

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PABLO FERREIRA DAS CHAGAS

Gene Musashi-1 em Meduloblastoma de Grupo 3 e 4

Ribeirão Preto - SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PABLO FERREIRA DAS CHAGAS

Gene Musashi-1 em Meduloblastoma de Grupo 3 e 4

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Coorientador: Dr. Elvis Terci Valera

Ribeirão Preto - SP

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Chagas, Pablo Ferreira das

Gene Musashi-1 em Meduloblastoma de Grupo 3 e 4. Ribeirão Preto, 2021.

159 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga

1. Meduloblastoma. 2. Musashi-1. 3. Notch.

Apoio e Suporte Financeiro

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. (Processos nº 2017/26160-5; 2014/20341-0);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FAEPA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Pablo Ferreira das Chagas

Título: Gene Musashi-1 em Meduloblastoma de Grupo 3 e 4

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta Tese à minha avó materna Maria José Ferreira (In memoriam), por ter me inspirado a ser, antes de tudo, professor de chão de escola. É assim que se faz minha essência.

Agradecimientos



Na verdade, nunca me disseram o que é viver um doutorado. Acredito que seja um processo que não venha acompanhado de avisos prévios e/ou protocolos de boa conduta. Ao final, descobri que viver um doutorado vai muito mais além da obtenção de um novo título. É sobre se transformar, amadurecer, crescer e evoluir. E mesmo diante de inúmeras dificuldades que a ciência brasileira neste momento enfrenta, me sinto privilegiado por ter tido ao meu lado durante estes quatro anos, pessoas que se tornaram únicas, por contribuir para que este processo tenha ocorrido de forma leve, e com amor me acompanharam nesta caminhada. Portanto, acima de tudo com respeito, humildade e simplicidade, me ajudaram a crescer como pessoa e como pesquisador, me mostrando como ser benevolente e resiliente, e antes de tudo, humano. A estas pessoas aqui registro meus agradecimentos.

À minha mãe *Rita Maria Ferreira*, pelo exemplo de garra, perseverança, honestidade, lealdade e transparência. Obrigado por ter criado um filho para “o mundo”, por ter cultivado em mim princípios e valores necessários ao meu amadurecimento e crescimento. Obrigado por acreditar, confiar e por me amar.

Aos meus pais *José Francisco das Chagas e Francisco Carlos Barbosa*. Obrigado pelo privilégio e honra, dos dois exemplos exímios de estrutura familiar.

Aos meus irmãos, *Pe. Diego Ferreira da Silva*, e *Tais Roberta da Silva Chagas*. Por todo apoio, credibilidade e respeito pelas minhas ausências.

Aos demais membros de minha família, que nunca me tornaram ausente. Obrigado pelo apoio e confiança.

Ao meu Orientador, *Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone*. Obrigado pela acolhida e confiança. Infelizmente as palavras não serão suficientes para descrever o imenso respeito, carinho e amor que sinto pelo Sr. Contudo, é preciso que fique registrado a transformação pessoal e profissional que o Sr. proporcionou para minha realidade, e o impacto dessa transformação para minha família. Com toda minha gratidão, foi um privilégio ter tido o Sr. como meu Orientador nestes quatro anos. E eu espero do fundo do meu coração, no futuro poder proporcionar aos meus alunos aquilo que o Sr. proporcionou e cultivou em mim. A Pós-graduação não é uma jornada fácil, ela é cruel, seletiva. Mas na realidade o Sr. conseguiu me mostrar o quão isso é necessário, e como superar estas dificuldades com parcimônia. Que saudades vou sentir. Obrigado por ter me ensinado a voar sem me fazer esquecer meu ninho.

Ao meu Coorientador, *Dr. Elvis Terci Valera*. Obrigado por todos os ensinamentos, direcionamentos, confiança e credibilidade. Neste período o Sr. foi um exemplo de pesquisador ao qual me espelhei muito. Ao Sr. toda minha gratidão por acreditar nas minhas ideias, corrigir meus passos e me ajudar a crescer. A vida às vezes pega a gente de surpresa, quando eu entrei

no doutorado não queria me tornar uma pessoa muito focada na escrita de artigos. Entretanto, o Sr. me ensinou o quanto isso é importante, pois faz parte de nossa história, nossa trajetória e se torna nosso retorno, que por obrigação precisamos ter com a sociedade. Obrigado por me ensinar a manter uma produção acadêmica com leveza, e acima de tudo com transparência e amor.

Ao *Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli*, por todo apoio, companheirismo, confiança e credibilidade neste período. Sempre o notei muito humano frente suas condutas. Portanto, o Sr. se tornou um exemplo.

Ao *Dr. Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro*, obrigado por todos os ensinamentos de bancada e conteúdo. Obrigado por ter despertado em mim o amor pelo estudo do Meduloblastoma. Embora não tenhamos convivido juntos por muito tempo, você teve um papel ímpar no início e desfecho, da construção deste projeto de pesquisa.

À *Dra. Carolina Alves Pereira Correa*, obrigado por desde o princípio ter sido uma fiel companheira em bancada. Nós aprendemos na escola o conceito de definição parental, mas foi muito importante este presente, através do nosso reencontro criamos um laço que vai além de definição, por amor ele apenas existe. Obrigado por ter segurado firme a minha mão. Além disso agradeço à *Camila Pontoglio*, que em conjunto, resgataram em mim a importância do amor, do respeito e união.

À *Me. Graziella Ribeiro de Sousa*, minha irmã de Alfenas. Grazi, talvez eu também não consiga dizer o quão importante você é em minha vida. Você foi responsável pela construção inicial de todo este caminho e amadurecimento. Foi um privilégio poder contar com você nestes anos. Vamos nos separar por um momento, mas eu acredito fortemente, que em breve estaremos juntos dividindo algum laboratório. Eu te amo muito.

À *Dra. Luciana Chain Veronez*, obrigado pelo presente de sua existência. Que alegria foi sua chegada, e que prazer poder contar com você durante este tempo. Você possui um lugar muito especial em minha vida. Desculpas por te deixar louca no dia-a-dia, mas era uma estratégia em te manter por perto.

À *Dra. Karina Bezerra Salomão*, obrigado por todo apoio, pelos ensinamentos, pelos abraços e sorrisos. Você foi um grande exemplo de como conseguir enfrentar todas as dificuldades com perseverança e amor.

Aos demais membros de laboratório e colegas de bancada: *Keteryne, Gabriela, Verena, Keliton, Ricardo, Taciani, Luís, Andrea, Pâmela, Lenisa, Mariana, Mirella, Milena, Régia*. Agradeço pelo companheirismo, aprendizado, e pelo compartilhar de momentos felizes que tivemos juntos nestes anos.

Aos meus amigos e companheiros de jornada, que compreenderam minhas escolhas, respeitaram, e me apoiaram neste processo: *Leilane, Manuella, Carol Mendes, Gabriela Azevedo, Yara Almeida, Gustavo de Gois, Isadora, Évila, Bárbara Garcia, Rayssa Reis (In memoriam), Hamanda e Júlio*. Obrigado por tudo.

Ao *Prof. Dr. José Andres Yunes, Prof^a. Dra. Suely K. N. Marie, Prof^a Dra. Silvia Regina Brandalise e Prof^a. Dra. Maria Sol Brassesco* pela disponibilidade e colaboração.

À minha Orientadora de Graduação *Prof^a Dra. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça* e à minha Orientadora de Mestrado, *Prof^a Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira*. Obrigado por terem me ensinado o caminho, e por despertar em mim o amor pela Genética.

À bióloga do nosso laboratório, *Dra. Rosane de Paula Gomez de Queiroz*, obrigado pela acolhida, pelos ensinamentos, puxões de orelha e por ter sido tão compreensiva em meus momentos de maiores dificuldades.

Às técnicas *Veridiana Kill Suazo* e a *Elizabeth Perna*, por todo amparo, companheirismo, ensinamento e ternura.

À *Evelise Vinsconte*, pela parceria, companheirismo, fidelidade e amizade construída.

A todos os membros, funcionários e prestadores de serviço do Laboratório de Pediatria, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. É preciso reconhecer com exatidão, o papel e a importância que cada um de vocês tiveram para que este ciclo chegasse ao fim. A cada bom dia acompanhado de um belo sorriso, e um até longo e bom descanso ao final do dia, é o que tornava minha caminhada mais firme e prazerosa.

À *Prof^a Dra. Marisa Ramos Barbieri*, por todo espaço e transformação proporcionada junto a Casa da Ciência.

À *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)*, seu corpo docente, direção e administração.

Ao *Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder*, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP.

À *Prof^a. Dra. Ester Silveira Ramos*, Chefe do Departamento de Genética e Vice-Coordenadora do programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP.

Aos *professores, equipe técnica e alunos* membros do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP. Em especial, à *Prof^a Dra. Vanessa Silva Silveira* e ao *Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz*, pelos ensinamentos e exemplos de conduta em ser professor.

À secretária do Departamento de Genética *Susie Nalon*, ao qual com todo carinho, amor e dedicação, sempre esteve disposta a ajudar e instruir. Obrigado, Susie.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto, bem como pela bolsa de Doutorado concedida durante este período (2017/26160-5).

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)*, pela concessão inicial da bolsa de Doutorado e apoio financeiro – Código de Financiamento 001.

À *Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência* do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), pelo apoio financeiro.

Aos *membros da banca*, pela disponibilidade e pela avaliação do nosso trabalho.

Aos *pacientes* acometidos pelo Meduloblastoma e seus *familiares*, por suas generosas contribuições para este estudo.

E a todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço também à fonte criadora da vida, e à *Ayahuasca* Medicina.

"Seja humilde se queres obter a sabedoria, porém, seja ainda mais humilde quando a tiver adquirido. A mais importante de todas as obras é o exemplo da própria vida".

Helena P. Blavatsk

RESUMO

CHAGAS, P. F. “Gene Musashi-1 em Meduloblastoma de Grupo 3 e 4”. 2021, 159 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Os Grupos 3 e 4 são os subgrupos moleculares de meduloblastoma (MB) que apresentam altas taxas de disseminação leptomeningea e maior frequência ao diagnóstico, respectivamente. Por conseguinte, são considerados, em conjunto, os mais mortais dos subtipos de MB. Até a presente data, é notado uma escassez de biomarcadores e caracterizações de vias de sinalização celular associadas a biogênese destes tumores. Todavia, embora seja descrito que a via *Notch* encontra-se alterada em MBs de Grupos 3 e 4, as principais causas desta desregulação permanecem desconhecidas. A proteína de ligação ao RNA Musashi-1 (MSI1), é um regulador da expressão gênica à nível pós-transcricional, descrito como marcador de célula-tronco neural, biomarcador de pior prognóstico e/ou promissor alvo terapêutico em diversos cânceres. Ademais, é reconhecido que MSI1 pode realizar *cross-talks* com moléculas da via de sinalização celular *Notch*. Neste estudo, foi investigado o papel biológico e funcional de *MSI1* na carcinogênese de MBs Grupos 3 e 4 *in vitro*. Em adição, foi avaliado seu papel como efetor de *cross-talks* com a via *Notch*. Inicialmente, foi avaliado o perfil da expressão gênica e proteica de MSI1 por qRT-PCR e imunohistoquímica em nossa coorte de pacientes pediátricos com MB, e por análises *in silico* utilizando os valores de expressão de banco de dados públicos de amostras de MBs pediátricos. Em seguida, foi realizado o *knockdown* de *MSI1* por shRNA na linhagem celular D283 Med (MB Grupo 3 e 4), sendo estas células utilizadas para os ensaios funcionais combinado ao tratamento com cisplatina, e para o sequenciamento de RNA. Foi identificado a hiperexpressão de *MSI1* nos MBs de Grupos 3 e 4. Posteriormente, o *knockdown* de *MSI1* induziu uma diminuição da expressão de p21, atenuou a viabilidade celular, promoveu a quimiosensibilidade celular frente ao tratamento com cisplatina e aumentou a taxa de apoptose das células D283 Med. Interessantemente, foi observado um aumento da expressão gênica e proteica de Notch-1 após o *knockdown* de *MSI1*. Ademais, as análises de enriquecimento de vias demonstraram o impacto do silenciamento gênico e proteico de MSI1 na alteração de importantes processos associados aos principais *hallmarks* do câncer. Em conclusão, os resultados do presente estudo são os primeiros a demonstrar que *MSI1* além de ser um promissor biomarcador de diagnóstico para os MBs de Grupos 3 e 4, atua também na modulação da expressão de genes chave da via *Notch* nestes tumores subgrupo-específico. Além disso, o *knockdown* de *MSI1* combinado ao tratamento com cisplatina pode oferecer uma estratégia em potencial para pesquisas futuras de terapia individualizada para os pacientes diagnosticados com MBs de Grupos 3 e 4.

Palavras-chave: Grupo 3; Grupo 4; Meduloblastoma; Proteína de ligação de RNA; *MSI1*.

ABSTRACT

CHAGAS, P.F. “**Musashi-1 gene in Group 3 and 4 Medulloblastomas**”. 2021, 159 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Groups 3 and 4 are the molecular subgroups of medulloblastoma (MB) that have the highest rates of leptomeningeal spread and frequency of diagnosis, respectively. Therefore, they are considered the deadliest subgroups. To date, it is noted a scarcity of biomarkers and characterizations of cell signaling pathways associated with the biogenesis of these tumors. However, although the *Notch* pathway has been reported to be altered in MBs from Groups 3 and 4, the main causes of this dysregulation remain unclear. The RNA binding protein Musashi-1 (MSI1) is a regulator of gene expression at the post-transcriptional level, described as a neural stem cell marker, a biomarker of worse prognosis and/or a promising therapeutic target in several cancers. Furthermore, it is recognized that MSI1 can cross-talk with molecules of the *Notch* cell signaling pathway. Initially, we evaluated the gene and protein expression profile of MSI1 by qRT-PCR and immunohistochemistry in our cohort of pediatric patients with MB, and by *in silico* analyzes using expression values from a public dataset of pediatric MB samples. Then, *MSI1* knockdown was performed by shRNA in the D283 Med cell line (MB Group 3 and 4), and these cells were used for functional assays in combination with cisplatin treatment, and RNA sequencing. An overexpression of *MSI1* was identified in MBs of Groups 3 and 4. Subsequently, *MSI1* knockdown induced a decrease in p21 expression, attenuated cell viability, promoted cell chemosensitivity against cisplatin treatment and increased the apoptosis rate of D283 Med cells. Interestingly, an increase of *Notch-1* gene and protein expression were observed after the knockdown of MSI1. Furthermore, pathway enrichment analyzes demonstrated the impact of MSI1 gene and protein silencing in altering important processes associated with the main hallmarks of cancer. In conclusion, the results of the present study are the first to demonstrate that *MSI1* is not only a promising diagnostic biomarker for MBs from Groups 3 and 4, but also modulates the expression of key genes of the *Notch* pathway in these subgroup-specific tumors. Furthermore, the *MSI1* knockdown combined with cisplatin treatment may offer a potential strategy for future research into individualized therapy for patients diagnosed with Group 3 and 4 MBs.

Keywords: Group 3; Group 4; Medulloblastoma; RNA binding protein; *MSI1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hallmarks do câncer e células do microambiente tumoral:	25
Figura 2 – Representação esquemática do início e progressão do MB	31
Figura 3 - Classificação histopatológica do MB.	33
Figura 4 - Heterogeneidade molecular do MB.	36
Figura 5 - Regiões de ligação e sítios de clivagem para a ativação da via <i>Notch</i>	42
Figura 6 - Alterações fenotípicas em <i>Drosophila sp.</i>	45
Figura 7 - Representação esquemática dos domínios de interação molecular de Musashi-1...46	
Figura 8 - Musashi e sua influência na modulação da auto-renovação em células tronco e no câncer.....	47
Figura 9 - Hiperexpressão de <i>MSI1</i> e modulação de genes alvos (Hipótese).....	51
Figura 10 - Fluxograma do delineamento experimental.....	55
Figura 11- Características clínicas e moleculares.....	58
Figura 12 - Perfil de expressão gênica de <i>MSI1</i> em MB pediátrico	71
Figura 13- Fotomicrografias representativas da expressão proteica de MSI1 em tecidos tumorais de MBs pediátricos determinada por IHQ.....	73
Figura 14- Análise de sobrevida global e livre de eventos.....	76
Figura 15 - Análise da curva ROC.	77
Figura 16 - Perfil de expressão gênica e proteica de MSI1	78
Figura 17 - Microfotografias ilustrativas Imunofluorescência.....	79
Figura 18 - Localização citogenética e representação genômica de MSI1.....	80
Figura 19 - Confirmação do <i>knockdown</i> de <i>MSI1</i> em células D283 Med.....	81
Figura 20 - Avaliação do efeito do silenciamento de <i>MSI1</i> no ciclo celular.....	82
Figura 21 - Quantificação das proteínas MSI1, p21 e p27.	83
Figura 22 - Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de <i>MSI1</i> na viabilidade celular.	84
Figura 23 - <i>knockdown</i> de <i>MSI1</i> associado ao tratamento com cisplatina	86
Figura 24 - Análise de correlação entre <i>MSI1</i> e <i>Notch-1</i>	88
Figura 25 - Expressão gênica diferencial entre shRNA Scramble e shRNA <i>MSI1</i> #2.....	89
Figura 26 - Análise de enriquecimento de vias.	90
Figura 27 – Perfil de expressão de genes da via <i>Notch</i>	91
Figura 28 - Confirmação do aumento da expressão de Notch-1	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definição das categorias de metástases..... 32
Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados neste estudo 61
Tabela 3 – Análise Imunohistoquímica de MSI1 nas biópsias de MBs pediátricos..... 74
Tabela 4 – Dados clínicos..... 75
Tabela 5 - Viabilidade celular e valores de IC₅₀..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Média desvio padrão
µL	Microlitros
µM	Micromolar
a.C	Antes de Cristo
ACG	Anaplásico de células grandes
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	<i>Area Under the ROC curve</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCG	Camada das células granulares
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGPs	<i>Granule cell progenitors</i>
CM	Camada molecular
CTNNB1	<i>Catenin beta 1</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
Dhh	<i>Desert hedgehog</i>
DN	Desmoplásico nodular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRCh	<i>Genome Reference Consortium Human</i>
h	Horas
HH	<i>Hedgehog</i>
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas
IB	Instituto Boldrini
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LaCTAD	Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida

LB	Luria Bertani
M	Metástase
MB	Meduloblastoma
MBEN	Meduloblastoma com extensa nodularidade
mM	Milimolar
MMA	<i>Mastermind-like</i>
MSI	Musashi
MSI1	Musashi-1
MSI2	Musashi-2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCs	<i>Purkinje cells</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PNETs	<i>Primitive neuroectodermal tumors</i>
PTC	<i>Patched</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
RBP	<i>RNA Binding protein</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA-Seq	<i>RNA-Sequencing</i>
ROC	Curvas de características de operação do receptor
Rpm	Rotações por minuto
RRMs	<i>RNA recognition motifs</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
Smo	<i>Smothered</i>
SNC	Sistema nervoso central
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline -Tween</i>
USP	Universidade de São Paulo

UTR	<i>Untranslated region</i>
Wnt	<i>Wingless</i>
α	Alfa
β	Beta
γ	Teta
δ	Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Câncer	24
1.2 Meduloblastoma: origem e resgate histórico	27
1.3 Meduloblastoma no Século XXI: diagnóstico molecular e terapia gênica	30
1.4 SUBGRUPOS MOLECULARES DO MEDULOBLASTOMA	37
1.4.1 Meduloblastoma WNT	37
1.4.2.1 Meduloblastoma SHH	38
1.4.3 MB Grupo 3	39
1.4.4 MB Grupo 4	40
1.4.5 MBs Grupos 3 e 4: um desafio clínico contemporâneo	41
1.5 Via de sinalização celular <i>Notch</i> : papel e implicações no câncer	41
1.6 Proteína Musashi	44
2. HIPÓTESE	51
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral	53
3.2 Objetivos Específicos	53
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
5. METODOLOGIA	57
5.1 Casuística	57
5.2 Linhagens celulares e condições de cultura	59
5.3 Análise da Expressão Gênica	60
5.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	60
5.3.2 PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	60
5.4 Análise da Expressão Proteica	60
5.4.1 <i>Western Blot</i>	60
5.4.2 Imunohistoquímica	61
5.5 Imunofluorescência	62
5.6 Modulação gênica de <i>MSII</i>	63
5.6.1 Expansão dos vetores para <i>knockdown</i>	63
5.6.2 Produção das partículas lentivirais	63
5.6.3 Transdução da linhagem D283 Med (MB Grupo 3 e 4)	64
5.7 Preparo e tratamento com a droga Cisplatina	64

5.8 Ensaio Funcionais	64
5.8.1 Viabilidade Celular	64
5.8.2 Ensaio de Apoptose	65
5.8.3 Ensaio/Análise do ciclo celular	65
5.9 Técnicas e abordagens de bioinformáticas integrativas aplicadas à análise transcriptoma	66
5.9.1 Análises <i>in silico</i>	66
5.9.2 Extração de RNA total e sequenciamento	66
5.9.3 Análise dos dados de RNA-seq	67
5.10 Análises estatísticas	68
5.10.1 Expressão gênica diferencial	68
5.10.2 Sobrevida Global e Livre de Eventos	68
5.10.3 Curva ROC	68
5.10.4 Análises dos ensaios funcionais	69
6. RESULTADOS	71
6.1 Avaliação do perfil de expressão gênica de <i>MSII</i> em amostras de MBs pediátricos	71
6.2 Avaliação do perfil da expressão proteica de <i>MSI1</i> em biópsias de MBs pediátricos	72
6.3 Análise da associação dos níveis de expressão gênica de <i>MSII</i> com características clínicas de pacientes pediátricos com MB em nossa coorte	74
6.4 Correlação entre o nível de expressão gênica de <i>MSII</i> e as sobrevida global e livre de eventos em pacientes pediátricos com MB	76
6.5 Avaliação do valor diagnóstico da expressão de <i>MSII</i> na discriminação de MBs de Grupos 3 e/ou 4 (pior prognóstico) dos demais subgrupos moleculares	77
6.6 Avaliação do perfil de expressão gênica e proteica de <i>MSI1</i> nas linhagens celulares de MB Grupo 3 e 4	78
6.7 Intensidade e localização celular de <i>MSI1</i> por imunofluorescência	79
6.8 Silenciamento da expressão gênica de <i>MSII</i> na linhagem celular D283 Med	80
6.9 Confirmação do <i>knockdown</i> de <i>MSII</i>	81
6.10 Ensaio de ciclo celular	82
6.11 Avaliação da expressão de proteínas de controle do ciclo celular após o <i>knockdown</i> de <i>MSII</i>	83
6.12 Viabilidade celular após o tratamento com a droga cisplatina	84
6.13 Avaliação do efeito do silenciamento de <i>MSII</i> na apoptose celular após o tratamento com cisplatina	85
6.14 Caracterização de <i>Notch-1</i> como alvo de <i>MSII</i> em MBs Grupos 3 e 4	87
6.15 Identificação de genes diferencialmente expressos entre células shRNA Scramble e shRNA <i>MSII</i> #2	88

6.16	Análise de enriquecimento de vias e processos celulares.....	89
6.17	Avaliação do perfil de expressão de <i>Notch-1</i> nos dados de RNA-Seq.....	91
6.18	Validação da expressão gênica e proteica de <i>Notch-1</i>	92
7.	DISCUSSÃO	94
8.	CONCLUSÕES	103
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10.	ANEXOS	124
11.	APENDICES	128

1 Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

“O câncer é uma doença tão antiga quanto a raça humana!”, defendem os pesquisadores que identificaram a presença de tumores malignos em animais que viveram em tempos pré-históricos, como por exemplo, a ocorrência de Osteossarcoma no Hadrossauro - “dinossauro bico de pato” (Rothschild *et al.*, 2003; Mitrus *et al.*, 2012). No entanto, no início do século XIX, foi encontrado no papiro de Edwin Smith, um texto de medicina da antiguidade egípcia datado em aproximadamente 1.600 anos antes de cristo (a.C), um dos primeiros relatos sobre uma doença grave e sem cura, que nos tempos atuais seria caracterizada como câncer de mama (Capasso and Mariani Costantini, 1994).

