

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

LENISA GERON

**Estudo da modulação da via Wnt pelo inibidor de
Aurora-quinases AMG900 em linhagens celulares de
meduloblastoma pediátrico**

Ribeirão Preto
2015

LENISA GERON

**Estudo da modulação da via Wnt pelo inibidor de
Aurora-quinases AMG900 em linhagens celulares de
meduloblastoma pediátrico**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

**Ribeirão Preto
2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Geron, Lenisa

“Estudo da modulação da via Wnt pelo inibidor de Aurora-quinases AMG900 em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico”. Ribeirão Preto, 2015.

71 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga.

1. Oncologia Pediátrica. 2. Meduloblastoma. 3. Aurora-quinase.
4. Via de sinalização Wnt. 5. AMG900.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2014/07124-0).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LENISA GERON

Estudo da modulação da via Wnt pelo inibidor de Aurora-quinases AMG900 em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico especialmente esse trabalho aos meus pais Tânia e César e às minhas irmãs Vanessa e Ana Júlia, por todo incentivo, amor e carinho, para que essa jornada fosse concluída.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** pela presença constante em minha vida e por mostrar o melhor caminho a seguir.

Ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, meu orientador, pela oportunidade, e acima de tudo pela confiança que creditou em mim durante esse trabalho. Sou grata pela atenção e disponibilidade durante todo o processo da minha formação.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli** pelo apoio e por toda a ajuda dispensada.

Ao **Dr. Kleiton Silva Borges**, pela paciência, apoio, confiança e dedicação. A você sou imensamente grata, pois desde o início aceitou o desafio de transmitir a mim o seu conhecimento. Mas agradeço mesmo pela amizade e por sempre me incentivar a melhorar e a nunca desistir, independente dos resultados de minhas escolhas. Tudo isso me ajudou a me tornar uma pessoa mais reflexiva e persistente.

Ao **MSc. Augusto Andrade Faria**, pelo incentivo e pela ajuda dispensada sempre que necessário. E também por sempre estar disposto a transmitir seu conhecimento.

A **MSc. Karina Bezerra Salomão**, por toda a dedicação e amizade e por ter dado todo o auxílio necessário em diversos momentos do meu trabalho. Sua ajuda foi indispensável e agradeço por poder ter aprendido com você.

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP pela atenção e apoio prestados.

A **Profª. Dra. Silvana Giuliatiti** coordenadora da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, ex-coordenador da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP.

À todos os amigos do laboratório **Dr^a Maria Sol Brassesco Annichini, Dr^a Vanessa da Silva Silveira, Dr^a. Rosane Gomes de Paula Queiroz, Caio, Gustavo, Maurício, Régia, Rodrigo e Veridiana**, pela amizade e por sempre me ajudarem, contribuindo para o meu aprendizado.

Às minhas queridas amigas de laboratório **Camilla, Carolina, Gabriela M., Gabriela V., Karina, Lara, Marcela, Mariana, Mirella e Pamela**. Agradeço pela amizade e pelos momentos de descontração e risadas dentro e fora do laboratório. A presença de vocês torna essa jornada mais leve e prazerosa.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria, **Sônia Scandusi, e Lucimar Fernandes** pelo apoio e convivência.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon e Silvia Sant'anna Consiglieri** e à secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelize Visconte**, pela atenção, simpatia e amizade durante o mestrado.

À **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Mestrado.

À minha mãe, **Tânia** e ao meu pai, **César** por terem me proporcionado uma formação humana realmente digna, me ensinando a buscar o conhecimento e nunca desistir dos meus objetivos e sonhos como pessoa e pesquisadora; e às minhas irmãs, **Vanessa e Ana Júlia**, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me divertindo, fazendo com a vida fique mais leve e alegre. Vocês são essenciais na minha vida.

A todos os meus **familiares** que sempre almejaram meu sucesso.

As minhas queridas amigas **Bruna, Laura, Lethícia e Patrícia**, obrigada pela amizade sincera e indispensável. Se amigos é a família que Deus nos permitiu escolher, com certeza eu fiz a melhor das escolhas, e agradeço pela presença de vocês em minha.

Aos **demais amigos** que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

GERON, L. “**Estudo da modulação da via Wnt pelo inibidor de Aurora-quinases AMG900 em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico**”. 2015, 71f. Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O meduloblastoma (MB) é o tumor cerebral maligno mais comum na infância. A formação/progressão desta neoplasia foi associada a alterações moleculares, que inclui a desregulação da via de sinalização Wntless (Wnt), responsável pelo desenvolvimento embrionário. Além disso, as proteínas da família Aurora-quinases (A, B e C) têm sido amplamente estudadas, uma vez que a Aurora A e B foram encontrados hiperexpressas em diversas neoplasias, como o MB. Estudos recentes mostraram que existe uma associação entre a Via Wnt e as Aurora-quinases. No entanto, poucos trabalhos foram realizados para confirmar essa associação. Ademais, não existem trabalhos que relatem os efeitos do AMG900, um pan-inibidor de aurora-quinases, em MB, dando enfoque na regulação da via Wnt. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da via Wnt pelo inibidor AMG900 nas linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico. Foram realizados os ensaios de PCR convencional, sequenciamento, qRT-PCR, transfecção transiente, ensaio clonogênico, Western Blot e ciclo celular. As linhagens celulares UW402, UW473 e ONS-76 não apresentaram mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* (*β-catenina*) e no éxon 15 do gene *APC*. Não foi observada uma expressão significativa de *CTNNB1*, confirmando que as linhagens não possuíam a via Wnt ativa. Com isso foi necessário a transfecção transiente com a *β-catenina*. Após este ensaio, houve um aumento da expressão de *CTNNB1*, *Ciclina D1* e *C-Myc* nas três linhagens, o que não ocorreu com as *Auroras A e B*. No ensaio clonogênico foi observado uma redução do número de colônias nas linhagens UW473 e ONS-76. Observou-se um aumento da expressão proteica da *β-catenina*, da Aurora A e B na UW473, o que ocorreu somente com a *β-catenina* na linhagem ONS-76. Após o tratamento com o AMG900 ocorreu uma diminuição da expressão proteica de *β-catenina*, da Aurora A e B em ambas as linhagens. A transfecção não alterou o percentil celular em G2/M na UW402 e UW473. Já na ONS-76 houve um aumento significativo em G2/M, e o AMG900 potencializou esse bloqueio apenas nessa linhagem. Os resultados sugerem que pode haver alguma relação entre a inibição das proteínas Aurora-quinases e a expressão de proteínas da via Wnt.

Palavras chave: Meduloblastoma, Via de sinalização Wnt, Aurora-quinases, AMG900.

ABSTRACT

GERON, L. “**Study of Modulation of the Wnt pathway by Aurora kinases inhibitor AMG900 in pediatric medulloblastoma cell lines**”. 2015, 71f. Master’s degree dissertation - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor in childhood. Tumor formation/progression has been associated to molecular alterations that include dysregulation of signaling pathway Wingless (Wnt), responsible for embryonic development. In addition, cell cycle proteins Aurora-kinase (A, B and C) have been widely studied since Aurora A and B were found overexpressed in many cancers such as MB. Recent studies show that there is an association between Wnt pathway and Aurora kinase proteins. However, few studies have been conducted to confirm this association. Moreover, there are no studies reporting the effects of AMG900 in MB, by focusing on the regulation of the Wnt pathway. The aim of this study is to evaluate Wnt pathway modulation by Aurora kinases inhibitor AMG900 in pediatric medulloblastoma cell lines. Conventional PCR, sequencing, qRT-PCR, transient transfection, clonogenic assay, Western Blot and cell cycle assays were performed. UW402, UW473 and ONS-76 cell lines did not present mutations in exon 3 of *CTNNB1* gene and exon 15 of *APC* gene. There was no significant expression of *CTNNB1* and their target genes in these cell lines, confirming that they did not have Wnt pathway activated. Considering this, transient transfection was necessary. After this trial, there was an increase in expression of *CTNNB1* gene and its target genes Cyclin D1 and C-Myc in the three cell lines, which was not observed in Aurora kinases. Furthermore, in the clonogenic assay, a reduction in the number of colonies in UW473 and ONS-76 cell lines was observed. It was also observed an increase in β -catenin protein, Aurora A and B in UW473 cell line, but not in ONS-76 cell line. However, after treatment there was a decrease in protein expression of β -catenin, Aurora A and B in both cells. Transfection did not change the cellular percentile in G2 / M in UW402 and UW473. In ONS-76 there was a significant increase in G2 / M, and the treatment with AMG900 potentiated this block only in this cell line. Results suggest that there may be some relation between the inhibition of Aurora kinase protein and protein expression in Wnt pathway.

Keywords: Medulloblastoma, Wnt signaling pathway, Aurora kinases, AMG 900.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização Wnt	22
Figura 2. Estrutura química do quimioterápico AMG900 (N-(4-((3-(2-aminopyrimidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)phenyl)-4-(4-methylthiophen-2-yl)phthalazin-1-amine).....	27
Figura 3. Delineamento experimental do trabalho	33
Figura 4. Fotografia do gel de agarose corado com brometo de etídio para a padronização da reação do sequenciamento na PCR convencional.....	42
Figura 5. Análise da expressão dos genes da <i>β-catenina</i> , <i>Ciclina D1</i> , <i>C-myc</i> , <i>Aurora-A</i> e <i>Aurora-B</i> , e dos cerebelos normais, nas linhagens de meduloblastoma pediátrico.....	44
Figura 6. Análise da expressão dos genes da <i>β-catenina</i> , <i>Ciclina D1</i> , <i>C-myc</i> , <i>Aurora-A</i> e <i>Aurora-B</i> , nas linhagens de meduloblastoma pediátrico após a transfecção transiente	45
Figura 7. Análise do efeito da transfecção transiente na formação de colônias no ensaio clonogênico nas linhagens UW473	46
Figura 8. Análise da expressão proteica de <i>β-catenina</i> e das Aurora-quinases nas linhagens UW473 e ONS-76 antes e após a transfecção transiente	47
Figura 9. Análise da expressão proteica de <i>β-catenina</i> e das Aurora-quinases nas linhagens transfectadas UW473 e ONS-76 antes e após o tratamento com AMG900.....	48
Figura 10. Ciclo Celular	50

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Características clínicas das amostras de cerebelo não-neoplásicos infantis	34
Tabela II. Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para a reação de PCR e o tamanho dos produtos de PCR	35
Tabela III. Programação do termociclador para a realização das reações de PCR.....	36
Tabela IV. Programação do termociclador para a realização das reações do sequenciamento	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Polipose Adenomatosa Coli
AMG900	Inibidor de Aurora-quinase (N-(4-((3-(2-aminopyrimidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)phenyl)-4-(4-methylthiophen-2-yl)phthalazin-1-amine)
AURKA	Proteína Aurora-quinase A
AURKB	Proteína Aurora-quinase B
β -TRCP	Proteína Ubequitina-ligase E3
cDNA	DNA Complementar
CK1- α	Caseína Quinase 1 α
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPP	Complexo de Proteínas Passageiras
CTNNB1	Gene Traduzido na Proteína β -catenina
DAOY	Linhagem Celular de Meduloblastoma DAOY
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DVL	Fosfoproteína Citoplasmática Dishevelled
HAM F-10	Solução Nutritiva para o Cultivo Celular
Fz	Família dos receptores Frizzled
GSK3- β	Glicogênio Sintase Quinase 3 β
G418	Antibiótico Neomicina
LRP5/6	Receptores de Lipoproteína 5 e 6
MB	Meduloblastoma
mRNA	RNA mensageiro
Notch	Via de Sinalização Notch
ONS-76	Linhagem Celular de Meduloblastoma ONS-76
PBS	Tampão Salina Fosfato
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico

RPMI	Meio de Cultivo Celular RPMI
RT	Radioterapia
SBF	Soro Fetal Bovino
SHH	Via de Sinalização Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS 1x	Solução Salina Tamponada com Tris 1x
TCF-Lef1	Fator de transcrição TCF-Lef1
UV	Luz Ultra Violeta
UW402	Linhagem Celular de Meduloblastoma 402
UW473	Linhagem Celular de Meduloblastoma 473
Wnt	Via de Sinalização/ ProteínaWingless

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
min	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Meduloblastoma	19
1.2 A via de sinalização Wnt.....	20
1.3 A via de sinalização Wnt e o meduloblastoma.....	23
1.4 A família das Auroras-quinases.....	24
1.4.1 Aurora-A.....	25
1.4.2 Aurora-B.....	25
1.4.3 Aurora-C.....	26
1.5 A relação das Auroras-quinases com o câncer e a via de sinalização Wnt.....	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específico	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Casuística.....	33
3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultura	34
3.3 Preparação da droga.....	34
3.4 Ensaio Funcionais	35
3.4.1 Extração de DNA.....	35
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.4.3 Sequenciamento dos genes <i>CTNNB1</i> e <i>APC</i>	36
3.4.4 Extração de RNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	37
3.4.5 Ensaio de Transfecção com Lipofectamina.....	38
3.4.6 Ensaio Clonogênico após Transfecção com Lipofectamina.....	39
3.4.7 Ciclo Celular.....	39
3.4.8 <i>Western Blot</i>	40
3.5 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Padronização dos produtos da PCR (<i>CTNNB1</i> e <i>APC</i>).....	42

4.2 Sequenciamento do éxon 3 de <i>CTNNB1</i> e do éxon 15 de <i>APC</i> em linhagens celulares de meduloblastoma	43
4.3 Análise da expressão gênica	43
4.4 Ensaio Clonogênico	45
4.5 <i>Western Blotting</i>	46
4.6 Ciclo Celular	48
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Meduloblastoma

O meduloblastoma (MB) é o tumor embrionário neuroepitelial mais comum na infância. Apesar dos recentes avanços na compreensão da patogênese desta neoplasia, algumas alterações genéticas específicas ainda não estão bem definidas (Marino, 2005; Packer, 2011). Os MBs correspondem a cerca de 20% de todos os tumores intracranianos em crianças, e 40% de todos os tumores pediátricos na fossa posterior. Embora haja uma maior incidência de MB durante a infância, com pico na primeira década, 30% destes ocorrem em adolescentes e adultos jovens. (Polkinghorn *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2008; Packer, 2011).

Pacientes com MB podem apresentar sintomas como hipertensão intracraniana e vômitos, além de alterações do equilíbrio e da coordenação motora. Isso ocorre porque esses tumores podem crescer causando a obstrução do fluxo liquórico e hidrocefalia. Além disso, podem se disseminar para outras partes do sistema nervoso central (SNC), mas dificilmente alcançam outras partes do corpo (Ris *et al.*, 2001). Apesar de aparentemente bem delimitado, o tumor é altamente infiltrativo e apresenta forte tendência à disseminação para o neuroeixo (Polkinghorn *et al.*, 2007; Packer, 2011).

O tratamento atual consiste na ressecção do tumor, seguida de radiação local e crânio-espinhal e/ou quimioterapia. A cirurgia é de extrema importância no tratamento do MB. Este procedimento tem como finalidade a remoção do tumor, causando o mínimo de danos neurológicos ao paciente, bem como confirmar o diagnóstico através da obtenção de uma amostra de tecido (Packer, 2011). No entanto, alguns MBs não podem ser removidos completamente. Em um terço dos pacientes, o tumor se desenvolve tronco cerebral, tornando difícil sua remoção total, visto que esta poderia causar danos neurológicos fatais ao paciente (Lang *et al.*, 2012).

