BISHOP, J. M. Nucleostemin maintains self-renewal of embryonic stem cells and promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. **The Journal of cell biology**, v. 197, n. 6, p. 731–45, 11 jun. 2012.

RAMASWAMY, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta neuropathologica**, 4 abr. 2016a.

RAMASWAMY, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 821–31, jun. 2016b.

RAMOS, A. D.; ATTENELLO, F. J.; LIM, D. A. Uncovering the roles of long noncoding RNAs in neural development and glioma progression. **Neuroscience Letters**, v. 625, p. 70–79, 2016.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–11, 1 nov. 2001.

RIJLAARSDAM, M. A. et al. Specific detection of OCT3/4 isoform A/B/B1 expression in solid (germ cell) tumours and cell lines: confirmation of OCT3/4 specificity for germ cell tumours. **British journal of cancer**, v. 105, n. 6, p. 854–63, 6 set. 2011.

RIZZINO, A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 6, p. 1033–9, jun. 2013.

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. 71–9, jan. 2012.
- ROMANOVA, L. et al. Novel role of nucleostemin in the maintenance of nucleolar architecture and integrity of small nucleolar ribonucleoproteins and the telomerase complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26685–94, 25 set. 2009.
- ROMER, J. T. et al. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. **Cancer cell**, v. 6, n. 3, p. 229–40, set. 2004.
- RONEN, D.; BENVENISTY, N. Genomic stability in reprogramming. **Current opinion in genetics & development**, v. 22, n. 5, p. 444–9, out. 2012.
- ROUSSEL, M. F.; HATTEN, M. E. Cerebellum development and medulloblastoma. **Current topics in developmental biology**, v. 94, p. 235–82, jan. 2011.
- RUTKA, J. T.; HOFFMAN, H. J. Medulloblastoma: A historical perspective and overview. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 29, p. 1–7, 1996.
- SASAI, K. et al. Medulloblastomas derived from Cxcr6 mutant mice respond to treatment with a smoothed inhibitor. **Cancer research**, v. 67, n. 8, p. 3871–7, 15 abr. 2007.
- SBARRATO, T. et al. A ribosome-related signature in peripheral blood CLL B cells is linked to reduced survival following treatment. **Cell death & disease**, v. 7, n. 6, p. e2249, 2016.
- SCAFFIDI, P.; MISTELI, T. In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 1051–1061, 21 ago. 2011.
- SCHMITT, A. M. et al. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. **Cancer Cell**, v. 29, n. 4, p. 452–463, abr. 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. 123–34, 12 ago. 2008.
- SEYMOUR, T.; TWIGGER, A.-J.; KAKULAS, F. Pluripotency Genes and Their Functions in the Normal and Aberrant Breast and Brain. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 11, p. 27288–301, jan. 2015.
- SHAYKHIEV, R. et al. Airway basal cells of healthy smokers express an embryonic stem cell signature relevant to lung cancer. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 9, p. 1992–2002, set. 2013.
- SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 5, p. 39, 2010.
- SHI, J. et al. OCT4 is epigenetically regulated by DNA hypomethylation of promoter and exon in primary gliomas. **Oncology reports**, v. 30, n. 1, p. 201–6, jul. 2013.
- SHI, X. et al. An epigenetic switch induced by Shh signalling regulates gene activation during development and medulloblastoma growth. **Nature communications**, v. 5, p. 5425, jan. 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, jan. 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SINGH, S. K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5821–8, 15 set. 2003.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 18 nov. 2004.

SIPRASHVILI, Z. et al. The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. **Nature genetics**, v. 48, n. 1, p. 53–8, jan. 2016.

SLOMNICKI, L. P. et al. Nucleolar Enrichment of Brain Proteins with Critical Roles in Human Neurodevelopment. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 15, n. 6, p. 2055–75, jun. 2016.

SMITH, B. A. et al. A basal stem cell signature identifies aggressive prostate cancer phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. E6544-52, 24 nov. 2015.

SONG, T. et al. Expression of 67-kDa laminin receptor was associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 125, n. 2, p. 427–32, maio 2012.

STEARNS, D. et al. c-myc overexpression causes anaplasia in medulloblastoma. **Cancer research**, v. 66, n. 2, p. 673–81, 15 jan. 2006.

STUDEBAKER, A. W. et al. Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 4, p. 459–70, abr. 2012.

SUN, L.; LI, Y.; YANG, B. **Downregulated long non-coding RNA MEG3 in breast cancer regulates proliferation, migration and invasion by depending on p53's transcriptional activity** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [s.l: s.n.].

TAAPKEN, S. M. et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 313–4, abr. 2011.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, 30 nov. 2007.

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.

TAKEDA, J.; SEINO, S.; BELL, G. I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 17, p. 4613–20, 11 set. 1992.

TAMASE, A. et al. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 106, n. 40, p. 17163–8, 6 out. 2009.

TANG, Y.-A. et al. Global Oct4 target gene analysis reveals novel downstream PTEN and TNC genes required for drug-resistance and metastasis in lung cancer. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 3, p. 1593–608, 18 fev. 2015.

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

TAYLOR, M. D.; MAINPRIZE, T. G.; RUTKA, J. T. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review. **Neurosurgery**, v. 47, n. 4, p. 888–901, out. 2000.

TAYLOR, R. E. et al. Outcome for patients with metastatic (M2-3) medulloblastoma treated with SIOP/UKCCSG PNET-3 chemotherapy. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 41, n. 5, p. 727–34, mar. 2005.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–90, 25 nov. 2009.

THOMPSON, E. M. et al. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 4, p. 484–495, 2016.

THORENOOR, N. et al. Long non-coding RNA ZFAS1 interacts with CDK1 and is involved in p53-dependent cell cycle control and apoptosis in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 1, p. 622–37, 5 jan. 2016.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 148–54, 1989.

TSAI, L.-L. et al. Oct4 Mediates Tumor Initiating Properties in Oral Squamous Cell Carcinomas through the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87207, 27 jan. 2014a.

TSAI, S. C. et al. Induced overexpression of OCT4A in human embryonic stem cells increases cloning efficiency. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 306, n. 12, p. C1108-18, 15 jun. 2014b.

VALDORA, F. et al. Epigenetic Silencing of DKK3 in Medulloblastoma. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 7492–505, jan. 2013.

VANNER, R. J. et al. Quiescent Sox2(+) Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. **Cancer cell**, v. 26, n. 1, p. 33–47, 17 jun. 2014.

VERMA, S.; TAVARÉ, C. J.; GILLES, F. H. Histologic features and prognosis in pediatric medulloblastoma. **Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society**, v. 11, n. 5, p. 337–43, 17 jan. 2008.

VERMEULEN, L. et al. Cancer stem cells--old concepts, new insights. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 6, p. 947–58, jun. 2008.

VERMEULEN, L. et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by

- the microenvironment. **Nature cell biology**, v. 12, n. 5, p. 468–76, maio 2010.
- 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.
- VESCOVI, A. L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. Brain tumour stem cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 6, p. 425–36, jun. 2006.
- VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. **Cell stem cell**, v. 10, n. 6, p. 717–28, 14 jun. 2012.
- WANG, P.; REN, Z.; SUN, P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 6, p. 1868–74, jun. 2012.
- WANG, V. Y.; ROSE, M. F.; ZOGHBI, H. Y. Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. **Neuron**, v. 48, n. 1, p. 31–43, 6 out. 2005.
- WANG, W.; XING, C. Upregulation of long noncoding RNA ZFAS1 predicts poor prognosis and prompts invasion and metastasis in colorectal cancer. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, n. 8, p. 690–695, 2016.
- WANG, X. et al. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 6, p. 1265–75, jun. 2009.
- WANG, X.; DAI, J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 5, p. 885–93, maio 2010.
- WARD, E. et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 83–103, 2014.
- WEISWALD, L.-B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 1–15, jan. 2015.
- WEZEL, F. et al. Differential expression of Oct4 variants and pseudogenes in normal urothelium and urothelial cancer. **The American journal of pathology**, v. 183, n. 4, p. 1128–36, out. 2013.
- WHITE, J.; DALTON, S. Cell cycle control of embryonic stem cells. **Stem cell reviews**, v. 1, n. 2, p. 131–8, jan. 2005.
- WHO. **Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.** Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2014.
- WHO. **World Health Organization - Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles , 2014.** Disponível em: <http://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2016.
- WHO; IARC. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>.

WONG, D. J. et al. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 333–44, 10 abr. 2008.

WU, G. et al. Oct4 is a reliable marker of liver tumor propagating cells in hepatocellular carcinoma. **Discovery medicine**, v. 20, n. 110, p. 219–29, out. 2015a.

WU, H. et al. Nucleostemin regulates proliferation and migration of gastric cancer and correlates with its malignancy. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 10, p. 17634–43, jan. 2015b.

WU, X. et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 529–33, 23 fev. 2012.

XU, G. et al. Small nucleolar RNA 113–1 suppresses tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 216, 2014.

XU, J. et al. Deaths: Final Data for 2013. **National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System**, v. 64, n. 2, p. 1–119, 16 fev. 2016.

XU, M. et al. Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. **Cancer letters**, v. 369, n. 1, p. 124–33, 1 dez. 2015.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601–10, 24 ago. 2007.

YANG, N. et al. Inhibition of Sonic Hedgehog Signaling Pathway by Thiazole Antibiotic Thiostrepton Attenuates the CD44+/CD24-Stem-Like Population and Sphere-Forming Capacity in Triple-Negative Breast Cancer. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 1157–70, 2016.

YANG, S. et al. Oct4 and Sox2 are overexpressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. **Oncology reports**, v. 28, n. 1, p. 186–92, jul. 2012.

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. 135–45, 12 ago. 2008.

YAO, L. et al. Dickkopf-1-promoted vasculogenic mimicry in non-small cell lung cancer is associated with EMT and development of a cancer stem-like cell phenotype. **Journal of cellular and molecular medicine**, 31 maio 2016.

YOSHIDA, R. et al. Nucleostemin affects the proliferation but not differentiation of oral squamous cell carcinoma cells. **Cancer science**, v. 102, n. 7, p. 1418–23, jul. 2011.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5858, p. 1917–20, 21 dez. 2007.

ZELTZER, P. M. et al. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 832–45, mar. 1999.

ZHANG, W. et al. Mapping of the minimal internal ribosome entry site element in the

human embryonic stem cell gene OCT4B mRNA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 394, n. 3, p. 750–4, 9 abr. 2010.

ZHANG, Y. et al. Elevated DDX21 regulates c-Jun activity and rRNA processing in human breast cancers. **Breast cancer research : BCR**, v. 16, n. 5, p. 449, 2014.

ZHAO, R. et al. A nontranscriptional role for Oct4 in the regulation of mitotic entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 44, p. 15768–73, 4 nov. 2014.

Anexos e Apêndices

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE 1 – Aberrações Cromossômicas – Daoy

Daoy

Genome: hg19

Aberration Algorithm: ADM-2

Threshold: 6.0

Fuzzy Zero: ON

GC Correction: OFF

Centralization (legacy): OFF

Diploid Peak Centralization: ON

Manually Reassign Peaks: OFF

Combine Replicates (Intra Array): ON

Combine Replicates (Inter Array): OFF

Array Level Filter: NONE

Aberration Filter: (Minimum Number of Probes for Amplification ≥ 5 AND Minimum Size (Kb) of Region for Amplification ≥ 0.0 AND Minimum Avg. Absolute Log Ratio for Amplification ≥ 0.3) OR (Minimum Number of Probes for Deletion ≥ 5 AND Minimum Size (Kb) of Region for Deletion ≥ 0.0 AND Minimum Avg. Absolute Log Ratio for Deletion ≥ 0.3)

Feature Level Filter: glsSaturated = true OR rlsSaturated = true OR glsFeatNonUnifOL = true OR rlsFeatNonUnifOL = true OR LogRatio = 0

Design Level Filter: NONE

Genomic Boundary: OFF

Show Flat Intervals: OFF

Daoy OCT4A Cy3 x Daoy Controle Cy 5

Chr	Citobanda	Início	Fim	Tamanho (pb)	Log 2 Ratio
chr1	p36.33 - p11.2	564424	121322377	120757953	-0.417695
chr1	p36.32 - p31.3	2712385	62516646	59804261	-0.505761
chr1	p31.1	72879485	74884406	2004921	-0.758471
chr1	p31.1	75553689	79518492	3964803	-0.406317
chr1	p13.3 - p12	108136664	118940584	10803920	-0.600883
chr1	p13.3	108136664	110888064	2751400	-0.719079
chr1	q21.2	149041933	149209289	167356	0.644698
chr1	q44	247234943	247581523	346580	-0.685987
chr2	p25.3 - p11.1	30341	91906643	91876302	-0.458621
chr2	p25.3	30341	3186279	3155938	-0.600895
chr2	p25.3 - p25.1	4234028	9802297	5568269	-0.975067
chr2	p25.1	9530929	9675325	144396	-1.575579
chr2	p24.3 - p16.3	13910712	51142908	37232196	-0.551786
chr2	q13	113859049	114149033	289984	-0.614615
chr2	q22.1	141891758	142036954	145196	-0.762467
chr3	p26.3 - p11.1	127520	90247088	90119568	0.327113
chr3	p25.3	9229981	9436617	206636	0.793271
chr3	q28	189191240	190052155	860915	-0.610569
chr4	p16.3 - p11	71552	49052888	48981336	-0.314833
chr4	p15.1 - p14	28226984	37021563	8794579	-0.542339

chr4	q32.2 - q32.3	164470077	165069393	599316	0.590337
chr6	q12 - q16.1	65423592	96365219	30941627	-0.365684
chr6	q15	90927089	90995225	68136	-1.194171
chr6	q22.33	128426960	128554171	127211	0.363992
chr6	q23.1	130325246	130980667	655421	1.238006
chr6	q27	165522628	169146744	3624116	-0.312527
chr7	p22.3 - p22.1	42976	7058843	7015867	-0.333991
chr7	p22.1	6407281	6777321	370040	-0.654481
chr7	p13 - p11.2	43602920	57558200	13955280	-0.408574
chr7	q11.21 - q11.23	62460665	74139390	11678725	-0.566088
chr7	q11.22	69217572	69803384	585812	-0.826301
chr8	p23.3 - p12	176814	30182993	30006179	0.415149
chr8	q24.11 - q24.3	118454531	146294098	27839567	0.344023
chr8	q24.22 - q24.3	132812388	146121090	13308702	0.45732
chr9	p21.3 - p21.2	21036673	26746962	5710289	1.044776
chr9	q34.11	131899913	132130630	230717	1.127093
chr9	q34.11 - q34.3	132809978	140994780	8184802	-0.416473
chr10	q25.3	116948124	118110882	1162758	0.355018
chr11	p15.1	17853233	18124834	271601	0.508604
chr11	p12	41649854	41944418	294564	0.540504
chr11	p11.2	46418069	48645948	2227879	0.325821
chr12	p13.33 - p11.1	204547	34360030	34155483	0.33294
chr12	q21.2	79689969	80018398	328429	-0.340787
chr13	q12.11	19544590	19938820	394230	0.40695
chr13	q21.2	60724914	60911484	186570	-0.376961
chr15	q21.2 - q21.3	50140086	53173259	3033173	-0.313923
chr15	q22.31	65490437	66643697	1153260	-0.404706
chr16	p13.12 - p12.2	13985389	21239607	7254218	-0.302644
chr18	p11.32 - p11.22	131700	9855325	9723625	0.519494
chr18	p11.21	11390927	14122521	2731594	0.322408
chr19	p13.3	266117	3990202	3724085	-0.376143
chr20	p13 - p12.3	67778	7348849	7281071	-0.823625
chr20	p12.1	15105985	15549511	443526	-0.566214
chr20	p11.23 - p11.21	18889484	24178558	5289074	0.359607
chr21	q11.2 - q21.1	15725818	21769040	6043222	-0.356662
chrX	p22.33 - p22.2	1770348	15941229	14170881	-0.601009
chrX	p22.33	1793480	2665013	871533	-0.338546
chrY	p11.32	11091	119113	108022	-0.760013
chrY	p11.32 - p11.31	431940	2639408	2207468	-0.312704
chrY	p11.31 - p11.2	2650450	9940478	7290028	0.6459
chrY	q11.21 - q11.223	13992304	23969952	9977648	0.374161
chrY	q11.21 - q11.221	14022441	15948750	1926309	0.733936

8.2. APÊNDICE 2 – Aberrações Cromossômicas – USP-13-Med

USP-13-Med

Genome: hg19
 Aberration Algorithm: ADM-2
 Threshold: 6.0
 Fuzzy Zero: ON
 GC Correction: OFF
 Centralization (legacy): OFF
 Diploid Peak Centralization: ON
 Manually Reassign Peaks: OFF
 Combine Replicates (Intra Array): ON
 Combine Replicates (Inter Array): OFF
 Array Level Filter: NONE
 Aberration Filter: (Minimum Number of Probes for Amplification \geq 5 AND Minimum Size (Kb) of Region for Amplification \geq 0.0 AND Minimum Avg. Absolute Log Ratio for Amplification \geq 0.3) OR (Minimum Number of Probes for Deletion \geq 5 AND Minimum Size (Kb) of Region for Deletion \geq 0.0 AND Minimum Avg. Absolute Log Ratio for Deletion \geq 0.3)
 Feature Level Filter: glsSaturated = true OR rlsSaturated = true OR glsFeatNonUnifOL = true OR rlsFeatNonUnifOL = true OR LogRatio = 0
 Design Level Filter: NONE
 Genomic Boundary: OFF
 Show Flat Intervals: OFF
 USP-13-Med OCT4A Cy3 x USP-13-Med Controle Cy5