Se migrarmos do Egito para a Grécia, nos deparamos com uma mistura de arte e ciência, e uma revolução na história da medicina que foi realizada pelos próprios gregos. Considerado pai da medicina, Hipócrates (460-375 a.C), foi um dos primeiros a questionar as principais superstições a respeito da origem do câncer, e começou a propor que o câncer em si, ocorria por causas naturais e promoveu uma abordagem racional da medicina (Galmarini, 2020). Hipócrates acreditava que o câncer se desenvolvia através do desequilíbrio entre um dos quatro humores do corpo, sendo estes: sangue, catarro, bile amarela e negra, e que cada um destes humores estaria conectado a um respectivo conjunto de órgãos e funções (Mitrus *et al.*, 2012). Conseqüentemente, Hipócrates começou a tratar destes pacientes acometidos pela doença e observou que na maioria das vezes a massa tumoral se apresentava centralizada, e com ramificações pulsantes. Portanto, a palavra câncer vem do grego (Καρκίνος / Karkínos), que significa caranguejo, cunhada inicialmente por Hipócrates ao comparar a morfologia do tumor as características e movimentos do animal (Hajdu, 2011; Faguet, 2015).

À face do exposto, o caminho existente dos estudos sobre o câncer, vão desde a época de Hipócrates até a era genômica contemporânea, e infelizmente a doença ainda não está compreendida em sua totalidade. Todavia, sabe-se atualmente que a carcinogênese é o processo de formação do câncer, caracterizado pela influência de vários fatores genéticos e ambientais que interagem entre si, sendo que estes fatores podem ser iniciados através da ação de agentes biológicos, químicos, radioativos e/ou hormonais (Peters and Gonzalez, 2018). Estes fatores em conjunto, podem comprometer a integridade cromossômica, promovendo mutações genéticas que também podem ser herdadas, e por essa razão, o câncer é também considerado

uma doença genética (Martincorena and Campbell, 2015). Simultaneamente, estas alterações promovem mudanças no microambiente celular e no meio extracelular, conseqüentemente, corroboram para que ocorra os três estágios intrínsecos de formação do tumor: a iniciação, promoção e progressão (Cheng *et al.*, 2020).

Do ponto de vista biológico, é extraordinária a capacidade que a célula tumoral possui de assumir vários fenótipos no organismo (Gillet *et al.*, 2013). Logo, são reconhecidos como *hallmarks*, as principais alterações fisiológicas que fornecem uma estrutura lógica para compreender as características que permitem que a célula se torne cancerígena (**Figura 1A**). Ademais, vale ressaltar que os tumores, são heterogêneos e compostos por um conjunto de células distintas (**Figura 1B**).

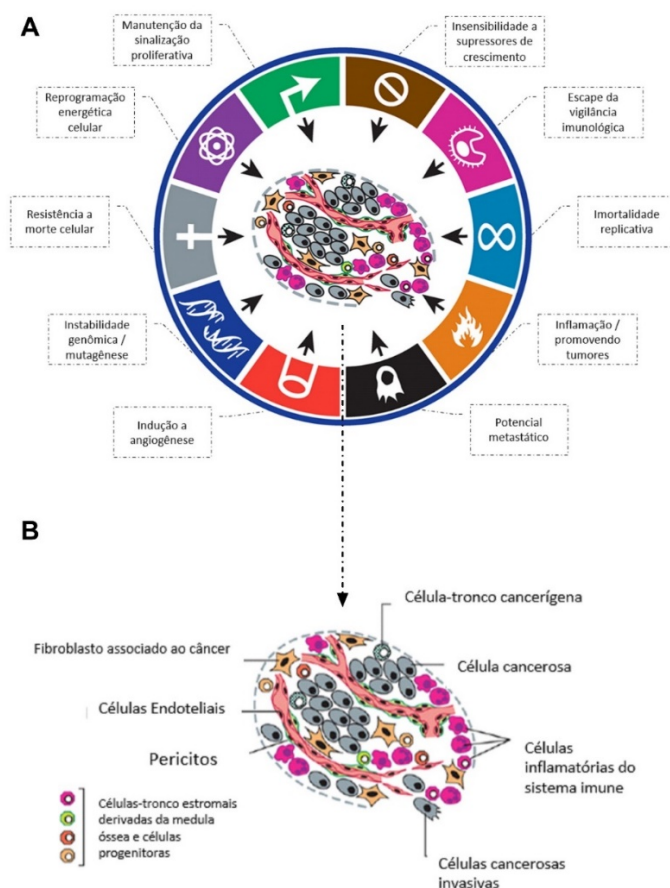


Figura 1 - Hallmarks do câncer e células do microambiente tumoral: (A) Características fenotípicas adquiridas por uma célula durante os processos de transformação celular e progressão tumoral. (B) células que estão presentes no microambiente tumoral. Adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2011).

O tumor é caracterizado por comprometer a homeostase tecidual local (Arneth, 2019). Entretanto, são caracterizados como câncer apenas os tumores (malignos), nos quais suas células apresentam um potencial de invadir o tecido subjacente e migrar para outros órgãos ou outras partes do corpo (processo conhecido como metástase) (Cheng *et al.*, 2020). Portanto, os sinais e sintomas da doença vão depender do seu local de início e progressão (Peters and Gonzalez, 2018).

Por se tratar de uma doença complexa e enigmática, o tratamento do câncer é visto como multimodal, o que inclui na grande maioria dos protocolos atuais de tratamento a ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia que, em conjunto, proporcionam a morte das células tumorais principalmente por necrose (Sullivan *et al.*, 2015). Infelizmente, os efeitos colaterais destes tratamentos podem ser devastadores.

O câncer ainda é caracterizado como uma das principais causas de mortalidade em todo o globo. Em particular no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o triênio de 2020-2022 há uma estimativa de 625 mil novos casos de câncer (Siegel *et al.*, 2019). Portanto, dentre os vários obstáculos científicos e tecnológicos que ainda precisam ser superados, para que sejam obtidos melhores resultados na clínica frente as opções de tratamento atuais disponíveis para o câncer, destacam-se: a necessidade de se realizar um diagnóstico precoce da doença, bem como reduzir a citotoxicidade dos atuais protocolos de tratamento (Zugazagoitia *et al.*, 2016). Diante desta problemática destaca-se o Meduloblastoma (MB), um tumor maligno, multifacetado que acomete o sistema nervoso central (SNC) (Bouffet, 2021).

1.2 Meduloblastoma: origem e resgate histórico

No início do século XX, havia pouco consenso sobre a nosologia das neoplasias da fossa posterior. Logo, dois renomados neurocirurgiões e neurofisiologistas da época, Harvey Cushing e Percival Bailey, buscaram fornecer uma uniformidade para a classificação de tumores cerebelares que eram compostos predominantemente por células-tronco embrionárias primitivas (Canale and Longo, 1990; Ferguson and Lesniak, 2005). Em particular, uma destas neoplasias foi inicialmente chamada de “*Espongioblastoma cerebelli*”, pois acreditava-se que os espongioblastos, um tipo de célula embrionária com potencial de diferenciação 'espongioblástica' (isto é, neuroglial) e neuroblástica, seriam as células responsáveis pela origem deste tumor que se desenvolvia na região cerebelar (Rutka and Hoffman, 1996).

Não obstante, Cushing e Bailey abandonaram este conceito inicial e durante a 50ª Reunião Anual da *American Neurological Association*, em 1925, cunharam o termo “*Meduloblastoma Cerebelli*”, ao aceitar a hipótese de que seriam os meduloblastos, um tipo de célula-tronco presente no tubo neural primitivo descrito por Alfred Shaper em 1897, os responsáveis pela origem deste “pequeno tumor de células azuis” que se desenvolvia no cerebelo (Ingraham *et al.*, 1948; Shonka *et al.*, 2012). Porém, o nome “Meduloblastoma” foi cunhado por Cushing em 1930, e utilizado posteriormente em todo o mundo por gerações subsequentes de neuropatologistas e neurocirurgiões.

A princípio, era observado no MB que as células granulares da camada externa do cerebelo apresentavam processos de diferenciação e proliferação celular comprometidos (Canale and Longo, 1990). Entretanto, o progresso na histogênese deste câncer veio do reconhecimento de que certas características das células presentes no microambiente tumoral se assemelhavam às células neuroepiteliais primitivas encontradas dentro do tubo neural em desenvolvimento no início da neuroembriogênese (Rorke, 1983). Curiosamente, foi ainda observado que estas células primitivas que estão presentes em todo córtex cerebelar no nascimento, desapareciam gradualmente durante o primeiro ano de vida, dando origem a uma das primeiras hipóteses iniciais do porquê o MB ocorria predominantemente em pacientes pediátricos (Park *et al.*, 1983).

O impacto dessas informações iniciais sobre a carcinogênese do MB, em conjunto com vários casos clínicos da doença tratados por Cushing, fez com que os primeiros protocolos iniciais de tratamento fossem estruturados, levando em consideração os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da doença (Ingraham *et al.*, 1948). Como primeira

abordagem de tratamento era realizado a ressecção total ou parcial do tumor. Ademais, sessões de radioterapia crânio-espinhal eram corriqueiramente utilizadas (Ingraham *et al.*, 1948). A prática destes protocolos iniciais de tratamento em rotina clínica prolongava significativamente a sobrevivência dos pacientes em 60-65%, acompanhados em 3 anos (Paterson and Farr, 1953).

Ao início da década de 1960, foi necessário realizar o aprimoramento dos critérios de estratificação dos pacientes dentro de grupos de risco, principalmente na busca de minimizar as sequelas endócrinas e cognitivas observadas nos sobreviventes, o que começou a ser associado ao alto índice de irradiação utilizado nos protocolos iniciais de tratamento (Faust *et al.*, 1970). Dentre as sequelas decorrentes do tratamento do MB destacavam-se: o mutismo cerebelar, transtornos de personalidade, déficit cognitivo e deterioração intelectual, o que impactava significativamente na qualidade de vida dos pacientes (Jenkin, 1969). Nesse contexto, a quimioterapia surgiu como um tratamento coadjuvante potencialmente útil para os pacientes com MB, sendo a cisplatina, vincristina, lomustina e metotrexato os quimioterápicos mais utilizados (Loeffler *et al.*, 1988).

Em 1973, o MB foi caracterizado como um tumor neuroectodérmico primitivo (PNETs), e a busca de uma melhor compreensão das variantes histológicas, características morfológicas e biológicas da doença, fez com que em 1977 a primeira linhagem celular humana de MB fosse estabelecida (MB TE671), e posteriormente utilizada como modelo experimental em diversos estudos (Hart and Earle, 1973; Mcallister *et al.*, 1977). A utilização dos exames de diagnóstico por imagem como, por exemplo, a ressonância magnética, trouxe uma contribuição ímpar na prática clínica, permitindo a detecção da presença de disseminação leptomeníngea e/ou metástases do tumor ao diagnóstico (Packer *et al.*, 1985; Hanigan *et al.*, 1986). Essa prática passou então a influenciar diretamente nas decisões de ressecção total ou parcial do tumor como primeira abordagem de tratamento (Packer *et al.*, 1984).

Interessantemente, Evans e colaboradores (1990) foram os primeiros a relatar os benefícios da utilização da quimioterapia em conjunto com a radioterapia, em contraste à radioterapia isolada (Evans *et al.*, 1990). Além disso, a realização de análises anatomopatológicas e imunohistoquímicas (IHQ), consequência do advento da tecnologia de anticorpos monoclonais, permitiu um grande avanço para as pesquisas direcionadas ao MB. Em conjunto, foi possível identificar não somente os diferentes tipos de células primitivas/embrionárias que constituíam a massa tumoral do MB, como também identificar o nível metastático (localização e extensão) do tumor (Friedman *et al.*, 1985).

Em consonância a estes avanços, consequência da utilização de técnicas rudimentares de biologia molecular, destacam-se as primeiras pesquisas que demonstraram o aumento de expressão dos oncogenes *MYC* e *MYCN* em amostras tumorais de pacientes acometidos pelo MB (Rouah *et al.*, 1989; Bigner and Vogelstein, 1990). Essa descoberta se tornou um marco histórico no direcionamento e na tomada de decisões para o tratamento do MB, pois, de forma intrigante, muitos pesquisadores começaram a observar que a presença da expressão aberrante desses genes encontrava-se associado ao pior prognóstico da doença (Wasson *et al.*, 1990; Badiali *et al.*, 1991).

Dado estes avanços, as características como idade do paciente, presença ou não de disseminação leptomeningea e/ou metástase ao diagnóstico, extensão e o tamanho residual do tumor após a intervenção cirúrgica (1 a 1,5cm²/pior prognóstico), começaram a ser consideradas como fatores prognósticos cruciais para o processo de estratificação dos pacientes dentro dos grupos de risco, visando o direcionamento de protocolos de radiação crânio-espinhal e de quimioterapia para o tratamento individualizado (Grabenbauer *et al.*, 1996). Notavelmente, com estes novos protocolos de triagem para o diagnóstico e tratamento para o MB, foi possível observar uma diminuição de sequelas permanentes, além de promover uma taxa de 65-75% de sobrevida aos pacientes (Albright *et al.*, 1996; Packer *et al.*, 1999).

Entretanto, os mecanismos moleculares intrínsecos aos processos de iniciação e progressão do MB, permaneciam como uma incógnita do ponto de vista clínico/científico. Portanto, buscando responder estas perguntas, e esclarecer estes mecanismos, modelos animais para o estudo do MB começaram a ser utilizados, o que levou a novas descobertas da doença à nível molecular (Pomeroy and Sturla, 2003; Gilbertson and Gajjar, 2005). À vista disso, pesquisadores, neurocirurgiões e neurocientistas, estariam prestes a enfrentar um novo cenário de diagnóstico e tratamento para o MB com a chegada do século XXI: o diagnóstico molecular e a terapia gênica. Um marco histórico em consonância com a era das “ômicas” do câncer (Gajjar *et al.*, 2004; Carlotti *et al.*, 2008; Ocaña and Pandiella, 2010).

1.3 Meduloblastoma no Século XXI: diagnóstico molecular e terapia gênica

Hoje em dia, sabe-se que o cérebro é o principal órgão do SNC, e o cerebelo que é uma região do cérebro, tem o início do seu desenvolvimento na fase pré-fetal. A propósito, existem duas zonas germinativas distintas responsáveis por originar os neurônios cerebelares. Uma dessas regiões é a zona ventricular, a qual é responsável por originar os neurônios GABAérgicos que formam, por exemplo, as células de Purkinje (PCs). A segunda região, que é denominada lábio rômbo superior, é responsável por originar os neurônios glutamatérgicos (células granulares) (Apps and Hawkes, 2009; Adamaszek *et al.*, 2017). Entretanto, o desenvolvimento cerebelar continua após o período embrionário, logo, estas células supracitadas são responsáveis por formar a camada molecular (CM) externa, a camada intermediária, e a camada das células granulares (CCG), que é a mais interna. Em conjunto, essas três regiões compõem o cerebelo maduro, o qual é caracterizado por exercer funções cruciais para o controle das funções motoras (coordenação, equilíbrio, postura) cognição, linguagem e emoção (Bihannic and Ayrault, 2016; Beckinghausen and Sillitoe, 2019).

À vista do exposto, o MB é um tumor maligno embrionário de origem cerebelar, que acomete células precursoras neurais que sofreram rápida e desordenada expansão proliferativa durante o desenvolvimento do cerebelo no período embrionário (**Figura 2**) (Northcott *et al.*, 2019). O MB representa 20% dentre todos os tumores do SNC diagnosticados na infância, sendo então o tumor cerebral pediátrico maligno mais comum, representando 55% dos tumores de fossa posterior. O MB é classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Grau IV, e apresenta um pico de incidência aos 6-8 anos de idade. Ademais, acomete mais pacientes do sexo masculino que feminino (com uma proporção de 1,8: 1 homem: mulher), e possui uma incidência de 5 casos em 1 milhão de indivíduos por ano, se tornando uma das principais causas de mortalidade e morbidade em neurooncologia pediátrica. Embora menos frequente, acomete também pacientes adultos (Northcott *et al.*, 2017; Northcott *et al.*, 2019).

As principais causas e/ou influências ambientais externas que condicionam o início e progressão do MB permanecem uma incógnita até o presente momento. Entretanto, foi proposto e aceito que fatores hereditários são os únicos fatores de risco de caráter comprovado (Waszak *et al.*, 2018). Neste contexto, destacam-se as condições Mendelianas por consequências de mutações presentes da linha germinativa em genes que compõem as vias de sinalização celular, que são cruciais por manter o controle dos processos de diferenciação neuronal de células-

tronco, e que quando desreguladas encontram-se envolvidas na tumorigênese do MB (Xie *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 2015; Northcott *et al.*, 2019).

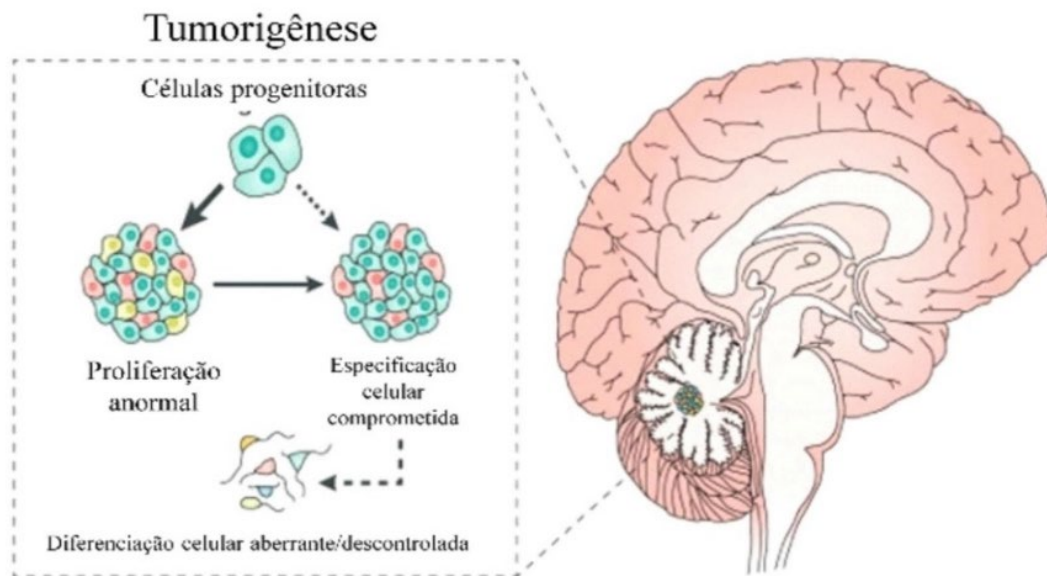


Figura 2 – Representação esquemática do início e progressão do MB: Presença de alterações em processos celulares iniciais de diferenciação neuronal de células-tronco, que quando desregulados contribuem para o início da tumorigênese do MB. Adaptado de (Northcott *et al.*, 2019).