Com isso, outros protocolos de tratamento são realizados, para tentar minimizar as sequelas aos pacientes. A radioterapia (RT) ainda continua sendo considerada a base do tratamento adjuvante pós-operatório de pacientes com meduloblastomas, com exceções nos casos de crianças muito jovens (menores de três anos) (Murphy *et al.*, 2015). Dentre as sequelas causadas pelas RTs, os prejuízos cognitivos, endocrinológicos e neuropsicológicos, são os mais prevalentes, tendo esses pacientes uma sobrevida de no mínimo três anos após o tratamento (51%) (Pichandi *et al.*, 2014). No entanto, estudos recentes mostraram que a RT

juntamente com a quimioterapia leva a um aumento considerável na sobrevivência desses pacientes, resultando no controle de cerca de 70% dos casos de MB (Sabia & Anger, 2015).

Neste contexto, é reconhecido que, independente do sucesso do tratamento, é necessário o desenvolvimento de novos protocolos que resultem em uma alta taxa de controle da doença, e também menores problemas neurocognitivos para os pacientes. Para isso, nos últimos anos, muitos avanços têm permitido um melhor entendimento da biologia tumoral do MB, viabilizando assim a identificação de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novas drogas antitumorais com mecanismos de ação específicos, para melhorar a qualidade de vida desses pacientes (Gulino *et al.*, 2008).

Dessa forma, um dos desafios a serem alcançados, objetivando novas propostas terapêuticas, é a melhor compreensão dos mecanismos moleculares que determinam o desenvolvimento celular/tecidual. Isso porque, a manutenção do funcionamento normal da célula, a homeostase dos tecidos, bem como o desenvolvimento e diferenciação das diferentes estruturas do corpo, encontram-se dependentes de regulações específicas de inúmeras vias de sinalização (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Uma dessas vias de desenvolvimento, em que se tem depositado grande interesse nos últimos anos, e que está relacionada com o desenvolvimento e progressão do MB, é a via de sinalização Wnt (Klaus & Birchmeie, 2008; Komiya & Habas, 2008; Fuentes *et al.*, 2015).

1.2 A via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt é uma via que também está envolvida no desenvolvimento cerebelar, e que foi conservada entre as espécies no decorrer da evolução (Komiya & Habas, 2008). Esta via é responsável por regular aspectos cruciais durante o desenvolvimento embrionário, como a proliferação, morfologia, migração, diferenciação celular e organogênese (Klaus & Birchmeie, 2008; Komiya & Habas, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que alterações genéticas e epigenéticas estão relacionadas com a ativação irregular desta via, podendo levar ao desenvolvimento e à progressão de diversas neoplasias (Kim *et al.*, 2011). Além disso, mutações nesta via estão associadas a defeitos congênitos humanos (Dale, 1998; Klaus & Birchmeie, 2008; Dutta-Simmons *et al.*, 2009; Davidson & Niehrs, 2010; Pei *et al.*, 2012).

As proteínas *Wingless* (Wnt) são um grupo de glicoproteínas, ricas em cisteína, que se ligam ao domínio N-terminal extracelular da família de receptores Frizzled (Fz), que são proteínas transmembrana que atuam como receptores para Wnt (Polakis, 2000; Kim *et al.*,

2011). O grupo de glicoproteínas Wnt é bastante diversificado, podendo influenciar múltiplos processos durante o desenvolvimento animal, sendo identificadas em diversas espécies, desde pequenos organismos até humanos (MacDonald *et al.*, 2009; GE & Wang, 2010; Davidson & Niehrs, 2010; Kim *et al.*, 2011). Essa grande variedade de proteínas está relacionada com a complexidade da regulação de sinalização, função e produção biológica das células (Dale, 1998; Komiya & Habas, 2008). Dessa forma, essas proteínas podem se ligar a diversos tipos de receptores Frizzled e atuar em diferentes vias de sinalização (Dale, 1998; Kawano *et al.*, 2003).

O sinal extracelular de Wnt pode estimular múltiplas vias de transdução de sinal intracelular. Dentre elas está a via canônica, a qual é dependente da proteína β -catenina, e a via não canônica de Wnt, independente de β -catenina (Komiya & Habas, 2008; GE & Wang, 2010). A via de sinalização canônica de Wnt é ativada quando a proteína citosólica β -catenina deixa de ser fosforilada por proteínas do complexo de degradação. Este complexo é composto pela axina, pela polipose adenomatosa coli (APC), pela caseína-quinase 1 α (CK1 α) e pela glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3- β), além da própria β -catenina, possibilitando assim, o acúmulo desta proteína no citoplasma (Marino, 2005; Dutta-Simmons *et al.*, 2009, Lucero *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Este acúmulo ocorre quando a Wnt se liga ao receptor Frizzled e a seus coreceptores, conhecidos como receptores de lipoproteína 5 e 6 (LRP5/6), formando um complexo Wnt-Fz-LRP5/6. Esse complexo recruta a fosfoproteína citoplasmática Dishevelled (*DVL*), que inibe a função da enzima GSK3- β (Komiya & Habas, 2008; Guessous *et al.*, 2008; Davidson & Niehrs, 2010; Kim *et al.*, 2011).

Estes eventos levam à inibição do complexo de degradação, e consequente redução da fosforilação e estabilização da β -catenina, que se acumula no citoplasma celular. Em maior concentração no citoplasma, essa proteína pode ser translocada para o interior do núcleo celular, onde pode se ligar aos fatores de transcrição TCF-LEF 1 (Taipale & Beachy, 2001; MacDonald *et al.*, 2009; GE & Wang, 2010). A ligação da β -catenina a esses fatores ativam a expressão de genes alvo da via Wnt, como o *c-Myc* e a *ciclina D1*, envolvidos na proliferação, migração e sobrevivência celular (Dale, 1998; Marino, 2005; Dutta-Simmons *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011) (Figura 1A).

Na ausência da sinalização promovida pela Wnt, a proteína citoplasmática β -catenina é constantemente fosforilada pela ação do complexo de degradação (Dutta-Simmons *et al.*, 2009). CK1 α e sequencialmente GSK3- β , componentes do complexo de degradação, fosforilam a região amino-terminal da β -catenina, na serina 45 e 33/37, respectivamente. A β -catenina fosforilada é então reconhecida pela subunidade β -transducina da proteína

ubiquitina-ligase E3 (β -TRCP) e, assim, é direcionada para a ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma (He *et al.*, 2004). Esta degradação contínua de β -catenina faz com que seu nível intracelular seja baixo, impedindo que esta entre no núcleo, reprimindo assim, a transcrição dos genes alvo de Wnt (Koesters *et al.*, 2003; GE & Wang, 2010) (Figura 1 B).

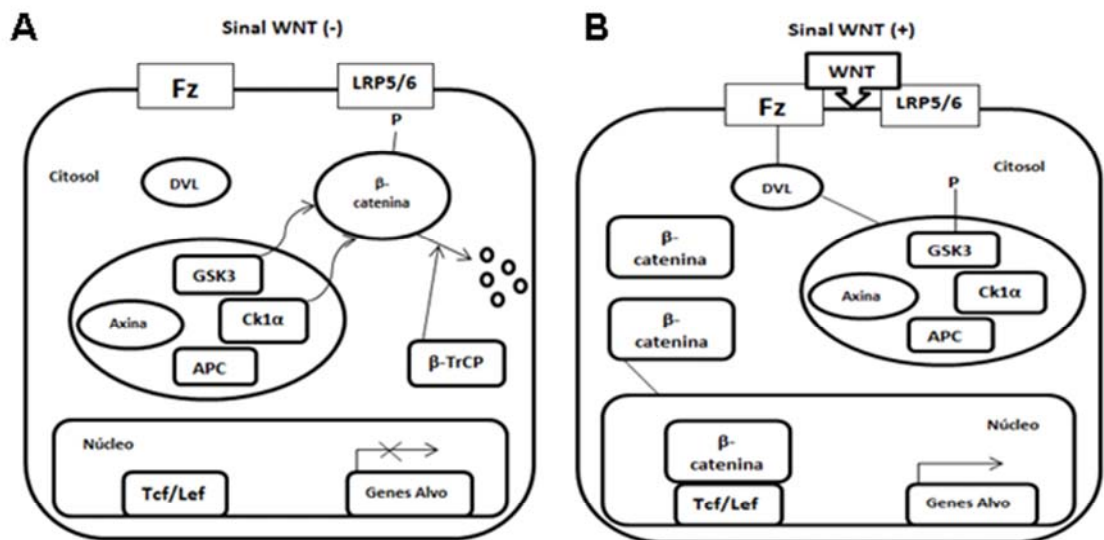


Figura 1. Via de sinalização Wnt. A) Na ausência do ligante Wnt, a β -catenina citoplasmática é degradada pelo complexo de degradação. A β -catenina fosforilada é reconhecida pela β -TrCP, sendo degradada pela via de ubiquitinação proteossomal no citosol. B) Após a ligação de Wnt aos receptores Fz e LRP5/6, o complexo de degradação é inativado devido à fosforilação da proteína GSK3 β . Isso faz com que a fosforilação e degradação da β -catenina seja inibida, sendo esta translocada para o núcleo. A β -catenina nuclear liga-se aos fatores de transcrição Tcf/Lef, ativando a expressão de genes alvos. Figura baseada em Koesters *et al.*, 2003.

Neste contexto, muitos estudos já mostraram que esta via está envolvida na patogênese de diversas doenças, incluindo mieloma múltiplo (Dutta-Simmons *et al.*, 2009), câncer gástrico (Dar *et al.*, 2009), gliomas (Xia *et al.*, 2013), carcinoma adrenocortical (Leal *et al.*, 2013) e meduloblastomas (El-Sheikh *et al.*, 2010). Porém, a etiologia e patogenia destas doenças ainda não estão bem entendidas. Tal desconhecimento dificulta a identificação de novas estratégias de tratamento que explorem a via de sinalização Wnt, sendo necessária uma maior investigação desses processos (GE & Wang, 2010).

1.3 A via de sinalização Wnt e o meduloblastoma

A formação e a progressão do MB têm sido associadas, nos últimos anos, a alterações moleculares. Dentre elas está a desregulação de algumas vias de sinalização, como a Notch, Sonic hedgehog (shh) e a Wingless (Wnt), conhecidas por sua importância durante o desenvolvimento cerebelar (Cimmino *et al.*, 2012). Estudos recentes mostraram que existe uma expressiva interação entre essas três vias, sendo que estas podem agir de maneira sinérgica na patogênese do MB (Baron, 2003).

Dessa forma, estudos recentes têm permitido um melhor entendimento da biologia tumoral do MB. Um desses avanços foi a concepção de uma nova classificação desta neoplasia, onde é atualmente classificada em quatro subgrupos moleculares, sendo eles: *Wnt*, *Shh*, Grupo 3 e Grupo 4 (Northcott *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2012). Cada subgrupo origina-se a partir de diferentes tipos celulares, possuindo características citogenéticas, perfis mutacionais e transcricionais distintos. Sendo assim, esses subgrupos são bastante divergentes quanto a sua distribuição e incidência, aspecto clínico e prognóstico (Northcott *et al.*, 2011; Cardona *et al.*, 2012; Kool, 2012; Millard & De Braganca, 2015).

Dentre os quatro subgrupos, o Wnt é o tipo de MB mais raro, tendo atualmente o melhor prognóstico, onde cerca de 90% dos pacientes sobrevivem. Esse subgrupo foi primeiro observado em pacientes com a síndrome de Turcot. Esta síndrome está associada a mutações no gene supressor de tumor APC, sendo caracterizada pelo desenvolvimento do câncer de cólon e de tumores cerebrais malignos, como gliomas e o MB (Rossi *et al.*, 2008; Stefanaki *et al.*, 2012)

Posteriormente mutações somáticas no gene *CTNNB1*, o qual é transcrito na proteína β -catenina, também foram observadas em pequenos subconjuntos de meduloblastomas esporádicos, sendo encontradas em aproximadamente 15% dos casos, mas não em outros tumores do SNC (Guessous *et al.*, 2008; Marino, 2005; Roussel & Hatten, 2011). Outras mutações, menos comuns também foram descritas em meduloblastoma, como as que ocorrem no gene *axina* (Rossi *et al.*, 2008).

A maioria das mutações na via Wnt é observada em MBs esporádicos, com resíduos alvos nas serinas 33 e 37 de β -catenina. Essas mutações tornam a via Wnt desregulada, bloqueando a degradação da proteína β -catenina. Como consequência, os níveis da β -catenina aumentam de modo descontrolado, levando ao desenvolvimento de um fenótipo transformado. Em células saudáveis, devido à ausência de Wnt, a degradação de β -catenina ocorre constitutivamente, não havendo seu acúmulo no citoplasma celular. Além disso, esta

proteína também é utilizada em outras atividades celulares, como a adesão e motilidade celular. Isso faz com que seu nível intracelular seja baixo, impedindo que esta proteína seja translocada para o núcleo, reprimindo assim, a transcrição dos genes alvo de Wnt (Gilbertson, 2004; Rossi et al., 2008; Goschzik et al., 2015).

Porém, estudos recentes mostraram que mutações na proteína β -catenina estão associadas à imunofenotipagem núcleo positiva, apresentando melhoras significativas na sobrevivência dos pacientes. Esses achados sugerem que o acúmulo nuclear de β -catenina possa ser um marcador com resultados favoráveis em MB. Assim, a ativação de Wnt poderia servir como um indicador de um bom prognóstico (Ellison *et al.*, 2005). Dessa forma, apesar das evidências, ainda restam dúvidas sobre a importância da ativação da via Wnt na formação de MBs, e pesquisas adicionais continuam sendo necessárias para esclarecer o papel desta via no desenvolvimento e progressão desta neoplasia (Guessous *et al.*, 2008; Goschzik et al., 2015).

1.4 A família das Auroras-quinases

Para que as cópias idênticas do genoma sejam passadas para suas células filhas, a progressão através do ciclo celular deve ser minuciosamente e rigorosamente regulada e controlada. Tal controle e regulação dependem de eventos sequenciais de síntese, ativação e degradação de proteínas, as quais às vezes requerem uma série de modificações pós-traducionais (Lopes *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2007). Existe uma variedade de proteínas quinases envolvidas na divisão celular, sendo as mais conhecidas, a CDK1 (ciclina dependente de quinase 1), PLK (polo-like quinase), Bub1 (budding uninhibited by benzimidazole 1), Nek 2 da família NIMA (never in mitose A) e as Aurora-quinases (Schmidt et al., 2007; Tamura K, 2015).

A família das Aurora-quinases compreende quinases de serina/treonina que atuam em processos do ciclo celular, tais como duplicação e separação do centrôssomo, interação dos microtúbulos com o cinetócoro das cromátides irmãs, e montagem do fuso mitótico. Além disso, desempenham funções importantes na condensação dos cromossomos, estabelecimento do fuso mitótico, orientação dos cromossomos, sendo necessárias também para o processo de citocinese (Carmena *et al.*, 2003; Montembault *et al.*, 2005; Gautschi *et al.*, 2008; Mountzios *et al.*, 2008).

O primeiro homólogo da família das Aurora-quinases foi identificado após um estudo genético que tinha como finalidade encontrar mutações que induziam aumento de ploidia em

células de leveduras (increase-in-ploidy phenotype - Ipl1) (Chan *et al.*, 1993). Um homólogo foi encontrado em *Drosophila melanogaster* em 1995, após a observação de mutações em gene chamado aurora. Esta mutação bloqueou o ciclo celular quando os cromossomos condensados foram recrutados para apenas um polo do fuso mitótico (Glover *et al.*, 1995). Este nome foi escolhido devido à semelhança entre a morfologia do fuso mitótico defeituoso com o fenômeno luminoso observado nas regiões polares do Planeta Terra, conhecido por aurora boreal (Mountzios *et al.*, 2008).