Chr	Citobanda	Início	Fim	Tamanho (pb)	Log 2 Ratio
chr1	p32.3	51241492	51445710	204218	1.175545
chr4	q22.2	93825108	94091830	266722	1.795175
chr4	q34.3	178533989	181664887	3130898	1.399088
chr4	q35.2	187227965	190135453	2907488	1.176348
chr9	p21.3	20121574	23486509	3364935	1.117925
chr12	q21.2	77428693	78584019	1155326	1.520183

8.3. APÊNDICE 3 – Parâmetros de qualidade de microarranjos de expressão gênica

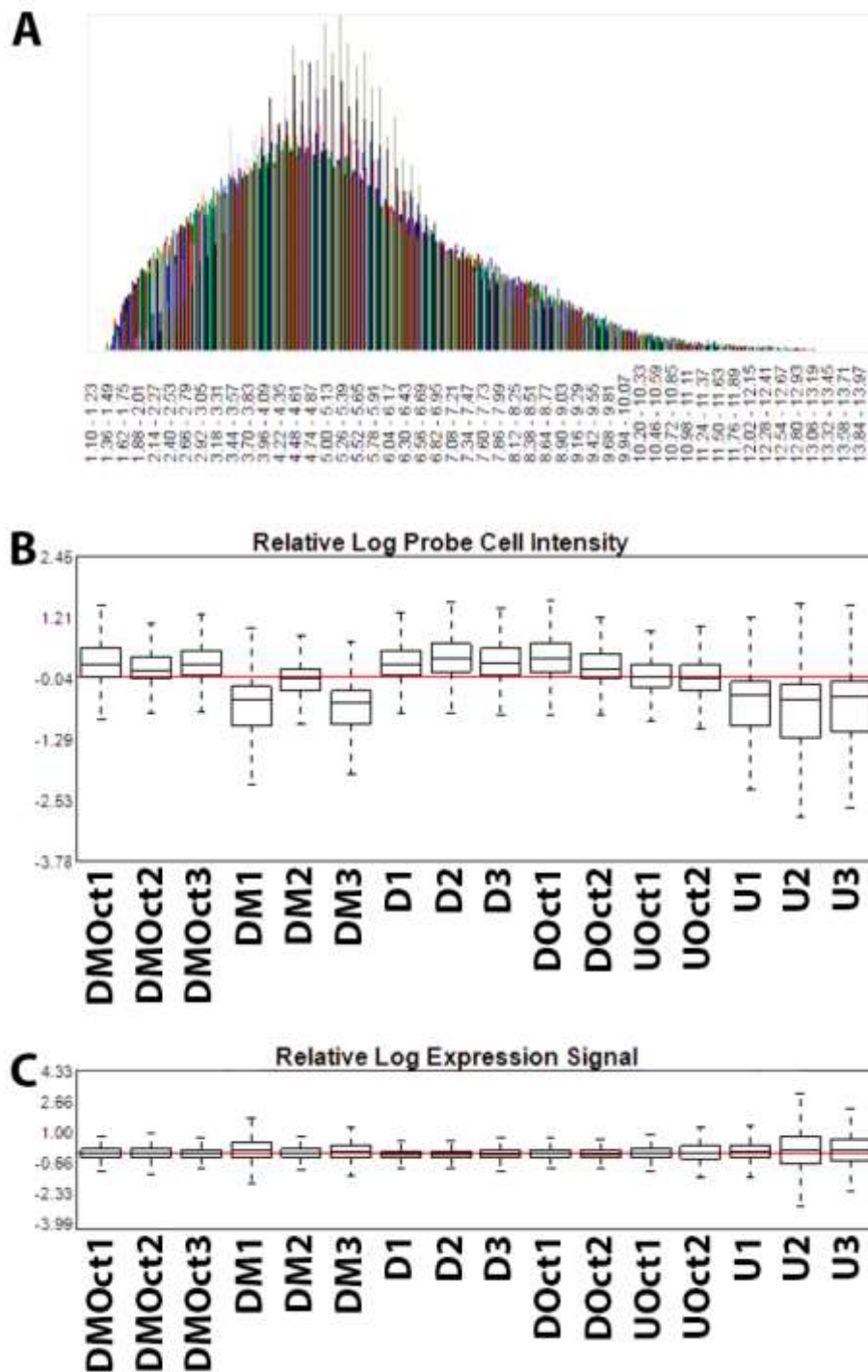
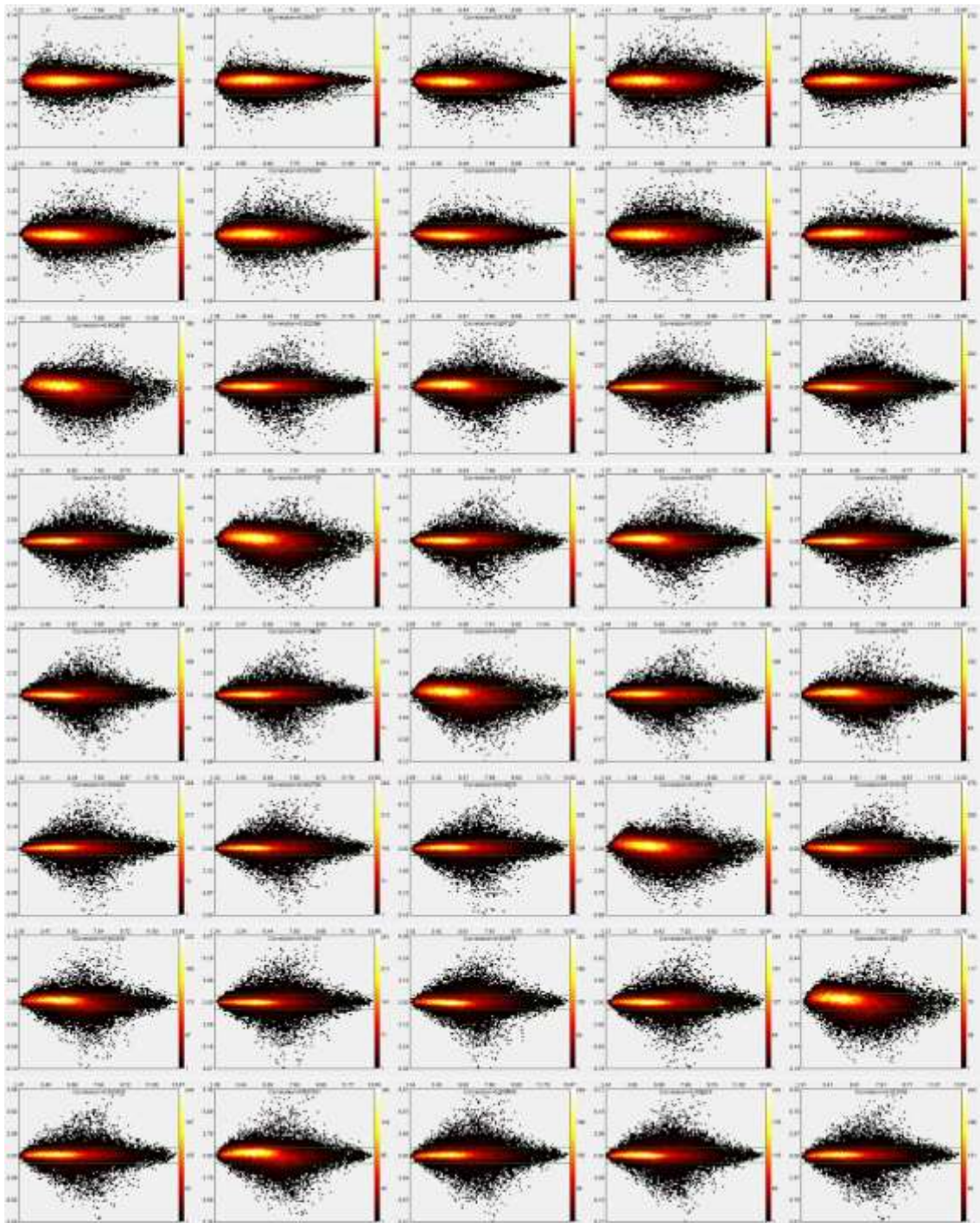


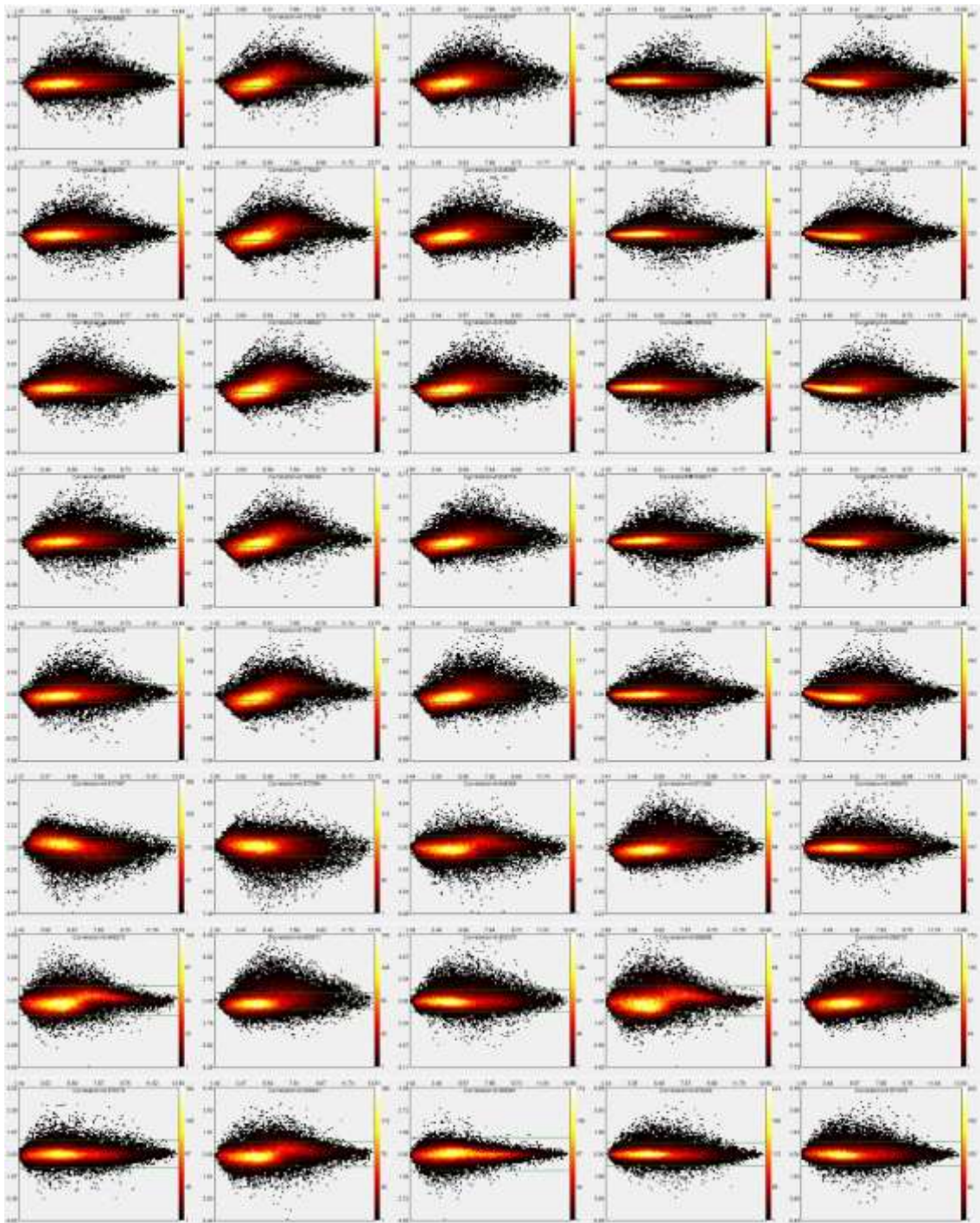
Figura 52 – Avaliação da qualidade dos microarranjos de expressão gênica. (A) Histograma de intensidade de sinal das sondas sobrepostas dos microarranjos de expressão gênica em uma distribuição normal. (B) Box-plot da razão de cada probe em relação a mediana da intensidade da probe em todos os microarranjos de expressão gênica. (C) Box-plot da razão do sinal de cada probe em relação a mediana do sinal da probe em todos os microarranjos de expressão gênica. D = Daoy Controle; DOct = Daoy OCT4A; DM = D283Med Controle; DMOct = D283Med OCT4A; U = USP-13-Med Controle; UOct = USP-13-Med OCT4A.

8.4. APÊNDICE 4 – MvA Plot de microarranjos de expressão gênica

(CONTINUA)



(CONTINUAÇÃO)



(CONCLUSÃO)

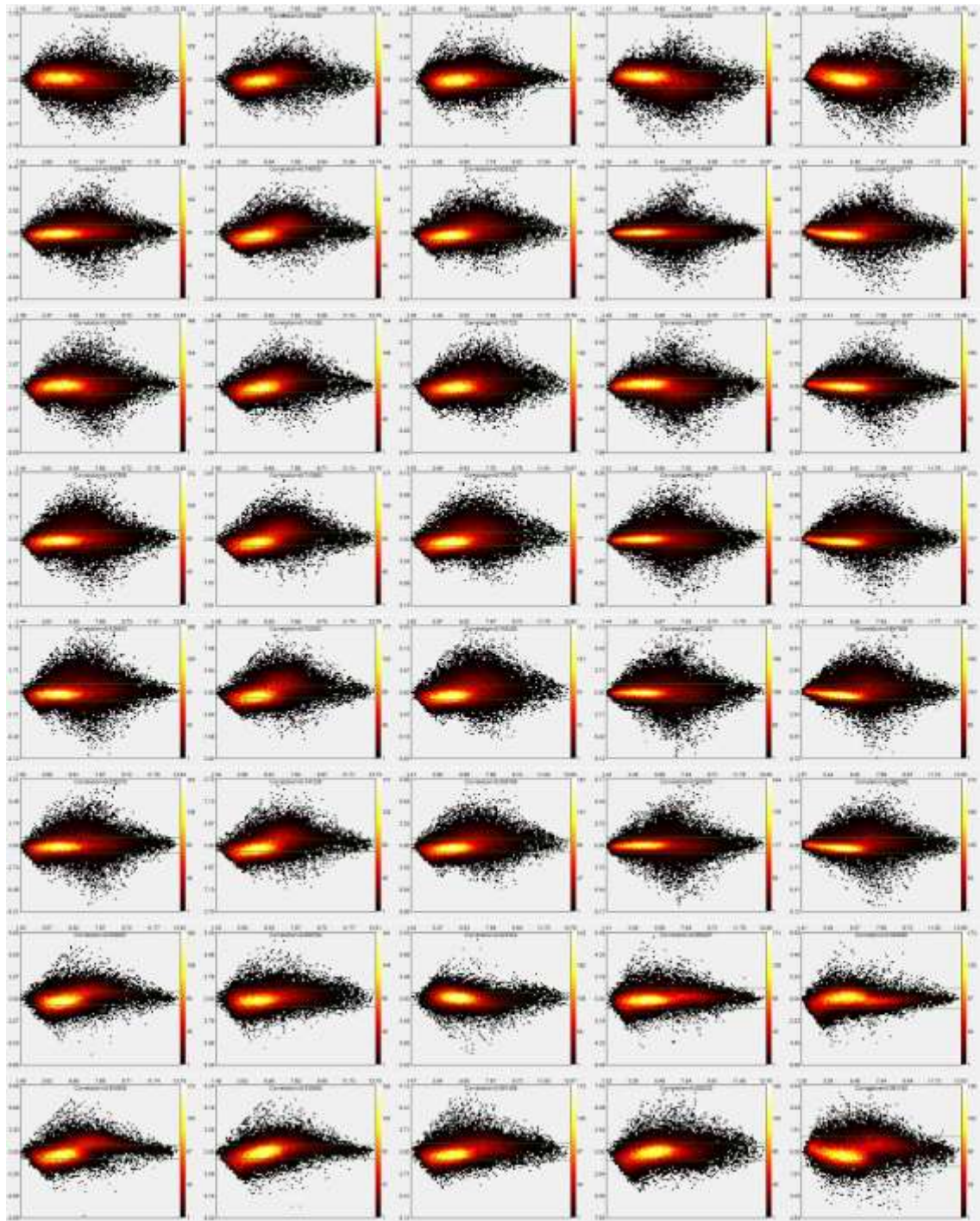


Figura 53 – MVA Plot dos microarranjos de expressão gênica. Os gráficos apresentam a magnitude das diferenças $[\log(\text{Sinal Array 1}) - \log(\text{Sinal Array 2})] \times \text{Média do Sinal}$, para cada *probe*, e compara um array com o outro.