Com o crescimento da massa tumoral, os principais sinais e sintomas clínicos observados nos pacientes acometidos pelo MB são - hipertensão intracraniana, o que pode promover vômitos não precedidos de náuseas (vômitos em jato), cefaleia matinal, alterações no estado cognitivo do paciente, alterações de equilíbrio e problemas de visão que incluem perda e/ou estrabismo (Northcott *et al.*, 2012; Sengupta *et al.*, 2017). Dor nas costas, dificuldades de marcha (ataxia) e, raramente, bexiga neurogênica e disfunção intestinal podem também ser observados em pacientes acometidos pelo MB (Northcott *et al.*, 2019).

A estes pacientes exames adicionais de imagem como, por exemplo, ressonância magnética de crânio e neuroeixo são realizados a fim de se iniciar o processo de triagem e diagnóstico do MB que consiste em: avaliar o tumor primário e rastrear a presença de metástases (Ramaswamy *et al.*, 2016). A investigação da presença de metástase é também realizada por citologia de fluido cérebro espinhal (para detectar metástases microscópicas), o que, consequentemente, permite realizar o estadiamento da doença. A proposta de estadiamento

do MB foi inicialmente elaborado por Chang e colaboradores (1969), classificando os pacientes em cinco grupos caracterizados por diferentes categorias de metástase (M): M0, M1, M2, M3 e M4, (**Tabela 1**) (Chang *et al.*, 1969).

Tabela 1- Definição das categorias de metástases (M) em cinco grupos: de M0 a M4. Sistema inicialmente proposto por Chang e colaboradores (1969).

Categoria	Definição
M0	Tumores que não mostram evidência de metástases através dos exames iniciais de ressonância magnética e análise citológica do líquido cefalorraquidiano (LCR)
M1	Presença de células tumorais microscópicas identificadas através de citologia do LCR
M2	Presença de metástase intracraniana (no espaço cerebelar ou subaracnoide cerebral ou no terceiro ventrículo lateral) através de ressonância magnética
M3	Presença de metástase na coluna e espaço subaracnóideo
M4	Presença de metástase fora do eixo cerebrospinal

Entretanto, o diagnóstico definitivo da doença baseia-se na avaliação anatomopatológica do material neoplásico proveniente da abordagem cirúrgica, o qual, de acordo com sua histologia, classifica o MB em quatro subgrupos distintos: clássico, desmoplásico nodular (DN), MB com extensa nodularidade (MBEN) e anaplásico de células grandes (ACG) (**Figura 3A, B, C e D, respectivamente**) (Northcott *et al.*, 2012).

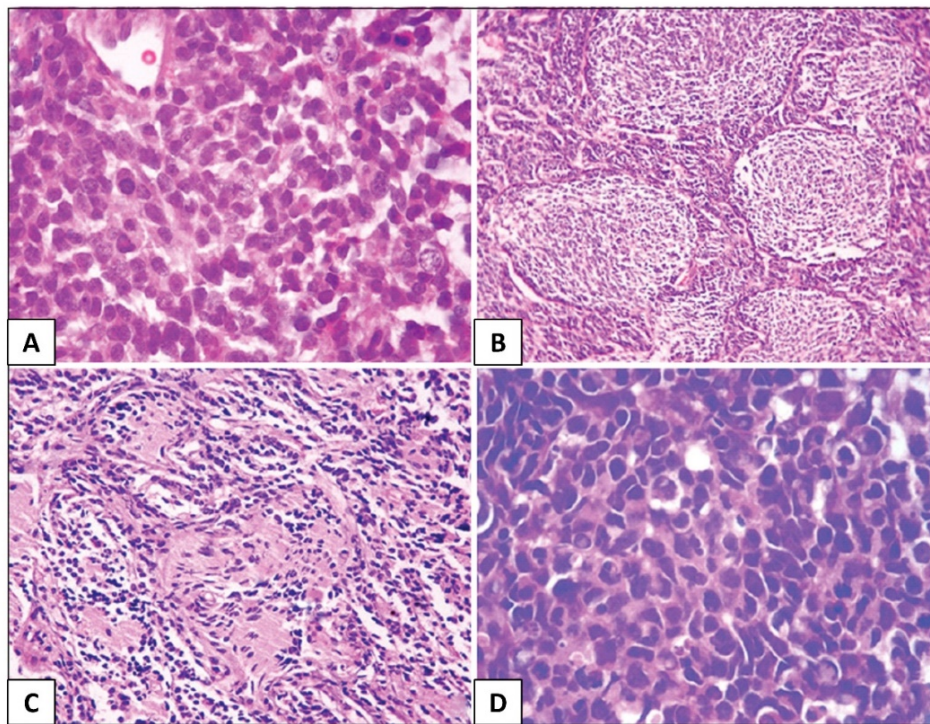


Figura 3 - Classificação histopatológica do MB: MB clássico, pequenas células redondas tumorais de cor azul densamente celulares em um arranjo sincicial com mitoses frequentes e rosetas de Homer-Wright ocasionais (A), MB desmoplásico nodular (B), MB com extensa nodularidade (C) e MB anaplásico de células grandes (D). Microfotografias realizadas após coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 40×. Adaptado de (Gupta *et al.*, 2017).

Após o diagnóstico definitivo do MB, é iniciado a estratificação de risco dos pacientes visando o direcionamento terapêutico que é realizado com base na idade do paciente, presença ou não de metástase ao diagnóstico, e por último, o grau de ressecção cirúrgica. Portanto, os pacientes menores que três anos de idade, que apresentarem metástase ao diagnóstico e/ou ressecção incompleta da massa tumoral, são classificados como pacientes de alto risco. Em contraste, os pacientes que apresentam quadros clínicos de ressecção completa do tumor, que não apresentam metástase ao diagnóstico e que são maiores que três anos, são classificados como baixo risco. É importante ressaltar que a média de sobrevida global (SG) em cinco anos observada é menor que 70% e entre 70-85% para os pacientes de alto e baixo risco, respectivamente (Ramaswamy *et al.*, 2016; Northcott *et al.*, 2019).

O tratamento multimodal do MB consiste na cirurgia radical (ressecção máxima segura, respeitando as margens de segurança do tecido circundante) como abordagem inicial de tratamento (Ramaswamy and Taylor, 2017). Adicionalmente, a quimioterapia citotóxica (multidrogas) e radioterapia de crânio e coluna (preferencialmente para pacientes com idade

superior a 3 anos) com um impulso focal para o local do tumor primário, fazem parte dos protocolos atuais de tratamento. Dentre os quimioterápicos utilizados a ciclofosfamida, cisplatina, lomustina, carboplatina e vincristina são as principais opções de escolha (Sengupta *et al.*, 2017; Northcott *et al.*, 2019).

Embora menos frequente, a imunoterapia encontra-se atualmente em estudos clínicos para se avaliar sua aplicabilidade na prática clínica (Kabir *et al.*, 2020), como, por exemplo, inibidores de *checkpoint* imunológico na busca de uma melhor resposta do escape da imunovigilância tumoral mediada por células T (linfócitos) (NCT02359565 e NCT03173950, Ensaios clínicos em fase I e II respectivamente), e a terapia CAR T-cells, que são células T geneticamente modificadas que expressam receptores de antígenos quiméricos artificiais (CAR) com propriedades de ligação ao antígeno e de ativação de células T (CT03638167 – Ensaio clínico em fase I) (Menyhárt and Györfy, 2020).

Apesar de o tratamento atual do MB apresentar uma boa taxa de sobrevida e/ou cura, infelizmente, são altos os níveis de toxicidade presente, o que resulta em um considerável aumento dos efeitos secundários a longo prazo (comorbidades) aos pacientes sobreviventes (Northcott *et al.*, 2017). Desta forma, os pacientes podem apresentar sequelas permanentes e/ou definitivas como: déficits de crescimento, neurológicos e psicossociais. Além disso, podem ocorrer crises convulsivas, perda auditiva, disfunções endócrinas e predisposição a ocorrência de neoplasias secundárias (Ramaswamy *et al.*, 2016; Kieffer *et al.*, 2019).

Aproximadamente 30% dos pacientes sobreviventes podem ainda ir a óbito dada a recorrência do MB. Existe um grande potencial de disseminação leptomeníngea e/ou metastático das células tumorais provenientes do tumor primário, que ocorre principalmente através do líquido cérebro espinhal (Massimino *et al.*, 2016; Garzia *et al.*, 2018). Vale ressaltar que metástases e recorrência são as principais barreiras para o sucesso terapêutico, e a recidiva da doença é responsável por 95% dos óbitos associadas ao MB. Pacientes que apresentam recidiva após receberem radioterapia inicial raramente sobrevivem (taxa de resgate <10%), apesar da multiplicidade de opções de tratamento (Sabel *et al.*, 2016).

Em continuidade, vários grupos de pesquisas começaram a induzir o crescimento tumoral do MB em modelos animais, e utilizar de técnicas robustas de análises moleculares (transcriptômicas e proteômicas) para melhor compreender os processos carcinogênicos intrínsecos de iniciação e progressão da doença (Raffel, 2004). De forma surpreendente, os resultados começaram a identificar que importantes genes das vias de sinalizações celulares

cruciais para o desenvolvimento cerebelar durante o período embrionário encontravam-se mutados e/ou hipo/hiperexpressos. Alguns exemplos correspondem aos genes das vias de sinalização celular *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Wingless (Wnt)* e *Notch* (Hallahan *et al.*, 2004; Browd *et al.*, 2006; Dakubo *et al.*, 2006; Coon *et al.*, 2010).

Portanto, dado o conhecimento que estas vias de sinalização celular também se encontravam alteradas em pacientes diagnosticados com MB, em 2012, foi realizada uma proposta inicial através de um consenso de que a classificação do MB poderia ser realizada conjuntamente de acordo com o seu perfil molecular. Esta ação coordenada visava principalmente melhorar o atual cenário frente aos protocolos atuais de estratificação e direcionamento terapêutico do MB (Northcott *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012).

Logo, este consenso foi inicialmente incorporado pela OMS, em 2016, e atualizado junto a *Classification of Tumors of the Central Nervous System* (Louis *et al.*, 2016). Portanto, o processo de estratificação dos pacientes dentro dos grupos de risco, seria realizado levando em consideração não apenas os dados/sintomas clínicos dos pacientes (idade, presença de metástase ao diagnóstico e extensão de ressecção cirúrgica), citologia de líquido e resultados de exames anatomopatológicos. Começaria a ser utilizado também em rotina clínica, o diagnóstico molecular, algo corriqueiramente utilizado até a presente data (Louis *et al.*, 2021). Consequentemente, este consenso, que logo foi adotado pelas comunidades de pesquisas básicas e clínicas, mudou a maneira de como o MB é estudado no laboratório, diagnosticado e tratado na clínica (Northcott *et al.*, 2019).

Assim sendo, o MB pode ser classificado em quatro principais subgrupos moleculares com respectivos subtipos distintos nomeados com as letras Gregas (α , β , γ e δ), levando em consideração os dados clínicos dos pacientes, o perfil de metilação do DNA e análises de transcriptômica e proteômica (abordagens genômicas integrativas) aplicado a análises de bioinformática. Estes subgrupos moleculares são: MB WNT (α e β), MB SHH (α , β , γ e δ), MB de Grupo 3 (α , β , γ) e MB de Grupo 4 (α , β , γ), como ilustra a **Figura 4** (Cavalli *et al.*, 2017).

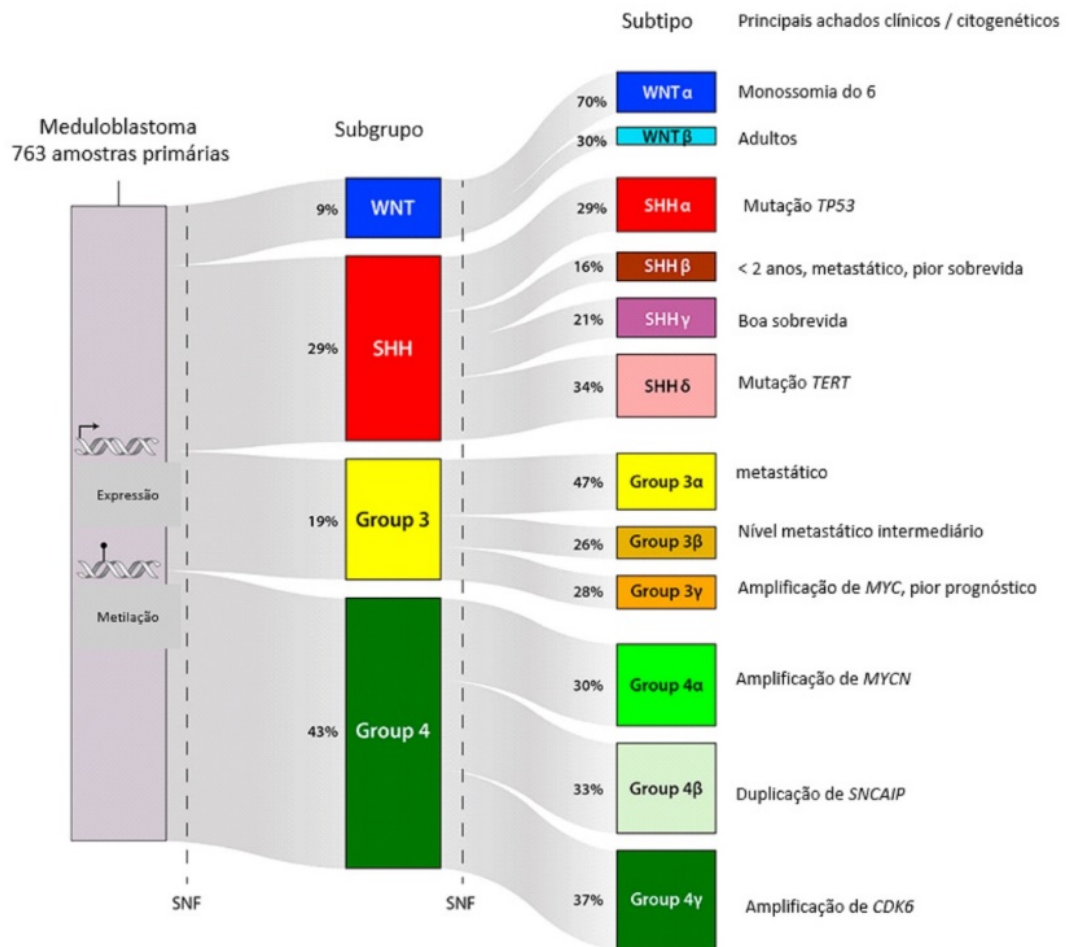


Figura 4 - Heterogeneidade molecular do MB: O MB apresenta 4 subgrupos e 12 subtipos moleculares distintos: MB WNT (α e β), MB SHH (α , β , γ e δ), MB de Grupo 3 (α , β , γ) e MB de Grupo 4 (α , β , γ). Em cada subgrupo é possível observar a porcentagem (%) de diagnóstico/estratificação, e os principais achados clínicos e/ou citogenéticos. Classificação realizada através de análises de expressão gênica e metilação de DNA, avaliado em (n=763) amostras primárias de MB. Modificado de (Cavalli *et al.*, 2017).

1.4 SUBGRUPOS MOLECULARES DO MEDULOBLASTOMA

1.4.1 Meduloblastoma WNT

A proteína *Wingless* (Wnt) foi identificada inicialmente no tecido da epiderme embrionária de *Drosophila sp.*, e caracterizada como uma das principais moléculas da cascata de sinalização da via *Wnt*, que é responsável pela regulação de processos celulares importantes nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Logan and Nusse, 2004). Em mamíferos esta via encontra-se conservada evolutivamente e possui como efetor principal o fator de transcrição β -catenina (via canônica), codificado pelo gene *CTNNB1*, que além de controlar processos celulares importantes como diferenciação, divisão e proliferação de células-tronco da zona ventricular durante o período embrionário e pós fetal, promove também a manutenção da homeostase tecidual cerebelar na fase adulta (Nusse and Clevers, 2017).

A β -catenina quando acumulada no núcleo celular (consequência da presença de mutações somáticas no gene *CTNNB1*, evidenciado em aproximadamente 90% dos pacientes) conduz a hiperativação da via *Wnt*, e corrobora para o início da proliferação desordenada de células-tronco precursoras dos grânulos cerebelares durante o desenvolvimento do cerebelo (Koch *et al.*, 2007; Pfaff *et al.*, 2010). Portanto, pacientes diagnosticados com MB que apresentam a ativação aberrante desta via são classificados molecularmente como MB WNT (Northcott *et al.*, 2019). Ademais, acredita-se que as células progenitoras do lábio rômico inferior do cerebelo podem ser as responsáveis pelo início e progressão deste subgrupo molecular de MB (Kawauchi *et al.*, 2012).

Aproximadamente 9% dos pacientes são classificados como MB WNT, entretanto, recentemente foi proposto uma nova subdivisão para este grupo em WNT- α (70%), caracterizando os pacientes geralmente mais jovens, e que frequentemente apresentam monossomia do cromossomo 6 (exclusão de uma cópia do cromossomo 6 no tumor, o que ocorre em aproximadamente 80% dos casos); e WNT- β (30%) que são os casos que acometem preferencialmente pacientes adultos (Cavalli *et al.*, 2017). O MB WNT frequentemente apresenta histologia clássica, pico de incidência em pacientes de 6-10 anos de idade e acomete adolescentes de ambos os sexos, e são raras as metástases evidenciadas ao diagnóstico. O subgrupo WNT, dentre todos os subgrupos, é o que apresenta o melhor prognóstico, demonstrando uma sobrevida livre de eventos em cinco anos de 95% (Taylor *et al.*, 2012; Northcott *et al.*, 2019).

1.4.2.1 Meduloblastoma SHH

Os principais genes da via *Sonic Hedgehog* (*Shh*): *Hedgehog* (*HH*), *Patched* (*PTC*) e *Smoothened* (*Smo*), foram inicialmente identificados em *Drosophila sp.*, e caracterizados como genes responsáveis pela manutenção da divisão e proliferação de células-tronco nos estágios iniciais da oogênese e neurogênese (Van Den Heuvel and Ingham, 1996). Adicionalmente, foi descrito que determinadas funções celulares importantes durante o desenvolvimento deste organismo tornavam-se comprometidas quando evidenciado a presença de mutação nestes genes (Forbes *et al.*, 1996).

A via *Shh*, através de uma complexa cascata de sinalização, é responsável por controlar os processos de diferenciação, divisão e proliferação celular, tanto nos estágios iniciais de desenvolvimento, bem como na manutenção do tecido adulto (Motoyama *et al.*, 1998). Nos mamíferos são encontrados 3 genes conservados e homólogos ao *HH*, identificado inicialmente em *Drosophila sp*: *Sonic Hedgehog* (*Shh*), responsável pela manutenção dos estágios iniciais no desenvolvimento do SNC; *Desert hedgehog* (*Dhh*) e *Indian Hedgehog* (*IHH*) (Tabin and McMahon, 1997).

Por estar fortemente associada ao desenvolvimento cerebelar, a ativação aberrante dessa via pode comprometer o processo de diferenciação de células-tronco somáticas e pluripotentes no SNC durante o período embrionário (Skoda *et al.*, 2018). À vista disso, pacientes diagnosticados com MB que apresentam mutações germinativas ou somática em um ou mais genes: *PCTHI* (43%), *SUFU* (10%), *SMO* (9%) e *GLII-2* (9%), que compõem e conseqüentemente condicionam a hiperativação da via *Shh*, são classificados molecularmente como MB SHH (29% ao diagnóstico). Acredita-se que as células progenitoras de neurônios granulares (CPGs) da camada germinativa externa da superfície do cerebelo em desenvolvimento podem ser as responsáveis pelo surgimento do MB SHH. E dentre os principais achados citogenéticos do MB SHH destacam-se as perdas dos braços longos do cromossomo 9 (9q) e 10 (10q) (Northcott *et al.*, 2019).

O MB SHH apresenta também subtipos distintos: SHH- α (29%) caracterizado pela alta frequência de mutação do gene *TP53* o que condiciona a um pior prognóstico, SHH- β (16%), SHH- γ (21%) e SHH- δ (34%) (Cavalli *et al.*, 2017). A este subgrupo pode-se ainda observar a presença de disseminação leptomeningea e/ou metástase ao diagnóstico, acomete recém-nascidos/crianças (<3 anos) e adultos de ambos os sexos, e em conjunto, apresentam um prognóstico intermediário com sobrevida livre de eventos de 60-80% em 5 anos (Schüller *et*

al., 2008). Vale ressaltar que histologicamente podem ser classificados em grandes células anaplásicas ou desmoplásico (Taylor *et al.*, 2012; Cavalli *et al.*, 2017).

Casos de MB WNT e MB SHH, apresentam uma melhor compreensão das anormalidades moleculares dos seus subgrupos e subtipos específicos, o que contribui para um processo mais otimizado de estratificação destes pacientes em grupos de risco e o desenvolvimento de ensaios clínicos subgrupos-específicos (Robinson *et al.*, 2017; Petirena *et al.*, 2018). A propósito, é observado uma pré-disposição ao desenvolvimento do MB dado a presença de algumas síndromes: Síndrome de Turcot, Síndrome de Gorlin, Síndrome de Curry-Jones e a Síndrome de Li-Fraumeni, principalmente por estes pacientes apresentarem mutações em genes da via *Wnt* ou *Shh* (Foulkes *et al.*, 2017; Kratz *et al.*, 2017; Carta *et al.*, 2020). Logo, a melhor compreensão das informações genéticas nestas duas subclasses de MBs contribuiu, nos últimos anos, para um melhor desenvolvimento de protocolos modernos de tratamento, na busca de aumentar as taxas de sobrevida dos pacientes, bem como minimizar sequelas de longo prazo (Northcott *et al.*, 2017).