Em 1998, três homólogos de Aurora-quinase foram identificados em humanos, a Aurora-A (AURKA, Aurora-2/BTAK, STK15, STK16, ARK1, AIK), Aurora-B (AURKB, Aurora-1, Ipl1, STK12, AIM-1, ARK2) e Aurora-C (AURKC, Aurora 3, STK13, AIK, AIE-2), localizados nas regiões cromossômicas 20q13.2-q13.3, 17p13.1 e 19q13.43, respectivamente (Carmena *et al.*, 2003; Montembault *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2007). Estes genes apresentam grande homologia nas sequências de nucleotídeos, ocupam locais distintos na célula, são ciclo-dependentes e desempenham diferentes funções no ciclo celular (Adams *et al.*, 2001).

A hiperexpressão de algumas das Aurora-quinases leva ao aumento da ploidia, principalmente devido à amplificação do centrôssomo e/ou desregulação dos pontos de checagem da divisão mitótica. Essa hiperexpressão pode favorecer a formação de diversos tipos tumorais (Fu *et al.*, 2007; Gautschi *et al.*, 2008; Mountzios *et al.*, 2008; Tamura K, 2015).

1.4.1 Aurora-A

A Aurora-A, está localizada no centrôssomo, mas pode ser encontrada também associada aos microtúbulos no polo metafásico durante a mitose (Kimura *et al.*, 1997). A atividade de fosforilação está envolvida na separação e maturação do centrôssomo, bem como na montagem e estabilidade do fuso mitótico (Glover *et al.*, 1995). A hiperexpressão ou inibição do gene Aurora-A causa diversas anormalidades no fuso celular (Bischoff *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2015).

1.4.2 Aurora-B

A proteína Aurora-B faz parte do Complexo de Proteínas Passageiras (CPP), que se movem do centrômero para o fuso mitótico durante a divisão celular, monitorando a

separação dos cromossomos (Adams *et al.*, 2001). Além disso, está associada ao cinetócoro do cromossomo durante a passagem da prófase para a metáfase, apresentando níveis elevados também na zona equatorial da célula em anáfase, e no anel contrátil da membrana celular durante a telófase (Carmena *et al.*, 2003).

Dentre outras funções, a Aurora-B regula a interação do cinetócoro com os microtúbulos durante a metáfase. Este processo garante que a célula prossiga pela metáfase somente quando todos os cromossomos tenham adquirido uma conexão bipolar com os microtúbulos que procedem de cada centrôssomo (conexão anfitélica). De fato, a Aurora-B pode prevenir conexões sintéticas ou monotéticas. Portanto, caso sejam identificadas conexões incorretas, como estas, os mecanismos de correção são ativados para garantir a montagem adequada do fuso celular (Ducat *et al.*, 2004; Meraldi *et al.*, 2004; Krenn *et al.*, 2015).

1.4.3 Aurora-C

A proteína Aurora-C não está muito bem caracterizada. Embora tenha sido encontrada hiperexpressa em algumas células tumorais, provavelmente está envolvida apenas na espermatogênese (Kimura *et al.*, 1999). Inicialmente relatada como uma proteína centrôssômica anáfase/citocinese (Kimura *et al.*, 1999), a Aurora-C foi descrita como uma proteína que também faz parte do CPP (Li X *et al.*, 2004; Sasai *et al.*, 2004; Quartuccio & Schindler, 2015).

1.5 A relação das Aurora-quinases com o câncer e a via de sinalização Wnt

A aneuploidia é a alteração genômica mais prevalente nos tumores sólidos humanos (Jallepalli *et al.*, 2001). Defeitos nos centrôssomos (quantidade, organização e comportamento) têm sido encontrados em diversos tipos de câncer afetando a segregação normal dos cromossomos e conseqüentemente produzindo células aneuplóides (Saunders *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001). Todos estes defeitos contribuem para a aquisição de uma instabilidade genética tipicamente observada em células cancerosas (Boveri, 1914; Negrini *et al.*, 2010; Bunting & Nussenzweig, 2013).

Aneuploidia e anormalidades do centrôssomo são também detectadas após a hiperexpressão ou inibição dos genes da família Aurora-quinase, caracterizando estas como moléculas que possivelmente possuem uma importante função no surgimento e na progressão

do câncer (Fu *et al.*, 2007; Gautschi I., 2008; Tamura K, 2015). A expressão elevada das Aurora-quinases foi observada em muitas neoplasias, incluindo carcinomas colorretais (Bischoff *et al.*, 1998; Tatsuka *et al.*, 1998; Ota *et al.*, 2002), mama (Zhou *et al.*, 1998; Tanaka, 1999), ovário, pâncreas (Tanner *et al.*, 2000; Gritsko *et al.*, 2003), hepatocarcinomas (Jeng *et al.*, 2004), meduloblastomas (Neben *et al.*, 2004) e gliomas (Scrideli *et al.*, 2008).

Além disso, a Aurora-A e o Aurora-B foram encontrados hiperexpressas em diversas neoplasias em comparação com os respectivos tecidos não neoplásicos. Com isso, vários trabalhos buscaram investigar estes genes como marcadores de prognóstico/diagnóstico e/ou como potenciais alvos terapêuticos. (Boss *et al.*, 2009; Lok *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2012).

Tendo em vista o importante papel dessas proteínas tanto na divisão celular normal, quanto no desenvolvimento tumoral, muitos inibidores de Aurora-quinases já foram descritos. Alguns desses inibidores já estão sendo utilizados em estudos clínicos e pré-clínicos (Gautschi *et al.*, 2008; Mountzios *et al.*, 2008). Dentre estes está o AMG900 (N-(4-((3-(2-aminopirimidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)phenyl)-4-(4-methylthiophen-2-yl)phthalazin-1-amine) (Figura 2), um inibidor/competitivo de trifosfato de adenosina, altamente potente e seletivo para as Auroras A, B e C, e que está atualmente na fase I de ensaios clínicos (Payton *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Geuns-Meyer *et al.*, 2015). O AMG900 tem a capacidade de inibir a autofosforilação das Aurora-quinases A e B, bem como a fosforilação da histona H3. Ele também foi capaz de inibir a proliferação de 26 linhagens celulares tumorais em concentrações nanomolares muito baixas, exibindo favoráveis perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos com toxicidade mínima (Payton *et al.*, 2010; Linardopoulos & Blagg, 2015).

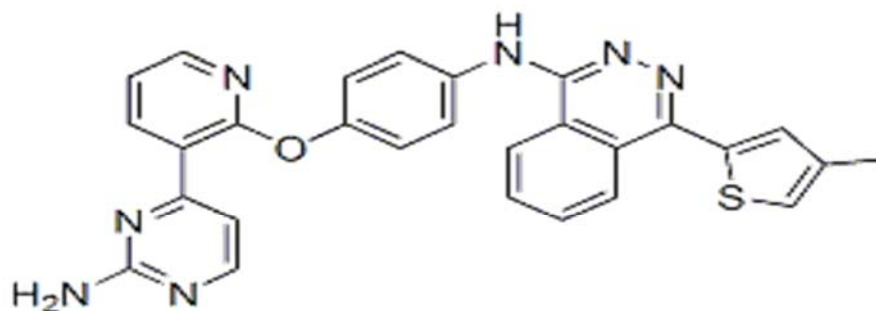


Figura 2. Estrutura química do quimioterápico AMG900 (N-(4-((3-(2-aminopirimidina-4-il)piridina-2-il)oxi)fenil)-4-(4-metiltiofen-2-il)phtalazina-1-amina).

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade dos membros da família das Aurora-quinases pode estar envolvida com a via de sinalização Wnt durante a progressão de diversas neoplasias. Xia e colaboradores (2013) relataram que a Aurora-A regula a auto-renovação e a tumorigenese em gliomas pela estabilização da β -catenina. Isso ocorre devido à interação da Aurora-A com a axina. Esta interação irá interferir na manutenção do complexo de degradação, tendo como consequência a estabilização da proteína β -catenina e consequente ativação da sinalização Wnt, promovendo assim a auto-renovação das células do glioma. Já El-Sheikh e colaboradores (2010), mostraram que a inibição da Aurora-A em MB, resultou em uma diminuição significativa da atividade dos fatores de transcrição TCF/Lef-1. Tais resultados poderiam indicar a existência de alguma relação entre esta proteína e a via de sinalização Wnt. Assim, estes dados sugerem possíveis mecanismos pelos quais as Aurora-quinases poderiam regular o crescimento celular em MB.

Segundo Dutta-Simmons e colaboradores (2009), a redução dos níveis de β -catenina em células de Mieloma Múltiplo está associada com alterações transcricionais no gene *Aurora-A*, considerado um novo alvo da Wnt. Tais estudos sugerem que a Aurora-A pode afetar diretamente a transição G2/M na progressão do ciclo celular. Dessa forma, a regulação direta da Aurora-A por β -catenina teria um impacto significativo sobre os estágios finais da progressão do ciclo celular e sobre a recuperação dos pontos de checagem. Esta hipótese apoiaria ainda mais o papel dessa proteína como um fator chave na regulação do ciclo celular e patogênese de diversas neoplasias (Dutta-Simmons, 2009).

Além disso, foi relatado por Dar e colaboradores (2009) que existe uma interação entre as proteínas Aurora-A e a GSK-3 β em células de câncer gástrico. GSK-3 β é uma importante proteína quinase, que regula a fosforilação da β -catenina no citoplasma. Sua desestabilização reduz a ubiquitinação de β -catenina, resultando em seu acúmulo nuclear e sua subsequente atividade transcricional. Os resultados encontrados por Dar *et al.* (2009) indicam que a Aurora-A poderia regular diretamente GSK-3 β , alterando sua expressão. A elevada expressão de GSK-3 β levaria então ao aumento no nível de β -catenina, que induziria a translocação e ativação da atividade de transcrição β -catenina/TCF nuclear. Assim, a expressão aberrante de β -catenina poderia causar desregulação na progressão do ciclo celular e na regulação dos pontos de checagem, levando à proliferação desordenada e ao acúmulo de anormalidades genéticas (Dar *et al.*, 2009).

Neste contexto, a relação existente entre as Aurora-quinases e a via canônica Wnt- β -catenina fornece novas perspectivas moleculares para uma investigação mais aprofundada, tanto para elucidar os mecanismos específicos envolvidos na biologia do MB, quanto para a

identificação de novas estratégias terapêuticas que aumentem a eficácia do tratamento, com o AMG900. Dados do nosso grupo mostram que o inibidor de Aurora-quinases AMG900 inibe a proliferação celular, a capacidade clonogênica e induz apoptose em linhagens celulares de MB pediátrico, isolado ou em combinação com o inibidor de histona desacetilase SaHa (Geron et al., 2015), atestando assim a relevância desta droga no presente estudo. Assim, este trabalho tem como principal hipótese o fato de existir uma correlação de expressão entre as proteínas Aurora-quinases e a β -catenina no MB, sendo que as Auroras-quinases poderiam estar modulando a ação da β -catenina, devido a sua interação com outros membros da via Wnt, como por exemplo, a axina. Além disso, essa possível interação poderia tornar os MBs com a via Wnt ativa mais susceptível aos efeitos da inibição das Aurora-quinases.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a modulação da via Wnt mediada pela inibição das proteínas Aurora-quinases, utilizando o inibidor AMG900 em linhagens celulares de meduloblastoma pediátrico.

2.2 Específico

- Verificar se há alguma relação da expressão dos genes *Aurora A* e *Aurora B* com o gene da via de sinalização Wnt, *CTNNB1* (β -*catenina*).
- Investigar a expressão proteica da β -*catenina*, da Aurora A e da Aurora B após o tratamento com o AMG900.
- Investigar a sensibilidade das células com a via Wnt ativada ao inibidor de Aurora-quinases AMG 900.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Na Figura 3 estão demonstrados todos os procedimentos realizados durante o trabalho.

Delineamento Experimental:

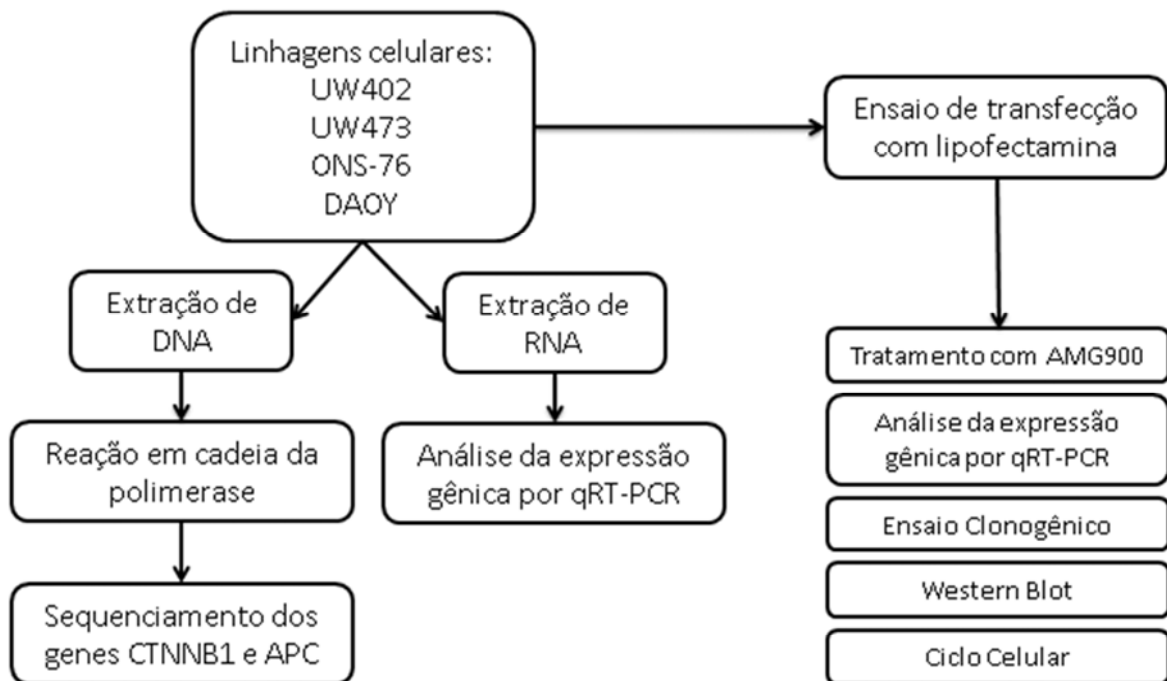


Figura 3 – Delineamento Experimental do trabalho. Exemplificação de todos os procedimentos realizados durante o trabalho.

3.1 Casuística

Foram utilizadas como controle seis amostras de cerebello não-neoplásico infantis coletadas no Departamento de Patologia (HC/FMRP-USP). O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC/FMRP-USP (Nº CAAE: 47781115.0.0000.5440). As características clínicas das amostras de cerebello não-neoplásicos estão listadas na tabela I.

Tabela I: Características clínicas das amostras de cerebelo não-neoplásicos infantis.