8.5. APÊNDICE 5 – Correlação de Pearson de microarranjos de expressão gênica

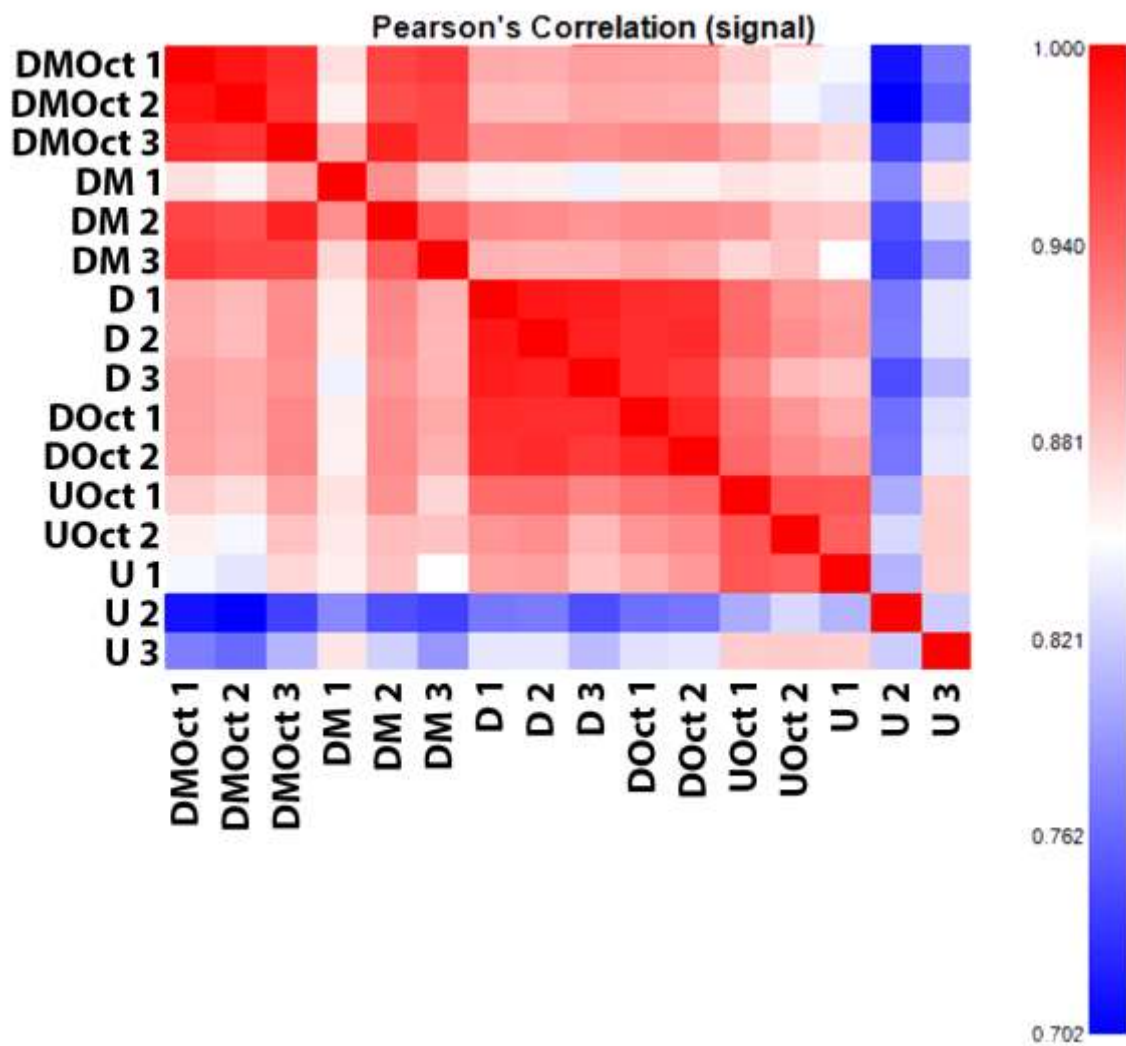


Figura 54 – Gráfico de correlação de Pearson (r^2) entre os microarranjos de expressão gênica. D = Daoy Controle; DOct = Daoy OCT4A; DM = D283Med Controle; DMOct = D283Med OCT4A; U = USP-13-Med Controle; UOct = USP-13-Med OCT4A.

8.6. APÊNDICE 6 – EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DE OCT4A NA AGRESSIVIDADE DE AT/RT

A linhagem celular USP-07-Med também foi estabelecida em nosso laboratório e obtida em colaboração com o Dr. Hamilton Matushita. A amostra foi coletada após ressecção tumoral de um paciente de 13 anos de idade, diagnosticado com AT/RT e submetida ao mesmo protocolo de isolamento e manutenção utilizado para a linhagem celular USP-13-Med.

Assim como para as demais linhagens celulares de meduloblastoma, foi realizada a superexpressão de OCT4A para a investigação dos efeitos deste fator de transcrição na tumorigênese e agressividade de AT/RT. A expressão de OCT4A nas células de USP-07-Med, em nível transcricional e proteico, bem como sua localização subcelular é apresentada na Figura 55.

Os efeitos da superexpressão de OCT4A foram inicialmente avaliados *in vitro*, por ensaio de crescimento independente de ancoragem e capacidade de formação de esferas tumorais. Como é possível observar na Figura 56, as células de USP-07-Med apresentaram um aumento na capacidade de geração de colônias e esferas tumorais, sendo esses dois parâmetros correlacionados com maior tumorigênese e agressividade tumoral.

Foram avaliados também os efeitos da superexpressão de OCT4A na tumorigênese e agressividade *in vivo*. Para tanto, foram inoculadas células USP-07-Med no flanco direito de camundongos BALB/C *Nude*, de forma subcutânea, e avaliada a cinética de crescimento tumoral. A linhagem celular estabelecida de AT/RT mostrou-se mais tumorigênica que as demais linhagens celulares de meduloblastoma, visto que a latência para crescimento tumoral foi inferior para células USP-07-Med (Figura 57A). Assim como observado nas diferentes linhagens celulares de meduloblastoma, a superexpressão de OCT4A também favoreceu a formação precoce de uma massa tumoral, e os tumores derivados apresentaram morfologia macroscópica típica de tumores agressivos (Figura 57B), com a presença de áreas hemorrágicas e de necrose.

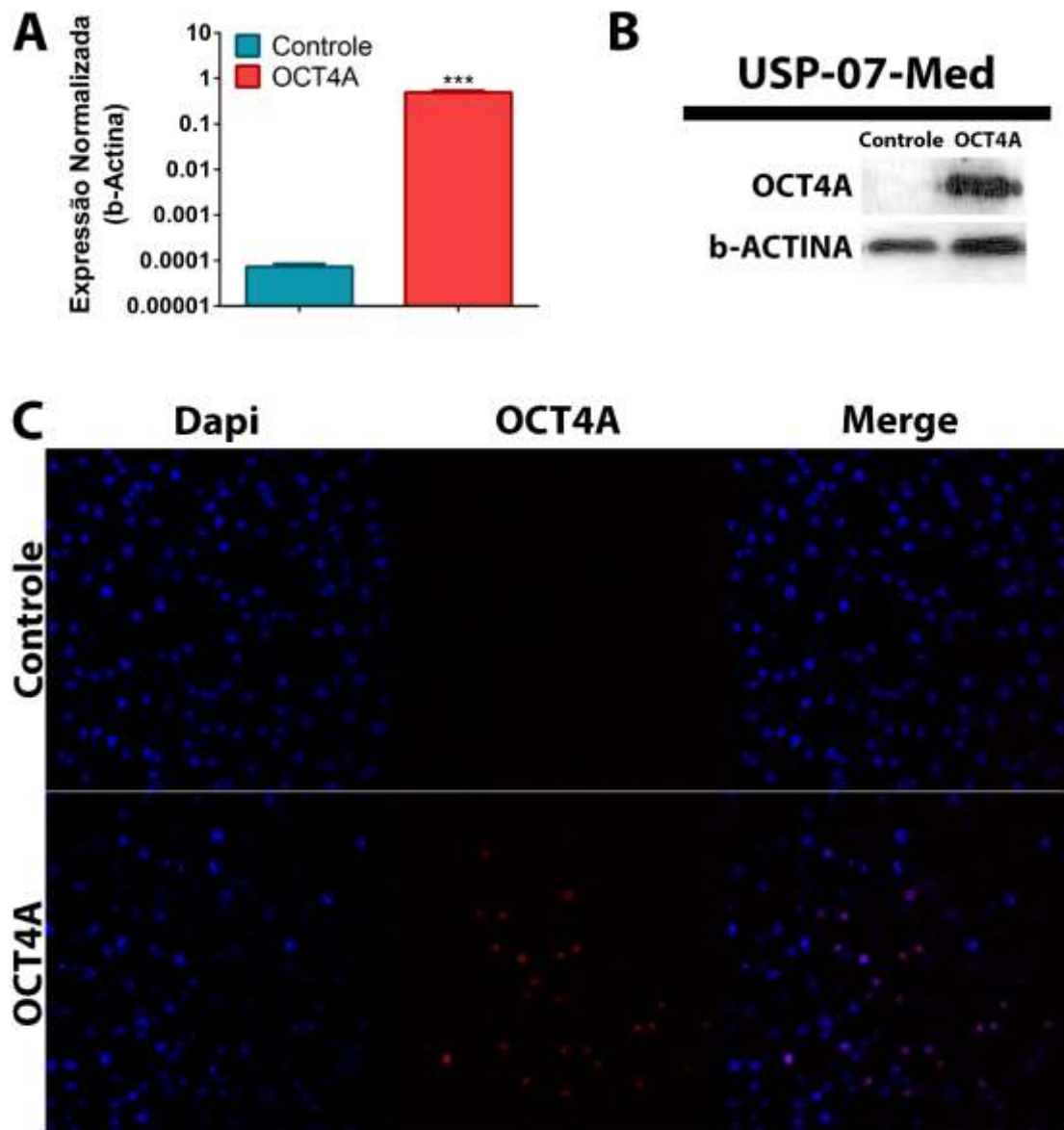


Figura 55 - Superexpressão de OCT4 em linhagem celular de AT/RT. (A) Quantificação da expressão do transcrito *Oct4A* por qRT-PCR. Dados normalizados pela expressão do gene endógeno β -ACTINA e apresentados de forma relativa à quantificação em CTE. (B) Avaliação da expressão proteica de OCT4A avaliada por *Western Blot*. (C) Avaliação da expressão proteica de OCT4A e sua localização subcelular, avaliada por imunofluorescência, em linhagem celular de AT/RT após superexpressão de OCT4A. O núcleo foi marcado com DAPI (Azul) e OCT4A marcado com anticorpo secundário conjugado com Cy3 (Vermelho).

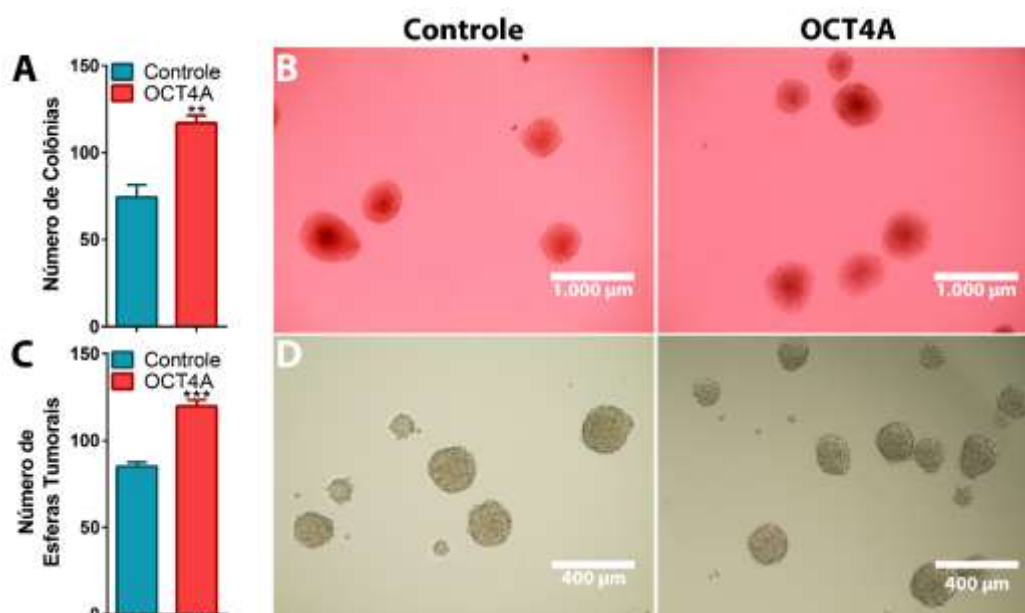


Figura 56 - Capacidade de crescimento independente de ancoragem e geração de esferas tumorais são afetadas após superexpressão de OCT4A em células de AT/RT. (A) Número total de colônias com diâmetro superior a 50 μm obtidas após 15 dias de crescimento independente de ancoragem. (B) Fotomicrografias representativas de colônias obtidas após 15 dias de crescimento independente de ancoragem. Barra: 1.000 μm . (C) Número total de esferas tumorais com diâmetro superior a 50 μm obtidas após 7 dias de cultivo em condições de enriquecimento de células neuroprogenitoras/esferas tumorais. *** $p < 0,001$. (D) Fotomicrografias representativas de esferas tumorais obtidas após 7 dias de cultivo em condições de enriquecimento de células neuroprogenitoras/esferas tumorais. Barra: 400 μm . OCT4A: células tumorais com superexpressão de OCT4A; Controle: células tumorais com expressão basal de OCT4A. Significância Estatística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

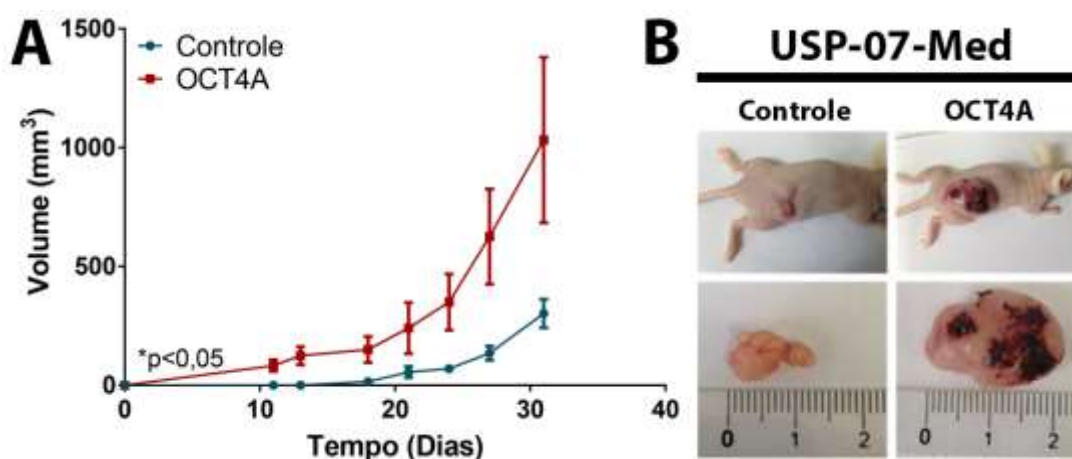


Figura 57 - Superexpressão de OCT4A favorece o crescimento tumoral de células de AT/RT. (A) Cinética de crescimento tumoral em modelo experimental subcutâneo. Dados representam média \pm SEM dos volumes tumorais. (B) Fotografia representativas de tumores desenvolvidos por células de AT/RT com níveis basais (Controle) ou superexpressão de OCT4A (OCT4A) após 31 dias de inoculação subcutânea.

Apesar de mais agressivo macroscopicamente, a análise histológica indica que a superexpressão de OCT4A não foi capaz de alterar características histopatológicas do tumor gerado, visto que ambos os tumores (Controle ou com superexpressão de OCT4A) apresentaram morfologia semelhante (Figura 58).

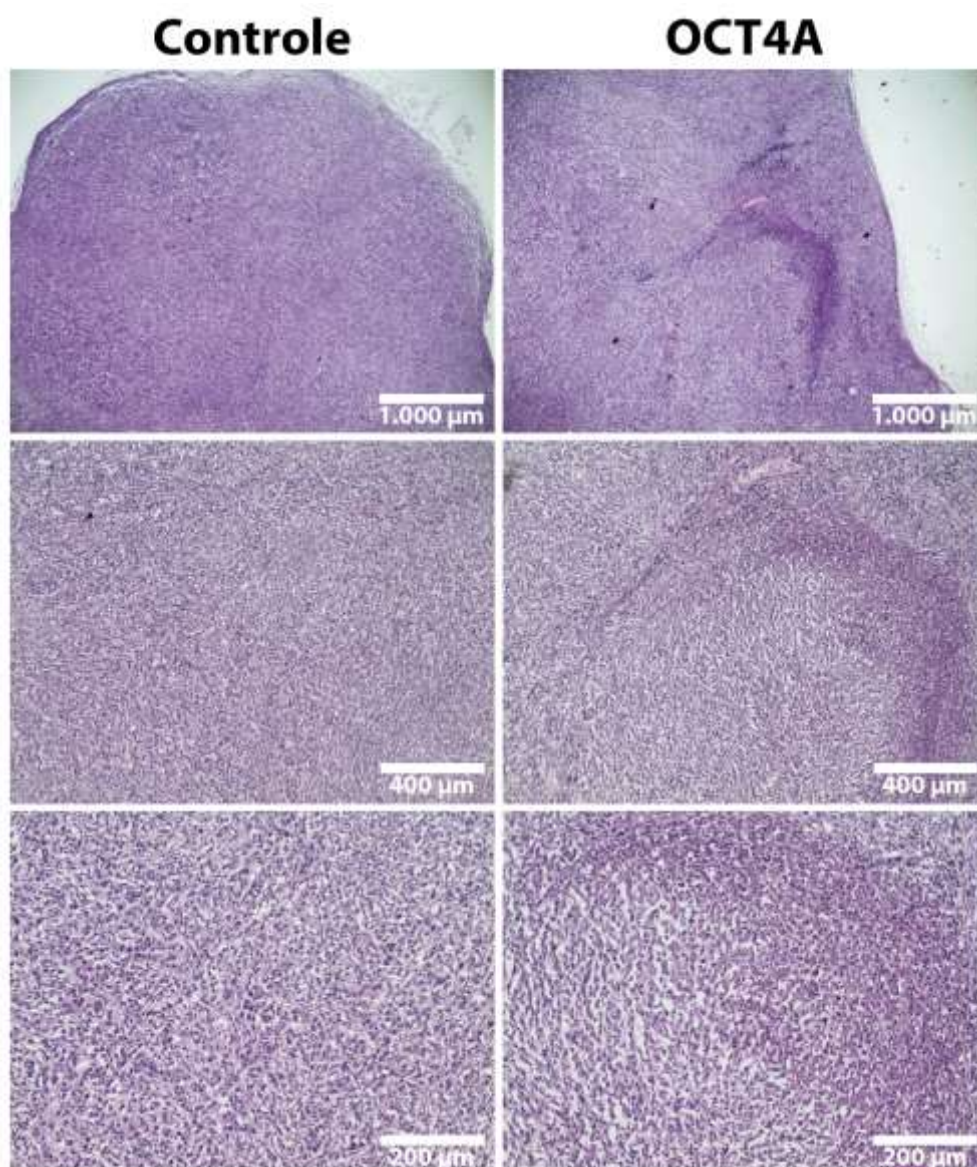


Figura 58 - Tumores gerados por células de AT/RT com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia semelhante a tumores gerados por células de AT/RT com expressão basal de OCT4A. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos submetidos a procedimento padrão de H.E. em diferentes magnificações.