1.4.3 MB Grupo 3

Cerca de 19% dos pacientes são diagnosticados com MB Grupo 3, o qual pode ser subdividido em: α , β e γ (Cavalli *et al.*, 2017). Existe uma hipótese de que este subgrupo se origina de células progenitoras da camada granular externa do cerebelo em desenvolvimento (Hovestadt *et al.*, 2019). Destaca-se ainda como o subgrupo de MB mais comumente diagnosticado em recém-nascidos e crianças do sexo masculino e quase nunca são observados em adultos (pico de diagnóstico 3-5 anos) (Archer *et al.*, 2017). Apresentam uma alta frequência de disseminação liquórica (até 50% dos pacientes) e frequentemente apresentam-se como anaplásicos de células grandes (Sengupta *et al.*, 2017). Infelizmente, a ausência de disseminação metastática não reflete necessariamente em um bom prognóstico.

Dentre os principais genes evidenciados mutados e/ou hiperexpressos destacam-se: *OTX2* (3%), *SMARCA4* (9%) *KBTBD4* (6%), *CTDNEP1* (5%) e *KMT2D* (5%). De forma interessante, o fator de transcrição *OTX2* tem um papel essencial no desenvolvimento do prosencéfalo, rombencéfalo e glândula pineal, e curiosamente, encontra-se como um dos principais genes envolvidos na patogênese do MB Grupo 3 (Beby and Lamonerie, 2013; Northcott *et al.*, 2019).

A amplificação de *MYC* é também evidenciada e utilizada como um dos principais critérios de estratificação deste subgrupo, e é observada em aproximadamente 17% dos

pacientes e correlacionada ao pior prognóstico (Remke *et al.*, 2013). Além disso, exibem extensa aneuploidia, caracterizada pela frequente presença do isocromossomo 17q (~ 40–50%; em que o braço q é duplicado e o braço p é perdido); ganho dos cromossomos 1q e 7; e perda dos cromossomos 8, 10q e 16q (Northcott *et al.*, 2019).

O MB Grupo 3 apresenta o pior prognóstico e é o mais mortal dentre todos os subgrupos moleculares com sobrevida global em 5 anos de <60%, e tornou-se para a comunidade científica uma grande urgência identificar biomarcadores essenciais para melhor compreender seu início e progressão, bem como desenvolver terapias-alvo subgrupo-específica (Menyhárt and Györfy, 2020).

1.4.4 MB Grupo 4

Este é o subgrupo molecular de MB de maior incidência ao diagnóstico (43%), sendo classificados em três subtipos: α , β ou γ (Cavalli *et al.*, 2017). É mais comumente diagnosticado em pacientes do sexo masculino (a prevalência é três vezes maior em homens do que em mulheres), pode apresentar histologia clássica ou anaplásicos de células grandes. Embora seja o subgrupo menos compreendido molecularmente, a amplificação do oncogene *MYCN* (6%) é uma molécula chave no processo de estratificação dos pacientes neste subgrupo, sendo caracterizada como biomarcador de pior prognóstico (Kool *et al.*, 2012; Menyhárt and Györfy, 2020).

Adicionalmente, alguns genes associados ao processo de diferenciação neuronal (*EZH2*, *CDK6*, *KDM6A*, *OTX2*, *FST*, *PRDM6* e *UTX*) são frequentemente encontrados amplificados e/ou mutados (Northcott *et al.*, 2012). Ademais, evidências recentes suportam a ideia de que as células de origem glutamérgica que tiveram os processos de diferenciação e proliferação comprometidos corroboram para o início e progressão do MB Grupo 4 (Hovestadt *et al.*, 2019).

As principais alterações citogenéticas observadas são especialmente ganhos do cromossomo 7 (40-50% dos pacientes) e 17q (> 80%) e deleções dos cromossomos 8 (40-50%), 11 (> 30%) e 17p (> 75%) (Northcott *et al.*, 2019). Aproximadamente 30-40% dos pacientes com MB Grupo 4 apresentam-se metastáticos ao diagnóstico, e tendem a apresentar recidiva após 5 anos do diagnóstico. Portanto, o MB Grupo 4 apresenta um prognóstico intermediário, com taxas de sobrevida global em 5 anos de 75-90% (Remke *et al.*, 2013; Northcott *et al.*, 2017).

1.4.5 MBs Grupos 3 e 4: um desafio clínico contemporâneo

Os MBs de Grupos 3 e 4 apresentam um prognóstico pouco definido na prática clínica. Portanto, um dos grandes desafios para os neurocientistas é identificar a verdadeira natureza e dissecar à nível molecular a heterogeneidade intratumoral destes subgrupos específicos (Northcott *et al.*, 2017). Entretanto, novas propostas de tratamento centralizadas em terapias-alvo, combinado a utilização de quimioterápicos clássicos (NCT04023669 e NCT03434262) para MBs de Grupos 3 e 4 encontram-se em fases iniciais de estudo (Menyhárt and Györfy, 2020).

Embora estas novas propostas sejam promissoras para rotina clínica, é preciso ressaltar um enigma existente e ainda não esclarecido para os MBs de Grupos 3 e 4: Qual a principal via de sinalização celular constitutivamente envolvida, que poderia ser caracterizada e associada a progressão tumoral desses subgrupos em específico? Neste contexto, destaca-se a via de sinalização celular *Notch*, que embora pouco explorada vem se mostrando intrinsecamente envolvida na biogênese dos MBs Grupos 3 e 4 (Wang *et al.*, 2017).

1.5 Via de sinalização celular *Notch*: papel e implicações no câncer

Os genes envolvidos na cascata de sinalização celular da via *Notch*, foram inicialmente identificados em *Drosophila melanogaster*, e posteriormente caracterizados como responsáveis por manter a regulação da diferenciação, proliferação e apoptose celular. Em mamíferos, os principais genes que compõem a via canônica de *Notch* são: os ligantes *Delta-Like 1,3* e *4*; *Jagged 1-2*; e os receptores *Notch 1-4*, ambos proteínas transmembrana que se encontram evolutivamente conservados (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Lai, 2004).

Não obstante, a ativação funcional da via ocorre mediante o contato entre células adjacentes, através de um processo complexo de interação (célula-célula) (Shaya *et al.*, 2017). Logo, os receptores que apresentam um domínio de ligação específico aos ligantes (ambos se encontram na superfície da membrana plasmática celular), se conectam durante o contato célula-célula, onde ocorre a primeira clivagem (contato extracelular), sendo o Domínio de metalopeptidase ADAM10 (ADAM10) uma das moléculas responsáveis por este processo (Bray, 2016).

Posteriormente, ocorre a segunda clivagem dentro do domínio transmembrana mediado pelo complexo γ -secretase. Após este processo, ocorre a liberação do domínio intracelular dos receptores de *Notch 1-4*, que se translocam para o núcleo celular, e junto a demais moléculas criam um complexo ativador transcricional, que interage com a região promotora de genes alvos para que ocorra a transcrição (**Figura 5**) (Gómez-Pinedo *et al.*, 2019). Vale ressaltar que este processo de interação entre os ligantes e receptores da via *Notch*, ocorrem de maneiras distintas dependendo do tipo celular (Shaya *et al.*, 2017).

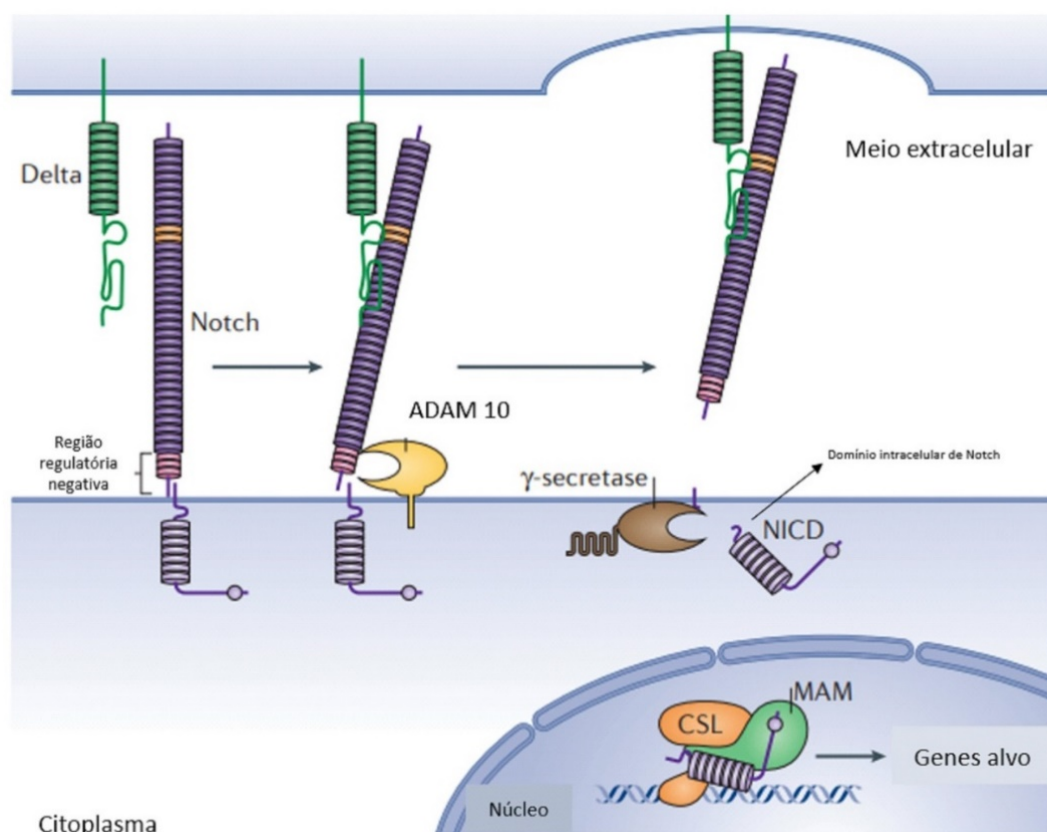


Figura 5 - Regiões de ligação e sítios de clivagem para a ativação da via *Notch*: Ligantes da via *Notch* (Delta-Like 1,3 e 4, verde) se ligam aos receptores *Notch* (Notch 1-4, roxo) nos sítios de ligação (laranja) na superfície celular adjacente, provocando eventos de clivagem proteolítica. O primeiro ocorre através de ADAM10 e o segundo por γ -secretase. Logo após, é liberado o domínio intracelular de *Notch*, que no núcleo interage com fatores de transcrição: Mastermind-like (MMA) e CSL, e criam um complexo ativador transcricional de genes alvo. Modificado de (Bray, 2016).

Frente a estes mecanismos de ativação, a via *Notch* desempenha papéis críticos em muitos processos durante o desenvolvimento embrionário, incluindo a neurogênese (Siebel and Lendahl, 2017). Digno de nota, é responsável por realizar a manutenção dos processos de divisão celular simétrica e na diferenciação de células-tronco progenitoras neurais durante o

desenvolvimento do SNC (Yao *et al.*, 2013). Neste contexto destacam-se os receptores *Notch 1-2*, como genes essenciais envolvidos nos processos de diferenciação e proliferação de células progenitoras de grânulos cerebelares, que conseqüentemente são responsáveis por originar o cerebelo maduro (Adachi *et al.*, 2021).

Dado a relevância funcional da via *Notch* no desenvolvimento, não é surpresa que quando desregulada assuma um papel oncogênico ou de supressão tumoral em diversos cânceres (Leong and Karsan, 2006; Bolós *et al.*, 2007), principalmente os que acometem o SNC como, por exemplo, gliomas (Chowdhury and Sarkar, 2019), astrocitomas (Brandt *et al.*, 2015) e ependimomas (De Almeida Magalhães *et al.*, 2020). Na biogênese do MB este cenário não é diferente, destacando-se o receptor *Notch-1* como um dos principais genes com expressão alterada em MBs de Grupos 3 e 4 (Northcott *et al.*, 2017; Kahn *et al.*, 2018; Ballabio *et al.*, 2021).

Por exercer esse papel a nível molecular em processos carcinogênicos distintos, novas opções de estratégias terapêuticas como, por exemplo, compostos inibidores das moléculas responsáveis pelo sítio de clivagem (inibidores químicos de γ -secretase - MK-0752 – NCT00106145 , Fase I) foram desenvolvidos (Andersson and Lendahl, 2014; Cui *et al.*, 2015). Dentre as principais finalidades destes inibidores destacam-se: o potencial de inibir a proliferação, metástase e angiogênese de uma maneira específica para o tipo de célula. Infelizmente, como a via celular *Notch* apresenta um perfil de ativação funcional heterogêneo no contexto celular normal e tumoral, fatidicamente, uma porcentagem relativamente pequena de pacientes respondem a estas propostas de terapia-alvos (Fouladi *et al.*, 2011; Mccaw *et al.*, 2021). Logo, destaca-se a necessidade em melhor explorar a viabilidade de incorporar estes compostos como tratamento adjuvante, nas atuais estratégias clínicas de tratamento.

Portanto, dependendo do tipo celular e/ou tumoral, a via *Notch* tem o potencial de afetar uma gama de processos celulares, e tornou-se um desafio compreender os motivos que levam esta via a adquirir um potencial oncogênico ou de supressão tumoral. Embora as principais causas desta desregulação permanecem inexplicadas até o presente momento, acredita-se que moléculas presentes no microambiente celular possam exercer *cross-talks* e/ou modular após a transcrição os genes responsáveis pela manutenção da via canônica, contribuindo para que ocorra sua ativação e/ou repressão funcional (Aster *et al.*, 2017).

Portanto, torna-se promissor identificar novos genes implicados na carcinogênese dos MBs de Grupos 3 e 4, que em consonância possam estar envolvidos na modulação da ativação

da via *Notch*, nestes tumores subgrupos-específico. Neste contexto, destaca-se Musashi-1 (MSI1), um marcador de célula-tronco neural, caracterizado como biomarcador de pior prognóstico e/ou promissor alvo terapêutico em diversos tumores sólidos e em neoplasias hematopoiéticas (Das Chagas *et al.*, 2020).

1.6 Proteína Musashi

Em 1994, Nakamura e colaboradores estavam investigando quais seriam os principais genes envolvidos na manutenção da divisão celular simétrica de células precursoras dos órgãos sensoriais de *Drosophila sp.* Como resultado, identificaram um gene responsável por codificar uma proteína de ligação ao RNA (*RNA binding protein* - RBP), que quando mutado, levava a formação de duas hastes na base de uma única cerda do organismo (**Figura 6A-D**). De forma interessante, eles associaram este fenótipo observado a presença de duas espadas, algo que era utilizado como a principal técnica de batalha por um grande espadachim da cultura oriental, Miyamoto Musashi, um dos maiores samurais da história do Japão. Portanto, esta proteína recebeu o nome de Musashi (MSI) em sua homenagem (Nakamura *et al.*, 1994).

Em mamíferos, MSI possui duas isoformas evolutivamente conservadas: Musashi-1 (*MSI1*) e Musashi-2 (*MSI2*), que possuem 90% de homologia, e apresentam um perfil de expressão gênica distinto dependendo do contexto celular (Sakakibara *et al.*, 1996; Sakakibara *et al.*, 2001). Em particular, durante o neurodesenvolvimento, *MSI1* é altamente expresso pelas células-tronco progenitoras neurais, sendo crucial para a formação do tubo neural e desenvolvimento do SNC durante o período embrionário, consequentemente, *MSI1* é caracterizado como um biomarcador de célula-tronco neural (Sakakibara *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 2000).

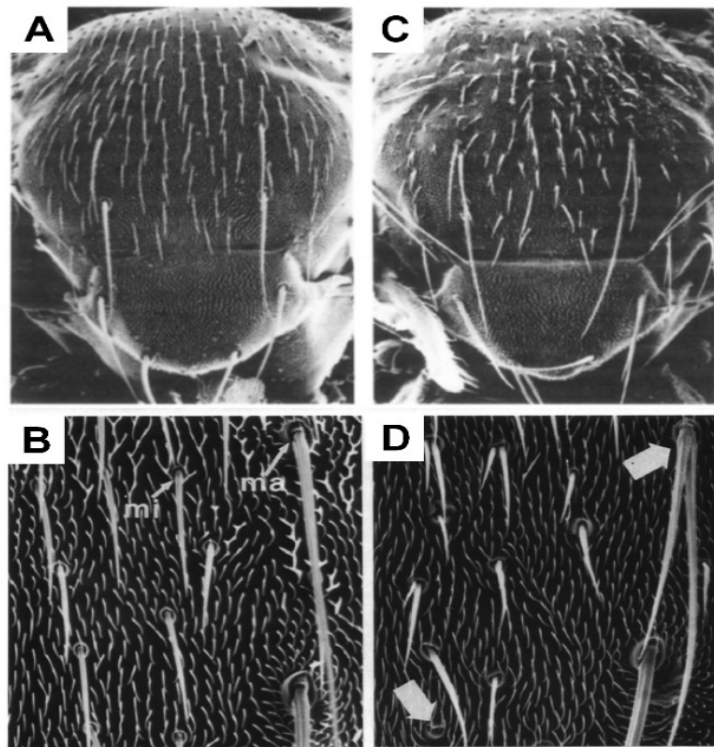


Figura 6 - Alterações fenotípicas em *Drosophila sp.* (A-D) Sensillas examinadas por microscopia eletrônica de varredura. Nota: (em artrópodes e alguns outros invertebrados) sensillas são receptores sensoriais simples que consiste em uma ou um pequeno grupo de células da cutícula ou epiderme, tipicamente em forma de cabelo ou haste. (A-B) imagens do tórax e abdômen normal (*wild-type*). [mi – microqueta /cerda pequena; ma – macroqueta região cefálica/cerda grande]. (C-D) imagens do tórax e abdômen variante (mutante), as setas em cinza indicam a presença de duas hastes em uma única cerda, comparado ao fenótipo normal. Adaptado de (Nakamura et al., 1994).

As proteínas RBP's MSI's, são também caracterizadas como ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNP) (Sakakibara *et al.*, 2001). Esta classe de proteínas geralmente possui um ou mais domínios de ligação ao RNA e pelo menos um outro domínio que auxilia na interação proteína-proteína (Han *et al.*, 2010). O reconhecimento das estruturas dos dois domínios de ligação das proteínas MSI's em mamíferos, *RNA recognition motifs* (RRMs 1-2), contribuiu para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais estas proteínas regulam a expressão gênica (Ohyama *et al.*, 2012; Iwaoka *et al.*, 2017).

Através de um mecanismo molecular coordenado as proteínas da família MSI realizam uma sobreposição com a região não traduzida (3'UTR) de vários RNAs mensageiros alvos e modulam a expressão gênica à nível pós-transcricional como, por exemplo, no pré-processamento do RNA mensageiro (RNAm), durante o *splicing* alternativo, no transporte/localização do RNAm do núcleo para o citoplasma, *turnover* e tradução do RNAm (Okano *et al.*, 2002; Okano *et al.*, 2005; Gerstberger *et al.*, 2014). Consequentemente, são

responsáveis por influenciar no bloqueio e/ou na expressão aberrante destes genes (Kudinov *et al.*, 2017).

Os RRM1 e RRM2 de MSI1 e MSI2 apresentam uma alta homologia, mas não são idênticos, portanto, possuem especificidade distintas nos sítios de ligação (Sakakibara *et al.*, 2001; Ohya *et al.*, 2012). Foi demonstrado através da técnica de *RNA Bind-n-Seq*, realizada por Kartz e colaboradores (2014), que o RRM1 de MSI1, por exemplo, se liga preferencialmente em sequências de adenina, uracila e guanina (AUG) presentes na região não traduzida (3'UTR) do RNAm alvo (**Figura 7**) (Katz *et al.*, 2014; Lambert *et al.*, 2014).

Por outro lado, a estrutura do domínio de ligação, a bioquímica e sinalização jusante de MSI1 e MSI2 em diferentes contextos celulares, não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, vale ressaltar que dentre os principais alvos das proteínas MSI's caracterizados até o presente momento, destacam-se os genes responsáveis pelos processos de diferenciação, ciclo, proliferação, migração, adesão e morte celular. Por este motivo, são caracterizadas como proteínas que desempenham um papel fundamental no destino celular (Kudinov *et al.*, 2017).

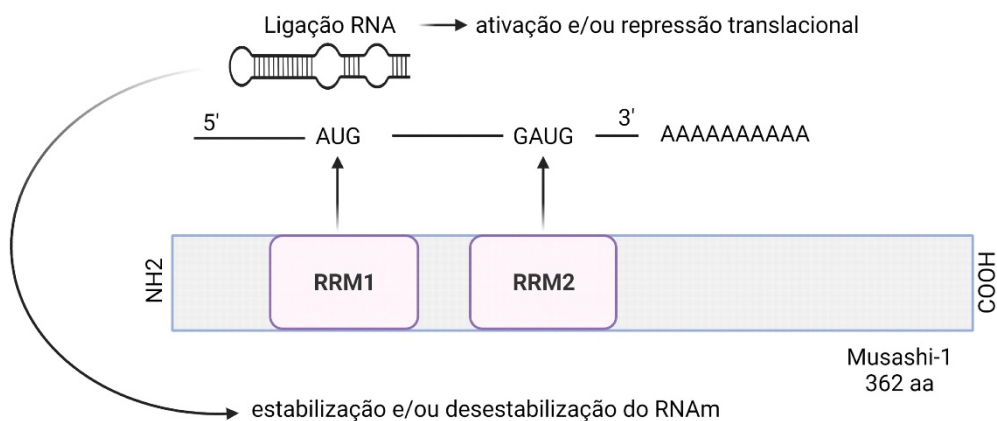


Figura 7 - Representação esquemática dos domínios de interação molecular de Musashi-1. *RNA recognition motifs* (RRMs 1-2). AUG/GAUG são domínios de interação molecular para interações com RNA e com outras proteínas de ligação a RNA (RBP's). aminoácidos (aa). Adaptado de (Kudinov *et al.*, 2017).