Amostra	Idade	Sexo
1	17 dias	Masculino
2	7 anos	Masculino
3	1 mês	Masculino
4	6 meses	Feminino
5	1 ano	Feminino
6	13 anos	Feminino

3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Foram utilizadas as linhagens UW402 e UW473, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Michael S. Bobola (Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, WA) e as linhagens ONS-76 e DAOY (utilizada como calibrador no ensaio de qRT-PCR), sendo todas de meduloblastoma pediátrico. As células foram mantidas em meio HAM F10 e RPMI (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) respectivamente, suplementados com 10% de SBF, 100U/mL, penicilina e 100µg/mL estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Na realização dos experimentos, a contagem e o teste de viabilidade celular foram determinadas utilizando o teste de exclusão do azul de Trypan. As linhagens utilizadas foram devidamente autenticadas através da análise do perfil de STR (*short tandem repeats*), gentilmente realizado pelo Laboratório de Investigação de Paternidade do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Simões.

3.3 Preparação da droga

Uma solução estoque de 1mM do inibidor de Aurora-quinases AMG900 (Selleckchem, USA) foi preparada em DMSO e estocada em alíquotas a -80°C. Todas as doses utilizadas estavam com a mesma quantidade de DMSO, 0,1%, a qual não causa danos celulares. A droga G418 (Sal de Disulfato, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), utilizada no processo de transfecção, estava em uma solução estoque de 50mg/ml, e foi preparada em água deionizada, sendo estocada em alíquotas a -20°C. As drogas foram adicionadas em meio de cultura completo imediatamente antes de serem aplicadas nas células.

3.4 Ensaios Funcionais

3.4.1 Extração de DNA

O DNA das linhagens celulares de MB pediátrico foi extraído com o kit Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen).

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas das linhagens de meduloblastoma pediátrico em estudo, a fim de verificar mutações no gene da β -catenina e no gene *APC*, ambos integrantes da via de sinalização Wnt.

Foi realizada então, a amplificação de fragmentos do éxon 3 do gene *CTNNB1* (227 pb) e de dois fragmentos diferentes (251pb e 271pb, respectivamente) do éxon 15 do gene *APC* (região do cluster de mutação: 1240-1513), pois é considerada uma região de *hotspots* para mutações. As sequências dos primers do éxon 3 de *CTNNB1* e do éxon 15 de *APC* estão apresentadas na tabela abaixo (Tabela II).

Tabela II: Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para a reação de PCR e o tamanho dos produtos de PCR (Bougatef *et al.*, 2008; Leal *et al.*, 2011).

Gene	Produto de PCR (pb)	Sequência Foward (5'-3')	Sequência Reverse (3'-5')
CTNNB1	227	GCTGATTTGATGGAGTTGGA	GCTACTTGTTCTTGAGTGAA
APC	251	AAGTGGTCAGCCTCAAAAGG	CTTCGCTCACAGGATCTTCAGC
APC	271	AGAATCAGCCAGGCACAAAG	GCTTGGTGGCATGGTTTGT

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 1µl de DNA, com 5 µl de tampão Buffer (5X GoTaq Flexi, Promega, Madison, WI, USA), 2 µl de MgCl₂, 0,5 µM de dNTP, 0,5µl de cada primer, mais 0,2 µl de Taq polimerase, e água de seringa, apresentando um volume final de 25µl.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, EUA). As condições de ciclagem das reações do PCR são mostradas na tabela abaixo (Tabela III).

Tabela III: Programação do termociclador para a realização das reações de PCR.

	Gene <i>CTNNB1</i>	Gene <i>APC</i>
Denaturação inicial	95°C (3 min)	95°C (4 min)
Denaturação 35 ciclos	95°C (40 seg)	95°C (40 seg)
Temperatura de Anelamento	53°C (40 seg)	65°C (40 seg)
Extensão Intermediária	72°C (1 min)	72°C (1 min)
Extensão Final	72°C (5 min)	72°C (10 min)

As reações foram mantidas a -4°C até a sua análise por eletroforese em gel de agarose (2%). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, com tampão TBS 1X e corados com brometo de etídio. Posteriormente, foram visualizados através da exposição a luz UV. A análise da eficiência da reação foi em relação ao tamanho da banda no gel de eletroforese. Foi utilizado padrão de tamanho de fragmento de DNA de 100pb (Invitrogen).

3.4.3 Sequenciamento dos genes *CTNNB1* e *APC*

Os fragmentos amplificados por PCR convencional foram sequenciados. O sequenciamento foi realizado por método automatizado em aparelho ABI PRISM DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystem), utilizando-se o reagente “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit”. Os *primers* do sequenciamento foram os mesmos utilizados na primeira amplificação por PCR convencional (Tabela II). Foram utilizados 1µl do produto de PCR para cada reação.

Foram adicionados 1µl de “Big Dye Terminator”, 2µl de tampão contendo Tris-HCl 0,2M, pH9,0, MgCl₂ 50 mM e água até completar o volume final de 10 µl. Foi utilizado o seguinte programa para a reação de sequenciamento (Tabela IV):

Tabela IV: Programação do termociclador para a realização das reações do sequenciamento.

	Temperatura/Tempo
Denaturação inicial	96°C (1min)
Denaturação 30 ciclos	96°C (15 seg)
Temperatura de Anelamento	50°C (15 seg)
Extensão Final	60°C (4 min)

Após a reação, foi realizada a precipitação, utilizando 1 µl de EDTA 125nM, 1 µl de acetato de sódio 3M, pH4,0 e 25 µl de etanol absoluto, seguida de centrifugação (30 min, a 3000 rpm), à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 35 µl de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação (15 min, a 3000 rpm). Foi descartado todo o sobrenadante e o precipitado foi seco a 96°C, por 3 minutos. Após este procedimento as amostras foram sequenciadas por método automatizado.

3.4.4 Extração de RNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR

Com o intuito de investigar a ativação da via Wnt, através da expressão de genes constituintes da via, foi realizada a PCR quantitativa em tempo real. Assim, foram mensuradas a expressão dos genes *CTNNB1*(β -*catenina*), *c-Myc*, *ciclina D1*, *Aurora A* e *Aurora B* nas linhagens de meduloblastoma pediátrico, antes e após o tratamento com o AMG900, e foram feitas comparações com cerebelos não-neoplásicos.

As células foram coletadas e foi realizada a extração de mRNA dessas a partir do reagente Trizol® (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) conforme instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas e a partir destas foram sintetizadas amostras de cDNA dos mRNAs-alvo por meio do kit High Capacity® (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

O qRT-PCR foi realizado utilizando o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sondas TaqMan® para os genes *CTNNB1*(β -*catenina*) (Hs00170025), *c-Myc* (Hs00153408_m1), *ciclina D1* (Hs0076555_m1), *Aurora A* (Hs00269212_ml) e *Aurora B* (Hs00177782_ml) foram adquiridas pelo sistema on-demand da Applied Biosystems. Como controles endógenos foram utilizados os genes *Gus* (4326320E) e *HPRT* (4326321E).

As amostras foram quantificadas em triplicata e com volume final, para cada reação, de 10µl, sendo utilizados 5,5 µl do Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, part number 4304437), 4,5 µl da amostra investigada diluída (1/20) e 15 µl de sonda. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.4.5 Ensaio de Transfecção com Lipofectamina

Este procedimento foi realizado a fim de analisar a expressão gênica e proteica dos genes envolvidos na via Wnt bem como realizar os ensaios funcionais.

As células foram semeadas ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em placas estéreis de seis poços, 24 horas antes do ensaio, para que ficassem com boa confluência. Os meios utilizados, HAM F10 para as linhagens UW402 e UW 473, e o RPMI, para a linhagem ONS-76, estavam livres de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e de soro bovino fetal, para que não interferissem no processo de transfecção transiente.

O DNA do plasmídeo de interesse (pcDNA3-S33Y – Plasmid #19286) (Addgene) (1 μ g) foi diluído em 150 μ l de meio Opti-MEM em um tubo eppendorf. Esse plasmídeo possui o gene de interesse β -catenina com a mutação S33Y (mutante estabilizador da β -catenina), local de ligação de GSK3 β . Quanto a sua nomenclatura, a mutação S33Y significa que houve uma substituição de uma serina por uma tirosina no códon 33. O mesmo foi realizado com o DNA do vetor vazio (controle) (1436 pcDNA3 Flag HA - Plasmid #10792) (Addgene), que não possui nenhum gene de interesse inserido em sua sequência.

Em dois outros tubos eppendorf, 2 μ l da lipofectamina (Invitrogen Co., CA, USA) foi diluída em 150 μ l de meio Opti-MEM. A solução com o DNA plasmidial de interesse foi combinada com o meio Opti-MEM/ Lipofectamina, e homogeneizada. O mesmo foi realizado com o DNA plasmidial do vetor vazio. As soluções foram então, incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 300 μ l da solução de transfecção em cada poço. Após cinco horas, a solução de transfecção foi retirada, e foram adicionados 3 ml de meio completo.

Para os estudos de expressão gênica as células foram tripsinizadas após 48h e armazenadas a uma temperatura de -80°C para que fosse extraído o mRNA das mesmas. Após extração do mRNA e de sua quantificação foi realizada a confecção do cDNA para a realização do ensaio de qRT-PCR.

Outro ensaio de transfecção foi realizado. No entanto, neste ensaio as células foram tratadas com AMG 900 (50nM), imediatamente após a retirada da solução de transfecção, por 48 horas, tendo como controle células tratadas com DMSO 0,1%. Após esse tempo, a fim de realizarmos o ensaio de qRT-PCR, as células foram tripsinizadas para extração do mRNA e confecção do cDNA das células tratadas.

3.4.6 Ensaio Clonogênico após Transfecção com Lipofectamina

Com o intuito de investigar os efeitos da expressão da β -catenina na capacidade clonogênica das células de meduloblastoma, foi realizado o ensaio clonogênico. Desta forma, 5000 células, retiradas do ensaio de transfecção, foram semeadas em placas de cultura de seis poços e incubadas com meio completo sem droga (3ml), em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram tratadas com a droga G418 (300mg/ml), para selecionar apenas as células transfectadas, visto que estas possuem o gene que confere resistência ao antibiótico neomicina. Em seguida, as células foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C, por 7-15 dias, até as colônias se tornarem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol por 15 minutos, e coradas com Giemsa. As colônias foram contadas com microscópio estereoscópico (magnificação 40x), sendo consideradas somente aquelas com pelo menos 50 células.

3.4.7 Ciclo Celular

Para observarmos se a transfecção transiente da β -catenina nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76 afetaria os processos de divisão celular dessas linhagens, foi realizado o ensaio de ciclo celular. As células foram semeadas (4×10^4 células/poço) em placas estéreis de seis poços, 24 horas antes do ensaio, para que ficassem com boa confluência. No dia seguinte, metade dos poços foram transfectados com o plasmídeo de interesse (pcDNA3-S33Y – Plasmid #19286) e a outra metade com o plasmídeo vetor vazio (1436 pcDNA3 Flag HA - Plasmid #10792). Após 24 horas, as células foram tratadas com AMG900 (50nM).

As células, após 48 horas, foram então ressuspensas em 1 ml de solução de tripsina a 37°C e a tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 10%SFB. Em seguida as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm, e o pellet foi ressuspensado em 1ml de PBS gelado e transferido para um eppendorf de 1,5ml. Após isso, as células foram centrifugadas por 5 min à 1000 rpm, e o pellet foi ressuspensado em 1 ml de etanol a 4°C e agitando lentamente e colocadas no freezer -80°C. Ao continuarmos o procedimento, as células foram centrifugadas por 5 mim a 2500 rpm, lavadas em PBS e centrifugadas novamente. Foram então ressuspensas, após lavagem, em 200 μ l de iodeto de propídio (PI). A leitura foi feita utilizando-se o Citômetro Guava Personal Cell Analysis System (Guava Technologies, Burlingame, CA), pertencente ao Laboratório de Citogenética e

Mutagênese do departamento de Genética da FMRP-USP, sob a responsabilidade da Prof^ª. Elza Tiemi Sakamoto Hojo. Os resultados foram analisados pelo Software Guava Cytosoft Versão 4.2.1, e demonstravam em qual o período do ciclo celular as células se encontravam G1, S ou G2.

3.4.8 Western Blot

Para a análise protéica, 20-30µg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e então incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (GE, Piscataway, NJ, EUA) por 1 hora, à 8°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos β-catenina (sc-7963), AURK1 (H-130) e AURK2 (H- 75) diluídos de acordo com as instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Como controle endógenos foi utilizado a proteína GAPDH (sc-47724). As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico para cada anticorpo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) (1:15000 em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente e lavada 3-5 vezes (5 minutos cada) com TBS-T 1%. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do ECLTM Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As membranas foram expostas entre 10 a 400 segundos e então analisadas. Para análise da intensidade das bandas, utilizou-se o software ImageJ (National Institutes of Health) (Schneider et al., 2012).

3.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas estatísticos GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Os ensaios funcionais foram realizados em duplicatas e abrangendo no mínimo três experimentos independentes, considerando-se a média dos experimentos. Foi utilizado o teste T de Student. A análise dos dados obtidos do sequenciamento foi realizada utilizando o software Geneious 8.0, no Western Blot foi o software ImageJ e no Ciclo Celular o software Guava Cytosoft Versão 4.2.1.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Padronização dos produtos da PCR (CTNNB1 e APC)

Antes de realizar o sequenciamento, foi feita a padronização dos produtos da PCR dos genes *CTNNB1* e *APC*, pois são as regiões genômicas onde mutações ocorrem com mais frequência (*hotspots*). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, sendo visualizados, posteriormente, através da exposição à luz UV. A análise da eficiência da reação foi em relação ao tamanho da banda no gel de eletroforese, sendo o padrão de tamanho de fragmento de DNA de 100pb (Invitrogen). Analisando o padrão das bandas, foi possível perceber que os genes *CTNNB1* e *APC* possuem o tamanho de pares de base esperados (227, 251 e 271pb, respectivamente), como pode ser visualizado na Figura 4.

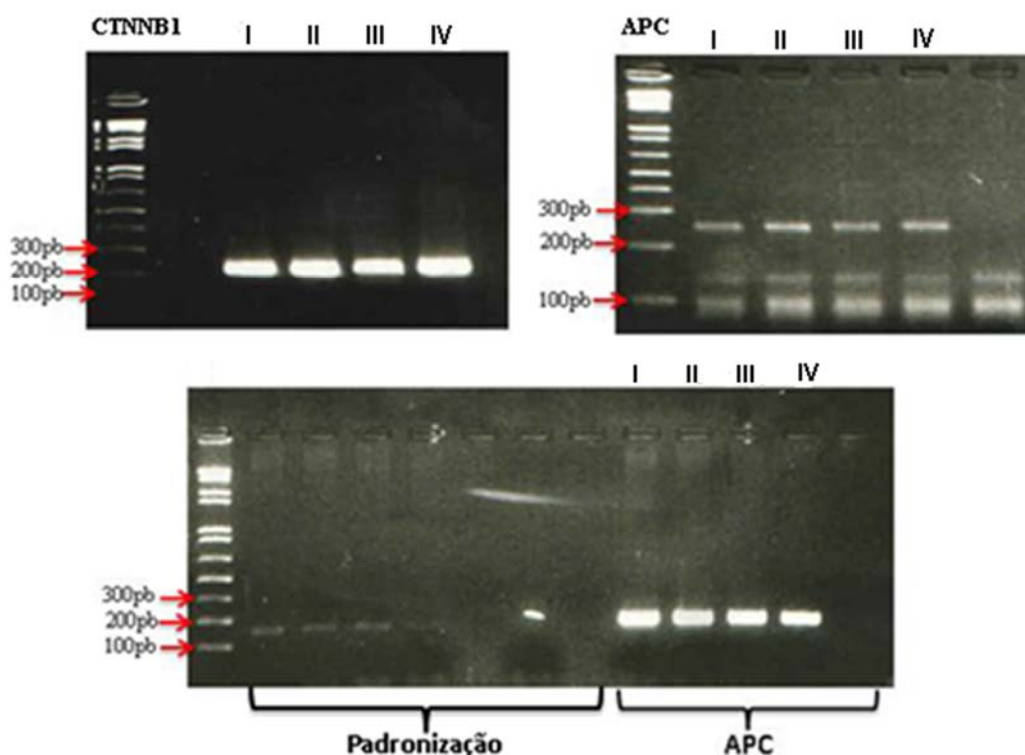


Figura 4 – Fotografias de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCRs para padronização de reação de sequenciamento dos éxons: **A)** 3 de *CTNNB1* (β -catenina) e **B)** de *APC*, após corrida eletroforética de 100V nas linhagens UW402 (I), UW473 (II), DAOY (III) e ONS-76 (IV). A) Gene *CTNNB1* (β -catenina) com 227pb, B) Gene *APC* com 251 pb, e C) Gene *APC* com 271 pb Pb= pares de bases.