Foi realizado também o ensaio de metástase *in vivo* por meio de inoculação de células de AT/RT (USP-07-Med) no ventrículo lateral direito de camundongos BALB/C *Nude*. Todos os animais desenvolveram sintomas clínicos, de forma mais agressiva e precoce em relação a todas as outras linhagens celulares de meduloblastoma utilizadas no presente trabalho. A superexpressão de OCT4A, no entanto, não foi capaz de alterar significativamente a capacidade metastática de células de AT/RT (Tabela 12). Os sintomas clínicos foram extremamente severos, sendo então necessária a eutanásia dos animais após um curto período de tempo visto a manifestação dos

sintomas clínicos (comportamento agressivo com os demais animais da gaiola, autoflagelação, perda de peso excessiva e/ou ataxia).

Tabela 12 - Parâmetros clínicos e histopatológicos de camundongos BALB/C *Nude* inoculados ortotopicamente para ensaio *in vivo* de metástase de AT/RT

	USP-07-Med	
	Controle	OCT4A
No de animais com sintomas clínicos	3/3	4/4
Dias para o surgimento dos sintomas clínicos	28,0 ± 1,0	26,0 ± 1,4*
Dias para Eutanásia	30,7 ± 0,57	29,2 ± 1,71
No de animais com M2	1/3	1/4
No de animais com M3	2/3	3/4

*M2 e M3 correspondem ao sistema de estadiamento de metástase proposto por Chang (1989)

A análise histológica de encéfalos de camundongos submetidos ao ensaio de metástase *in vivo* indica que tumores gerados por células de AT/RT com superexpressão de OCT4A apresentam maior heterogeneidade tumoral, observado por regiões nodulares com alta densidade celular, enquanto que tumores gerados por células de AT/RT controle apresentaram um perfil histológico mais homogêneo (Figura 59).

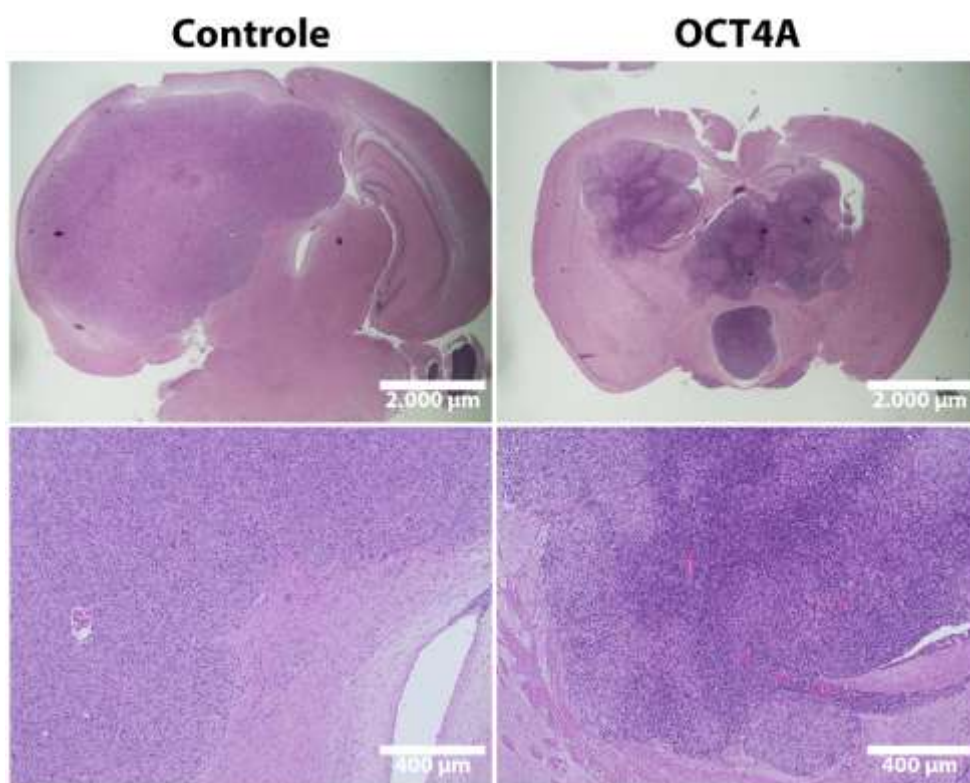


Figura 59 - Tumores com superexpressão de OCT4A apresentam histopatologia heterogênea. Fotomicrografias representativas de encéfalos de camundongos BALB/C *Nude* em diferentes magnificações. Os cortes histológicos apresentam os tumores derivados de células de AT/RT humano após ensaio de metástase.

9. ANEXOS

9.1. SUMULA CURRICULAR

Patrícia Benites Gonçalves da Silva

Formação Acadêmica

- 2011 - Atual Doutorado em **Ciências Biológicas (Biologia Genética)**.
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
 Título: Fator de pluripotência OCT4A e agressividade de meduloblastoma humano
 Orientador: Oswaldo Keith Okamoto
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2007 - 2010 Graduação em **Biomedicina**.
 Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
 Título: Ação moduladora do composto L3 na cinética de proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade, indução de apoptose, produção de óxido nítrico e expressão gênica de genes alvos em células HTC
 Orientador: Mário Sérgio Mantovani
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação Complementar

- 2014 Monitoria Acadêmica PAE em **Biologia Celular**. (144h). USP, São Paulo, Brasil
- 2012 Curso **Synthetic and Viral-based Systems for Gene Silencing**. (16h). USP, São Paulo, Brasil.
- 2012 Curso de curta duração em **Stem Cells in Development Biology and Cancer**. (35h). Hospital A.C. Camargo, Brasil.
- 2012 Curso **Cell Therapy Regulations**. (8h). Associação Brasileira de Terapia Celular, Brasil.
- 2012 Curso **Vacinas Antitumorais**. (8h). USP, São Paulo, Brasil
- 2012 Curso **Neurociência Cognitiva**. (8h). USP, São Paulo, Brasil

- 2012 Curso **Neuroanatomia**. (4h). USP, São Paulo, Brasil
- 2010 Curso **Predição de Estruturas de Proteínas**. (6h). LNCC, Petrópolis, Brasil
- 2010 Curso **Simulação de Proteínas de Biomembranas**. (6h). LNCC, Petrópolis, Brasil
- 2010 Curso **Dinâmica Molecular Básica**. (6h). LNCC, Petrópolis, Brasil
- 2010 Curso **Farmacogenômica**. (3h). SBG, Guarujá, Brasil
- 2010 Curso **Aplicações do Sequenciamento de Nova Geração**. (3h). SBG, Guarujá, Brasil
- 2010 Curso **Atualização em Imunologia: Imunologia Inata**. (12h). UEL, Londrina, Brasil
- 2010 Curso **Análise Estatística Aplicada a Dados Moleculares**. (2h) UEL, Londrina, Brasil
- 2010 Curso **Análise da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real**. (18h). UNESP, Botucatu, Brasil
- 2009 Monitoria Acadêmica na Disciplina de **Embriologia**. (64h). UEL, Londrina, Brasil
- 2009 Curso **Diagnóstico por Imagem**. (4h). UEL, Londrina, Brasil
- 2009 Curso **Óxido Nítrico na Saúde e na Doença**. (8h). UEL, Londrina, Brasil
- 2009 Extensão universitária em **Dia Mundial da Saúde**. (6h). UEL, Londrina, Brasil
- 2009 Curso **Biomarcadores de Câncer**. (6h). UNESP, Botucatu, Brasil
- 2009 **Updates in Reproductive Biology**. (48h). UNIFESP, São Paulo, Brasil
- 2009 Curso **Proteomics**. (5h). USP, Ribeirão Preto, Brasil
- 2008 Curso **Redação Científica**. (4h). UNESP, Botucatu, Brasil
- 2008 Curso **Genética da Reprodução Humana**. (6h). UNESP, Botucatu, Brasil
- 2007 Curso **Biologia do Desenvolvimento**. (20h). UEL, Londrina, Brasil

Prêmios e Auxílios

- 2016 Travel Award para Participação em **12th International Congress of Cell Biology**, Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
- 2015 Menção Honrosa no **VI Prêmio Oswaldo Frota-Pessoa de Incentivo à Pesquisa - Doutorado**, Departamento de Genética e Biologia

- Evolutiva - IB/USP
- 2015 Travel Grant para Participação em **The EMBO/EMBL Symposium: Frontiers in Stem Cells & Cancer**, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - IB/USP
- 2015 Travel Grant para Participação em **13th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research**, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - IB/USP
- 2013 Travel Grant para Participação em **11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research**, Pró-Reitoria de Pós-Graduação - USP
- 2010 Menção Honrosa no **Prêmio Painel Iniciação Científica com o trabalho na área de Mutagênese**, Sociedade Brasileira de Genética
- 2010 Travel Grant para a Participação em **V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos**, LNCC.

Artigos Publicados

- 2016 ZANELATTO, L. C., **SILVA, P. B. G.**, SARTORI, D., PANIS, C., LEPRI, S. R., FATIMA, A., MANTOVANI, M. S. *LNO3 and L3 are associated with antiproliferative and proapoptotic action in hepatoma cells.* Genetics and Molecular Biology (online version)
- 2015 **SILVA, P. B. G.**, RODINI, C. O., KAID, C., NAKAHATA, A. M., PEREIRA, M. C. L., MATUSHITA, H., COSTA, S. S., OKAMOTO, O. K. *Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells.* Cytotechnology (Dordrecht)
- 2015 SANTOS, M. C. T., **SILVA, P. B. G.**, RODINI, C. O., FURUKAWA, G., MARCO ANTONIO, D. S., ZANOTTO-FILHO, A., MOREIRA, J. C. F., OKAMOTO, O. K. *Embryonic stem cell-related protein L1TD1 is required for cell viability, neurosphere formation and chemoresistance in medulloblastoma.* Stem Cells and Development.
- 2015 KAID, C., **SILVA, P. B. G.**, CORTEZ, B. A., RODINI, C. O., SEMEDOKURIKI, P., OKAMOTO, O. K. *miR-367 Promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells.* Cancer Science.
- 2015 CRUZ, D. S. G., LIMA, A. P. N., **SILVA, P. B. G.**, PALERMO-NETO, J., MASSOCO, C. *Effects of Unilateral Cervical Vagotomy on Murine Dendritic Cells.* American Journal of Immunology..
- 2014 LEPRI, S. R., ZANELATTO, L. C., **SILVA, P. B. G.**, SARTORI, D., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. *The effects of genistein and daidzein on cell proliferation kinetics in HT29 colon cancer cells: the expression of CTNNBIP1 (β -catenin), APC (adenomatous polyposis coli) and BIRC5 (survivin).* Human Cell.

- 2013 DE FREITAS, L F, ZANELATTO, L C, MANTOVANI, M S, **SILVA, P B G**, CECCINI, R, GRECCO, C, MORIYAMA, L T, KURACHI, C, MARTINS, V C A, PLEPIS, A M G *In vivo photothermal tumour ablation using gold nanorods*. Laser Physics.
- 2012 LEPRI, S. R., LUIZ, R. C., ZANELATTO, L. C., **SILVA, P. B. G.**, SARTORI, D., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. *Chemoprotective activity of the isoflavones, genistein and daidzein on mutagenicity induced by direct and indirect mutagens in cultured HTC cells*. Cytotechnology (Dordrecht).

Patentes

OKAMOTO, O. K., **SILVA, P. B. G.**, SANTOS, M. C. T. **Composições farmacêuticas para eliminação de células-tronco tumorais e uso das mesmas**, 2015. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020150030169. Data de depósito: 11/02/2015. Depositante/Titular: Oswaldo Keith Okamoto. Depositante/Titular: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

OKAMOTO, O. K., RODINI, C. O., **SILVA, P. B. G.**, FURUKAWA, G. **Método de prognóstico da agressividade de tumores e kit**, 2014. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020140155775. Data de depósito: 17/06/2014. Depositante/Titular: Oswaldo Keith Okamoto. Depositante/Titular: FAPESP

Participação em Eventos

- 2016 12th International Congress of Cell Biology – Praga, República Tcheca.
- 2016 18th Congress of The Brazilian Society for Cell Biology – São Paulo, Brasil.
- 2015 The EMBO/EMBL Symposium: Frontiers in Stem Cells & Cancer – Heidelberg, Alemanha.
- 2015 13th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research – Estocolmo, Suécia.
- 2015 VI Prêmio Oswaldo Frota-Pessoa de Incentivo à Pesquisa – São Paulo, Brasil.
- 2014 12th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research - Vancouver, Canadá.
- 2014 Scientific Meeting -HUG CELL of the Human Genome and Stem Cell Research Center – Guarujá, Brasil.

- 2013 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research – Boston, EUA.
- 2013 New Advances in Stem Cell Research – São Paulo, Brasil.
- 2012 7º Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular – São Paulo, Brasil.
- 2012 Stem Cells in development biology and câncer – São Paulo, Brasil.
- 2012 Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde – São Paulo, Brasil.
- 2011 Challenge for Integrating Molecular and System Biology, São Paulo, Brasil.
- 2010 XIV Congreso Latinoamericano de Genética – Viña del Mar, Chile.
- 2010 56º Congresso Brasileiro de Genética – Guarujá, Brasil.
- 2010 X Encontro Paranaense de Genética – Londrina, Brasil.
- 2010 V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos – Petrópolis, Brasil.
- 2010 Ciclo De Palestras: Formação Pedagógica e Científica – Londrina, Brasil.
- 2010 7º Encontro Paranaense de Astronomia – Londrina, Brasil.
- 2009 8º Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde, 4º Encontro Paranaense de Patologia Experimental e 1º Encontro Nacional de Rede de Cooperação das Pós-Graduações em Patologia – Londrina, Brasil.
- 2009 2º Encontro Paranaense de Ciências Biomédicas – Londrina, Brasil.
- 2009 12º Encontro Nacional de Biomedicina – Botucatu, Brasil.
- 2009 II Workshop on Male Reproductive Biology – São Paulo, Brasil
- 2009 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences – Ribeirão Preto, Brasil.
- 2009 Seminário de Ciências Forenses – Londrina, Brasil.
- 2008 11º Encontro Regional de Biomedicina – Botucatu, Brasil.
- 2007 Atualização de temas relevantes para o curso de biologia: curso de biologia do desenvolvimento – Londrina, Brasil.

9.2. ARTIGOS SUBMETIDOS

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

Carolini Kaid, Patricia 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

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in children aged 4 or younger and one of the leading causes of morbidity and mortality related to childhood cancer.^(1,2) This embryonal tumor of the cerebellum, classified by the World Health Organization (WHO) as a grade IV tumor, is highly malignant and often spreads to other brain regions as well as to the spinal cord. The current treatment consisting of surgically removing as much tumor as possible, followed by radiation and chemotherapy, is not effective in approximately one-third of patients, who eventually succumb to the disease.

Although early age and metastatic spread at diagnosis are usually associated with poor survival,⁽³⁾ predictions of prognosis and response to standardized treatments based on clinical parameters have proven difficult. Medulloblastoma cells present a high degree of phenotypic and functional heterogeneity, which may result from stochastic genetic⁽⁴⁾ and/or epigenetic changes,⁽⁵⁾ as well as from interaction between cancer cells and the tumor niche.⁽⁶⁾ Based on molecular and genetic traits, the most recent consensus classification stratifies medulloblastoma in four distinct groups, two of which relate to developmental signaling pathways.⁽⁷⁾

The existence of highly tumorigenic cancer cells displaying stem cell properties in several types of malignant tumors adds another layer of complexity in understanding the mechanisms

underlying inter-tumor and intra-tumor heterogeneity.⁽⁸⁾ Due to their self-renewal and differentiation capability, cancer stem cells may generate different progenies of cancer and stromal cells along tumor development. The continuous process of sub-clonal development and divergence fuels heterogenic aberrant tumor cell behavior, with important impacts on the clinical outcome of patients.⁽⁹⁾ Investigating stemness properties in cancer cells is, therefore, of great relevance to improve medulloblastoma treatment.

As in most embryonal tumors, medulloblastoma cells display primitive cell features, including aberrant function of SHH, NOTCH, WNT and TGFβ1 signaling pathways, which are involved in normal neurodevelopment.⁽¹⁰⁾ Some of these abnormalities are thought to arise from prenatal mutations more likely occurring in neural stem or progenitor-like cells, favoring an increasing genomic instability in those cells.⁽¹¹⁾ Despite the cell of origin, alterations conferring stemness to cells may increase their fitness and favor tumor development.