Em contraste, a desregulação da expressão normal das proteínas MSI's, em células-tronco comprometem os processos celulares supracitados (reconhecidos como os principais *hallmarks* do câncer), e contribuem para a instabilidade tecidual local. Infelizmente estes fatores em conjunto, são caracterizados por originar um processo carcinogênico com fenótipos tumorais altamente agressivos (**Figura 8A-C**) (Fox *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2020). Conseqüentemente, na maioria dos tumores sólidos e em neoplasias hematopoiéticas é evidenciado uma expressão aberrante de *MSI1* ou *MSI2* quando comparado ao tecido normal (**Figura 8D**) (Kharas and Lengner, 2017).

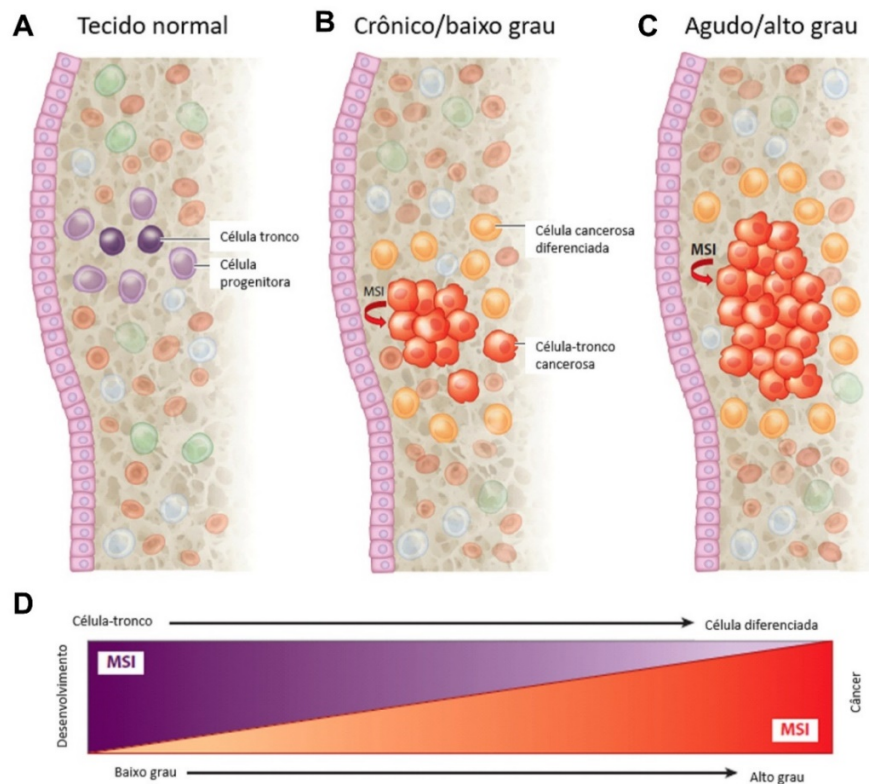


Figura 8 - Musashi e sua influência na modulação da auto-renovação em células tronco e no câncer. (A) No desenvolvimento tecidual normal, Musashi é altamente expresso pelas células-tronco (roxo escuro). A expressão de Musashi diminui em células progenitoras e células diferenciadas (tons mais claros de roxo). (B) Nas fases iniciais do desenvolvimento do câncer, os níveis de Musashi aumentam em resposta a mutações oncogênicas, e a expressão de Musashi permanece elevada nas células-tronco cancerosas (células vermelhas). O câncer geralmente é composto por uma população heterogênea de células, assim, as células-tronco cancerosas podem dar origem a mais células-tronco cancerosas (representando o tumor de baixo grau), bem como a populações mais diferenciadas (células laranja). O equilíbrio das células cancerosas indiferenciadas e diferenciadas determina o grau e a agressividade da doença. (C-D) O aumento do processo de diferenciação e proliferação de células-tronco cancerígenas (caracterizada por altos níveis de Musashi) leva a um câncer mais agressivo (alto grau) e de pior prognóstico. Adaptado de (Fox *et al.*, 2015).

Desse modo, *MSI1* e *MSI2* são caracterizados como biomarcadores de pior prognóstico e/ou potenciais alvos terapêuticos, e se destacaram nas últimas décadas como proteínas RBP's promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer (Kang *et al.*, 2020; Bley *et al.*, 2021). É importante mencionar que abordagens de triagem e modelagem de drogas contribuíram para a identificação e síntese de compostos que demonstraram uma significativa eficiência no bloqueio da tradução de *MSI1* e *MSI2*, como também para a estabilização/bloqueio da ligação das proteínas MSI's no RNAm. Dentre estes compostos destacam-se: o AZA-9 (Lan *et al.*, 2020), (-)-gossypol (Lan *et al.*, 2015) e a Luteolina (Yi *et al.*, 2018). Entretanto, estes compostos encontram-se em testes iniciais junto a pesquisa básica, e embora promissores, é reportado junto a literatura alguns efeitos colaterais, como alta toxicidade bem como a ligação não específica destes compostos ao RNAm e/ou as proteínas MSI's.

É crescente na literatura científica trabalhos que buscam caracterizar potenciais alvos de *MSI1* e *MSI2* frente aos principais *hallmarks* do câncer. Entretanto, pesquisadores ao redor do globo continuam tentando decifrar como a expressão aberrante destas proteínas corroboram para a transformação maligna de células-tronco. Na busca de fornecer novos *insights* frente a este cenário enigmático, inicialmente através de uma revisão de literatura, nosso grupo demonstrou que as proteínas da família MSI podem exercer *cross-talks* com os principais genes (receptores e ligantes) de vias de sinalização celular que são cruciais pela manutenção do desenvolvimento embrionário, incluindo a via *Notch*. Além disso, reportamos os impactos destes *cross-talks* no início e progressão de tumores sólidos e de neoplasias hematopoiéticas (Das Chagas *et al.*, 2020).

Conforme relatado anteriormente, a via *Notch*, exerce um mecanismo molecular de sinalização celular altamente conservado, que é crucial para a manutenção do auto renovação e diferenciação de células-tronco embrionárias, e consequentemente, alterações nestes processos contribuem para o surgimento de situações patológicas como, por exemplo, o câncer (Bolós *et al.*, 2007). Concordante com estes dados, nos últimos anos, pesquisadores demonstraram que a via *Notch* encontra-se desregulada em MBs de Grupos 3 e 4, destacando o receptor *Notch-1* como um dos principais genes alterados desta via (Kahn *et al.*, 2018; Ballabio *et al.*, 2021), entretanto, as principais causas e/ou moléculas responsáveis por influenciar nesta desregulação permanecem obscuras até o presente momento.

Vale ressaltar que *MSI1* e os genes chave da cascata de sinalização de *Notch*, são moléculas dependentes de interação no microambiente celular bem como da densidade celular

e do contato célula-célula, e estudos que buscam caracterizar estas interações no microambiente celular tumoral tornam-se necessários. Surpreendentemente, não há relatos na literatura que buscam explorar e caracterizar MSI1 como efetor de *cross-talks* na via *Notch*, e em consonância investigar seu papel biológico e/ou funcional na etiologia dos MBs de Grupos 3 e 4.

2 Hipótese



2. HIPÓTESE

Este projeto se baseia na hipótese de que o *MSI1* está hiperexpresso em MBs de Grupos 3 e 4, modulando a expressão gênica de *Notch-1* de modo a contribuir para a presença de um fenótipo tumoral mais agressivo, através de mecanismos proliferativos, anti-apoptóticos e quimioresistentes.

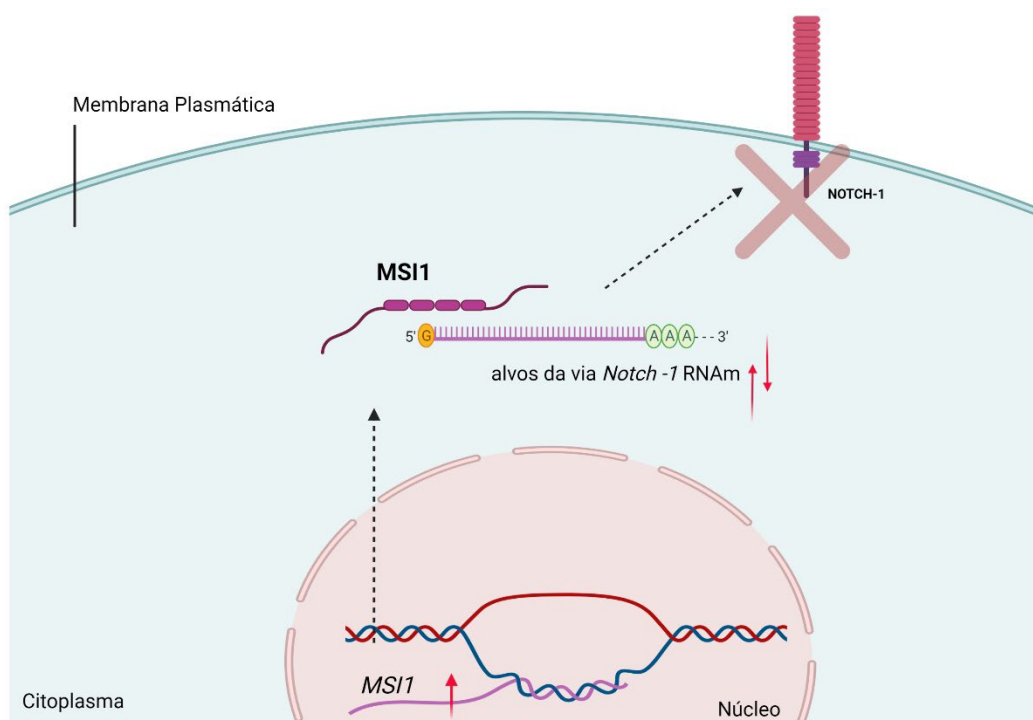


Figura 9 - Hiperexpressão de *MSI1* e modulação de genes alvo. Aumento transcricional de *MSI1* no núcleo da célula tumoral. A hiperexpressão aberrante deste gene (*MSI1*) faz com que sua proteína (MSI1) se acumule no citoplasma e module a expressão de genes alvo à nível pós-transcricional, como por exemplo, a expressão de *Notch-1*, impedindo a ativação funcional deste receptor. Fonte: Do Autor. Criado com o BioRender.com

3 Objetivos



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do gene *MSII* nos processos envolvidos na tumorigênese de MBs de Grupos 3 e 4.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar o perfil de expressão de *MSII* nos subgrupos moleculares de MBs (*in-house cohort*) e identificar padrões de expressão de relevância clínica.
2. Aferir o perfil de expressão gênica e proteica de *MSII* em linhagens de MB de Grupo 3 e 4.
3. Avaliar os efeitos funcionais do *knockdown* de *MSII* associado ou não ao tratamento com cisplatina em MB de Grupo 3 e 4 *in vitro*.
4. Caracterizar os processos biológicos e vias moleculares moduladas após o *knockdown* de *MSII* em linhagem de MB Grupo 3 e 4 por meio de sequenciamento de RNA, e realizar validações de alvos preditos por qRT-PCR e *Western Blot*.

4 Delineamento Experimental



4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

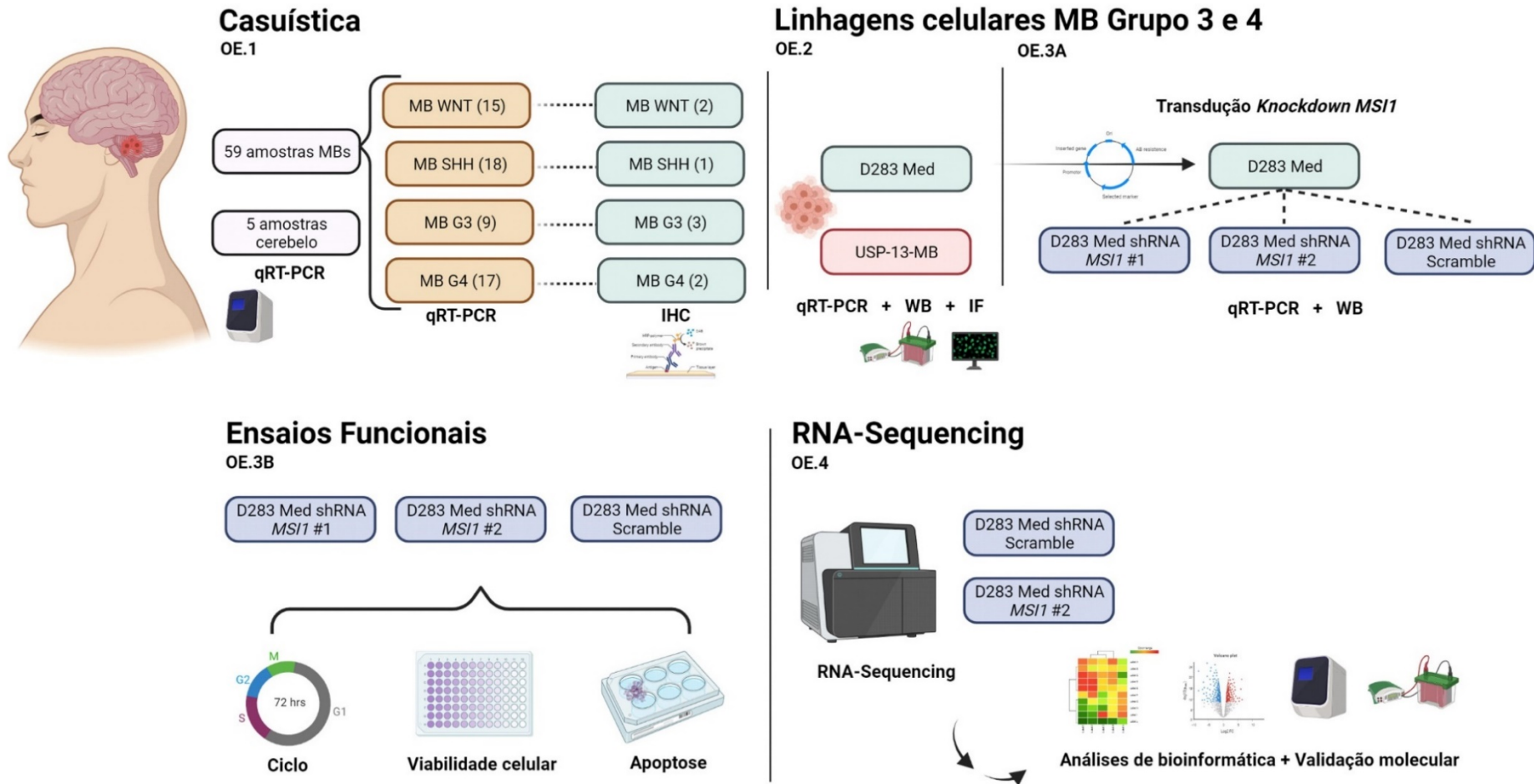


Figura 10 - Fluxograma do delineamento experimental do presente estudo com base nos objetivos específicos (OE) propostos no item 3.2 (p.53).

5 Metodologia



5. METODOLOGIA

5.1 Casuística

Foram incluídos para análise deste estudo um total de 59 amostras de pacientes pediátricos (0-19 anos) diagnosticados com MBs, provenientes de dois institutos/centros de tratamento brasileiros: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP), e Centro Infantil Boldrini, Campinas (CIB). Todas as amostras tumorais coletadas, imediatamente, após ressecção cirúrgica foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido e, tiveram os diagnósticos revisados e confirmados pelos Departamentos de Patologia das respectivas instituições e microdissecadas. Posteriormente, estas amostras foram classificadas molecularmente pelo nosso grupo de pesquisa como MB WNT (n = 15), MB SHH (n = 18), MB Grupo 3 (n = 9) e MB Grupo 4 (n = 17) (Cruzeiro *et al.*, 2019). Do total de amostras, oito casos haviam disponíveis blocos de tecido incluídos em parafina e foram utilizados para análise e caracterização de MSI1 por imunohistoquímica (IHQ). Adicionalmente, cinco amostras de cerebelos não-neoplásicos (provenientes de necrópsia) foram utilizadas como controle.

Das 59 amostras, 19 casos apresentaram recidiva. Entretanto foram utilizadas somente as amostras dos tumores primários para este estudo. Trinta e cinco crianças eram do sexo masculino e 24 do sexo feminino, e 13 tinham menos de 3 anos de idade no momento do diagnóstico. Trinta e oito pacientes tiveram ressecção parcial e 19 ressecção total do tumor. Vinte pacientes apresentaram metástases ao diagnóstico, e 18/20 destes casos foram associados a quadros de alto risco. As características clínico-patológicas e a classificação molecular da referida coorte encontram-se listados na **Figura 11**.

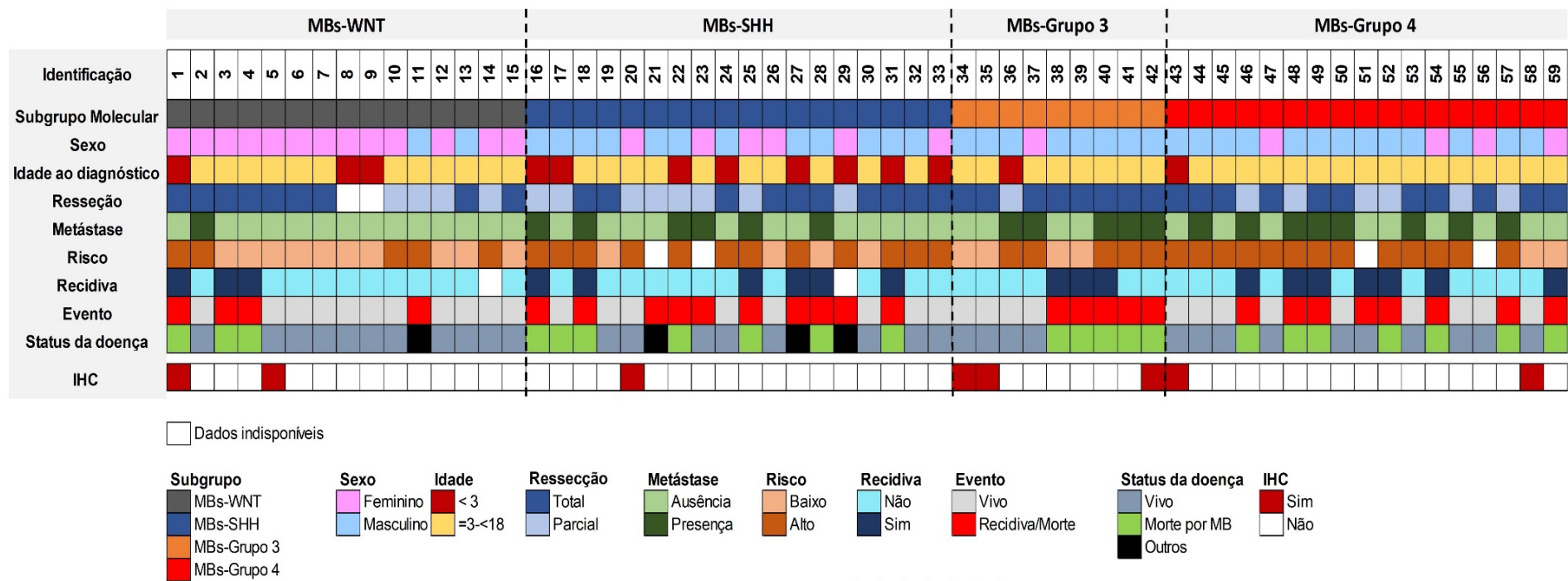


Figura 11- Características clínicas e moleculares dos pacientes pediátricos diagnosticados com MB em nossa coorte.

Este estudo faz parte do projeto Projeto Temático (Processo FAPESP nº: 2014/20341-0) “Interação entre alvos terapêuticos emergentes e vias de desenvolvimento associadas à tumorigênese: ênfase em neoplasias da criança e do adolescente”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP/USP, nº Proc. **15509/2016; CAAE: 37206114.1.0000.5440 (Anexo I)**; Banco de Tumores do Laboratório de Biologia Molecular do CIB (aprovado pelo CEP da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp – reunião dia 17/02/09). Ademais, a proposta deste projeto de pesquisa em particular foi também aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC / FMRP-USP. Número de aprovação: **CAAE: 39356920.0.0000.5440 (ANEXO II)**.

5.2 Linhagens celulares e condições de cultura

Foram utilizadas neste estudo as linhagens celulares de MB pediátricas D283 Med (ATCC HTB-185) e USP-13-MED, gentilmente, cedida pelo Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - SP. A linhagem D283 Med, foi imortalizada de um paciente masculino de seis anos de idade, e a USP-13-MED de um paciente masculino de três anos de idade. Ambas classificadas molecularmente como MB de Grupo 3 e 4 (Friedman *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2016). Ademais, também foi utilizado células de rim embrionário humano 293 (HEK93T) (ATCC CRL-1573).

As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM/F12 com 100mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (SBF) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. A autenticação das mesmas foi conduzida no Laboratório de Genética Bioquímica da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, pela metodologia de STR (*Short Tandem Repeat*). Os resultados obtidos foram comparados com os perfis disponibilizados pela *American Type Culture Collection* (ATCC) em seu *website* e atestaram a compatibilidade das linhagens, segundo as diretrizes estabelecidas pela ATCC.