4.2 Sequenciamento do éxon 3 de *CTNNB1* e do éxon 15 de *APC* em linhagens celulares de meduloblastoma

Foram analisadas a presença de mutações no éxon 3 e no éxon 15 dos genes *CTNNB1* e *APC*, respectivamente, por reações de PCR convencional e sequenciamento direto de DNA das linhagens de meduloblastomas UW402, UW473, ONS-76 e DAOY.

O sequenciamento não revelou nenhuma mutação em ambos os genes analisados nas quatro linhagens. As análises foram realizadas utilizando o software Geneious 8.0. Foi possível inferir que, nenhuma das linhagens possui a via Wnt constitutivamente ativa, devendo ser classificadas em outro subgrupo de MB. Esses resultados foram confirmados pelos ensaios de expressão a seguir.

4.3 Análise da expressão gênica

Os níveis de expressão do mRNA dos genes que codificam proteínas envolvidas na via Wnt, β -catenina (*CTNNB1*), *Ciclina D1* e *C-myc*, das proteínas *Aurora-A* (*AURKA*) e *Aurora-B* (*AURKB*), e dos genes de referência endógena *GUS* e *HPRT* foram quantificados. Essa quantificação ocorreu através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em quatro linhagens de meduloblastoma pediátricos (UW402, UW473, DAOY e ONS-76) e 5 amostras de cerebelo não-neoplásico. As reações foram otimizadas para cada gene com relação à concentração dos *primers* e analisadas quanto à eficiência da reação. Os produtos de PCR, por sua vez, foram checados quanto à amplificação específica nas linhagens não transfectadas (Figura 5), e nas linhagens transfectadas (Figura 6).

Foram então analisadas as expressões dos genes em relação à linhagem DAOY (calibrador da reação) nas linhagens não transfectadas. Dentre os cinco genes analisados, os cerebelos apresentaram uma elevada expressão apenas do gene da β -catenina (*CTNNB1*) quando comparados ao calibrador (Figura 5A). Dentre as linhagens UW402, UW473 e ONS-76, em relação aos cerebelos não-neoplásico, nenhuma delas apresentou uma elevada expressão do gene da β -catenina (*CTNNB1*) (Figura 5B). Em compensação, as três linhagens apresentaram uma maior expressão relativa dos genes *Ciclina D1*, *C-Myc*, *Aurora A* e *Aurora B* quando comparado aos cerebelos não neoplásicos (Figura 5 C-F).

Assim, como o objetivo da análise da expressão gênica era o de complementar os dados do sequenciamento, podemos concluir que as linhagens de MB pediátricos UW402, UW473 e ONS-76 não apresentam a via Wnt ativa, e que provavelmente não há uma correlação entre a expressão gênica dos Aurora-quinases com a β -catenina (Figura 5).

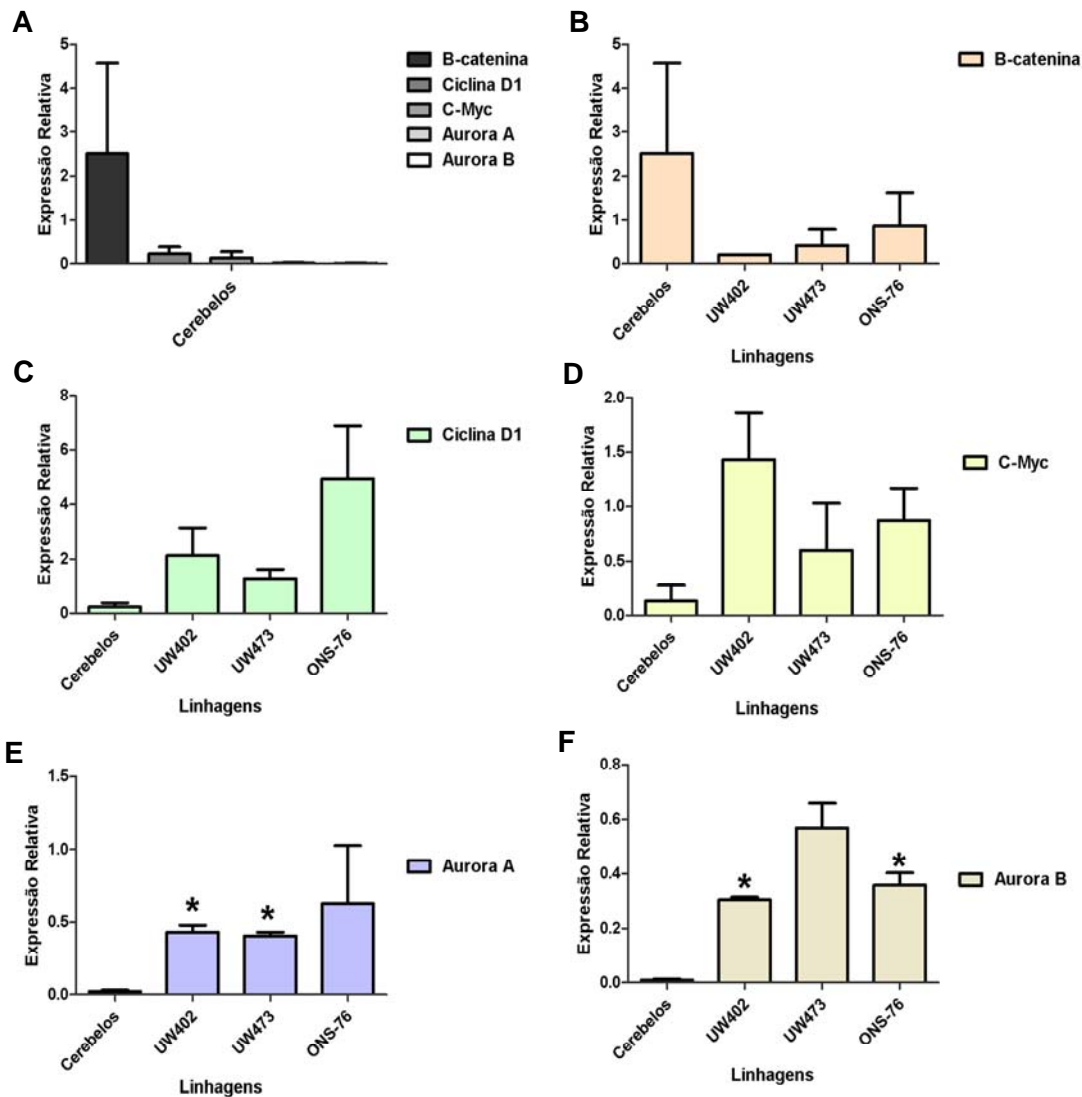


Figura 5 – Análise da expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas na via Wnt, β -catenina, *Ciclina D1* e *C-myc*; dos genes *Aurora-A* e *Aurora-B*, e dos cerebelos normais, nas linhagens de meduloblastoma pediátrico. **A)** Expressão dos genes β -catenina, *Ciclina D1*, *C-myc*, *Aurora-A* e *Aurora-B* nos cerebelos não-neoplásicos. **B)** Expressão do gene β -catenina. **C)** Expressão do gene *Ciclina D1*. **D)** Expressão do gene *C-myc*. **E)** Expressão do gene *Aurora-A*. **F)** Expressão do gene *Aurora-B*. Todas as expressões estão sendo comparadas aos cerebelos não-neoplásicos nas linhagens de MB (* $p < 0.05$).

Como a via Wnt foi encontrada inativa nessas linhagens, o processo de transfecção transiente foi necessário para realizarmos os demais experimentos. Assim, após a transfecção das linhagens celulares UW402, UW473 e ONS-76, foi possível observar que, em relação ao controle (vetor vazio), todas as linhagens apresentaram uma hiperexpressão do gene da β -catenina (*CTNNB1*) (Figura 6A). Além disso, as três linhagens apresentaram também uma elevada expressão dos genes alvos da via Wnt, *Ciclina D1* e *C-Myc*. No entanto isso não foi observado para os genes da *Aurora-A* e da *Aurora-B* nessas linhagens (Figura 6B). Tais resultados corroboram com a hipótese anterior de que não exista uma correlação entre a expressão gênica da β -catenina e das Aurora-quinases.

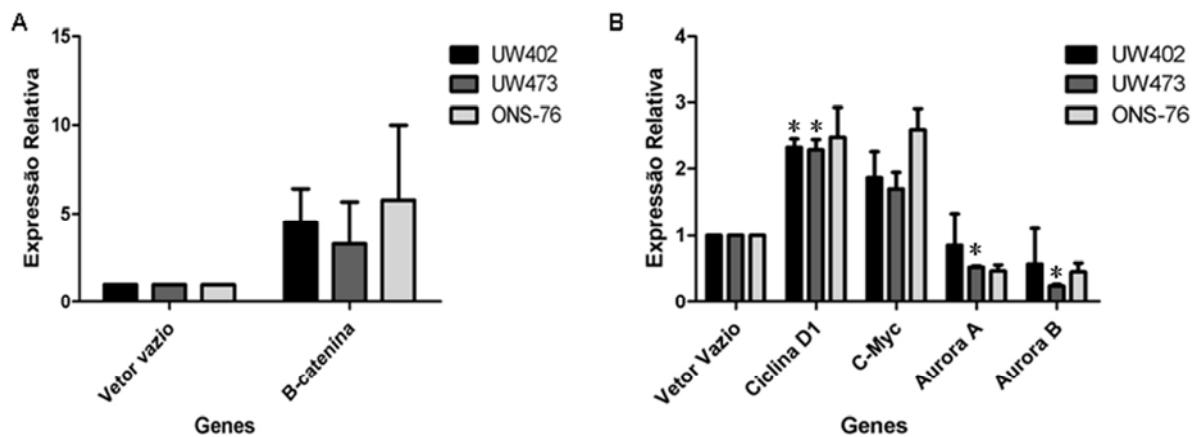


Figura 6 – Análise da expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas na via Wnt, β -catenina (A), *Ciclina D1* e *C-myc*; e dos genes *Aurora-A* e *Aurora-B*, nas linhagens de meduloblastoma pediátrico (B) após a transfecção transiente com lipofectamina (* $p < 0.05$).

4.4 Ensaio Clonogênico

Com o intuito de analisarmos a capacidade de formação de colônias após a transfecção transiente nas linhagens de meduloblastoma, foi realizado o ensaio clonogênico. Assim, 24 horas após o plaqueamento de 5000 células, retiradas do ensaio de transfecção transiente, as linhagens UW473 e ONS-76 foram tratadas com a droga G418 (300mg/ml), para selecionar apenas as células transfectadas, visto que estas possuem o gene que confere resistência ao antibiótico neomicina. Dessa forma, foi possível observar uma redução significativa do número de colônias, após a transfecção, em ambas as linhagens, quando comparadas ao controle. A linhagem UW473 apresentou uma diminuição de aproximadamente 32% no

número de colônias, e na linhagem ONS-76 essa diminuição foi de aproximadamente 43%. Tais resultados mostraram assim um aumento significativo da mortalidade celular, após a ativação da via Wnt em MB (Figura 7).

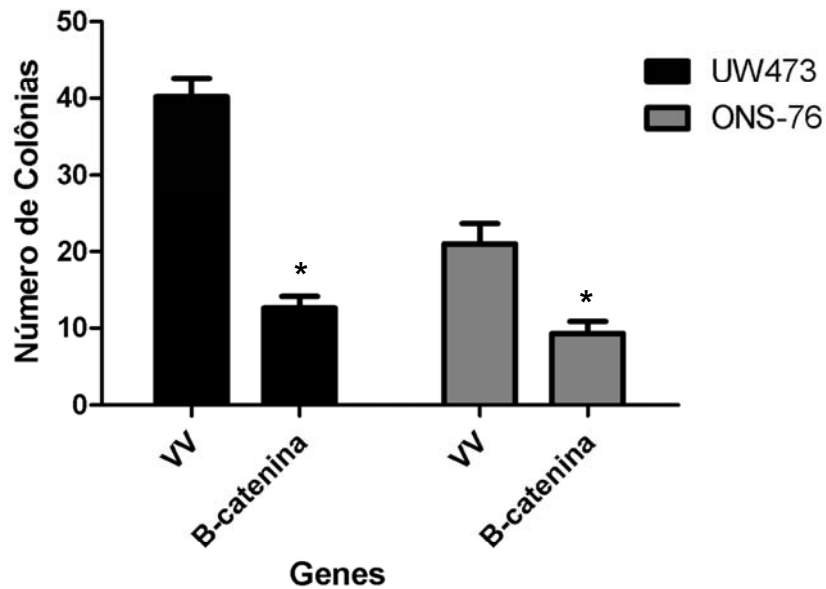


Figura 7 – Análise da redução de colônias nas linhagens UW473 e ONS-76 após a transfecção transiente (* $p < 0.05$) comparado ao controle transfectado com o vetor vazio (VV).

4.5 Western Blotting

A fim de analisar a expressão proteica de β -catenina e das Aurora A e B, nas linhagens transfectadas UW473 e ONS-76, antes e após o tratamento com AMG900 (50nM), o ensaio de Western Blot foi realizado. Após a transfecção transiente, foi possível observar que na linhagem UW473, as células transfectadas com o vetor de interesse passam a expressar a β -catenina e as proteínas Aurora A e B, quando comparadas ao controle transfectado com o vetor vazio (VV). Porém, na linhagem ONS-76, observou-se que no controle já ocorre a expressão endógena dessas proteínas, e que após a transfecção a expressão de β -catenina apresentou um aumento de aproximadamente 26%. No entanto isso não ocorre com as Auroras A e B (Figura 8).

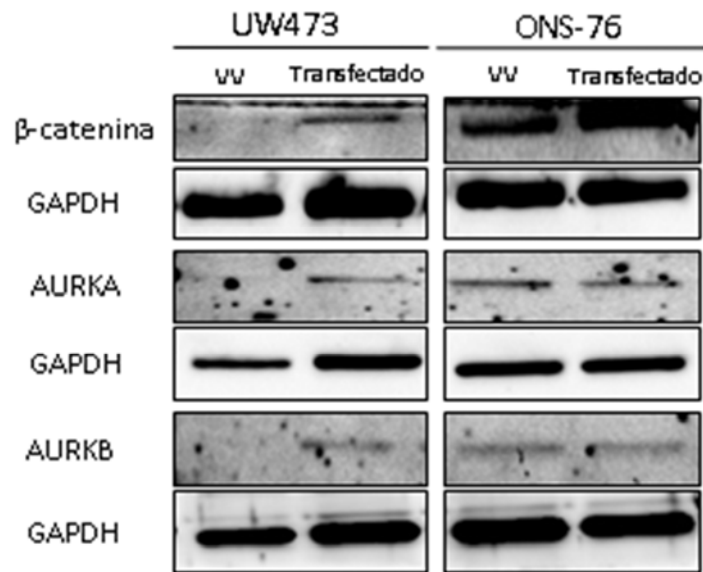


Figura 8 – Análise da expressão proteica da β -catenina, da Aurora A e da Aurora B nas linhagens UW473 e ONS-76 antes e após a transfecção transiente.