Certain early driver alterations may also be related to embryonic stem cell (ESC) traits, because these cells display unlimited growth potential and tumorigenicity.⁽¹²⁾ At the molecular level, cancer cells and ESC also share many similarities in their gene expression programs.^(13,14) Indeed, aberrant expression of ESC-related pluripotency factors such as LIN28⁽¹⁵⁾ and OCT4 have

Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma

Márcia Cristina Teixeira Santos,¹ Patrícia Benites Gonçalves Silva,¹
 Carolina Oliveira Rodini,¹ Gabriela Furukawa,¹ David Santos Marco Antonio,¹
 Alfeu Zanotto-Filho,² José C.F. Moreira,² and Oswaldo Keith Okamoto¹

Misexpression of stem cell-related genes may occur in some cancer cells, influencing patient's prognosis. This is the case of medulloblastoma, a common and clinically challenging malignant tumor of the central nervous system, where expression of the pluripotency factor, OCT4, is correlated with poor survival. A downstream target of OCT4, *L1TD1* (LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 family member), encodes a novel embryonic stem cell (ESC)-related protein involved in pluripotency and self-renewal of ESCs. *L1TD1* is still poorly characterized and its expression pattern and function in cancer cells are virtually unknown. Although normally restricted to non-neoplastic undifferentiated cells and germ cells, we found that high *L1TD1* expression also occurs in medulloblastoma cells, reaching levels similar to those found in ESCs, and is correlated with poor prognosis. Conversely to what is reported during normal cell differentiation, when differentiated cells remain healthy, despite *L1TD1* downregulation, depletion of *L1TD1* protein levels by targeted gene silencing significantly reduced medulloblastoma cell viability, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. More strikingly, *L1TD1* depletion downregulated expression of the neural stem cell markers, CD133 and Nestin, inhibited neurosphere generation capability, and sensitized medulloblastoma cells to temozolomide and cisplatin, two chemotherapeutic agents of clinical relevance in medulloblastoma treatment. Our findings provide insights about the contribution of pluripotency-related genes to a more aggressive tumor phenotype through their involvement in the acquisition of stem-like properties by cancer cells and point out *L1TD1* as a potential therapeutic target in malignant brain tumors.

Introduction

SINCE THE EARLY STUDIES with embryonic teratocarcinoma cell injection into mouse blastocysts [1], stem cells and cancer cells have been shown to share common properties, linking normal development and tumorigenesis. While tumor initiating capability is a classic hallmark of non-neoplastic cells displaying pluripotency, either as a natural feature or induced by genetic reprogramming [2,3], in cancer cells, abnormal expression of genes regulating developmental processes enhances their tumorigenicity [4–6].

Expression of pluripotency factors has been reported to be associated with poor prognosis in some cancers. In germ cell tumors [7], enhanced expression of OCT4 has been associated with increased malignant potential [8]. High OCT4 expression also predicts unfavorable clinical outcome in medulloblastoma and gastric cancer [9,10]. Lin28b, an RNA-binding protein, has been implicated in the genesis of Wilms' tumor

[11] and gliomas [12], as well as recurrence of hepatocellular carcinoma [13], and aggressiveness of breast carcinoma [14]. Altogether, these and other recent studies highlight a contribution of pluripotency-related genes toward a more aggressive tumor phenotype, supporting their involvement in the acquisition of a stem-like state in cancer cells.

L1TD1 (LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 family member) is a novel, still poorly characterized, embryonic stem cell (ESC)-related protein. It was originally identified by differential display as an ESC-associated transcript (ECAT) in mouse ESCs and preimplantation embryos [15]. In this same study, the authors characterized other ECATs that later became well-known pluripotency factors, such as Nanog. More recently, *L1TD1* expression was reported to be restricted to the inner cell mass in mouse blastocysts and epiblasts. The authors also found that although upregulated by the enforced expression of the Yamanaka pluripotency factors in somatic cells, *L1TD1* was dispensable

¹Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Biochemistry, Oxidative Stress Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.



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.

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

A. M. Nakahata
Fundação Antônio Prudente, A.C. Camargo Cancer
Center, Rua Tagua, 440,
Liberdade, São Paulo CEP 01508-010, Brazil

H. Matushita
Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo,
Avenida Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 255,
Cerqueira César, São Paulo CEP 05403-000, Brazil

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

Introduction

Primary tumors in the central nervous system (CNS) are frequent in children and adolescents, who have their quality of life significantly affected due to motor, cognitive, and endocrine defects secondary to the

ARTIGO SUBMETIDO PARA *ONCOTARGET***HIGH OCT4A LEVELS DRIVE TUMORIGENICITY AND METASTATIC POTENTIAL OF MEDULLOBLASTOMA CELLS**

Patrícia Benites Gonçalves da Silva¹, Márcia Cristina Teixeira dos Santos¹, Carolina Oliveira Rodini¹, Carolini Kaid¹, Márcia Cristina Leite Pereira¹, Gabriela Furukawa¹, Daniel Sanzio Gimenes da Cruz², Mauricio Barbugiani Goldfeder³, Clarissa Ribeiro Reily Rocha⁴, Carla Rosenberg¹, Oswaldo Keith Okamoto^{1*}

¹Centro 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, CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil

²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87. CEP: 05508-270. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan. Av. Vital Brazil, 1500. CEP 05503-900. Butantã, São Paulo, SP, Brazil

⁴Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. CEP: 05505-900. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding author:

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, CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Phone: (55 11) 3091-7501. Fax: (55 11) 3091-7553. E-mail: keith.okamoto@usp.br.

Running Title: OCT4A and medulloblastoma aggressiveness.

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

ABSTRACT

Medulloblastoma is a highly aggressive pediatric brain tumor, in which expression of the pluripotency factor OCT4 has been recently correlated with poor patient survival. However the contribution of OCT4 transcript variants to tumor aggressiveness is still poorly understood. In this study, we found that transcripts encoding OCT4A, but not OCT4B or OCT4B1, were significantly correlated with LIN28A expression, which encodes another well-known pluripotency factor. LIN28A was found to specifically bind OCT4A transcripts and interact with poly(A) binding protein and RNA helicase A in polysomal fractions of medulloblastoma cells, favoring increased OCT4A protein levels in these cells. Medulloblastoma cells stably overexpressing OCT4A displayed significantly enhanced clonogenic activity, tumorsphere generation and invasion capability, as well as increased tumorigenicity. 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 effects of OCT4A were found to be expression-level dependent and accompanied by distinct chromosomal aberrations and a marked differential expression of non-coding RNAs, including newly discovered, still poorly characterized, long non-coding RNAs and multiple 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.

INTRODUCTION

Primary malignant tumors of the central nervous system (CNS), although rare, are challenging to treat, often leading to severe patient morbidity. Some of these malignant tumors are also associated with significant mortality rates, particularly if not properly treated. This is the case of some WHO Grade IV tumors[1], such as embryonal CNS tumors occurring mostly in pediatric patients[2]. In young children, medulloblastoma is the predominant form of embryonal tumor, which is comprised by densely packed cells with high mitotic activity and ability to spread throughout the CNS[1]. About 40% of medulloblastoma patients already present metastasis at initial diagnosis[3], which further complicates treatment, consisting basically of surgical resection followed by craniospinal radiotherapy and chemotherapy[2].

To minimize the risk of secondary tumors, as well as considerable neurological, vascular, and endocrinal sequels of radiation therapies, children over three years of age with minimum residual disease (average risk group) receive adjuvant radiotherapy at lower doses than children with partial tumor resection and/or metastatic disease (high risk group)[2]. Following adjuvant chemotherapy, up to 60% of high risk patients still experience disease progression or succumb to the disease within 5 years[4]. As recently discussed in the CNS drug discovery and development conference[5], this significant rate of poor treatment response is partly due to the lack of effective drugs capable of reaching infiltrating tumor cells at primary and metastatic sites, and of destroying cells despite tumor heterogeneity. Another complicating factor relates to the high degree of intertumor heterogeneity observed in medulloblastoma, which is currently classified in four distinct molecular subtypes, WNT, SHH, Group 3 and Group 4[6].

Pursuing novel therapeutic targets is also encouraged for medulloblastoma. For this particular purpose, a better knowledge of the basic biology of this important embryonal CNS tumor is crucial. Previous independent studies have shown an intriguing misexpression of the pluripotency-related genes *OCT4*[7], *LIN28B*[8], *SOX2*[9] and *LITDI*[10], in medulloblastoma. In all cases, an aberrant overexpression of either gene was significantly correlated with poor survival. Intriguingly, genome-wide studies in medulloblastoma so far have not described driver mutations in such genes. A recent whole-genome methylation profiling analysis, however, did find a hypomethylation in an alternative promoter of *LIN28B* that was correlated with increased *LIN28B* expression particularly in Group 3 and Group 4 medulloblastomas[8]. These studies support a possible contribution of pluripotency-related genes in medulloblastoma physiopathology, although further functional evidences are needed.

In embryonic stem cells (ESC), LIN28 promotes *OCT4* expression indirectly, by binding its inhibitory microRNA let-7, and through direct binding of *OCT4* transcripts, thereby enhancing their translation[11]. Abnormal expression of *OCT4* has been detected in different types of aggressive cancers[12–14]. In medulloblastoma specimens, in particular, increased *OCT4* expression was shown capable of discriminating average risk patients with poorer survival typical of high risk patients[7]. Despite this prognostic value, direct evidences of *OCT4* contribution to more aggressive traits in medulloblastoma are missing.

The *OCT4* transcription factor is encoded by the *POU5F1* gene located in chromosome 6. Alternative splicing of the *POU5F1* primary transcript generates five transcript variants, encoding the isoforms OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265, OCT4B-164 and OCT4B1[15–17]. OCT4A is the most studied and described isoform, originally reported as a regulator of ESC pluripotency and self-renewal[18], while OCT4B and OCT4B1 functions are still uncertain. There are reports of OCT4B and OCT4B1 involvement with genotoxic stress and anti-apoptotic properties[16,19], but no clear association with stemness[20]. The identity of the *OCT4* isoform predominantly involved in cancer is still elusive since no distinction has been made in most studies reporting *OCT4* misexpression in tumors[13,21,22].

In light of these recent observations, when evaluating expression of *OCT4* transcript variants in medulloblastoma, we found a specific correlation between OCT4A and poor survival as well as a potent oncogenic activity for OCT4A, through a mechanism involving LIN28A and novel non-coding RNAs. These findings highlight the involvement of OCT4A in a mechanism driving aggressiveness of medulloblastoma, which could be further explored not only as a prognostic indicator, but also as a therapeutic target for a precision medicine approach in neuro-oncology.

RESULTS

LIN28A specifically interacts with OCT4A transcripts and affects OCT4A protein levels in medulloblastoma cells

Expression of Lin28A and OCT4 was previously found correlated in medulloblastoma samples from patients[7]. Here, a more detailed analysis revealed that, from all alternative *POU5F1* transcripts investigated, only OCT4A transcript levels significantly correlated with Lin28A expression in clinical medulloblastoma specimens (Figure 1A). Furthermore, RNA co-immunoprecipitation assays confirmed a stronger interaction between LIN28A and OCT4A transcripts, while OCT4B1 and OCT4B

transcripts displayed a weaker interaction with LIN28A. As controls, the precursor microRNA LET7a (pre-LET7a) was efficiently co-immunoprecipitated with LIN28A, while C-MYC did not interact, as expected (Figure 1B). These results suggest that LIN28A has a greater affinity towards the OCT4A isoform.

Based on previous evidences of LIN28 function on OCT4 translation in ESC[11] and on the results of LIN28A interaction with OCT4A described above, we next evaluated a possible OCT4A translational activation role of LIN28A in medulloblastoma cells. Our protein-protein interaction assays demonstrated that LIN28A interacts with Poly(A) binding protein and RNA helicase A in medulloblastoma cells (Figure 1C). Polysomal profiling analysis also confirmed co-localization of Lin28A with translational complexes. Interestingly, LIN28A was found mostly concentrated in the fractions containing the 80S ribosomal complex and polysomal particles. In these experiments, the protein Actin was used as a negative control (Figure 1D). RNA extracted from the same fractions and analyzed by qPCR confirmed co-sedimentation of OCT4A transcripts with fractions containing LIN28A (Figure 1E).

Finally, transient overexpression of Lin28A in medulloblastoma cells resulted in increased OCT4A protein levels (Figure 1F), strengthening the hypothesis that LIN28A cooperates to enhance OCT4A translation in medulloblastoma cells by a mechanism reminiscent of that described in ESC. However, given that tumor cells may harbor different genetic aberrations, the effectiveness of such mechanism may vary due to the high molecular heterogeneity of medulloblastoma (Figure 1G).

Increased OCT4A levels enhance proliferation, tumorsphere generation capacity and invasion of medulloblastoma cells

Given the previous correlation of OCT4A expression with poor patient survival, we next evaluated whether OCT4A would directly affect aggressive traits of medulloblastoma cells. Stable OCT4A-overexpressing medulloblastoma cell lines were generated and characterized to confirm specific enhancement of OCT4A, at physiological levels[23] (Supplementary Figure S1A-B). Population doubling level (PDL) assays carried out for at least 30 generations revealed a significant decrease in population doubling time of Daoy and D283Med cells upon OCT4A overexpression (Figure 2A). Accordingly, a significant shift in cell cycle towards increased proportion of cells in S and G2/M phases and decreased proportion of cells in G1 was observed for all medulloblastoma cell lines stably overexpressing OCT4A (Figure 2B). These results indicate that OCT4A positively affect proliferation of medulloblastoma cells.

Similar pro-oncogenic effects of OCT4A were observed when cells were cultured as tumor spheroids in 3D assay platforms. OCT4A overexpression significantly enhanced anchorage-independent cell growth (Figure 2C). Not only was the amount of tumor cell colonies significantly increased but also the overall size of these colonies (Figure 2D). Generation of tumorspheres enriched in stem-like cells was also significantly enhanced by OCT4A overexpression (Figure 2E-F). Eventual increment in tumorsphere size was found to be a consequence of sphere expansion and events of sphere fusion, the latter enhanced by the frequency of such tumorspheres in culture (Supplementary VideoS1). Finally, OCT4A overexpression significantly affected adhesion (Figure 3A) and 3D invasion capacity of medulloblastoma cells (Figure 3B-C).

Noteworthy, further assays with clonal cell lines expressing increasing stable levels of OCT4A (basal, moderate and high) revealed that these pro-oncogenic effects are expression-level dependent (Supplementary Figure S2). These results are in agreement with previous clinical evidences, given that, not only frequency, but also increased OCT4 expression, have been correlated with poor survival of medulloblastoma patients[7].

OCT4A contributes to the development of aggressive tumors *in vivo*

OCT4A overexpression significantly aggravated tumor formation and progression, as indicated by both ectopic and orthotopic models of medulloblastoma. When subcutaneously inoculated in Balb/C Nude mice, medulloblastoma cells overexpressing OCT4A generated tumors faster than respective control cells (Figure 4A-B). While Daoy control cell-derived tumors displayed a more homogenous histological phenotype, tumors generated from Daoy OCT4A-overexpressing cells were larger and presented histologic features typical of aggressive tumors, including cells with high nucleus-to-cytoplasm ratio, presence of necrotic areas and inflammatory infiltration (Figure 4C). More striking tumorigenic effects of OCT4A were observed in experiments with the USP-13-Med cell line. USP-13-Med cells overexpressing OCT4A, but not respective control cells, were capable of generating subcutaneous tumors characterized by being highly vascularized and necrotic (Figure 4A-B). Histological analysis of these USP-13-Med-derived tumors confirmed presence of intratumoral hemorrhagic areas with extensive inflammatory infiltration (Figure 4C). Under the same experimental conditions, experiments with D283Med cells were not conclusive since only one out of five animals injected with cells developed subcutaneous tumors in both experimental groups.

Pro-tumorigenic effects of OCT4A were also evident in an orthotopic metastatic model of medulloblastoma, in which OCT4A overexpression was found to significantly affect aggressiveness in tumors derived from all cell lines tested. Clinical symptoms were more frequent or developed earlier in animals injected with OCT4A-overexpressing cells. Similarly, except for Daoy-derived tumors, an increased metastatic spread was observed for OCT4A-overexpressing cells in histological analysis of brain sections (Table 1). Furthermore, tumors derived from OCT4A-overexpressing cells tended to be more developed, more enriched in necrotic areas, and with increased intraparenchymal invasion capability, when compared with tumors generated from control cells (Figure 4D and Supplementary Figure S3A). In the case of D283Med cells, tumor spreading to the spinal cord was found in all animals injected with OCT4A-overexpressing cells, but only in 50% of animals injected with control cells (Table 1 and Supplementary Figure S3B). These results were confirmed by longitudinal *in vivo* imaging studies of medulloblastoma-bearing mice, which showed a bimodal pattern of metastatic tumor foci in the brain and/or distant metastatic foci in the spinal cord occurring predominantly in animals injected with OCT4A-overexpressing cells (Figure 4E). Mice injected with OCT4A-overexpressing cells also displayed shorter survival (Figure 4F). Again, as observed for clonogenic activity and neurosphere generation capability, the positive effects of OCT4A on tumor development were expression-level dependent (Supplementary Figure S4).

Chromosomal aberrations and non-coding RNA expression changes associated with *OCT4A* overexpression

Since chromosomal aberrations are frequently detected in pluripotent stem cells[24], aCGH analyzes were then performed to verify whether OCT4A overexpression would enhance genomic instability in cancer cells. Among the cell lines studied, the highest and lowest levels of OCT4A were detected in Daoy and D283Med cells, respectively. Interestingly, the highest amount of extra chromosomal aberrations associated with OCT4A overexpression was also detected in Daoy cells (39 losses and 23 gains detected). Comparatively, only few additional chromosomal aberrations due to OCT4A overexpression was detected in USP-13-Med (6 gains), while no extra aberrations were observed in D283Med cells. These copy number aberrations are presented in Figure 5A and detailed in Supplementary DataS1. Two chromosome regions were commonly found altered in Daoy and USP-13-Med cell lines after OCT4A overexpression, mapped at 1p32.3 and 9p21.3 (Figure 5B). From these, only 9p21.3 displayed the same type of aberration (amplification) in both cell lines, while a large segment in 1p was deleted in Daoy and a focal high level amplifications comprising only 2 genes (*FAF1*, *CDKN2C*) were observed in USP-13-Med after OCT4A overexpression. The genes located in the affected regions are listed in Supplementary TableS1.