5.3 Análise da Expressão Gênica

5.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras e linhagens celulares, foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Inc, Carlsbad, EUA) ou *AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as especificações dos fabricantes. As concentrações foram determinadas pela leitura de espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280nm no aparelho de ND-1000 *Spectrophotometer* (NanoDrop 1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA) e armazenados em freezer -80°C . Razões que variavam de 1,8 a 2,0 foram consideradas satisfatórias para o grau de pureza do RNA. A reação de transcrição reserva para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 500ng de RNA total por meio do *kit High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

5.3.2 PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) utilizando o equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems* (PE Applied Biosystems). Para análise dos RNAs mensageiros alvos foram utilizados as sondas *MSII* (Hs01045894_m1) e *Notch-1* (Hs01062014_m1). Como controle endógeno utilizamos as sondas *HPRT* (4326321e) e *GUS* (Hs00939627_m1). A quantificação relativa da expressão foi determinada empregando o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak and Schmittgen, 2001), onde o $\Delta\text{CT} = \text{CT de genes alvo} - \text{média geométrica dos dois genes de referência}$. Como calibrador foi utilizado uma linhagem comercial de cerebelo.

5.4 Análise da Expressão Proteica

5.4.1 Western Blot

A expressão proteica das linhagens celulares foi realizada através da metodologia de *Western Blot*. O reagente *RIPA Lysis and Extraction Buffer®* (Pierce Biotechnology, IL, EUA), foi utilizado para extração de proteínas de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise proteica, 40 μg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE. Em seguida, as

proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas em TBST 1% contendo 5% de solução bloqueadora (*Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA*) por 1 hora, em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário da proteína de interesse, diluído de acordo com as instruções do fabricante. A lista dos anticorpos utilizados neste estudo está descrita na **Tabela 2**. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do Kit ECL™ *Western Blot Analysis System* (*Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*). A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada pelo *software* ImageJ 1.52a *National Institutes of Health* (NIH) usando como controle endógeno o anticorpo anti-GAPDH (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Lista de anticorpos primários.

Anticorpo	Código	Especificações	Empresa
GAPDH	Sc-47724	Mouse Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Musashi-1	D46A8	Rabbit monoclonal	Cell Signaling
Notch-1	EP1238Y	Rabbit Monoclonal	Abcam
p21	#2947	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
p27	D69C12	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling

5.4.2 Imunohistoquímica

No total, oito amostras de biópsias de MBs previamente classificadas molecularmente, encontravam-se disponíveis para a reação de IHQ em cortes histológicos de 4µm de espessura. Após completa desparafinização e posterior hidratação, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (pH 6,0). O sistema de detecção utilizado foi o polímero *REVEAL Polyvalent HPR-DAB Detection System* (*Spring Bioscience, Canada Customers, US*), seguindo as recomendações do fabricante. O anticorpo primário utilizado foi o anti-Musashi-1 ([Musashi-1 (D46A8) Rabbit mAb #5663], *Cell Signaling Technology, Danvers, MA*, diluição 1/70), devidamente diluído com BSA 1% e incubado *overnight*. Por último, foi realizada a imunomarcagem com o cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) e as lâminas contra coradas com Hematoxilina de Harris.

Uma amostra de córtex cerebral foi selecionada como controle positivo para MSI1. Os padrões de imunomarcção foram analisados por um neuropatologista experiente (F.P.S; FMRP-USP), considerando como células positivas aquelas com coloração citoplasmática e/ou nuclear para MSI1. As células positivas foram analisadas de acordo com a porcentagem de células tumorais com marcação citoplasmática e/ou nuclear para MSI1: + (<25%), ++ (<25-50%), +++ (<50-75%) e ++++ (<75-100%). Adicionalmente, foi avaliado a intensidade de imunomarcção nas células tumorais, consideradas como: fraca (+) ou forte (++) . As imagens dos casos representativos foram capturadas com ampliação de 40× usando o equipamento Nikon ECLIPSE 80i.

5.5 Imunofluorescência

Para realização do teste de imunofluorescência, aproximadamente, 25.000 células das linhagens celulares D283 Med e USP-13-MED foram plaqueadas e mantidas em meio de cultura sob lamínulas. Após a adesão e crescimento celular, as células foram fixadas a 37°C com paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X, pH 7.4 durante 15 minutos. Logo após, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e permeabilizadas com 0.3% de Triton-X100 (diluído em PBS 1X), por 10 minutos. Repetiu-se a lavagem com PBS 1X, e em seguida, foi realizado o bloqueio dos aldeídos livres com 100mM de Glicina (diluída em PBS 1X), por 5 minutos.

Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com BSA 2% por 2 horas e adicionado o anticorpo primário (Anti-Musashi-1 [Musashi-1 (D46A8) Rabbit mAb #5663], Cell Signaling Technology, Danvers, MA, diluição 1/500) em solução de bloqueio BSA 2% por 2 horas. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e foram adicionados os anticorpos secundários (Faloidina – emissão de fluorescência no espectro vermelho; Alexa 647 e Alexa 488), também diluídos em solução de bloqueio BSA 2% por 1 hora. Para finalização, as lamínulas foram recobertas utilizando meio de montagem contendo 4,6 diamidinofenilinol (DAPI) emissão de fluorescência no espectro azul (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). O procedimento de digitalização e captura das imagens foi realizado utilizando-se o microscópio Leica DM2500 (*LeicaBiosystems, Wetzlar, Alemanha*), bem como *software* de aquisição de imagem LAS (*Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha*). A intensidade da luz foi padronizada em todas as digitalizações.

5.6 Modulação gênica de *MSI1*

5.6.1 Expansão dos vetores para *knockdown*

Os vetores shRNA para indução do *knockdown* de *MSI1* (pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>hMSI1[shRNA#1] e pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>hMSI1[shRNA#2]), e o respectivo vetor vazio/puro (pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>*Scramble_shRNA#1*) foram construídos e obtidos da empresa Vector Builder (<https://en.vectorbuilder.com>). Os vetores inseridos em bactéria *E.coli* foram semeados em placa com meio LB e ágar suplementado com o antibiótico de seleção ampicilina, *overnight* a 37°C. Em seguida, uma colônia isolada foi selecionada e submetida à expansão clonal em meio LB líquido, também suplementado com o antibiótico de seleção, *overnight* a 37°C. Posteriormente, os plasmídeos foram purificados utilizando o kit “QIAGEN Plasmid Midi Kit” (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza foram avaliadas pelo aparelho de ND-1000 *Spectrophotometer* (NanoDrop 1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA).

5.6.2 Produção das partículas lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas na linhagem celular HEK293T. Portanto, foram semeadas aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células em garrafas de 75cm³ e incubadas *overnight*. Posteriormente, as células foram transfectadas com uma solução composta por meio DMEM, agente de transfecção (FuGENE® HD, PRomega Corporation, Madison, WI, USA), plasmídeo de empacotamento lentiviral (psPAX2, Addgene, #12260), plasmídeo para construção do envelope lentiviral (pMD2.G, Addgene, #12259) e os respectivos plasmídeos para o *knockdown* de *MSI1* e o vetor puro/vazio. Após 24h, o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM F12 completo. O meio de cultivo contendo a suspensão lentiviral foi coletado 24 e 48h após a transfecção, centrifugado, filtrado em Millex HV 0,45µm *low-protein binding* (Fisher Scientific Millipore) para a retirada de debris celulares e armazenado a -80°C.

5.6.3 Transdução da linhagem D283 Med (MB Grupo 3 e 4) com partículas lentivirais

A linhagem celular D283 Med foi semeada em placas de 6 poços na concentração de 4×10^5 células por poço. No dia seguinte, as células foram transduzidas com a suspensão lentiviral (500 μ L) contendo os vetores para o *knockdown* de *MSII* e o vetor vazio, além de 8μ g/mL de polibreno. Após 48h, o meio de transdução foi substituído por meio completo suplementado com o antibiótico de seleção blasticidina, na concentração de 10μ g/mL até a completa seleção das células resistentes. Após seleção e expansão das linhagens, o *knockdown* de *MSII* foi confirmado por qRT-PCR e *Western Blot*.

5.7 Preparo e tratamento com a droga Cisplatina

Para os ensaios de viabilidade e morte celular a linhagem D283 Med, submetida ao *knockdown* de *MSII*, foi tratada com diferentes doses (descritas abaixo) da droga Cisplatina (Catalogo N°1166), previamente diluída em PBS 1X, conforme a recomendação do fabricante. A cisplatina é um quimioterápico clássico utilizado na rotina clínica do tratamento de MB e foi adquirido pela empresa *Selleckchem bioactive compound Expert* (<https://www.selleckchem.com/>).

5.8 Ensaios Funcionais

5.8.1 Viabilidade Celular

As linhagens celulares (D283 Med shRNA *Knockdown MSII* #1 e #2, e D283 Med shRNA *Scramble*), foram semeadas, em placas de 96 poços, na densidade celular de $1-3 \times 10^3$ células/ poço. Para os experimentos com a droga Cisplatina foram avaliadas as doses de 3μ M, 5μ M, 7μ M e 10μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. Após os diferentes tempos de tratamento foi adicionado 30μ L do reagente *CellTiter-Glo*® (Promega) em temperatura ambiente. A detecção pelo *CellTiter-Glo*® ocorre através do uso da reação de luciferase para medir a quantidade de ATP das células viáveis. Em poucos minutos após a perda da integridade da membrana, as células perdem a capacidade de sintetizar ATP e as ATPases endógenas destroem qualquer ATP remanescente. Após adição do reagente *CellTiter Glo*® ocorre 3 etapas: 1) lise das membranas

celulares para liberar o ATP; 2) inibição das ATPases endógenas e por último; 3) Fornece luciferina, luciferase e outros reagents necessários para medir o ATP usando uma reação bioluminescência. A leitura de luminescência foi realizada utilizando o aparelho *SpectraMax® L Microplate Reader*. Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo (PBS 1X-veículo da droga).

Nota: IC₅₀: Para o cálculo do IC₅₀ (dose em que a droga causa a inviabilidade de 50% das células) da droga Cisplatina, foi utilizado o *software CalcuSyn* (Biosoft®, Cambridge, U.K.). Para cada experimento foram calculados a fração celular afetada após o tratamento com as diferentes doses da droga Cisplatina em comparação ao controle no tempo de 72h.

5.8.2 Ensaio de Morte Celular

Para o ensaio de morte celular, 3-5x10⁴ células (D283 Med shRNA *Knockdown MSII* #1 e #2, e D283 Med shRNA *Scramble*) foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com a droga Cisplatina na dose de 4.1 µM (menor dose após cálculo IC₅₀) por 72 horas. Após esse período, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas com PBS 1X gelado e, em seguida, ressuspendidas em 250 µL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). Logo após, as células foram marcadas com 5 µL de Anexina VI FITC (BD Biosciences Pharmigen, USA) e 50 µL de solução de Iodeto de Propídeo (PI). As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão em comparação aos resultados das células do controle negativo (PBS 1X-veículo da droga).

5.8.3 Ensaio/Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, um total de 17,5x10⁴ células (D283 Med shRNA *Knockdown MSII* #1 e #2, e D283 Med shRNA *Scramble*) foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas em cultura por 72h, sem combinação com drogas/quimioterápicos. Em seguida, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm / 5 min e lavadas com PBS 1X. As células foram fixadas com etanol 70% gelado e mantidas a -20° C *overnight*.

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 800 rpm / 5 min, lavadas com PBS 1X e o *pellet* resultante foi ressuspenso em PBS 1X com 25µL de RNase A (10 ng/mL) a 37° C por 30 min. Em seguida, para marcação das células, foi adicionado o PI a uma concentração final de (50µg/mL). As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi obtida pelo *software* Flow Jo™ V10. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células D283 Med shRNA *Scramble*.

5.9 Técnicas e abordagens de bioinformáticas integrativas aplicadas à análise transcriptoma

5.9.1 Análises *in silico*

Para avaliar o perfil de expressão gênica de *MSII*, e *Notch-1* foram utilizados dados do GSE85217 (Cavalli *et al.*, 2017) disponíveis no *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform*, compreendendo: amostras pediátricas de MB WNT (n=51), MB SHH (n=146), MB Grupo 3 (n=131) e MB Grupo 4 (n=300). Para identificar a correlação de expressão de *Notch-1* com *MSII*, também foi utilizado o banco de dados públicos citado acima, adotando um coeficiente de correlação de *Pearson* (negativo e positivo) maior que $\pm 0,4$ e $p < 0,05$.

5.9.2 Extração de RNA total e sequenciamento

Após confirmado o *knockdown* de *MSII*, amostras da linhagem celular D283 Med shRNA *MSII#2* e shRNA *Scramble*, foram submetidas à extração de RNA utilizando o AllPrep RNA/DNA/Protein Mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as especificações do fabricante. O RNA foi quantificado e analisado em gel de agarose 1% para uma triagem inicial da qualidade. As amostras foram submetidas a análise de *RNA integrity number* (RIN) por meio do *Bioanalyzer*. Este experimento foi realizado em triplicata. A preparação das bibliotecas de RNA (inclusão dos adaptadores exclusivos *barcodes* e preparação do *pool* para o sequenciamento) e o sequenciamento do RNAm total (RNA-seq) foram realizados pelo

Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

5.9.3 Análise dos dados de RNA-seq

Cada amostra foi sequenciada em *paired-end* gerando assim dois arquivos brutos em formato fastq, os quais foram submetidos para análise de qualidade de *reads* através dos *softwares* FastQC (versão 0.72) e MultiQC (versão 1.9) (Ewels *et al.*, 2016), as quais avaliam a qualidade do sequenciamento, o conteúdo de GC (guanina-citosina), o número de *reads* gerados e a porcentagem de duplicações por amostra individual e amostras compiladas, respectivamente (Wang *et al.*, 2012). Logo após, para remover as sequências de adaptadores Illumina e cortar (*trim*) a extremidade de *reads* de baixa qualidade, foi utilizado o programa Trimmomatic (versão 0.38) (Bolger *et al.*, 2014). Os *reads* processados foram então alinhados com o genoma de referência humano (Genome Reference Consortium Human GRCh38) por meio do HISAT2 (versão 2.2.1) (Kim *et al.*, 2019). A anotação gênica e contagem de *reads* foi realizada pelo *software* featureCounts (versão 2.0.1).

Posteriormente, utilizando os *reads* processados e alinhados com o genoma de referência (GRC38/hg38), foi realizada a normalização através do algoritmo VST e análise estatística para detecção da expressão diferencial entre as amostras D283 Med shRNA *Knockdown MSII #2* e D283 Med shRNA *Scramble*, através do pacote DESeq2 (versão 1.32.0) (Love *et al.*, 2014). Para visualização dos valores estatísticos dos genes diferencialmente expressos, o *Volcano plot* foi gerado pelo pacote ggplot2 (versão 3.3.5). O *threshold* utilizado foi p-ajustado <0.05 , sendo considerado como genes hipoexpressos (“*downregulated*”) aqueles com $\log_2 \text{Fold Change}$ ($\log_2\text{FC}$) <0.3 e hiperexpressos (“*upregulated*”) $\log_2\text{FC} >0.3$. Posteriormente, o *heatmap* dos DEGs foi gerado utilizando o pacote ComplexHeatmap (versão 2.8.0) (Gu *et al.*, 2016) no *software* RStudio aplicando a distância de *Spearman* e algoritmo Ward.D2 de clusterização. Ademais, conduzimos a análise de enriquecimento de vias através do banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e *Gene Ontology* (GO) processos biológicos e função molecular para entender melhor as funções putativas dos DEGs usando a plataforma Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) (Kanehisa *et al.*, 2017). Todas as análises foram realizadas por bioinformatas do nosso grupo de pesquisas

5.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os *softwares* (Graph Prism 8.0 GraphPad Software, San Diego, CA USA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Em todas as análises, foram considerados valores significativos quando valor de $p < 0,05$.

5.10.1 Expressão gênica diferencial

Para a análise de expressão gênica das amostras de MB em comparação com as amostras de cerebelos não-neoplásicos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* e valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Este mesmo parâmetro foi utilizado para avaliar o perfil de expressão gênica de *MSII* nos dados públicos de MB (GSE85217). Enquanto que para associação da expressão diferencial de *MSII* com as características clínicas dos pacientes foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* com valor de p significativo $\leq 0,05$. As variáveis analisadas dos pacientes foram: sexo (feminino ou masculino); idade ao diagnóstico (≥ 3 anos ou < 3 anos); grau de ressecção (completa ou incompleta); metástase (ausência ou presença); recidiva (presente ou ausente), evento (se o paciente está vivo ou se foi a óbito/apresentou recidiva); *status* da doença (se o paciente está vivo ou se veio a óbito por MB).

5.10.2 Sobrevida Global e Livre de Eventos

O teste não paramétrico de *long-rank* foi empregado para análise da sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) em 5 anos. Os gráficos de *Kaplan-Meier* foram construídos com base em valores de mediana de expressão de *MSII* dos pacientes com MB e divididos entre tumores com hipoexpressão ou hiperexpressão.

5.10.3 Curva ROC

Curvas de características de operação do receptor (ROC) foram usadas para avaliar a capacidade da expressão de *MSII* em discriminar os subgrupos moleculares de MBs. A precisão foi determinada pela área sob a curva (AUC).

5.10.4 Análises dos ensaios funcionais

Para os ensaios funcionais de viabilidade, ciclo e apoptose celular, foram utilizados os testes *t-Student*, *Anova OneWay* e pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados pelos valores de média \pm desvio padrão.

6 Resultados



6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do perfil de expressão gênica de *MSI1* em amostras de MBs pediátricos

A partir das 59 amostras de MBs pediátricos e de cinco amostras de cerebelos não neoplásicos de nossa coorte e do banco de dados públicos de MBs pediátricos (n=628), foi possível observar uma maior expressão de *MSI1* nas amostras de tecido tumoral de MBs Grupos 3 e 4 ($p < 0,001$, $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparada às amostras de cerebelos (Figura 12A). Além disso, entre os subgrupos moleculares de MBs, *MSI1* encontra-se hiperexpresso em MBs de Grupos 3 e 4 ($p < 0,001$ e $< 0,0001$, respectivamente) em ambas as coortes (Figura 12B).

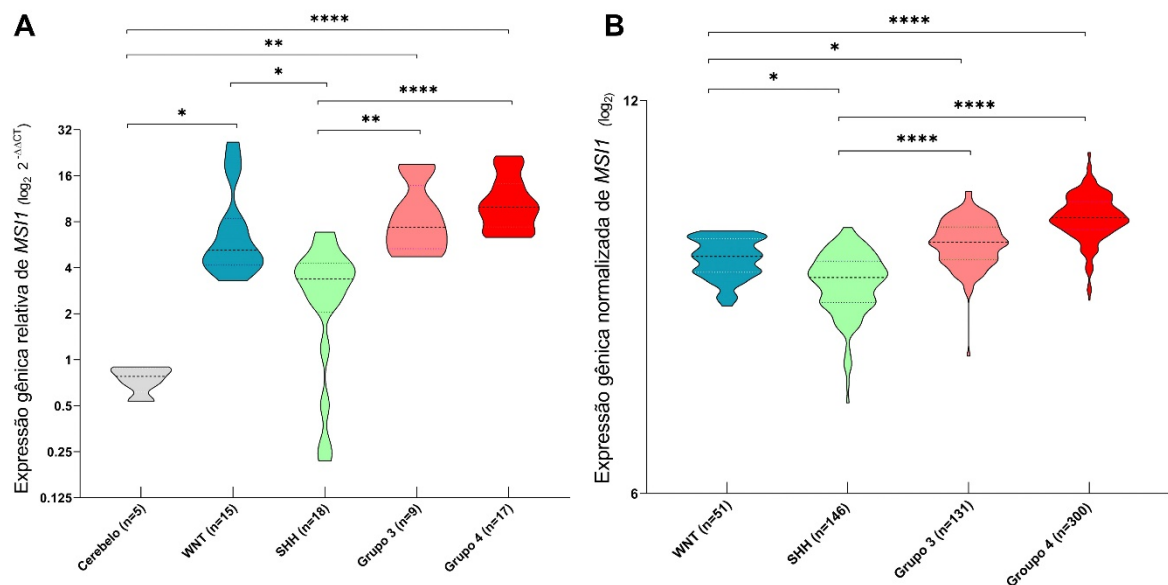


Figura 12 - Perfil de expressão gênica de *MSI1* em MB pediátrico. (A) Expressão gênica relativa de *MSI1* por qRT-PCR nas amostras de cerebelo e nos diferentes subgrupos moleculares de MBs pediátricos (B) Perfil de expressão gênica de *MSI1* em banco de dados público de MBs pediátrico (GSE85217). Os valores da expressão gênica estão em escala logarítmica log₂. *($p < 0,01$), **($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$).

6.2 Avaliação do perfil da expressão proteica de MSI1 em biópsias de MBs pediátricos

No total, oito das 59 amostras de MBs analisadas por qRT-PCR encontraram-se também disponíveis para análise da expressão proteica de MSI1 por IHQ e os resultados destas oito biópsias de MBs (MBs – WNT: n=2, SHH: n=1, Grupo 3: n=3, e Grupo 4: n=2) foram revisados por um patologista experiente e analisados de forma semiquantitativa para determinação da percentagem de células positivas para MSI1 (*score*) e intensidade de marcação à nível nuclear e citoplasmático.