Para analisarmos os efeitos do inibidor AMG 900 sobre a expressão proteica da β -catenina, da Aurora A e da Aurora B, linhagens transfectadas com o vetor de interesse (pcDNA3-S33Y) UW473 e ONS-76, o Western Blot foi novamente realizado. Após 24 horas de tratamento com o AMG 900 (50nM) foi possível observar que ocorreu uma diminuição da expressão tanto da β -catenina (10 e 30%, respectivamente) (Figura 9 A) quanto das proteínas Aurora A (35 e 15%, respectivamente) (Figura 9 B) e Aurora B (13 e 38%, respectivamente) (Figura 9C) nas linhagens UW473 e ONS-76. Tais resultados nos levam a inferir que provavelmente existiria uma correlação proteica entre as Aurora-quinases e a β -catenina (Figura 9).

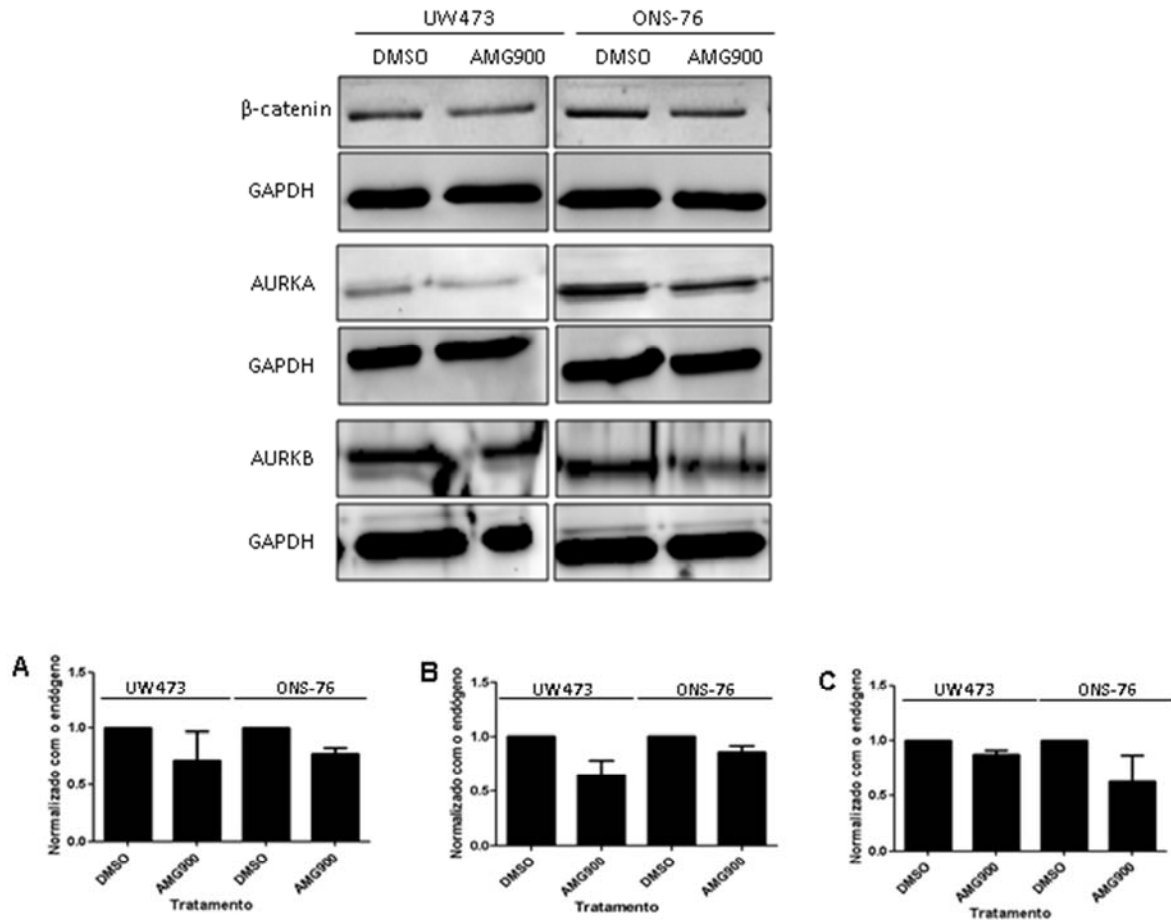


Figura 9 – Análise da expressão proteica da β -catenina, da Aurora A e da Aurora B nas linhagens transfectadas UW473 e ONS-76 antes e após o tratamento com AMG900.

4.6 Ciclo Celular

Para observarmos os efeitos da hiperexpressão de β -catenina no processo de divisão celular das linhagens de meduloblastoma, foi realizado o ensaio de ciclo celular. Com a análise dos resultados foi possível observar a transfecção com o vetor de interesse (pcDNA3-S33Y) nas linhagens UW402 e UW473 não alterou significativamente o percentil de células em G2/M (Figura 10 A e C). No entanto, na linhagem ONS-76, observou-se que a hiperexpressão de β -catenina levou a um aumento significativo de aproximadamente 9% no número de células nesta fase do ciclo celular (G2/M). Consequentemente encontramos uma diminuição nas fases G1 e S nesta linhagem (Figura 10 E).

Em seguida, foi realizado o ciclo celular das linhagens de MB transfectadas e tratadas com o inibidor AMG 900, para analisarmos qual seria o efeito dessa droga na divisão celular dessas linhagens. As células controle, transfectadas com o vetor vazio, tiveram um bloqueio

em G2/M, como o esperado devido ao papel das auroras nessa fase do ciclo (Fu *et al.*, 2007). A inibição das Aurora-quinases com AMG 900 (50nM), durante 48 horas, levou a um bloqueio significativo do ciclo celular na fase G2/M, tanto no controle transfectado com o vetor vazio quanto nas células transfectadas com o vetor de interesse nas linhagens UW402 (24% e 36%, respectivamente) e UW473 (28% e 31%, respectivamente), acarretando assim, em uma diminuição do número de células na fase G1. Esses resultados mostraram que não houve uma diferença entre o controle e as células transfectadas, sendo possível inferir que a hiperexpressão de *β-catenina* não está interferindo neste processo (Figura 10 B e D). Por outro lado, na linha ONS-76 houve um aumento da porcentagem de células na fase G2/M no grupo transfectado com a *β-catenina* e tratado com AMG900 (7%) quando comparado com as linhagens somente com a transfecção da *β-catenina* (Figura 10 F).

Assim, com esses resultados fica evidente que tanto a transfecção quanto o tratamento com AMG 900 causa efeitos diferentes na ONS-76 quando comparadas com as linhagens UW402 e UW473. Isso nos leva a inferir que na linhagem ONS-76, em comparação com as demais linhagens, a inibição das Auroras-quinases pela droga AMG 900 parece potencializar o bloqueio em G2/M já observado nesta linhagem transfectada com a *β-catenina*.

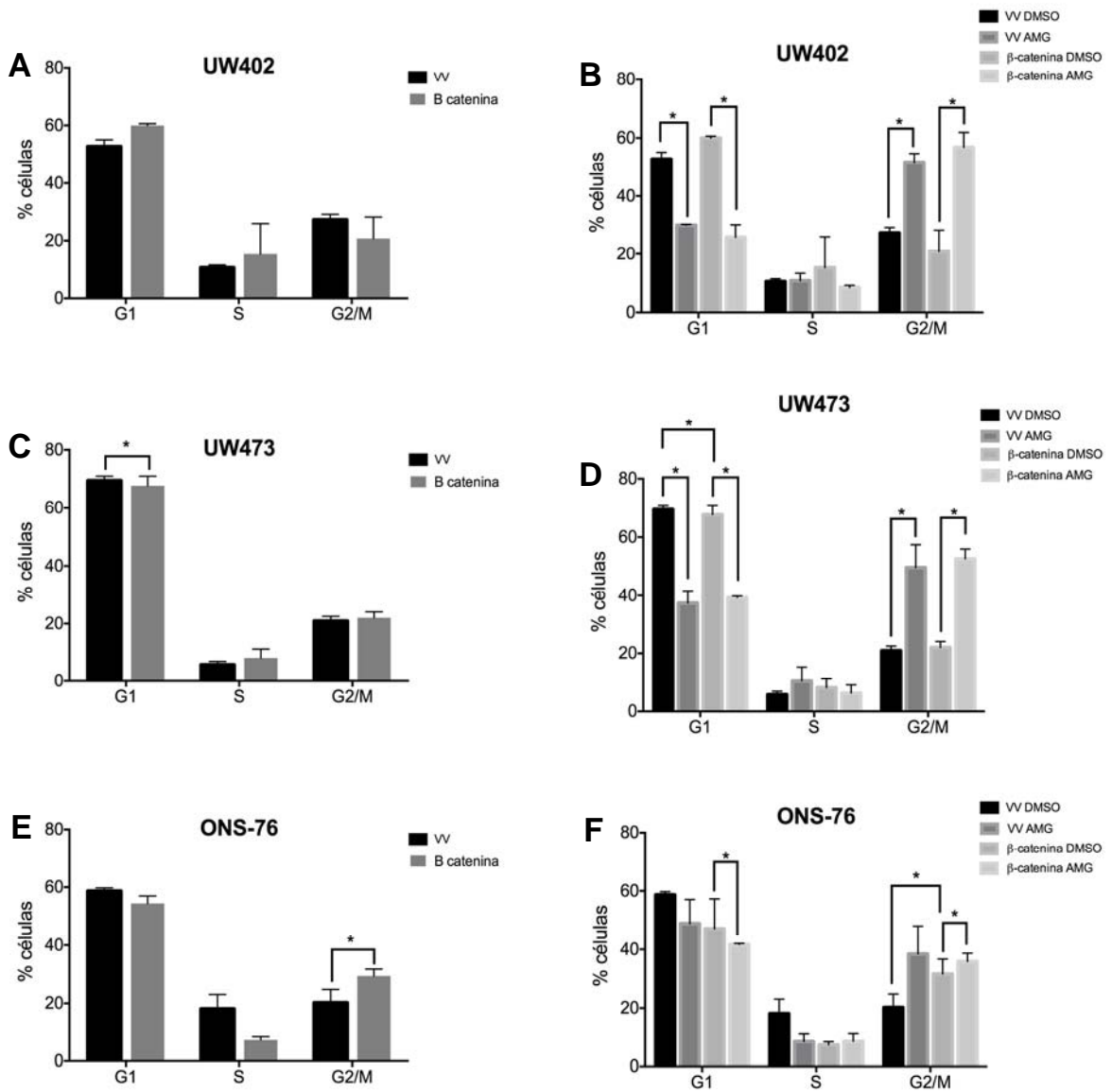


Figura 10 – Análise do Ciclo Celular. Ciclo celular após a transfecção com o vetor de interesse (pcDNA3-S33Y – β -catenina) e tratamento com o inibidor de Aurora-quinases AMG 900 nas linhagens UW402 (A e B); UW473 (C e D) e ONS-76 (E e F), quando comparadas aos controles (* p<0.05). VV= vetor vazio; AMG = AMG 900.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O MB é o tumor embrionário neuroepitelial mais comum na infância, e apesar dos recentes avanços na compreensão da patogênese desta neoplasia, algumas alterações genéticas específicas ainda não estão bem definidas (Marino, 2005; Northcott *et al.*, 2011; Packer, 2011; Taylor *et al.*, 2012; Frandsen *et al.*, 2015). A formação e a progressão do MB têm sido associadas a alterações moleculares, as quais incluem a desregulação de algumas vias de sinalização, como a Wingless (Wnt) (Cimmino *et al.*, 2012). A via Wnt é a responsável por regular aspectos cruciais durante o desenvolvimento embrionário, como a proliferação, morfologia, migração, diferenciação celular e organogênese (Klaus & Birchmeier, 2008; Komiya & Habas, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que alterações genéticas e epigenéticas estão relacionadas com a ativação irregular desta via, podendo levar ao desenvolvimento e à progressão de diversas neoplasias (Kim *et al.*, 2011).

Neste contexto, o estudo da via canônica Wnt- β -catenina fornece novas perspectivas para uma melhor investigação do desenvolvimento e progressão do MB, e também na identificação de estratégias terapêuticas mais específicas. Dessa forma, visando analisar a relação dessa via de desenvolvimento com as proteínas Aurora-quinases envolvidas no controle do ciclo celular, a hipótese do nosso trabalho foi a de que poderia existir uma correlação de expressão entre as proteínas Aurora-quinases e a β -catenina. Essa possível interação poderia tornar os MBs com a via Wnt ativa mais susceptível aos efeitos da inibição das Aurora-quinases. Para atestar a relevância desse trabalho e a utilização de um inibidor específico de Aurora-quinases, o AMG 900, tivemos como base dados publicados recentemente por nosso grupo, que mostram que a inibição das proteínas Aurora-quinases pelo AMG 900 é capaz de inibir a proliferação celular, a capacidade clonogênica e induzir apoptose em linhagens celulares de MB pediátrico, isolado ou em combinação com o inibidor de histona desacetilase SaHa (Geron *et al.*, 2015).

O gene mais estudado nesta via é o *CTNNB1*, localizado no cromossomo 3p22, uma região constantemente alterada em uma grande variedade de tumores, tem como produto final a proteína multifuncional β -catenina. Essa proteína possui uma porção N-terminal de 130, uma central de 550 e uma C-terminal de 100 aminoácidos, tendo como principais funções, em células não-neoplásicas, a adesão e a motilidade celular. (Silva *et al.*, 2013).

Em MB as mutações na β -catenina são encontradas principalmente nas serinas 33 e 37, do éxon 3, desregulando a via Wnt, devido ao bloqueio na degradação dessa proteína. Como consequência, os níveis de β -catenina aumentam de modo descontrolado, levando ao

desenvolvimento de um fenótipo transformado (Gilbertson, 2004; Rossi et al., 2008). Porém, trabalhos recentes mostraram que alterações na expressão da proteína β -catenina estão associadas a um melhor prognóstico e a uma maior sobrevida dos pacientes. Esses resultados sugerem que o acúmulo nuclear dessa proteína possa ser um marcador com resultados favoráveis em MB, e que a ativação de Wnt poderia servir como um indicador de um bom prognóstico (Ellison et al., 2005).

Além dessa via de sinalização, as proteínas da família Aurora-quinase (A, B e C) têm sido amplamente estudadas em diversos tumores, uma vez que dois de seus membros, o *Aurora-A* e a *Aurora-B*, foram encontrados hiperexpressos em diferentes tipos de neoplasias. Petersen *et al.* (2014) avaliaram 29 amostras de MB infantil (11 Shh, 7 Grupo 3 e 11 Grupo 4) e observaram a expressão dos Aurora A e B em 100% dos tumores, mas sem diferença significativa no nível de expressão relativa para os grupos moleculares. Harris *et al.* (2014) relataram que o Aurora-A e o Aurora-B estão hiperexpressos em amostras de MB, e a inibição destes genes por siRNA suprimiu o crescimento de células de MB *in vitro*. Além disso, foi relatado que a hiperexpressão da Aurora-A é um preditor independente de prognóstico desfavorável para os pacientes com MB (Neben *et al.*, 2004).