Large scale changes in gene expression also occurred in medulloblastoma cells as a result of OCT4A overexpression. Considering the gene expression profiles of three independent clones of each parental and respective OCT4A-overexpressing cells, a total of 141 genes were found differentially expressed, common to all cell lines evaluated (Supplementary TableS2). Interestingly, only 43 of them encode proteins, including *POU5F1B*, a transcribed pseudogene of *POU5F1* that has been reported to encode a functional protein with transcription factor activity similar to OCT4[25]. The remaining 98 genes (69.5%) were related to non-coding RNAs. Two other transcribed pseudogenes of *POU5F1*, *POU5F1P3* and *POU5F1P4*, for which proteins have not been described, were also differentially expressed (Figure 5C). Functional annotation analysis revealed enrichment of genes involved in cellular movement, cell death and survival, cellular development and cell cycle, which are all important mechanisms in tumor initiation and progression. The chromosomal location of these genes and pseudogenes affected by OCT4A overexpression is depicted in Figure 5D. Further analysis integrating chromosomal aberrations and global gene expression profiling data indicated that only a minor portion of differentially expressed genes/pseudogenes were located in regions with chromosomal copy number changes associated to OCT4A overexpression (Supplementary TableS3-4).

DISCUSSION

In ESC, fine-tune regulation of OCT4 levels is required for pluripotency maintenance or induction of cell differentiation[26]. OCT4 translation is favored by the RNA-binding protein LIN28, which interacts with RNA helicase A and *OCT4* transcripts forming more efficient translation complexes[11]. Both OCT4 and LIN28 have also been implicated in malignancies[7,27,28], but only in a few cases concomitant expression of *OCT4* and *LIN28* have been simultaneously analyzed and correlated with prognosis[29,30]. In our study, a significant positive correlation between expression of *LIN28A* and *OCT4A* was found in medulloblastoma samples. Interestingly, no such correlation with *LIN28A* was found with the other alternative transcripts encoding either OCT4B or OCT4B1 isoforms. Furthermore, in medulloblastoma cells, biochemical assays revealed a preferential binding of LIN28A with OCT4A transcripts. A more detailed analysis demonstrated that LIN28A also interacts with Poly(A) Binding Protein and RNA helicase A in medulloblastoma cells, forming translation complexes in polysomes. Further functional assays demonstrating that *LIN28A* overexpression increases OCT4A protein levels point out a preserved post-transcriptional regulation mechanism that favors *OCT4A* expression in medulloblastoma.

Although high *OCT4* expression has been associated with poor prognosis in different cancers[12–14], little is known about its function in tumorigenesis, particularly in brain tumors. In gliomas, few studies have found a correlation of *OCT4* expression with higher tumor grade[31], although association with patient survival was not found[32]. Studies about *OCT4* isoforms in tumor development and cancer prognosis are even scarcer. Different functions have been proposed for each of these isoforms, including involvement in genotoxic stress[17], apoptosis[19,20], and self-renewal/pluripotency[15]. Lack of isoform discrimination in most studies concerning *OCT4* expression in cancer pathogenesis[21] requires a more careful interpretation and may explain some discrepancies in the literature[33,34]. For instance, some studies reporting *OCT4* as a transcription factor involved in stem cell fate determination and cancer stemness display a predominant cytoplasmic *OCT4* immunostaining[13,22]. Cytoplasmic localization has been proposed for the *OCT4B* isoform, which is implicated in genotoxic stress response, whereas the *OCT4A* isoform involved in pluripotency is nuclear.

In a previous study, we postulated *OCT4* expression as a predictor of poor clinical outcome of medulloblastoma patients, since it could discriminate patients that, despite being clinically stratified as average-risk, displayed a poor overall survival typical of high-risk patients[7]. Now, further functional studies highlight the specific contribution of the *OCT4A* isoform to medulloblastoma traits classically associated with poor prognosis. Given that a significant expression correlation and a functional biochemical interaction with another pluripotency-related protein, *LIN28A*, were also found for *OCT4A* transcripts with implications in *OCT4A* protein levels, a potential contribution of *OCT4A* in medulloblastoma pathogenesis became more evident.

Indeed, when *OCT4A* was stably overexpressed in medulloblastoma cells at physiologically relevant levels, all downstream functional studies supported a significant gain in aggressive tumor traits, namely cell proliferation, 3D invasion behavior, clonogenicity in soft-agar, tumorsphere generation capability, and *in vivo* tumorigenicity. Interestingly, most of these effects were found positively correlated with the level of *OCT4A* expression. These findings are in agreement with the previous correlation found between increased *OCT4* expression and poorer survival of medulloblastoma patients[7]. *Ex vivo* tumorsphere generation capability, in particular, is a stem cell-like property of tumor cells that has been associated with high tumorigenicity[35] and poor clinical outcome of patients with embryonal brain tumors[36].

From the clinical point of view, of particular importance was the fact that *OCT4A* overexpression significantly enhanced medulloblastoma cell mobility properties *in vitro*, as well as metastatic spread in the neuroaxis, including capacity of tumor colonization in the spinal cord. Among primary malignant brain tumors, medulloblastoma is one of the most metastatic. Presence of metastasis at diagnosis is a classic indicator of poor prognosis in medulloblastoma patients. Tumor spread is mostly detected within the neuroaxis, where initial presence of tumor cells in the liquor progressively form nodular metastasis in supratentorial regions and/or in the spinal cord, the latter site representing the highest stage of tumor spreading (M3). Extracranioaxial metastases (M4) are rare and associated with more advanced disease without proper treatment[4].

Notably, almost 70% of all differentially expressed genes commonly found in medulloblastoma cell lines overexpressing *OCT4A* are related to non-coding RNAs, many of which recently catalogued and with unknown functions or implications in tumorigenesis. Some of them are involved in RNA metabolism and transport, such as the vault-RNA *VTRNA2-1*, which was reported to have either tumor suppressor[37] or protooncogenic activity[38]. Given the emergent relevance of long non-coding RNAs in regulating ESC pluripotency[39] and their recent involvement in cancer stem cells[40], it was also intriguing the disturbance found in the expression of 23 long non-coding RNAs of unknown function, as a consequence of *OCT4A* overexpression in medulloblastoma. Another class of enriched non-coding RNA was small nucleolar RNAs (snoRNA), comprising approximately 25% of genes found differentially expressed after *OCT4A* overexpression. Although snoRNAs are primarily involved with rRNA modifications, other functions in chromatin remodeling, alternative splicing and as precursors of miRNAs have also been reported[41–43]. Interestingly, disturbances in the expression of some snoRNAs are correlated with human diseases, particularly cancer[41,43,44]. Elevated levels of *SNORD14C* have been suggested as prognostic marker of high risk squamous cell carcinomas of the larynx[45], while downregulation of *SNORD59A* was found in prostate cancer specimens[46]. Some differently expressed snoRNAs were associated with poor survival of lung cancer patients and snoRA42, in particular, was implicated in self-renewal and tumorigenesis of lung tumor initiating cells[47]. Similarly, in the present study, *OCT4A* overexpression was found to alter the expression of 36 snoRNAs in medulloblastoma cells, three of which, *SNORA18*, *SNORA62* and *snoRD96A*, previously reported as components of a molecular signature of lung tumor initiating cells[47].

Among the protein-coding genes identified, high expression levels of *GNL3* (also known as *NS*, encoding the protein Nucleostemin) were observed after *OCT4A* overexpression. Interestingly, Nucleostemin is a nucleolar protein reported with important role in self-renewal of ESC[48,49] and neuroprogenitors[49,50]. Ectopic overexpression of *NS* induces dedifferentiation of somatic cells and reprogramming to a pluripotent stem cell state[48]. In cancer, increased Nucleostemin levels were correlated

with high grade gliomas[51] and with cancer cells displaying enhanced tumor initiating capability[52–54]. Moreover, alterations in cell proliferation, invasion and metastasis have been observed after manipulation of *NS* expression, indicating its contribution to pro-tumorigenic properties of gliomas, oral squamous cell carcinoma, as well as breast and gastric cancer [51–53,55,56].

Increased genomic instability has also long been associated with poor cancer prognosis. OCT4 is highly expressed in normal pluripotent stem cells which, as cancer cells, are genomically unstable and present many different chromosomal abnormalities over the course of their *in vitro* expansion[24]. In medulloblastoma cells, OCT4A overexpression was also associated with increased chromosomal instability. Copy number aberrations, however, varied in frequency and type according to the cell line, apparently in an expression level-dependent manner. Two common mutated regions, 1p32.3 and 9p23.1, were detected in Daoy and USP-13-Med cells overexpressing OCT4A. Interestingly, trisomies of chromosomes 1 and 9 have been reported in human somatic cells after reprogramming to a pluripotent state[57]. However, the vast majority of differentially expressed genes detected in highly aggressive OCT4A overexpressing medulloblastoma cells were not located in chromosomal regions further disturbed in those cells. Altogether, these results indicate that increased OCT4A levels significantly enhance medulloblastoma cell aggressiveness through independent underlying mechanisms involving differential expression of non-coding RNAs, mainly snoRNAs, and heterogeneous genomic aberrations. Our findings support the relevance of pluripotency-related factors in the aggravation of medulloblastoma development, as well as the prognostic and therapeutic value of OCT4A in this challenging type of pediatric brain cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Patients Sample

Medulloblastoma cell lines Daoy and D283Med were purchased directly from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultivated as previously described[23]. USP-13-Med is a patient-derived cell line established in our group and its cultivation method and characterization were described previously[58]. The H9 cell line of human ESC (hESC) was kindly provided by Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LANCE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and cultivated under standard conditions, as previously described[59]. Cultures were maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C and subcultivated when 80% of confluence was reached.

Co-immunoprecipitation of RNAs

Total cellular extracts were prepared from DAOY cells and added to IgG-Sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or IgG Sepharose beads conjugated with anti-LIN28A antibody (ABcam, Cambridge, UK). Immunoprecipitation was performed at 4°C for 4 h. IgG-Sepharose beads were washed with buffer containing 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 5 mM magnesium chloride, 0.1% Nonidet P-40, 150 mM sodium chloride, 1 mM DTT and protease inhibitors. After immunoprecipitation, the material was split to RNA and Protein extraction.

Quantitative Real Time PCR

The RNA obtained by Co-immunoprecipitation was isolated from bound fractions using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). After RNA extraction, cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA). Cell culture RNA was extracted from samples using RNeasy® Mini Kit (Qiagen) and genomic DNA was removed by treating with DNase I following manufacturer recommendations. RNA samples were reverse transcribed into cDNA using SuperScript® II Reverse Transcriptase System (Lifetechnologies) according to manufacturer's instructions. Primers were designed to specifically amplify OCT4A, OCT4B, and OCT4B1. Their specificity was determined by melting curve analysis, amplicons electrophoresis and sequencing (Supplementary Figure S5). Reactions were done in triplicate using Power SYBR Green Master Mix (Lifetechnologies) on Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System. Quantitative analyses were performed using relative quantification curve which human embryonic stem cell (H9) was used as positive control. Primers sequence are listed in Supplementary Table S5.

Western Blot

The protein extracts were submitted to western blotting standard protocol. Proteins were transferred to poly(vinylidene) difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare). The antibodies used were anti-LIN28A, anti-PABP and anti-RHA (ABcam), mouse anti-OCT4A antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA), anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and anti-beta Actin HRP-linked antibody (ABcam). The immunoblots were developed using the Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA).

Polysome Profile Analysis

For polysome profile analysis cell extracts from Daoy cells was used. Following addition of cycloheximide (100 µg/mL) to the cultures, cells were harvested and suspended in breaking buffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 200 µg/mL heparin, 100 µg/mL cycloheximide, 1 mM PMSF) and lysed. Polysomes were separated by centrifugation at 190,000xg for 3 hours at 4 °C with a Beckman SW41 rotor. Gradients were fractionated and monitored at 254 nm with an absorbance monitor (BioRad, Hercules, CA, USA). Analysis of free ribosome subunits was performed using breaking buffer B (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 400 mM EDTA, 1 mM PMDF, 1 mM DTT, 200 µg/mL heparin, 100 µg/mL cycloheximide). Proteins from each fraction (500 µL) were precipitated with 15% trichloroacetic acid and analyzed by western blot with specific antibodies.

LIN28A and OCT4A Overexpression

LIN28A was transiently overexpressed in Daoy and D283Med after cell transfection with a plasmid containing LIN28A fused to a GFP tag. The GFP empty plasmid was used as a negative control. Cell extracts expressing either GFP or GFP-LIN28A were generated in buffer containing 50mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 0.2% v/v Triton X-100, 1mM PMSF. All medulloblastoma cell lines underwent stable OCT4A overexpression by retroviral transduction. Briefly, HEK 293-T cells were transfected with 10% Polyethylenimine (PEI), 700 ng/mL CMV-GP plasmid, 350 ng/mL VSVG plasmid and 1 µg/mL OCT4A plasmid. Viral supernatant was collected after 48 hours, concentrated by ultracentrifugation (60,000 × g for 2 hours) and suspended in residual media overnight. Medulloblastoma cells were exposed to retroviral particles for 24 hours and expanded in culture for further analysis.

Population Doubling Level

To evaluate the proliferative profile of medulloblastoma cells after OCT4A overexpression, a cumulative population doubling level (PDL) was performed as previously described[58]. The PDL of parental Daoy and USP13-Med cells, under the same experimental conditions, are known[58].

Cell Cycle Analysis

The cell cycle was analyzed using Cell Cycle Reagent Kit (Millipore) following manufacturer's procedure. The cell cycle was previously synchronized by serum starvation. Analysis were performed using Guava EasyCyte 5HT™ Flow Cytometer and GuavaSoft 2.1 software (Millipore).

Soft Agar Colony Formation Assay

Single cells at low density (52.63 cells per cm²) were seeded over a coating of 0.6% agarose solution containing supplemented media at normal conditions. The cells were allowed to set up for 10 minutes at room temperature and then covered by a 0.3% agarose solution. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ humidified atmosphere and media were replaced every 3-4 days. After 15 days, colonies over 50 µm were counted.

Tumorsphere Formation Assay

Cells were seeded into a 96-well ultra-low attachment plate (Corning, Corning, NY, USA) in DMEM/F12 supplemented with B-27, N-2, 20 ng/mL of EGF and 20 ng/mL of bFGF. The tumorspheres were counted after 7 days of incubation at 37°C with 5% CO₂ humidified atmosphere. Time-lapse of tumorsphere formation was conducted every 30 minutes for 4 days.

Adhesion Assay

Cells at a density of 8x10³/mL were allowed to attach into a 24 well-plate. D283Med were plated in 96 well-plate previously coated with Poly-L-ornithine 0.01% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Non-attached cells were discarded after 45 minutes and residual cells were incubated with MTT solution (166.67 µg/mL; Sigma-Aldrich) for 4 hours at 37°C. As control of total adhesion, cells were not discarded after 45 minutes. The supernatant was discarded and formazan crystals were dissolved with DMSO. The optical density was measured at 560 nm.

3D Spheroid Invasion Assay

Spheroid invasion capacity was evaluated using Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) following the manufacturer's recommendation. Invasion area of the spheroids was measured as recommended by the manufacturer on days 0, 1, 3, 5 and 7 after invasion matrix addition. The D283Med cell line was not included in this assay since these cells fail to form spheroids under such experimental condition[23].

Subcutaneously Tumor Xenograft Assay

Female Balb/C Nude mice were inoculated subcutaneously in the right flank with 2×10^6 cells. Tumor growth were observed and measured weekly. Paraffin sections were subjected to standard H.E. procedures and analyzed under a light microscope.

In vivo Metastasis assay

The model used was adapted from Studebaker et al.[60]. Briefly, cells (1×10^6) contained in 4-6 μL were stereotaxically injected in the right lateral ventricle of female Balb/C Nude mice in a ratio of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. The coordinates used were 1 mm to the right and 0.5 mm posterior of the bregma and 2.2 mm of depth. Animals were euthanized after 50 days of inoculation or after the development of neurological deficits and/or excessive body weight loss. The study was approved by the ethics committee for animal research of the University of São Paulo (CEUA protocol no. 132/2011). The brain and medulla were collected to standard H.E. procedure. A total of 10 sections were obtained randomly from each brain and medulla to analyze the presence of metastasis. Metastasis classification was based on M-Stage proposed by Chang[4].

Tumor development was also assessed by *in vivo* imaging using a bioluminescence-based method with the IVIS Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Medulloblastoma cells were engineered to constitutively express firefly luciferase using pLV/Luc lentiviral vector, described by Rocha et al. [61] and orthotopically injected in Balb/C Nude mice as described above. Bioluminescence images were taken every week after intraperitoneal injection of 1.5 mg D-luciferin (Promega, Madison, WI, USA) in PBS. Tumor burden was calculated by the Living Image 3.1.0 software (PerkinElmer).

Array-CGH

DNA was extracted using standard chloroform / phenol protocol. Array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) was performed for detecting copy number alterations using 60K whole-genome platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All procedures were carried out following the manufacturer's recommendation. Microarray scanned images were processed using the Feature Extraction Software and copy number aberrations (CNAs) were called using the statistical algorithm ADM-2 (sensitivity threshold: 6.7) in Genomic Workbench 6.9.6 Software (both from Agilent Technologies). Chromosome deletions and duplications were considered when \log_2 ratio of Cy3/Cy5 intensities were detected < -0.3 and > 0.3 , respectively. Hybridizations were carried out using the OCT4A overexpressing cell lines as test samples and their corresponding tumor parental cells as reference sample.

Global gene expression analysis

Total RNA of 2-3 clones of each cell line (Control and OCT4A overexpression) was extracted with the RNeasy kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. Gene expression profiling were carried out independently for each sample using Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST whole-transcript arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The quality control and normalization of data were processed by Affymetrix® Expression Console Software (Affymetrix). Differentially expressed genes were identified with the One-Way ANOVA, with a p-value cutoff of 0.05, using Transcriptome Analysis Console v3.0 (Affymetrix). Functional Annotation was conducted on Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen). Raw data is available at GEO with accession number: GSE77947.