Foi observada uma imunomarcação positiva para MSI1 à nível nuclear e citoplasmático em um *score* entre + (< 25%) a ++ (< 25-50%) e de fraca intensidade para os 3/3 casos analisados de MBs WNT e SHH (**Figura 13A-C**). Em contraste, o nível de expressão proteica de MSI1 para os casos de MBs de Grupos 3 e 4, apresentaram um *score* de marcação entre +++ (< 50-75%) e ++++ (< 75-100%), com intensidade forte para 3/5 casos analisados apresentando também uma marcação nuclear e citoplasmática (**Figura 13D-H**). Digno de nota, o número de biópsias de MBs incluídas neste estudo para análise de IHQ foi limitado e insuficiente para ser correlacionado a qualquer característica clínica dos pacientes. Todavia, quando analisados de forma pareada, os resultados das análises de IHQ e de qRT-PCR apresentaram padrão de expressão similares, demonstrando uma maior expressão de MSI1 nos subgrupos moleculares de MBs Grupos 3 e 4 (**Tabela 3**).

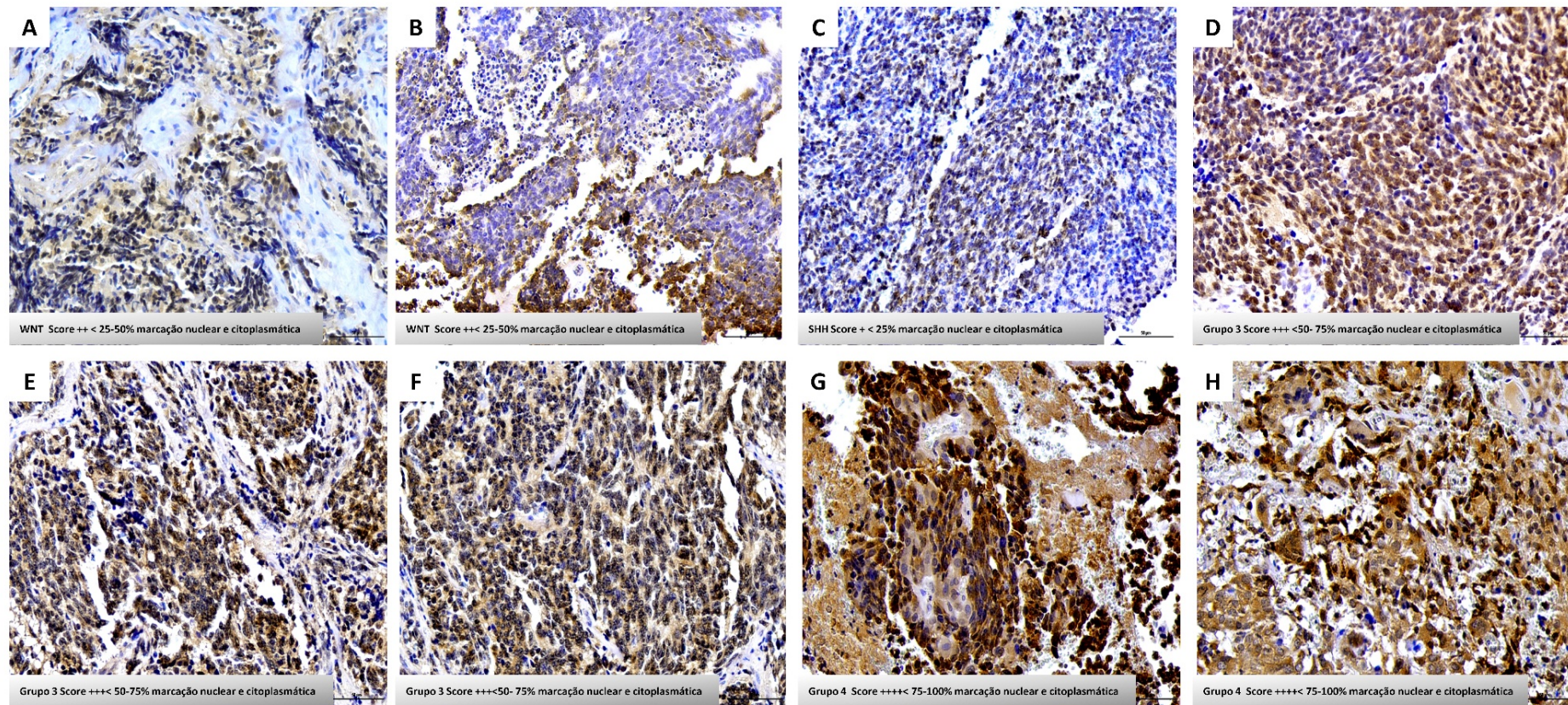


Figura 13- Fotomicrografias representativas da expressão proteica de MSI1 em tecidos tumorais de MBs pediátricos determinada por IHQ. (A-B) Amostras de MB WNT, (C) MB SHH, (D-F) MB Grupo 3, (G-H) MB Grupo 4. Todos os casos analisados apresentaram marcação positiva (coloração marrom) para MSI1 à nível nuclear e citoplasmático. Barra de escala 50 µm / Magnificação original de 20X.

Tabela 3 – Análise de IHQ para MSI1 em biópsias de MBs pediátricos.

Nº da Amostra	Subgrupo Molecular	qRT-PCR (RQ)	<i>MSI1</i>	Score	Intensidade
1	MB WNT	4,00	Hipo	++	+
5	MB SHH	3,30	Hipo	++	+
20	MB SHH	0,27	Hipo	+	+
34	MB Grupo 3	6,72	Hiper	+++	++
35	MB Grupo 3	7,30	Hiper	+++	+
42	MB Grupo 3	7,38	Hiper	+++	+
43	MB Grupo 4	6,39	Hiper	++++	++
58	MB Grupo 4	6,91	Hiper	+++	++

RQ – Quantificação relativa da expressão gênica de *MSI1*. Hipoexpresso (Hipo) ou Hiperexpresso (Hiper) de acordo com a mediana de expressão gênica de *MSI1*. *Score* para determinação da porcentagem de células com marcação positiva para MSI1: + (<25%), ++ (<25-50%), +++ (<50-75%) e ++++ (<75-100%). Intensidade de imuno-marcação: Fraco (+) e Forte (++)

6.3 Análise da associação dos níveis de expressão gênica de *MSI1* com características clínicas de pacientes pediátricos com MB em nossa coorte

Para verificar se a hiperexpressão de *MSI1* apresentaria alguma associação com prognóstico em MB, avaliamos o perfil de expressão desse gene de acordo com os parâmetros clínicos dos pacientes. Entretanto, como pode ser observado na **Tabela 4**, não foi encontrado nenhuma associação significativa com as características clínicas analisadas.

Tabela 4 – Análise de associação da expressão de *MSII* com características clínicas de pacientes pediátricos com MB, incluindo sexo, idade, grau de ressecção cirúrgica, presença de metástase, recidiva, evento e status da doença (NA= não avaliado).

Variável Clínica	Nº de Pacientes (%)	Valor de p
Sexo		
Feminino	24 (41%)	0,878
Masculino	35 (59%)	
Idade ao diagnóstico		
< 3 anos	13 (23%)	0,082
> 3 anos	46 (77%)	
Grau da ressecção cirúrgica		
Completo	38 (65%)	0,974
Incompleto	19 (33%)	
NA	2 (2%)	
Metástase		
Ausência	39 (66%)	0,147
Presença	20 (34%)	
Recidiva		
Sim	19 (33%)	0,838
Não	38 (65%)	
NA	2 (2%)	
Evento		
Vivo	27 (45%)	0,397
Recidiva/Óbito	32 (55%)	
Status da doença		
Vivo	33 (55%)	0,476
Óbito (MB)	22 (27%)	
Outros	4 (18%)	

6.4 Correlação entre o nível de expressão gênica de *MSII* e as sobrevida global e livre de eventos em pacientes pediátricos com MB

Para relacionar os dados clínicos dos pacientes e o valor das expressões de *MSII* com a sobrevida considerou-se o tempo de SG como a data do diagnóstico até o óbito ou a data do último seguimento. A mediana do seguimento de evento (recidiva ou óbito) foi de 56,4 meses, variação de 3 a 168 meses. Enquanto a mediana do segmento do desfecho clínico (vivo ou óbito) foi igual a 53,9 meses, variação de 3 a 163 meses. Não houve nenhum dado estatisticamente significativo entre o valor das expressões de *MSII* e a SG (**Figura 14A**, $p=0,393$) e SLE (**Figura 14B**, $p=0,861$) dos pacientes.

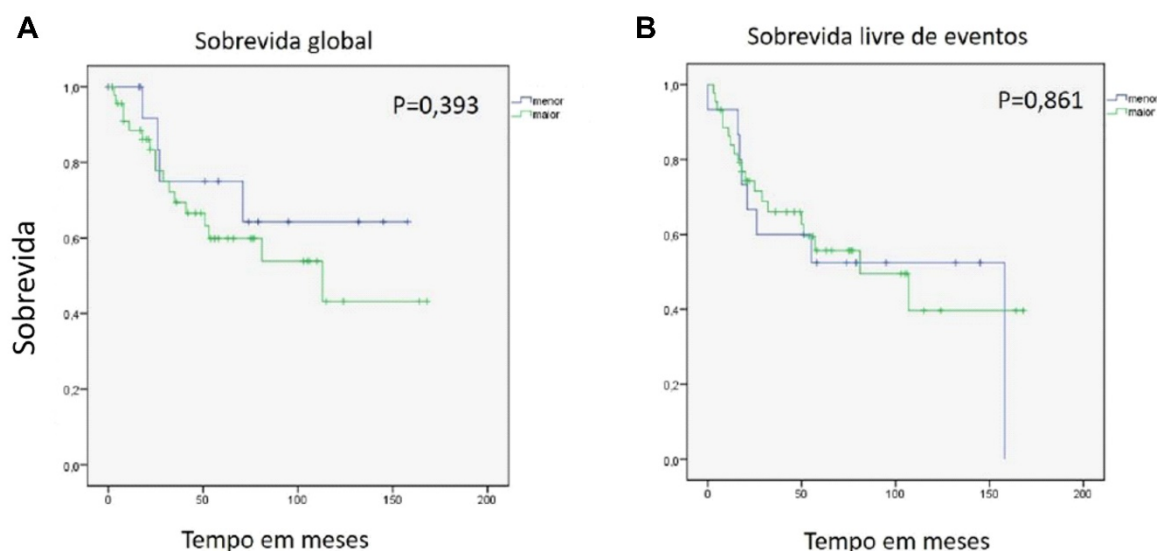


Figura 14- Análise de sobrevida global (A) e livre de eventos (B) de acordo com a mediana de expressão do gene *MSII*.

6.5 Avaliação do valor diagnóstico da expressão de *MSI1* na discriminação de MBs de Grupos 3 e/ou 4 (pior prognóstico) dos demais subgrupos moleculares

Após evidenciar que *MSI1* encontra-se hiperexpresso em MBs de Grupos 3 e 4, foi avaliado, através da análise de curva ROC, se a expressão de *MSI1* poderia discriminar com precisão e acurácia os subgrupos de MBs de pior prognóstico, ou seja, Grupos 3 e 4, dos demais subgrupos. Surpreendentemente, a área sob a curva ROC observada foi de 0,856 ($p < 0,001$), sugerindo uma alta precisão diagnóstica na discriminação entre os MBs de Grupos 3 e 4 dos subgrupos WNT e SHH (Figura 15).

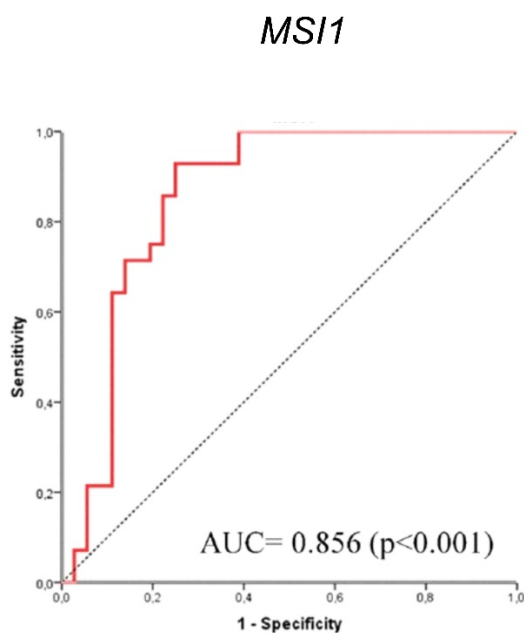


Figura 15 - Análise da curva ROC do valor diagnóstico de *MSI1* na discriminação entre MBs de Grupos 3 e 4 dos subgrupos moleculares WNT e SHH com base no valor da expressão gênica de *MSI1* nos pacientes de nossa coorte.

6.6 Avaliação do perfil de expressão gênica e proteica de MSI1 nas linhagens celulares de MB Grupo 3 e 4

Diante dos dados descritos acima de que *MSI1* está hiperexpresso e permite a elevada acurácia em discriminar amostras de MBs Grupos 3 e 4 quando comparado aos demais subgrupos, o próximo passo foi caracterizar o perfil de expressão gênica e proteica de MSI1 em linhagens de MBs subgrupos-específicas. Portanto, foi avaliado o perfil de expressão gênica e proteica de MSI1 nas linhagens celulares de MBs Grupo 3 e 4 (USP-13-MED e D283 Med), para identificar e selecionar o melhor modelo experimental para continuidade deste estudo. Foi identificado por qRT-PCR e *Western blot* que a linhagem celular D283 Med apresenta uma maior expressão de MSI1 (**Figura 16A-B**, $p < 0.01$), em comparação a linhagem celular USP-13-MED, **Figura 16A-B**, à nível de RNAm e proteína, respectivamente.

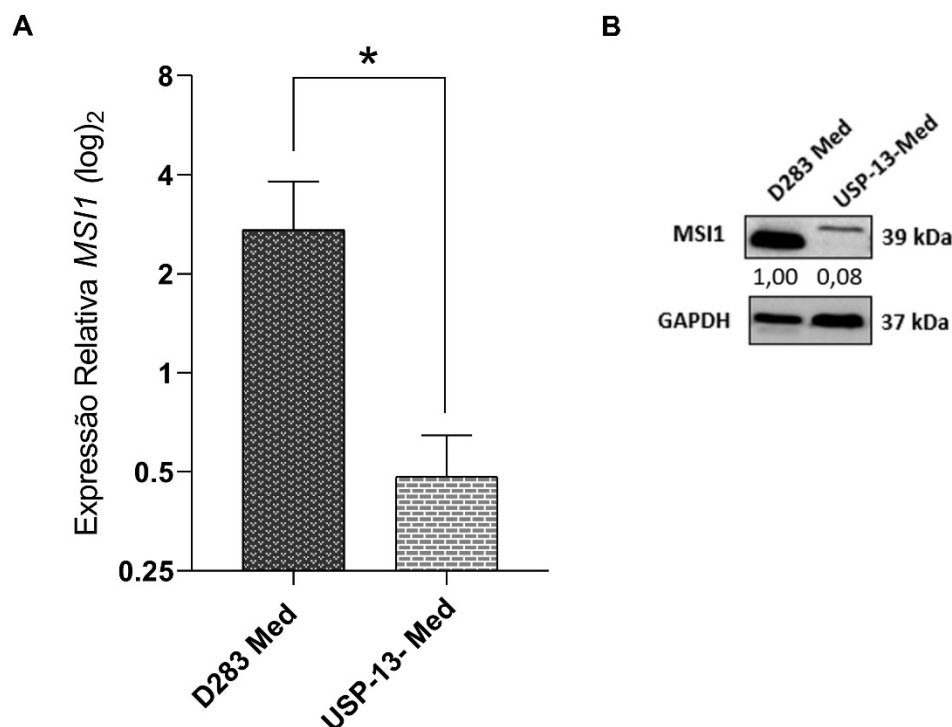


Figura 16 - Perfil de expressão gênica e proteica de MSI1 em linhagens celulares de MB de Grupo 3 e 4. (A) Expressão gênica e (B) níveis proteicos de MSI1 nas linhagens celulares D283 Med e USP-13-MED determinados por qRT-PCR e *Western Blot*, respectivamente. No gráfico (A) os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (* $p < 0,01$). A quantificação relativa da expressão proteica foi determinada pelo *software* ImageJ, utilizando a proteína GAPDH como controle endógeno

6.7 Intensidade e localização celular de MSI1 por imunofluorescência

MSI1 é uma proteína RBP presente no núcleo e no citoplasma das células (Kudinov *et al.*, 2017). Portanto, foi investigado por imunofluorescência, as diferenças de intensidade de fluorescência e a localização celular de MSI1 nas linhagens celulares de MB Grupo 3 e 4 (D283 Med e USP-13-MED). É possível observar que a linhagem celular D283 Med apresentou uma maior intensidade de fluorescência para MSI1 (em magenta) à nível nuclear e citoplasmático (**Figura 17A**), quando comparado a linhagem celular USP-13-MED, que apresentou uma intensidade de fluorescência fraca para MSI1 à nível citoplasmático, e moderada intensidade de fluorescência observada nas regiões de contato célula-célula (**Figura 17B**).

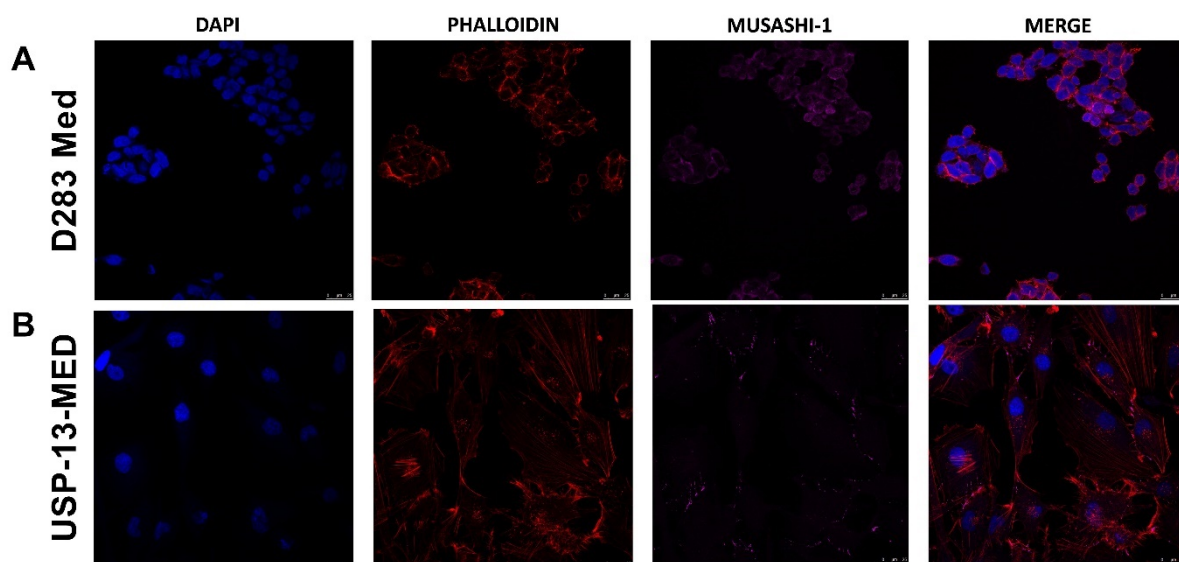


Figura 17 - Microfotografias ilustrativas da intensidade e localização celular de MSI1 em linhagens de MB de Grupo 3 e 4. Análises por microscopia confocal confirmam a presença de MSI1 (magenta) em diferentes intensidades de fluorescência e localização nas linhagens celulares: (A) D283 Med – intensidade forte para o núcleo e citoplasma; e (B) USP-13-MED – intensidade moderada para o citoplasma

6.8 Silenciamento da expressão gênica de *MSI1* na linhagem celular D283 Med

Após realizar a caracterização do perfil de expressão de *MSI1* nos modelos experimentais disponíveis, foi selecionado a linhagem celular D283 Med para avaliarmos o papel funcional e a relevância biológica de *MSI1* em MB Grupo 3 e 4 *in vitro*, através do *knockdown* de *MSI1* por shRNA (transdução lentiviral). Para indução do silenciamento dois vetores lentivirais foram construídos para diferentes regiões gênicas de *MSI1* (éxons 4 e 8), como ilustrado na **Figura 18A**. O controle (vetor puro/vazio) foi nomeado como shRNA *Scramble* (**Figura 18B**), e os dois vetores para foram nomeados como shRNA *MSI1*#1 (éxon 4, **Figura 18C**) e shRNA *MSI1*#2 (éxon 8, **Figura 18D**).