A inibição farmacológica das atividades dessas proteínas têm mostrado resultados promissores para a terapia do câncer (Boss *et al.*, 2009; Lok *et al.*, 2010; Geron *et al.*, 2015). Entre os inibidores de Aurora-quinases já descritos, o AMG 900, um inibidor/competitivo de trifosfato de adenosina, está atualmente na fase I de ensaios clínicos. Essa droga é altamente potente e seletiva para as auroras A, B, e C, e possui a capacidade de inibir, também, a fosforilação da histona H3, apresentando efeitos similares a outros inibidores de Aurora-quinases (Payton *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Geuns-Meyer *et al.*, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade de um dos membros da família das Aurora-quinases, a Aurora-A, pode estar envolvido com a via de sinalização Wnt durante a progressão de diversas neoplasias. El-Sheikh e colaboradores (2010) mostraram que a inibição da Aurora-A em MB, pode desencadear uma diminuição significativa da atividade dos fatores de transcrição TCF/Lef-1. Isso poderia indicar que inibindo a Aurora-A uma deficiência na via de sinalização Wnt estaria ocorrendo. Estes dados sugerem possíveis mecanismos pelos quais as Aurora-quinases regulariam o crescimento de células em MB (El-Sheikh *et al.*, 2010).

No entanto, devido à pequena coorte de MB tipo Wnt, e pelo fato de esta ser uma neoplasia bastante rara e com um prognóstico favorável, linhagens celulares de MB Wnt ainda não foram immortalizadas, não estando disponíveis para estudos. Como ainda não está

claro se a ativação da via Wnt pode conferir um genótipo menos agressivo em MB são necessárias mais investigações nesse subgrupo molecular (Salaroli *et al.*, 2015).

Assim, com o intuito de testar a hipótese do trabalho, todas as linhagens de MB presentes no laboratório foram caracterizadas. Para isso, foi realizado o sequenciamento do éxon 3 do gene *CTNNB1* (Silva *et al.*, 2013), e do éxon 15 do gene *APC* (Bougatef *et al.*, 2008), que são as regiões genômicas onde mutações ocorrem com mais frequência (*hotspots*), e que codificam proteínas importantes para a via Wnt (Zakrzewska *et al.*, 2004). Ambos os genes, quando mutados, tornam a β -catenina resistente à degradação, contribuindo assim, para a tumorigênese (Bougatef *et al.*, 2008; Bo *et al.*, 2012). Contudo, no presente estudo, nenhuma das linhagens sequenciadas apresentou mutações nos éxons descritos, sendo possível inferir que as linhagens UW403, UW473 e ONS-76 não são possuídas a via Wnt ativada, devendo ser classificadas em outro subgrupo de MB.

A fim de confirmar os resultados do sequenciamento, foi realizada também a análise da expressão gênica nas linhagens celulares em estudo e em cerebelos infantis não-neoplásicos. A análise da expressão gênica de mRNAs foi realizada em genes que codificam proteínas envolvidas na via Wnt, como β -catenina (*CTNNB1*), *Ciclina D1* e *C-Myc*, além dos genes que codificam as proteínas *Aurora-A* (*AURKA*) e *Aurora-B* (*AURKB*). A partir desse ensaio foi possível observar que o gene *CTNNB1* (β -catenina) apresentou uma baixa expressão nas linhagens UW402, UW473 e ONS-76, confirmando a hipótese de que nenhuma das linhagens seria Wnt ativa. No entanto, os genes alvos dessa via, *Ciclina D1* e *C-Myc*, apresentaram uma elevada expressão nas três linhagens. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que nas células a expressão desses genes pode ser independente da expressão de β -catenina (Pogoriler *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2014). A elevada expressão de β -catenina (*CTNNB1*) nos cerebelos não neoplásicos já era esperada, visto que esta proteína tem um papel importante em outras atividades celulares, como nas junções celulares contendo caderina e na motilidade celular (Gilbertson, 2004; Rossi *et al.*, 2008).

Sendo assim, com o intuito de estudar os efeitos da indução da expressão dos genes da via Wnt, fez-se necessário a indução da ativação dessa via, através do processo de transfecção transiente. Ao constatar que essa técnica seria necessária, foi então selecionado um plasmídeo específico. Este deveria possuir a inserção de um gene de interesse (*CTNNB1*) em sua sequência de DNA, para que a via fosse ativada. Dessa forma, o plasmídeo escolhido foi o pcDNA3-S33Y, que codifica uma forma não degradável de β -catenina, para que pudessemos avaliar os efeitos biológicos em condições de cultura e após o tratamento. Além disso, esse vetor possui uma mutação específica, que desencadeia a desregulação da via Wnt. A mutação

S33Y ocorre quando há uma substituição de uma serina por uma tirosina no códon 33, sendo o local de ligação de GSK3 β , proteína integrante do complexo de degradação da β -catenina na via Wnt. Ademais, o vetor escolhido também contém o gene de resistência à neomicina, permitindo assim, a seleção de células transfectadas resistentes ao antibiótico G418. (Kolligs *et al.*, 1999; Salaroli *et al.*, 2015).

Após a transfecção, foi realizada, novamente, a análise da expressão gênica dos mRNAs dos genes da β -catenina (*CTNNB1*), *Ciclina D1*, *C-myc*, *Aurora-A (AURKA)* e *Aurora-B (AURKB)* para verificar se a transfecção havia ocasionado a ativação da via Wnt e se essa ativação teria alguma correlação com a expressão dos genes dos Auroras-quinases. Com isso, foi possível observar que os níveis de expressão de β -catenina (*CTNNB1*), e dos seus genes alvos *Ciclina D1* e *C-Myc*, aumentaram em todas as linhagens, quando comparadas às linhagens não transfectadas, inferindo assim que a transfecção havia sido bem sucedida. Resultados semelhantes foram identificados por Salaroli e colaboradores (2015), onde observaram que a transfecção com pCIneo/ β -catenina S33Y, um outro plasmídeo que desencadeia a ativação da via, semelhante ao utilizado neste estudo, levou ao aumento da expressão da β -catenina, *Ciclina D1* e *C-myc* em linhagens de meduloblastoma. É interessante ressaltar que a expressão dos genes *Aurora-A* e *Aurora-B* nessas linhagens não foi alterada após a transfecção, indicando que não há uma correlação da expressão gênica da β -catenina com a dos genes *Aurora-A* e *Aurora-B*.

Foi realizado então o ensaio clonogênico com o intuito de analisar a capacidade de formação de colônias após a transfecção transiente nas linhagens UW473 e ONS-76. Foi possível então observar que ocorreu uma redução do número de colônias nas células transfectadas com o vetor de interesse (pcDNA3-S33Y). Em concordância com os dados encontrados neste trabalho, Salaroli *et al.* (2015) relataram uma redução no número de colônias após transfectar células de meduloblastoma com o plasmídeo pCI-neo/b-catenin S33Y. Tais resultados mostram que o aumento na taxa de mortalidade das células, após a ativação de Wnt em MB, pode ser devido a uma resposta celular ao acúmulo de β -catenina. No entanto, tal hipótese ainda não pode ser confirmada, pois no presente momento não há um modelo animal com MB do tipo Wnt, para que os ensaios *in vivo* confirmem que o acúmulo de β -catenina estaria relacionado a um bom prognóstico, por exemplo.

Posteriormente, para investigar se haveria alguma relação proteica entre as Auroras-quinases e as proteínas integrantes da via Wnt, foram realizadas a análise da expressão proteica da β -catenina, da Aurora A, e também da Aurora B nas linhagens transfectadas UW473 e ONS-76, antes e após o tratamento com AMG900. Foi possível observar que após a

transfecção a linhagem UW473 passou a expressar a β -catenina e as proteínas Aurora A e B, quando comparadas ao controle transfectado com o vetor vazio. No entanto, a linhagem ONS-76 já expressava, de maneira endógena, essas proteínas, e após a transfecção a expressão da β -catenina apresentou um aumento de aproximadamente 26% quando comparado ao controle. As expressões da Aurora A e da Aurora B não sofreram alterações significativas após a transfecção transiente nesta linhagem. Nas células transfectadas e tratadas, ambas as linhagens tiveram uma diminuição da expressão tanto da β -catenina (10 e 30%, respectivamente), quanto das Aurora-A (35 e 15%, respectivamente) e B (13 e 38%, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados por Zheng *et al.* (2014) e Li *et al.* (2015), que mostraram que o tratamento com inibidores de Auroras-quinases está relacionado com a diminuição da expressão de β -catenina em câncer de mama. Além disso, tais resultados também são consistentes aos observados por Xia *et al.* (2013) que demonstraram que a proteína Aurora A pode influenciar a estabilização da β -catenina, através da sua interação com a axina, ativando assim a via Wnt e promovendo a auto-renovação do glioma. Dutta-Simmons e colaboradores (2014) também demonstraram, em Mieloma Multiplo, que reduções de β -catenina estão correlacionadas com alterações da Aurora-A, o que poderia influenciar a progressão do ciclo celular. Assim, estes resultados mostram que provavelmente existe uma correlação proteica entre as Aurora-quinases e a β -catenina no MB.

Estudos anteriores demonstraram que a hiperexpressão de β -catenina pode estar relacionada com bloqueio da progressão do ciclo celular em G2/M, o que poderia desencadear a morte celular (Olmeida *et al.*, 2003; Hadjihannas *et al.*, 2012). Assim, para analisarmos se a transfecção estaria interferindo na progressão do ciclo, realizamos o ensaio de ciclo celular com as três linhagens celulares. Com isso, observamos que a hiperexpressão de β -catenina levou a um aumento celular significativo em G2/M na linhagem ONS-76. Porém, nas linhagens UW402 e UW473, não ocorreu uma alteração significativa no número de células nesta mesma fase do ciclo celular. Resultados que demonstram os efeitos de β -catenina no ciclo celular vão de encontro aos observados por nosso grupo. Olmeida e colaboradores (2003) mostraram que após a transfecção, com um plasmídeo semelhante ao utilizado por nosso grupo, de células epiteliais sincronizadas na fase S, os níveis de β -catenina aumentaram na fase S chegando ao seu acúmulo máximo em G2/M, o que desencadeou a apoptose dessas células. Hadjihannas e colaboradores (2012) também mostraram que em células de câncer colorretal, células com elevada expressão de β -catenina apresentam um pico celular em G2/M seguido de um rápido declínio para a fase G1. Tais resultados também explicariam talvez a redução do número de colônias no ensaio clonogênico, pois o aumento da expressão da β -

catenina está relacionado com o bloqueio do ciclo celular em G2/M, acarretando na morte celular (Olmeida *et al.*, 2003).

Em seguida, realizamos este mesmo ensaio, porém após o tratamento com o AMG 900 das linhagens transfectadas para avaliarmos qual seria o efeito dessa droga na divisão celular dessas linhagens. A inibição das Aurora-quinases com AMG 900 levou a um bloqueio significativo do ciclo celular na fase G2/M na linhagem ONS-76. Como esse bloqueio já havia ocorrido após a hiperexpressão de β -catenina (9%), o AMG 900 apenas intensificou este efeito encontrado nesta linhagem. Já nas linhagens UW402 e UW473 a inibição das Aurora-quinases levou a um aumento significativo das células na fase G2/M, tanto no controle transfectado com o vetor vazio quanto nas células transfectadas com o vetor de interesse. Esses resultados sugerem que o bloqueio observado nessas linhagens foi independente da β -catenina, diferentemente do observado na linhagem ONS-76. Tais resultados nos levou a hipótese de que a β -catenina não estaria interferindo no bloqueio do ciclo celular em G2/M nessas linhagens, e que esse efeito seria devido ao inibidor das Aurora-quinases. Assim, na linhagem ONS-76, devido a expressão endógenas dessas proteínas, o AMG 900 poderia estar potencializando o efeito já observado após a hiperexpressão da β -catenina, fazendo com que essas células ficassem mais susceptíveis ao tratamento com o AMG 900.

Neste trabalho, encontramos diferentes respostas das linhagens dependendo do ensaio realizado. Esta diferença, segundo Northcott *et al.* (2012), seria devido ao fato de o MB, assim como muitos tumores sólidos, ser altamente heterogêneo. Além disso, devemos destacar o fato de as linhagens UW402 e UW473 possivelmente serem classificadas como Grupo 3 ou 4 (Castro-Gamero *et al.*, 2012), enquanto que a linhagem ONS-76 é classificada como sendo do subgrupo Shh (Triscott *et al.*, 2013). Ademais, essas linhagens podem também apresentar diferenças na ploidia, alterações numéricas e rearranjos estruturais. Tais características têm sido associadas às modificações no comportamento biológico dessas células, bem como sua resposta aos quimioterápicos (Castro-Gamero *et al.*, 2012).

Essa diversidade celular poderia explicar talvez a heterogeneidade nos pacientes. Isso porque, apenas alguns grupos de células tumorais apresentam a mutação de β -catenina. Ademais, parte desses grupos podem também apresentar uma maior expressão basal das Aurora-quinases ou nem expressá-las. Isso gera perfis transcricionais distintos nas diferentes linhagens celulares. Com isso, pacientes podem ser diagnosticados com os diferentes subgrupos moleculares de MB. Sendo assim, alguns pacientes Wnt serão mais sensíveis aos inibidores de Aurora-quinases por possuírem talvez uma expressão endógena dos Aurora-

quinases, o que poderia favorecer a apoptose dessas células tumorais, e isto estaria relacionado ao melhor prognóstico desses pacientes.

Tais resultados nos levam a acreditar que possivelmente existe uma correlação proteica entre a β -catenina e as proteínas Aurora-quinases na patogênese do MB. Essa associação poderia ser talvez a responsável pelo bom prognóstico dos pacientes com MB do tipo Wnt. Além disso, os dados nos leva a hipotetizar que pacientes que já possuem uma expressão endógena das Aurora-quinases seriam mais suscetíveis a inibição destas pelo AMG 900, tendo assim uma melhor resposta ao tratamento. Todavia, apesar das evidências mostradas no presente estudo, ainda restam dúvidas sobre os mecanismos de ação envolvidos na ativação da via Wnt na formação de MBs, e sua relação com os Auroras-quinases. Assim, pesquisas adicionais continuam sendo necessárias para esclarecer o papel desta via, associada ou não com as Auroras-quinases, no desenvolvimento e na progressão do MB para que possamos ampliar os dados aqui discutidos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nos permitiram concluir que:

- Não foram encontradas mutações no éxon 3 e 15 da β -catenina (CTNNB1) e APC, respectivamente;
- As linhagens UW402, UW473, DAOY e ONS-76 não possuem a via Wnt ativa;
- Com a transfecção transiente, é possível aumentar a expressão de β -catenina, e de seus genes alvos *Ciclina D1* e *C-Myc* nas três linhagens celulares;
- Após a transfecção não ocorreu um aumento da expressão das Aurora-quinases, mostrando que provavelmente não há uma correlação entre a expressão gênica dos Aurora-quinases (*AURKA* e *AURKB*) com a expressão de β -catenina;
- A formação de colônias diminuiu após a transfecção transiente nas linhagens UW473 e ONS-76;
- O tratamento com AMG 900 diminuiu a expressão proteica da β -catenina e das Auroras A e B nas linhagens UW473 e ONS-76;
- A transfecção transiente não leva a uma alteração no número de células em G2/M nas linhagens UW402 e UW473. Porém, na linhagem ONS-76, esse aumento celular foi significativo em G2/M;
- O tratamento com AMG 900 levou a aumento significativo de células no ciclo na fase G2/M, no controle transfectado com o vetor vazio e nas células transfectadas nas linhagens UW402 e UW473. No entanto, na ONS-76 este bloqueio ocorre somente nas células transfectadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R. R.; Carmena, M.; Earnshaw, W. C. ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11(2):49–54.