Statistical Analysis

Unpaired Student's t test and Spearman's rank correlation coefficient were performed with Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was established at $p < 0.05$ level in all analyzes. Experiments were conducted in triplicate and three independent experiments were carried out. Data are presented as the mean \pm SEM.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Silvia Souza da Costa and Karina Griesi-Oliveira, for their technical assistance, and Prof. Carlos F. Menck for his helpful comments.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors disclose no potential conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants: FAPESP-CEPID (2013/08028-1), FAPESP (2010/52686-5), FAPESP Fellowships: 2011/05534-8, 2013/17566-7, 2011/51588-2, 2011/10001-9, 2013/02983-1;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants: CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8);

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Grant FINEP-CTC (0108057900)

REFERENCES

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40: 356–65. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.010
- Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJH, Witt H, Croul S, Bouffet E, Fults DW, Eberhart CG, Garzia L, Van Meter T, Zagzag D, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature.* 2012; 482: 529–33. doi: 10.1038/nature10825
- Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, Allen JC, Stevens KR, Stanley P, Li H, Wisoff JH, Geyer JR, McGuire-Cullen P, et al. Metastasis Stage, Adjuvant Treatment, and Residual Tumor Are Prognostic Factors for Medulloblastoma in Children: Conclusions From the Children's Cancer Group 921 Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 832–.
- Levin VA, Tonge PJ, Gallo JM, Birtwistle MR, Dar AC, Iavarone A, Paddison PJ, Heffron TP, Elmquist WF, Lachowicz JE, Johnson TW, White FM, Sul J, et al. CNS Anticancer Drug Discovery and Development Conference White Paper. *Neuro Oncol.* 2015; 17 Suppl 6: vi1–26. doi: 10.1093/neuonc/nov169
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho Y-J, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012; 123: 465–72. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z
- Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, de Souza JES, Cavalheiro S, Toledo SRC, Okamoto OK. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol.* 2012; 106: 71–9. doi: 10.1007/s11060-011-0647-9
- Hovestadt V, Jones DTW, Picelli S, Wang W, Kool M, Northcott PA, Sultan M, Stachurski K, Ryzhova M, Warnatz H-J, Ralser M, Brun S, Bunt J, et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature.* 2014; 510: 537–41. doi: 10.1038/nature13268
- Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, Kushida M, Head R, Morrissy S, Zhu X, Aviv T, Voisin V, Clarke ID, et al. Quiescent Sox2(+) Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *Cancer Cell.* Elsevier; 2014; 26: 33–47. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.005
- Santos MCT, Silva PBG, Rodini CO, Furukawa G, Marco Antonio DS, Zanotto-Filho A, Moreira JCF, Okamoto OK. Embryonic Stem Cell-Related Protein LIT1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. *Stem Cells Dev.* 2015; 24: 2700–8. doi: 10.1089/scd.2015.0052
- Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y. Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 1240–8. doi: 10.1093/nar/gkp1071
- Yin X, Li Y-W, Jin J-J, Zhou Y, Ren Z-G, Qiu S-J, Zhang B-H. The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2013; 5: 1155–62. doi: 10.3892/ol.2013.1151
- Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 3488–98. doi: 10.1245/s10434-009-0617-z
- Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, Lu J, Fan X, Zhu S, Wang Y, Guo Q, Wang L, Huang Y, et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 2013; 340: 113–23. doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.009
- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziace SAM, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 3068–74. doi: 10.1634/stemcells.2008-0530

16. Gao Y, Wang X, Han J, Xiao Z, Chen B, Su G, Dai J. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *J Genet Genomics*. 2010; 37: 461–5. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60065-5
17. Farashahi Yazd E, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaei M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. *Cancer Lett*. 2011; 309: 170–5. doi: 10.1016/j.canlet.2011.05.027
18. Tsai SC, Chang DF, Hong C-M, Xia P, Senadheera D, Trump L, Mishra S, Lutzko C. Induced overexpression of OCT4A in human embryonic stem cells increases cloning efficiency. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014; 306: C1108–18. doi: 10.1152/ajpcell.00205.2013
19. Asadzadeh J, Asadi MH, Shakhssalim N, Rafiee M-R, Kalhor HR, Tavallaei M, Mowla SJ. A plausible anti-apoptotic role of up-regulated OCT4B1 in bladder tumors. *Urol J*. 2012; 9: 574–80.
20. Li S-W, Wu X-L, Dong C-L, Xie X-Y, Wu J-F, Zhang X. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PLoS One*. 2015; 10: e0118033. doi: 10.1371/journal.pone.0118033
21. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*. 2010; 28: 885–93. doi: 10.1002/stem.419
22. Hatefi N, Nouraei N, Parvin M, Ziaee S-AM, Mowla SJ. Evaluating the expression of oct4 as a prognostic tumor marker in bladder cancer. *Iran J Basic Med Sci*. 2012; 15: 1154–61.
23. Kaid C, Silva PBG, Cortez BA, Rodini CO, Semedo-Kuriki P, Okamoto OK. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. *Cancer Sci*. 2015; 106: 1188–95. doi: 10.1111/cas.12733
24. Ben-David U. Genomic instability, driver genes and cell selection: Projections from cancer to stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1849: 427–35. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.005
25. Panagopoulos I, Möller E, Collin A, Mertens F. The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1. *Oncol Rep*. 2008; 20: 1029–33.
26. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000; 24: 372–6. doi: 10.1038/74199
27. Sawant S, Gokulan R, Dongre H, Vaidya M, Chaukar D, Prabhaskar K, Ingle A, Joshi S, Dange P, Joshi S, Singh AK, Makani V, Sharma S, et al. Prognostic role of Oct4, CD44 and c-Myc in radio-chemo-resistant oral cancer patients and their tumorigenic potential in immunodeficient mice. *Clin Oral Investig*. 2015; . doi: 10.1007/s00784-015-1476-6
28. Jakobiec FA, Kool M, Stagner AM, Pfister SM, Eagle RC, Proia AD, Korshunov A. Intraocular Medulloepitheliomas and Embryonal Tumors With Multilayered Rosettes of the Brain: Comparative Roles of LIN28A and C19MC. *Am J Ophthalmol*. 2015; 159: 1065–74.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2015.03.002
29. Peng S, Maible NJ, Huang Y. Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 2153–9. doi: 10.1038/onc.2009.500
30. Ma W, Ma J, Xu J, Qiao C, Branscum A, Cardenas A, Baron AT, Schwartz P, Maible NJ, Huang Y. Lin28 regulates BMP4 and functions with Oct4 to affect ovarian tumor microenvironment. *Cell Cycle*. 2013; 12: 88–97. doi: 10.4161/cc.23028
31. Holmberg J, He X, Peredo I, Orrego A, Hesselager G, Ericsson C, Hovatta O, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, Nistér M, Muhr J. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PLoS One*. 2011; 6: e18454. doi: 10.1371/journal.pone.0018454
32. Elsir T, Edqvist P-H, Carlson J, Ribom D, Bergqvist M, Ekman S, Popova SN, Alafuzoff I, Ponten F, Nistér M, Smit A. A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: Identification of Nanog as a predictor of survival. *Int J Cancer*. 2014; 134: 1123–31. doi: 10.1002/ijc.28441
33. Yang S, Zheng J, Ma Y, Zhu H, Xu T, Dong K, Xiao X. Oct4 and Sox2 are overexpressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. *Oncol Rep*. 2012; 28: 186–92. doi: 10.3892/or.2012.1765
34. Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SMR, Matsumoto D, Nakamura Y, Ohira M, Yokoi S, Nakagawara A. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci*. 2015; 106: 840–7. doi: 10.1111/cas.12677
35. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432: 396–401. doi: 10.1038/nature03128
36. Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Yong WH, Cloughesy TF, Lazareff JA, Mischel PS, Moore TB, Kornblum HI. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passagable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 55: 644–51. doi: 10.1002/pbc.22627

37. Lee H-S, Lee K, Jang H-J, Lee GK, Park J-L, Kim S-Y, Kim S-B, Johnson BH, Zo JI, Lee J-S, Lee YS. Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget. Impact Journals*; 2014. p. 3472–81.
38. Kong L, Hao Q, Wang Y, Zhou P, Zou B, Zhang Y. Regulation of p53 expression and apoptosis by vault RNA2-1-5p in cervical cancer cells. *Oncotarget. Impact Journals*; 2015. p. 28371–88.
39. Bergmann JH, Li J, Eckersley-Maslin MA, Rigo F, Freier SM, Spector DL. Regulation of the ESC transcriptome by nuclear long non-coding RNAs. *Genome Res*. 2015; 25: 1336–46. doi: 10.1101/gr.189027.114
40. Gui X, Li H, Li T, Pu H, Lu D. Long Noncoding RNA CUDR Regulates HULC and β -Catenin to Govern Human Liver Stem Cell Malignant Differentiation. *Mol Ther*. 2015; 23: 1843–53. doi: 10.1038/mt.2015.166
41. McMahon M, Contreras A, Ruggero D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 6: 173–89. doi: 10.1002/wrna.1266
42. Makarova JA, Ivanova SM, Tonevitsky AG, Grigoriev AI. New functions of small nucleolar RNAs. *Biochem Biokhimiia*. 2013; 78: 638–50. doi: 10.1134/S0006297913060096
43. Thorenor N, Slaby O. Small nucleolar RNAs functioning and potential roles in cancer. *Tumour Biol*. 2015; 36: 41–53. doi: 10.1007/s13277-014-2818-8
44. Mannoor K, Liao J, Jiang F. Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826: 121–8. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.005
45. Mirisola V, Mora R, Esposito AI, Guastini L, Tabacchiera F, Paleari L, Amaro A, Angelini G, Dellepiane M, Pfeffer U, Salami A. A prognostic multigene classifier for squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer Lett*. 2011; 307: 37–46. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.013
46. Ho S-M, Cheong A, Lam H-M, Hu W-Y, Shi G-B, Zhu X, Chen J, Zhang X, Medvedovic M, Leung Y-K, Prins GS. Exposure of Human Prostatospheres to Bisphenol A Epigenetically Regulates SNORD Family Noncoding RNAs via Histone Modification. *Endocrinology*. Endocrine Society Washington, DC; 2015; 156: 3984–95. doi: 10.1210/en.2015-1067
47. Mannoor K, Shen J, Liao J, Liu Z, Jiang F. Small nucleolar RNA signatures of lung tumor-initiating cells. *Mol Cancer*. 2014; 13: 104. doi: 10.1186/1476-4598-13-104
48. Qu J, Bishop JM. Nucleostemin maintains self-renewal of embryonic stem cells and promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *J Cell Biol*. 2012; 197: 731–45. doi: 10.1083/jcb.201103071
49. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells*. 2009; 27: 1066–76. doi: 10.1002/stem.44
50. Meng L, Lin T, Peng G, Hsu JK, Lee S, Lin S-Y, Tsai RYL. Nucleostemin deletion reveals an essential mechanism that maintains the genomic stability of stem and progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 11415–20. doi: 10.1073/pnas.1301672110
51. Bao Z, Wang Y, Yang L, Wang L, Zhu L, Ban N, Fan S, Chen W, Sun J, Shen C, Cui G. Nucleostemin promotes the proliferation of human glioma via Wnt/ β -Catenin pathway. *Neuropathology*. 2015; . doi: 10.1111/ncup.12265
52. Lin T, Meng L, Li Y, Tsai RYL. Tumor-initiating function of nucleostemin-enriched mammary tumor cells. *Cancer Res*. 2010; 70: 9444–52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2159
53. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 20388–93. doi: 10.1073/pnas.1015171108
54. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, et al. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 17163–8. doi: 10.1073/pnas.0905016106
55. Yoshida R, Fujimoto T, Kudoh S, Nagata M, Nakayama H, Shinohara M, Ito T. Nucleostemin affects the proliferation but not differentiation of oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2011; 102: 1418–23. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01935.x
56. Wu H, Wang W, Tong S, Wu C. Nucleostemin regulates proliferation and migration of gastric cancer and correlates with its malignancy. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 17634–43.
57. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti J-C, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, Benvenisty N. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 521–31. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.017

58. Silva PBG da, Rodini CO, Kaid C, Nakahata AM, Pereira MCL, Matushita H, Costa SS da, Okamoto OK. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology*. 2015;. doi: 10.1007/s10616-015-9914-5
59. Suzuki DE, Nakahata AM, Okamoto OK. Knockdown of E2F2 Inhibits Tumorigenicity, but Preserves Stemness of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2014; : 1–31. doi: 10.1089/scd.2013.0592
60. Studebaker AW, Hutzen B, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, Raffel C. Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2012; 14: 459–70. doi: 10.1093/neuonc/nor231
61. Rocha CRR, Garcia CCM, Vieira DB, Quinet A, de Andrade-Lima LC, Mumford V, Belizário JE, Menck CFM. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1505. doi: 10.1038/cddis.2014.465

Table 1.

	Daoy		D283Med		USP-13-Med	
	Control	OCT4A	Control	OCT4A	Control	OCT4A
No of animals with clinical symptoms	3/5	5/5	4/4	3/3	7/8	8/10
Days to the onset of clinical symptoms	40.67 ± 2.31	24.40 ± 9.90*	73.8 ± 6.46	37.60 ± 5.32*	49.43 ± 9.38	50.00 ± 9.15
No of animals with M2	2/3	2/3	2/4	0/3	1/4	3/5
No of animals with M3	0/5	4/5	2/4	3/3	1/4	1/5

*M2 and M3 correspond to progressive stages of medulloblastoma metastasis according to Chang's staging system.

FIGURE CAPTIONS

Table 1. Clinical and pathological parameters of BALB/c nude mice bearing orthotopically implanted human medulloblastoma cells.

Figure 1. LIN28A regulates OCT4A isoform post-transcriptionally and enhances OCT4A translation in medulloblastoma. **(A)** Significant positive correlation between LIN28A and OCT4A expression in medulloblastoma specimens. **(B)** LIN28A specifically binds OCT4A transcripts. LIN28A was immunoprecipitated (IP) from Daoy cell extracts and the corresponding bound RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. Pre-Let-7a and C-MYC transcripts were respectively used as positive or negative controls of specific LIN28A RNA binding. **(C)** LIN28A interacts with PABP – Poly(A) Binding Protein and RHA – RNA Helicase A. Protein detection by Western Blot. TE - Total Extract from Daoy cells, FT - Flow Through fraction and IP - Immunoprecipitated Fraction. **(D)** Polysomal profiling of Daoy cells. Detection of LIN28A cosedimenting with 40S, 60S, 80S ribosomal particles and polysomal fractions by Western Blot. Actin was used as a control of protein not involved in translation. **(E)** Detection of Oct4A transcripts cosedimenting with LIN28A within 80S and polysomal fractions of polysomal gradients. **(F)** Western Blot of cell extracts from Daoy and D283Med cells overexpressing LIN28A reveal a positive upregulation of OCT4A protein levels by LIN28A in medulloblastoma. **(G)** Densitometry of Western Blot protein bands showing increased levels of OCT4A upon LIN28A overexpression in Daoy and D283Med cells. The bars represent mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 2. OCT4A overexpression increases medulloblastoma cell proliferation and tumorsphere generation *in vitro*. **(A)** Comparative population doubling levels of parental and OCT4A-overexpressing cells after at least 30 generations. **(B)** Cell cycle analysis by flow cytometry displaying a lower proportion of cells in G1 phase and increased proportion of cells in S and/or G2/M in medulloblastoma OCT4A-overexpressing cells. The bars represent mean \pm SEM of three independent experiments done in triplicate. **(C)** OCT4A overexpression and enhanced medulloblastoma cell clonogenicity. Bar graph indicates the total amount of cell colonies generated under anchorage-independent growth conditions. Only colonies larger than 50 μm were counted. The bars represent mean \pm SEM of two independent experiments done in triplicate. **(D)** General aspect of Daoy, D283Med and USP-13-Med colonies. Colonies of OCT4A-overexpressing cells were increased in size. **(E)** Medulloblastoma OCT4A-overexpressing cells also displayed significantly enhanced tumorsphere generation capability. The bars represent mean \pm SEM of three independent experiments done in triplicate. **(F)** Representative images of medulloblastoma tumorspheres. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3. OCT4A significantly potentiates medulloblastoma cell motility. **(A)** Tumor cells overexpressing OCT4A exhibited significantly reduced adhesion properties. The bars represent mean \pm SEM of three independent experiments done in triplicate. **(B)** 3D cell invasion assay with OCT4A-overexpressing cells displaying a significantly enhanced invasive behavior. Data are displayed as area of invading protrusions emerging from the initial tumor spheroid area. Blue: Control (parental cells); Red: OCT4A-overexpressing cells. The curves represent mean \pm SEM of three independent experiments done in quadruplicate. **(C)** Representative images of tumor spheroid cells invading the hydrogel matrix at days 1, 3, 5 and 7. *Bar size: 400 μm .* * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 4. OCT4A overexpression significantly enhances tumorigenicity of medulloblastoma cells. **(A)** Kinetics of tumor growth after subcutaneous inoculation of medulloblastoma cells in BALB/c nude mice. OCT4A-overexpressing cells generated more developed tumors at a faster pace than corresponding control cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **(B)** Representative images of subcutaneous tumors resected after 90 or 120 days post-injection of Daoy or USP-13-Med cells, respectively. Control USP-13-Med cells and D283Med cells did not generate palpable subcutaneous tumors under the experimental conditions tested. **(C)** Histological analysis showing typical aggressive features, including extensive necrotic and hemorrhagic areas, in subcutaneous tumors from OCT4A-overexpressing cells. **(D)** Representative images of histological brain sections from BALB/c nude mice bearing orthotopically implanted medulloblastoma cells. Local tumor cell invasion was typically observed in brain tumors generated from OCT4A-overexpressing cells. **(E)** Bioluminescence-based detection of medulloblastoma cells orthotopically injected in BALB/c nude mice.

Images were taken three or four weeks after the intracerebroventricular injection of Daoy or USP-13-Med cells, respectively. Multiple small tumor foci, including spreading to the spinal cord were more frequent in mice injected with OCT4A-overexpressing cells. **(F)** Kaplan-Meier curves showing shorter overall survival rates for BALB/c nude mice bearing orthotopically implanted OCT4A-overexpressing cells.

Figure 5. Molecular alterations induced by OCT4A overexpression in medulloblastoma cells. **(A)** Differences in copy number profiles of the OCT4A overexpressed cells compared to their parental tumor cells. All chromosomes from 1p (left) to 22q, X and Y are represented. The blue bars above and below the middle lines (zero or no difference) represent more and less copy numbers, respectively. **(B)** Differences in copy number profiles of chromosomes 1 and 9 for OCT4A overexpressed medulloblastoma cell lines. Daoy, differences are highlighted in Green and USP-13-Med in Orange. **(C)** Cluster analysis of commonly differentiated expressed genes due to OCT4A overexpression. D: Daoy Control; DM: D283Med Control; U: USP-13-Med Control; D Oct: Daoy overexpressing OCT4A; DM Oct: D283Med overexpressing OCT4A; U Oct: USP-13-Med overexpressing OCT4A. Data are presented as average normalized signal in Log₂. Genes were functionally classified according to Ensembl definition. **(D)** Chromosomal location of commonly differentiated expressed genes after OCT4A overexpression in Daoy, D283Med and USP-13-Med cells.

Figure 1

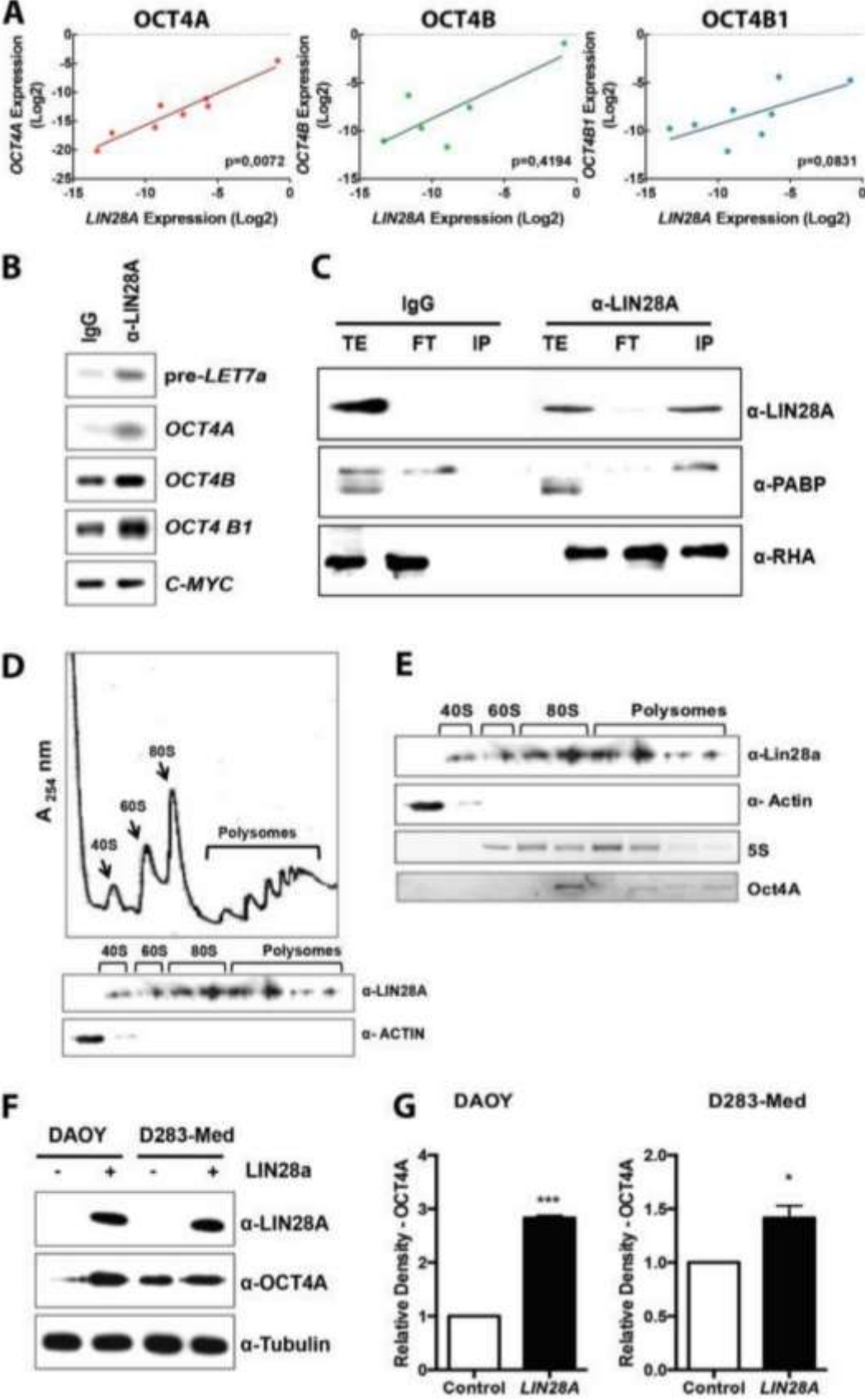


Figure 2

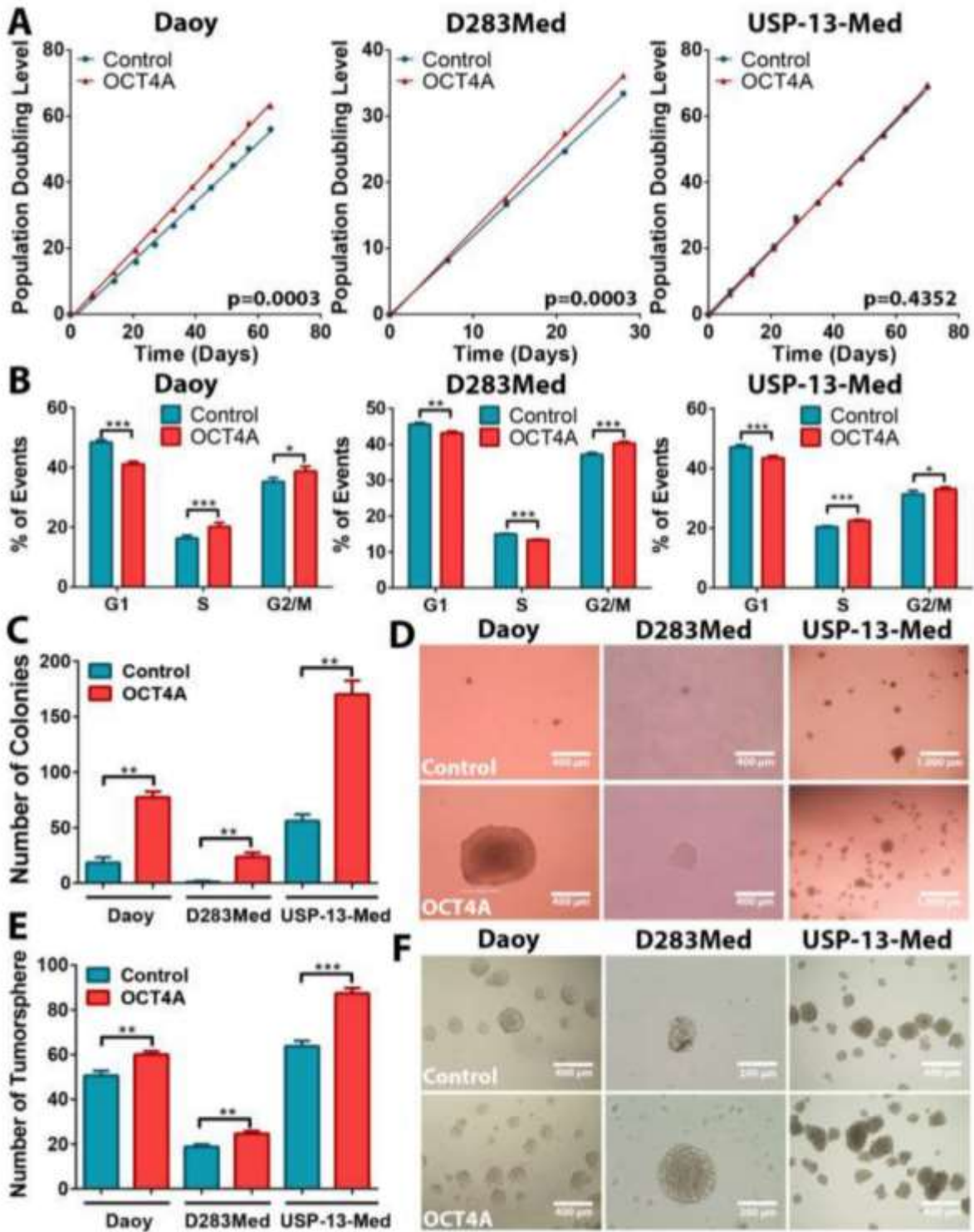


Figure 3

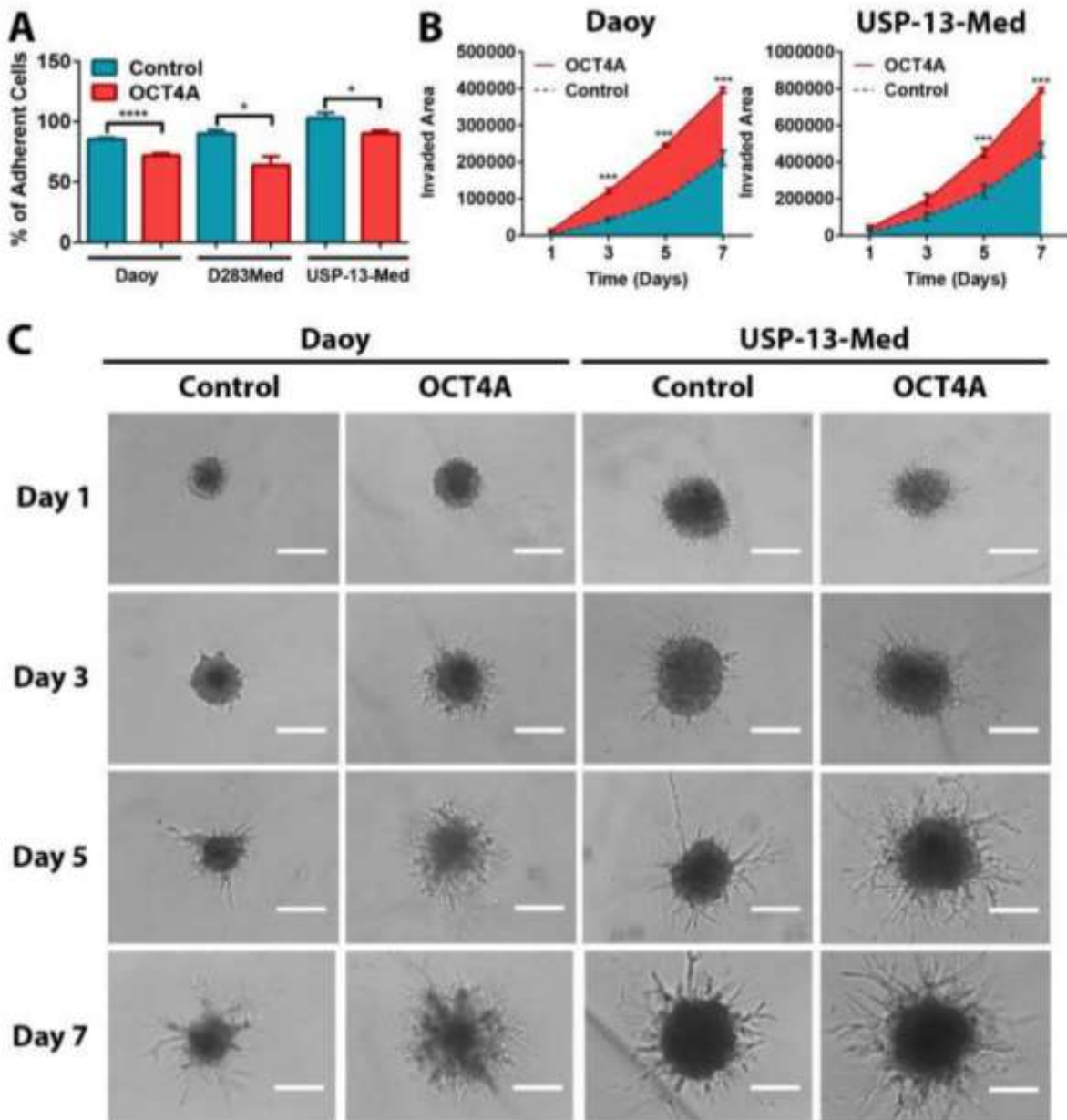


Figure 4

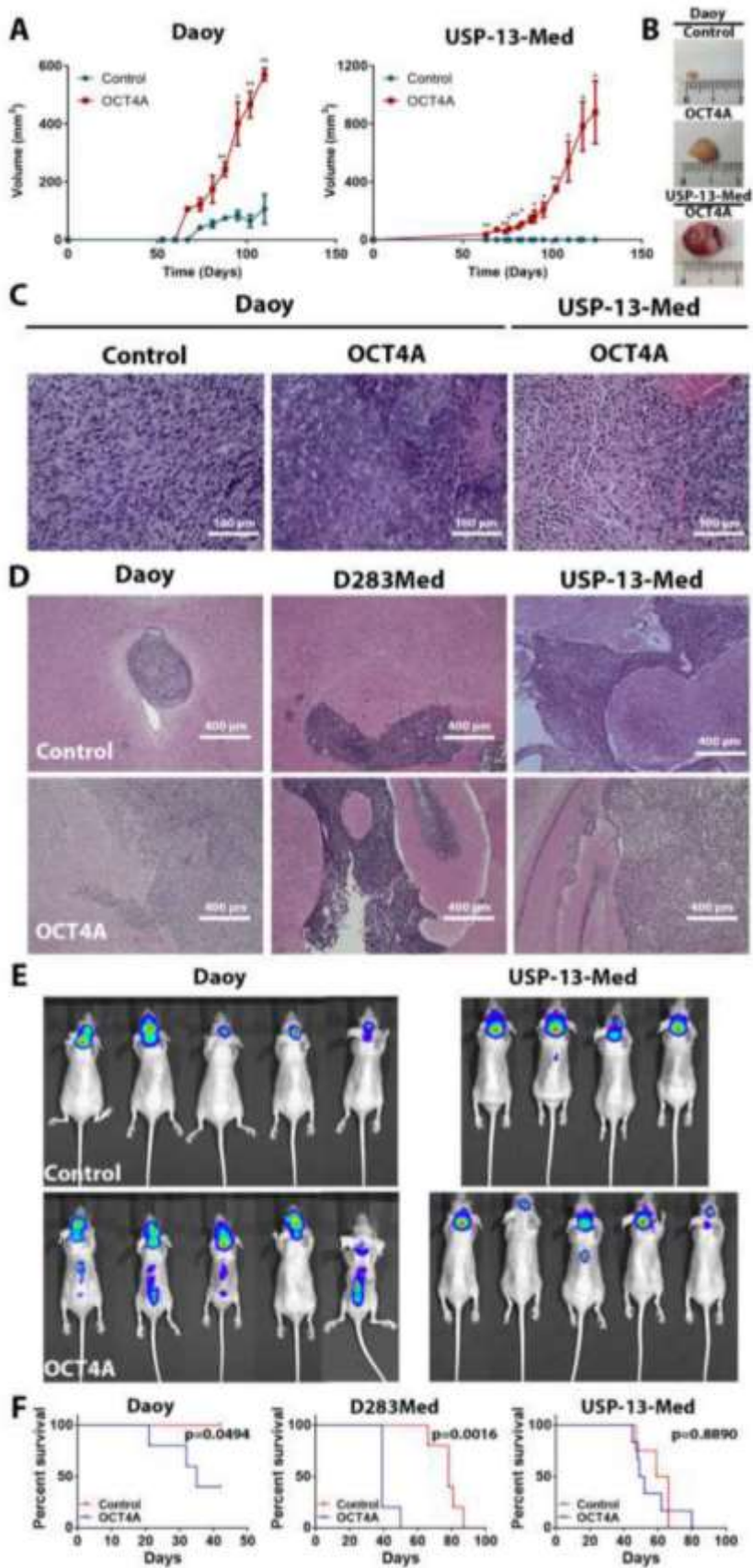
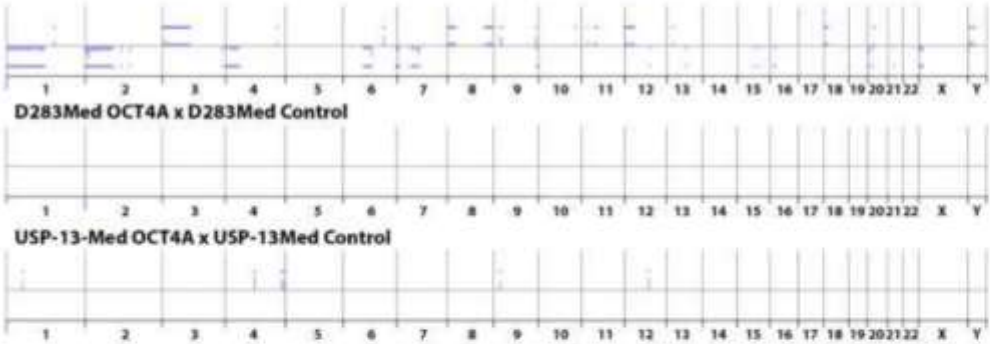


Figure 5

A Daoy OCT4A x Daoy Control



B Chromosome 1