Baron, M. An overview of the Notch signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14(2):113-119.

Bo N; Wang D; Wu B; Chen L; Ma R. Analysis of b-Catenin Expression and Exon 3 Mutations in Pediatric Sporadic Aggressive Fibromatosis. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2012; 15:173–178.

Borges, K. S. *et al.* Inhibition of Aurora kinases enhances chemosensitivity to temozolomide and causes radiosensitization in glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Mar;138(3):405-14.

Boss, D. S.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. Clinical experience with aurora kinase inhibitors: a review. *Oncologist*. 2009 Aug; 14(8):780-93

Bosotti, R., *et al.* Transcriptional analysis of the Aurora inhibitor Danusertib leading to biomarker identification in TP53 wild type cells. *Gene* 494 2012; 202–208.

Bougatef K *et al.* Prevalence of mutations in APC, CTNNB1, and BRAF in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2008; 187:12-18

Boveri, T. *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*. Fischer, Jena, 1914.

Bunting, S. F. and Nussenzweig, A. End-joining, translocations and cancer. *Cancer. Nature Reviews* 2013, 13: 443-454.

Cardona, A. F. *et al.* Novel genomic alterations in medulloblastoma: the final frontier? *RedLANO e-Journal*, 2012.

Carmena M.; Earnshaw W.C. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(11):842-54.

Castro-Gamero, A. M. *et al.* Inhibition of nuclear factor- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. *Anticancer Drugs* 2012; 23(6):638-50.

Chan, C. S.; Botstein, D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*, 1993; 135(3):677–91.

Cimmino, F. *et al.* Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/ β -catenina signaling. *J. Neurooncol.* 2012; 106:59-70.

Courjal, F. *et al.* DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. *Br J Cancer* 1996,74(12):1984-9.

Dakeng, S. *et al.* Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: Reduction of Wnt associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated β -catenin to the nucleus. *J Cell Biochem.* 2012; 113(1): 49–60.

Dale, T.C. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* (1998) 329, 209±223.

Dar, A. A.; Belkhiri, A.; El-Rifai, W. The aurora kinase A regulates GSK-3 β in gastric cancer cells. *Oncogene* 2009; 28, 866–875.

Davidson, G.; Niehrs, C. Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends in Cell Biology* 2010; 20:453–460.

Diaz, R. J. *et al.* Mechanism of action and therapeutic efficacy of Aurora kinase B inhibition in MYC overexpressing medulloblastoma. *Oncotarget* 2014, 6(5): 3359-74.

Ducat, D.; Zheng, Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Experimental Cell Research* 301 2004; 60– 67.

Dutta-Simmons, J. Aurora kinaseA is a target of Wnt/ β -catenin involved in multiple myeloma disease progression. *Blood* 2009; 114: 2699-2708.

Ellison, D.W. *et al.* Beta-catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The United Kingdom children's cancer study group brain tumour committee. *J Clin Oncol* 2005; 23:7951–7957.

El-sheikh, A. *et al.* Inhibition of aurora kinase A enhances chemosensitivity of medulloblastoma cell lines. 2010; 35-41. Doi:10.1002/pbc.

Fu, J. *et al.* Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5(1):1–10.

Fuentes, R. G.; Arai, M. A.; Ishibashi M. Natural compounds with Wnt signal modulating activity. *Nat Prod Rep* 2015.

Frandsen JE; Wagner A; Bollo RJ; Shrieve DC; Poppe MM. Long-term life expectancy for children with ependymoma and medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2015.

Gautschi, O. *et al.* Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer res* 2008; 14(6):1639-1648.

GE, X.; Wang, X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 2010, 3:33.

Geron L; Suazo VK; Andrade AF; Borges KS; Scrideli CA; Tone LG. Antitumour activity of AMG 900 alone or in combination with histone deacetylase inhibitor SaHa on medulloblastoma cell lines. *Neurological Research*. 2015; 37(8): 703-711.

Geuns-Meyer, S. *et al.* Discovery of N-(4-(3-(2-aminopyrimidin-4-yl)pyridin-2-yloxy)phenyl)-4-(4-methylthiophen-2-yl)phthalazin-1-amine (AMG 900), a highly selective, orally bioavailable inhibitor of aurora kinases with activity against multidrug-resistant cancer cell lines. *J Med Chem*. 2015, 58(13):5189-207.

Gilbertson, R. J.; Ellison, D. W. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis* 2008; 3:341–365.

Glover, D. M. *et al.* Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995; 81(1):95–105.

Goschzik, T. *et al.* Molecular stratification of medulloblastoma: comparison of histological and genetic methods to detect Wnt activated tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015, 41(2):135-44.

Gritsko, T. M. *et al.* Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer res* 2003, 9(4):1420-6.

Guessous, F.; Li, Y.; Abounader, R. Signaling pathways in medulloblastoma. *J. Cell. Physiol*. 2008; 217:577-83.

Gulino, A.; Arcellab, A.; Giangaspero, F. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Current Opinion in Oncology* 2008, 20:668–675.

Gupta T1, Shirsat N, Jalali R. Molecular Subgrouping of Medulloblastoma: Impact Upon Research and Clinical Practice. *Curr Pediatr Rev.* 2015;11(2):106-19.

Hadfield C; Jordan BE; Mount RC; Pretorius GHJ; Burak E. G418-resistance as a dominant marker and reporter for in *Saccharomyces cerevisia*. *Curr Genet.* 1990; 18:303-313.

Hadjihannas, M. V. *et al.* Cell cycle control of Wnt/b-catenin signaling by conductin/axin2 through CDC20. *EMBO reports* 2012, 13(4):347-354.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-76.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.

Harris, PS *et al.* Integrated genomic analysis identifies the mitotic checkpoint kinase WEE1 as a novel therapeutic target in medulloblastoma. *Mol Cancer.* 2014; 13:72.

He, X.; Semenov, M.; Tamai, K.; Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004;131:1663–1677.

Huang L.; Be X.; Berry L.; Moore E.; Janosky B.; Wells M.;Pan W-P.; Zhao Z.; Lin M-H J. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterizations of AMG 900, an orally bioavailable small molecule inhibitor of aurora kinases. *Xenobiotica*, 2011, 41(5): 400–408.

Jallepalli, P. V.; Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* 2001, 1(2):109-17.

Jeng, Y. M. et al. Overexpression and amplification of Aurora A in hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10(6):2065-71.

Jimenez A, Davies J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature.* 1980; 287:869-871.

Kawano, Y.; Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 2003; 116:2627-2634.

Kim, Y. *et al.* Wnt/ β -Catenin: A new therapeutic approach to acute myeloid leukemia. *leukemia research and treatment* 2011.

Kim, Y. *et al.* Influencing the Wnt Signaling Pathway in Multiple Myeloma. *ANTICANCER RESEARCH* 2011; 31: 725-730.

Kimura, M et al. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a Novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem* 1997, 272(21):13766-71.

Kimura, M. *et al.* Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Lpl-1 related protein kinase, Alk3. *J Biol Chem* 1999, 274(11):7334-40.

Klaus, A.; Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *NATURE REVIEWS Cancer* 2008; 8: 387-398.

Koesters, R.; Doeberitz, M.V.K. The Wnt signaling pathway in solid childhood tumors. *Cancer Lett.* 2003; 198:123-138.

Komiya, Y.; Habas, R. Wnt vias de transdução de sinal. *Organogenesis* 2008, 4(2):68-75.

Kool, M. *et al.* Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2012; 123, 473–484.

Kollings FT *et al.* Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(8):5696-706.

Krenn, V. and Musacchio, A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol.* 2015, 5:225. doi: 10.3389/fonc.2015.00225.

Lang, S. S. *et al.* Surgical treatment of brain tumors in infants younger than six months of age and review of the literature. *World Neurosurg* 2012, 78(1- 2):137-44.

Leal LF *et al.* Wnt/ β -Catenin Pathway Deregulation in Childhood Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(10):3106–3114.

Li, X. et al. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the Novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* 2004, 279(45):47201-11.

Li, J-P. *et al.* The pan-inhibitor of Aurora kinases danusertib induces apoptosis and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy* 2015, 9:1027-62.

Linardopoulos, S. and Blagg, J. Aurora kinase inhibition: a new light in the sky? *J Med Chem.* 2015, 58(13):5186-8.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.

Lok, W.; Klein, R. Q.; Saif, M. W. Aurora kinase inhibitors as anti-cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2010 Apr; 21(4):339-50.

Lopes, C. S.; Sunkel, C.A. The spindle checkpoint: From Normal cell Division to Tumorigenesis. *Archives of Medical Research* 2003;34:155-165.

Lucero, O.M. *et al.* A Re-evaluation of the “Oncogenic” Nature of Wnt/ β - catenin Signaling in Melanoma and Other Cancers. *Curr Oncol Rep* 2010; 12:314–318.

MacDonald, B.T. *et al.* Wnt/ β -catenin Signaling: Components, Mechanisms and Diseases. *Developmental Cell*. 2009.

Marino, S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol. Med.* 2005; 11:17-22.

Maris, J.M. *et al.* Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the pediatric preclinical testing program (PPTP). 2010; 26-34. Doi:10.1002/psc.

Meraldi, P.; Honda, R.; Nigg, E. A. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Op in Gen & Develo* 2004; 14(1):29-36.

Millard, N. E. and De Braganca, K. C. Medulloblastoma. *J Child Neurol* 2015.

Montebault, E.; Prigent, C. Aurora kinase: therapeutic potential. *Drugs and future* 2005; 30(1):1-9.

Mountzios, G.; Terpos, E.; Dimopoulos, M. A. Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer treatment Reviews* 2008; 34:175-182.

Murphy, E. S. *et al.* Radiosurgery for Pediatric Brain Tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. doi: 10.1002/pbc.25831.

Neben, K. *et al.* Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res* 2004; 64(9):3103-11.

Negrini, S.; Gorgoulis, V. G. and Halazonetis, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Molecular Cell Biology*. *Nature Reviews* 2010, 11: 220-228.

Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J. Clin. Oncol* 2011; 29, 1408–1414.

Northcott, P. A. *et al.* Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 2012;. 123, 615–626.

Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastomas: the end of the beginning. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group 2012.

Olmeda, D. *et al.* β - Catenin Regulation during the Cell Cycle: Implications in G2/M and Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 2003, 14:2844–2860.

Ota, T. *et al.* Increase mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res*, 2002; 62(18):5168-77.

Packer, R. J. Risk stratification of medulloblastoma: a paradigm for future childhood brain tumor management strategies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11(2):124-6.

Payton M, *et al.* Preclinical evaluation of AMG 900, a novel potent and highly selective pan-aurora kinase inhibitor with activity in taxane-resistant tumor cell lines. *Cancer Res*. 2010 Dec 1;70(23):9846-54

Pei, Y. *et al.* WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development* 2012; 139:1694-1703.

Petersen W, *et al.* Dasatinib suppression of medulloblastoma survival and migration is markedly enhanced by combining treatment with the aurora kinase inhibitor AT9283. *Cancer Lett.* 2014; 354(1):68–76.

Pichandi, A. *et al.* Cranio Spinal Irradiation of Medulloblastoma Using High Precision Techniques - A Dosimetric Comparison. *Technol Cancer Res Treat* 2014.

Pogoriler, J. *et al.* Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Development* 2006; 133(19): 3929–3937.

Polakis, P. Wnt signaling and câncer. *Genes Dev.* 2000 14: 1837-1851.

Polkinghorn, W. R.; Tarbell, N. J. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4(5):295-304.

Quartuccio, S. M. and Schindler K. Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2015, 3:50.

Reznikoff, C. A. et al. A molecular genetic model of human bladder pathogenesis. *Semin Oncol* 1996, 23(5):571-84.

Ris, M. D. *et al.* Intellectual outcome after reduce-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 2001; 19:3470-3476.

Rossi, A. *et al.* Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14:971-976.

Roussel, M.F.; Hatten, M.E. Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 2011 ; 94: 235–282.

Sabia, A. and Anger, W. H. Jr. Chemotherapy for Children With Medulloblastoma. *Cancer Nurs*, 2015, 38(6):490-2.

Salaroli R *et al.* Radiobiologic response of medulloblastoma cell lines: involvement of b-catenin? *J Neurooncol* 2008, 90:243–251.

Salaroli R *et al.* Wnt activation affects proliferation, invasiveness and radiosensitivity in medulloblastoma. *J Neurooncol* (2015) 121:119–127.

Sato, N. *et al.* Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genetic Cytogenetic* 2001, 126(1):13-9.

Sasai, K. et al. Aurora-C kinase is a Novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell motil Cytoskeleton* 2004, 59(4):249-63.

Saunders, W. S. et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl acad Sci USA* 2000; 97(1)303-8.

Schmidt, M.; Bastians, H. Mitotic drug targets and the developed of Novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resistance Updates* 2007; 10:162-181.

Scrideli, C.A. et al. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and Non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Neuro-Oncology*, 2008.

Shinwari, Z. et al. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21WAF1 up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *J Neurooncol* 2008; 87:123–132.

Silva R *et al.* CTNNB1, AXIN1 and APC expression analysis of different medulloblastoma variants. *Clinics*. 2013; 68(2):167-172

Stefanaki, K. *et al.* Tumors of central and peripheral nervous system associated with inherited genetic syndromes. *Pediatr Neurosurg*. 2012, 48(5):271-85.

Taipale, J.; Beachy, P.A. Pathways in cancer. 2001; 411.

Tamura K1. Development of cell-cycle checkpoint therapy for solid tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2015.

Tanaka, T. et al. Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1999, 59(9):2041-4.

Tanner, M. et al. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clinical Cancer Res* 2000, 6(5):1833-9.

Tatsuka, M. et al. Multinuclearty and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* 1998, 58(21):4811-6.

Taylor, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 465–472.

Triscott, J. *et al.* Personalizing the Treatment of Pediatric Medulloblastoma: Polo-like Kinase 1 as a Molecular Target in High-Risk Children. *Cancer Res* 2013, 73(22):6734-44.

Ulrich H; Trujillo C A. Bases moleculares da biotecnologia. São Paulo: Roca, 2008. 218 p.

Xia.Z. *et al.* AURKA governs self-renewal capacity in glioma-initiating cells via stabilization/activation of b-catenin/Wnt signaling. *Mol Cancer Res* 2013; 11(9).

Zakrzewska M et al. Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors--analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1, 5, 9, 10, 11, 16, 17 and 22. *Clin Neuropathol*. 2004; 23(5):209-17.

Zhang, X. and Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Cancer Res* 2015, 5(8):2344-60.

Zhang, J. *et al.* Prognostic value of Aurora kinase A (AURKA) expression among solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol.* 2015, 45(7):629-36.

Zheng, F-M. *et al.* A Novel Small Molecule Aurora Kinase Inhibitor Attenuates Breast Tumor-Initiating Cells and Overcomes Drug Resistance. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(8):1991-2003.

Zhou, H. *et al.* Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998, 20(2):189-93.