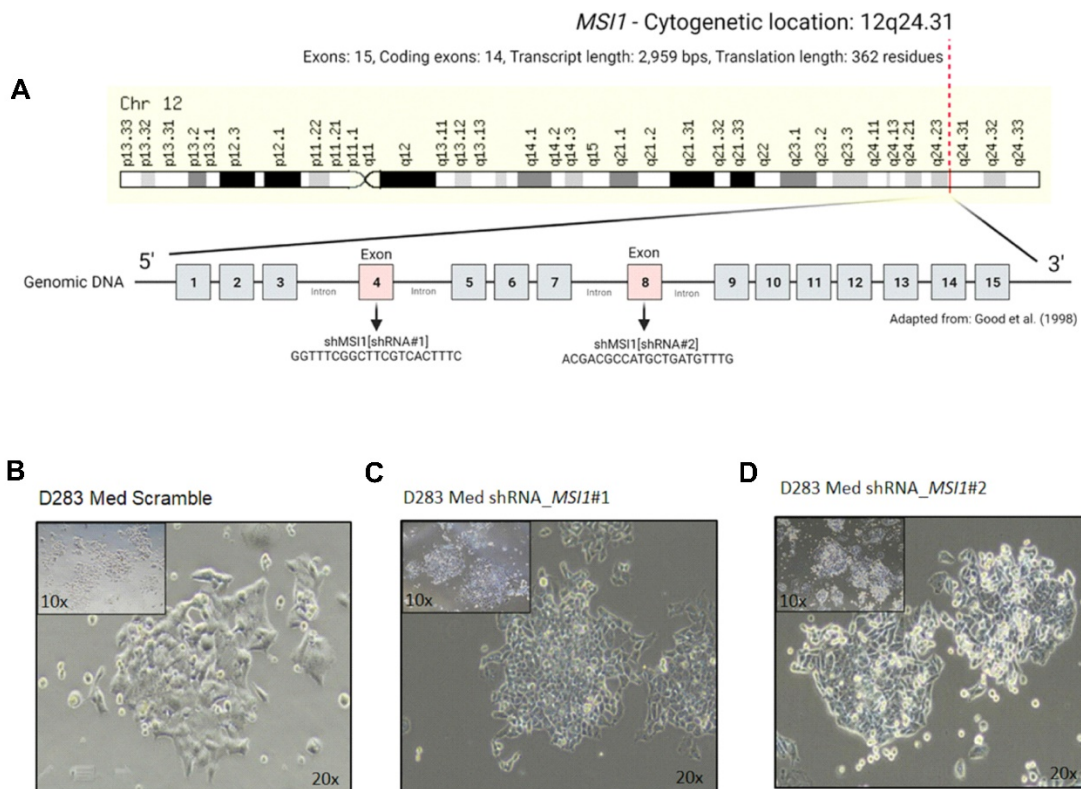


Figura 18 - (A) Localização citogenética e representação genômica de *MSI1*: construção dos vetores para *Knockdown*. Imagem da linhagem celular D283 Med após o processo de transdução, seleção e expansão. (B) D283-Med shRNA *Scramble*, (C) D283 Med shRNA *MSI1*#1, (D) D283Med shRNA *MSI1*#2. Imagens adquiridas por microscopia invertida visualizadas nos aumentos de 10X e 20X.

6.9 Confirmação do *knockdown* de *MSI1*

Posteriormente aos processos de transdução, seleção e expansão das linhagens, foi realizada a confirmação do silenciamento da expressão gênica e proteica de *MSI1* por qRT-PCR e *Western blot*. É possível observar que houve uma redução de aproximadamente 60 e 85% do nível de expressão gênica de *MSI1* para o clone 1 (shRNA *MSI1*#1, $p < 0,01$) e para o clone 2 (shRNA *MSI1*#2, $p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao controle (**Figura 19A**). Indo de encontro a estes achados, foi possível observar por *Western blot*, o impacto do silenciamento gênico na redução significativa dos níveis da proteína MSI1 para o clone 1 (shRNA *MSI1*#1, $p < 0,05$) e para o clone 2 (shRNA *MSI1*#2, $p < 0,001$), com relação ao controle (**Figura 19B**). De modo interessante, foi possível constatar que o clone 2, apresentou uma maior eficiência de silenciamento gênico e proteico de *MSI1* em comparação ao clone 1.

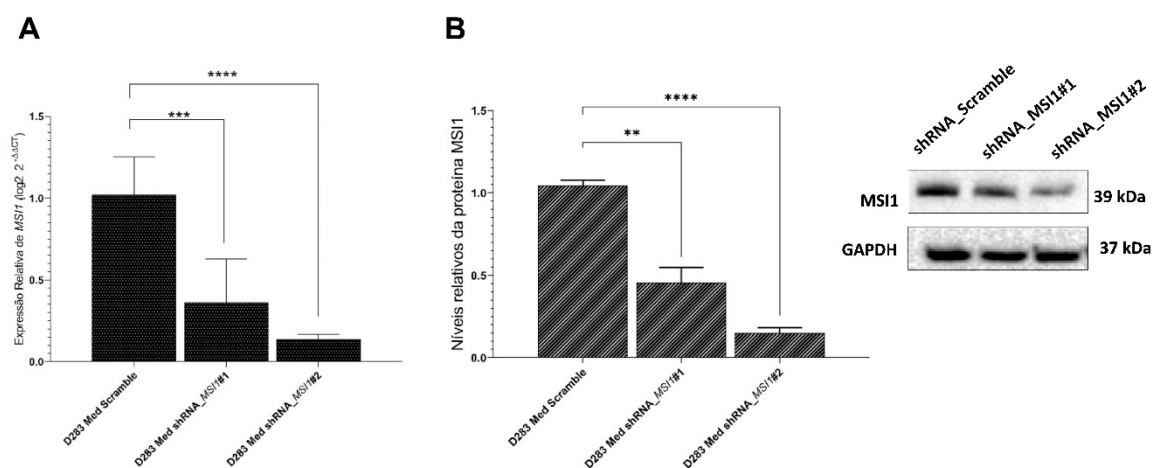


Figura 19 - Confirmação do *knockdown* de *MSI1* nas células D283 Med. (A) Expressão gênica relativa de *MSI1* por qRT-PCR. (B) Níveis relativos da proteína *MSI1* por *Western blot* na linhagem celular de MBs pediátricos D283 Med após modulação gênica. A quantificação relativa da expressão proteica foi realizada utilizando o *software* ImageJ. Como controle endógeno da técnica de *Western blot* foi utilizada a proteína GAPDH. Os gráficos mostram a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) e ****($p < 0.0001$).

6.10 Ensaio de ciclo celular

Após a confirmação do *knockdown* de *MSI1* na linhagem celular D283 Med, buscamos investigar como estas células se comportariam sob essa nova condição. Inicialmente, foi realizada uma análise de ciclo celular, por citometria de fluxo, para investigar se o *knockdown* de *MSI1* levaria a alterações no ciclo celular dessas células. Como apresentado na **Figura 20**, é possível observar pelo histograma gerado bem como pelas porcentagens de células analisadas, as proporções normais de células presentes em cada fase do ciclo das células após 72 horas de plaqueamento. Foi observado um aumento de 15% do número de células D283 Med shRNA *MSI1*#1 em G0/G1 ($p < 0,0001$) e de 12% na fase S ($p < 0,001$) em comparação com o controle. Além disso, foi possível identificar que o *knockdown* de *MSI1* induziu uma diminuição do número de células em G2/M em ambas as linhagens moduladas: D283 Med shRNA *MSI1*#1 (redução de 14%, $p < 0,0001$) e D283 Med shRNA *MSI1*#2 (redução de 12%, $p < 0,001$) comparadas ao controle (**Figura 20**).

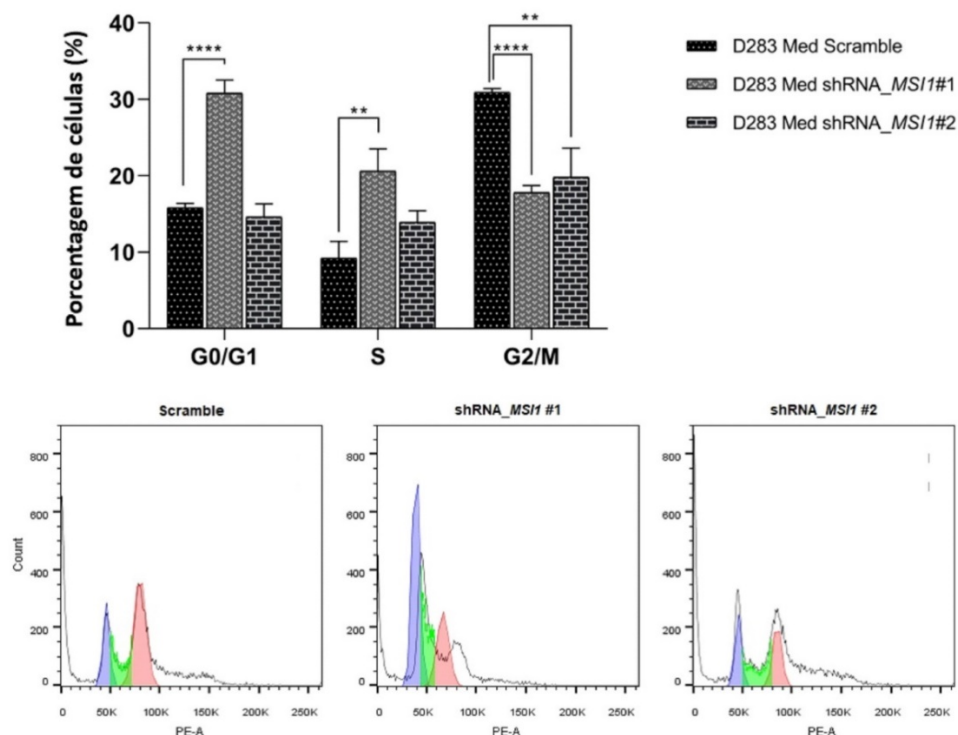


Figura 20 - Avaliação do efeito do silenciamento de *MSI1* no ciclo celular da linhagem de MB D283 Med. (Superior) O *knockdown* de *MSI1* nas células D283 Med shRNA *MSI1*#1 e D283 Med shRNA *MSI1*#2 diminuiu a fase G2/M em comparação com shRNA *Scramble*. (Inferior) histogramas do ciclo celular. O gráfico mostra a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. **($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$).

6.11 Avaliação da expressão de proteínas de controle do ciclo celular após o *knockdown* de *MSI1*

Tendo em vista os resultados encontrados no ensaio de ciclo celular, realizamos a expressão das proteínas p21 e p27 nas linhagens celulares moduladas, uma vez que além de serem cruciais para o controle do ciclo celular, já foram previamente caracterizadas como alvos preditos de *MSI1* (Niu *et al.*, 2017). Como resultado, foi possível observar que houve uma leve redução da expressão de p27 e uma diminuição quase que total de p21 nas linhagens celulares moduladas (*knockdown* de *MSI1*) em comparação ao controle (**Figura 21**).

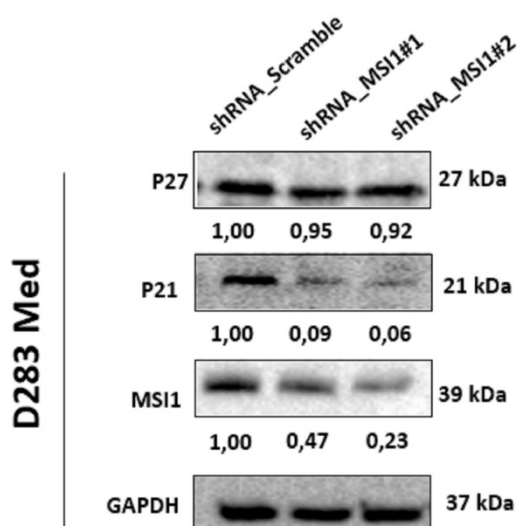


Figura 21 - Quantificação das proteínas *MSI1*, *p21* e *p27* na linhagem celular de MBs pediátricos D283 Med após modulação gênica. A quantificação relativa da expressão proteica foi avaliada por *Western blot*, seguida de análise pelo *software* ImageJ. Como controle endógeno da técnica foi utilizada a proteína GAPDH.

6.12 Viabilidade celular após o tratamento com a droga cisplatina

Em continuidade, foi realizado ensaio de viabilidade celular para avaliar o impacto do silenciamento gênico de *MSII* na progressão e resistência das células de MBs Grupo 3 e 4 em resposta ao tratamento com cisplatina. De maneira interessante, foi observado uma redução da viabilidade das células silenciadas (shRNA *MSII*#1 e #2) comparadas ao controle, nas doses analisadas de 3, 5, 7 e 10 μM ($p < 0.05$), como descrito na **Tabela 5**. Com os dados da viabilidade celular, foi também realizado o cálculo do IC_{50} nas linhagens após 72 horas de tratamento (tempo que demonstrou os efeitos de tratamento mais pronunciados, resultados de 24h, 48h e 96h / **Anexo III**). Como pode ser observado na **Figura 22**, o clone 1 shRNA *MSII*#1 (IC_{50} 6,6 μM) e o clone 2 shRNA *MSII*#2 (IC_{50} 4,1 μM), se demonstraram mais sensíveis ao tratamento com cisplatina quando comparados ao controle, uma vez que doses menores que o IC_{50} da linhagem controle (10,98 μM) foram suficientes para induzir a redução de 50% na viabilidade celular das células moduladas. Ou seja, esses resultados sugerem que a hiperexpressão de *MSII* pode contribuir, pelo menos em parte, para indução de quimioresistência de MB Grupo 3 e 4.

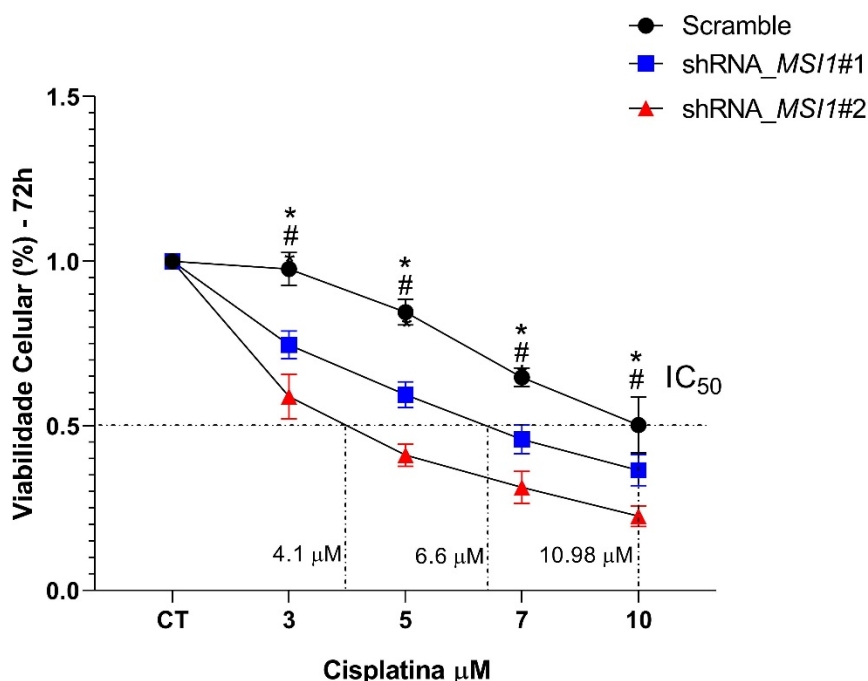


Figura 22 - Avaliação do efeito do *knockdown* de *MSII* na viabilidade celular em resposta à cisplatina na linhagem celular D283 Med. Redução da viabilidade celular nas linhagens *knockdown* de *MSII* (shRNA *MSII* #1 e #2) tratadas com cisplatina nas doses de 3, 5, 7 e 10 μM por 72h, comparado ao controle (*Scramble*). O gráfico mostra a média \pm do desvio padrão de três experimentos independentes. #,* $p < 0,05$.

Tabela 5 - Viabilidade celular e valores de IC₅₀ após o tratamento com cisplatina.

Concentração (μM)	Viabilidade Celular (%)		
	D283 Med <i>Scramble</i>	D283 Med shRNA <i>MSII#1</i>	D283 Med shRNA <i>MSII#2</i>
0	± 100,00	± 100,00	±100,00
3	± 97,64	± 74,59	± 51,23
5	± 91,23	± 64,45	± 44,84
7	± 81,42	± 43,54	± 34,86
10	± 53,61	± 36,54	± 26,13
Valores IC₅₀ (μM)	10,98 μM	6,6 μM	4,1 μM

Concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀); micromolar (μM); média de três experimentos independentes (±).

6.13 Avaliação do efeito do silenciamento de *MSII* na apoptose celular após o tratamento com cisplatina

Para investigar se a redução da viabilidade celular induzida pelo *knockdown* de *MSII* em combinação com o tratamento com cisplatina seria resultante de morte celular, foi realizado, por citometria de fluxo, uma quantificação da apoptose celular por meio da marcação das células com Anexina VI e iodeto de propídeo (PI), após 72 horas de tratamento com o quimioterápico. Para este ensaio, foi utilizado a droga cisplatina na dose de 4,1 μM (menor dose de IC₅₀). Como esperado, o tratamento com cisplatina induziu apoptose tanto das células controle, quanto nas silenciadas. Foi observado um aumento significativo na taxa de apoptose na linhagem shRNA *Scramble* (30%, p <0,01), e nas linhagens moduladas shRNA *MSII#1* (12%, p <0,05) e shRNA *MSII#2* (63%, p <0,01) em comparação com os respectivos grupos de células não tratadas (**Figura 23**).

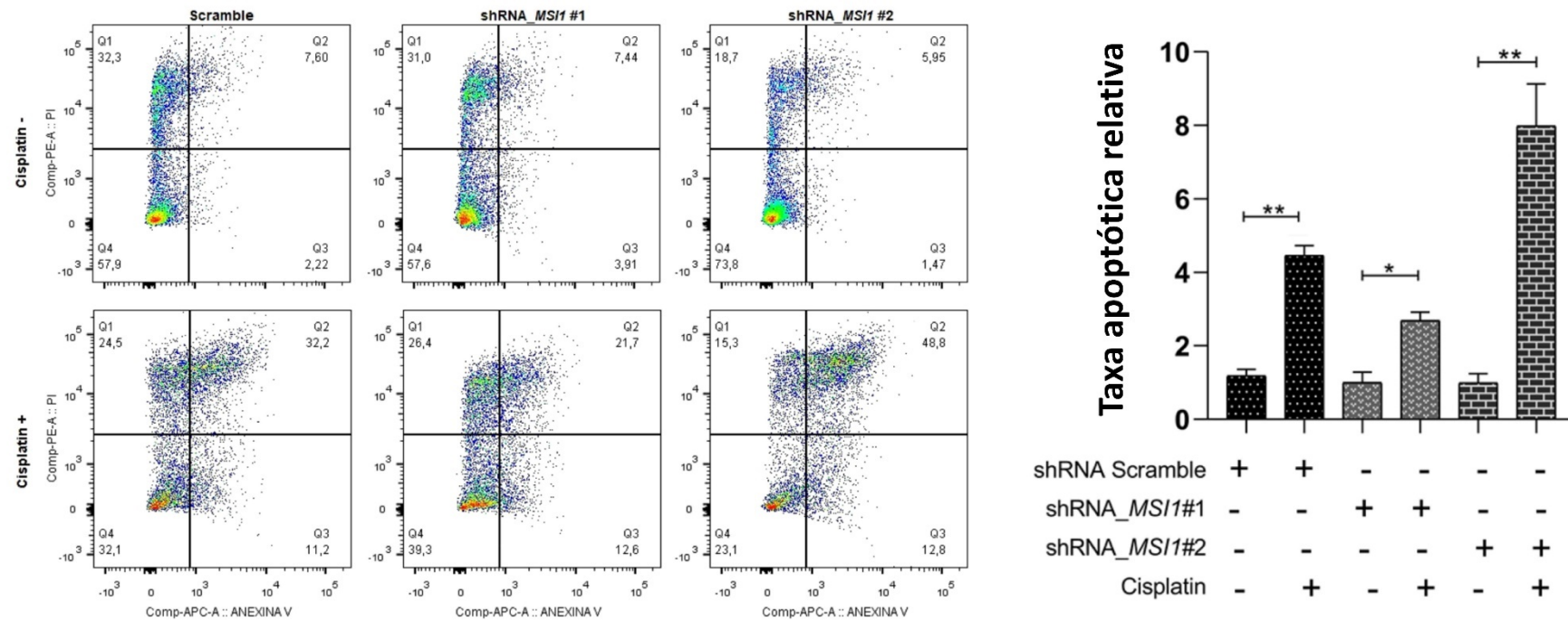


Figura 23 - O knockdown de *MS11* associado ao tratamento com cisplatina nas células D283 Med aumentou a taxa de apoptose celular. A apoptose foi detectada por citometria de fluxo após coloração com Anexina VI e Iodeto de Propídio. Teste *Two-Way* ANOVA. O gráfico de barras é expresso como média \pm desvio padrão da taxa relativa de células apoptóticas resultantes de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.14 Caracterização de *Notch-1* como alvo de MSI1 em MBs Grupos 3 e 4

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que MSI1 realiza *cross-talks* com genes-chave da via de sinalização celular *Notch* (Das Chagas *et al.*, 2020). Dado o crescente número de trabalhos que destacam o envolvimento do gene *Notch-1* na progressão e resistência aos tratamentos de MBs Grupos 3 e 4 (Kahn *et al.*, 2018; Ballabio *et al.*, 2021), optamos por aprofundar nossos achados iniciais em consonância a estas recentes publicações.

Primeiro, utilizamos o mesmo banco de dados públicos de MBs pediátricos GSE 85217, (Cavalli *et al.*, 2017), e realizamos uma análise de correlação de *Pearson* entre os valores de expressão de *MSI1* e *Notch-1*. Nessas condições, foi observado uma correlação negativa entre os valores de expressão de *MSI1* e *Notch-1* ($r = -0,2671$, $p < 0,0001$), como demonstrado na **Figura 24A**. Interpretando este resultado, esta análise indica que, em amostras de pacientes com MB quanto maior for a expressão de *MSI1*, menor é a expressão de *Notch-1*.

Para reforçar este dado, foi realizado a análise de expressão gênica diferencial de *Notch-1* entre os subgrupos moleculares de MB, utilizando os dados do GSE85217. Foi possível observar que *Notch-1* encontra-se menos expresso em amostras de MBs Grupos 3 e 4, em contraste aos subgrupos moleculares WNT e SHH ($p < 0,0001$; **Figura 24B**). Digno de nota, os nossos resultados iniciais demonstram *MSI1* hiperexpresso nos mesmos subgrupos moleculares, MBs de Grupos 3 e 4 (**Figura 12 A-B**), portanto, sugerimos que, de fato, MSI1 pode estar modulando negativamente a expressão de *Notch-1*.

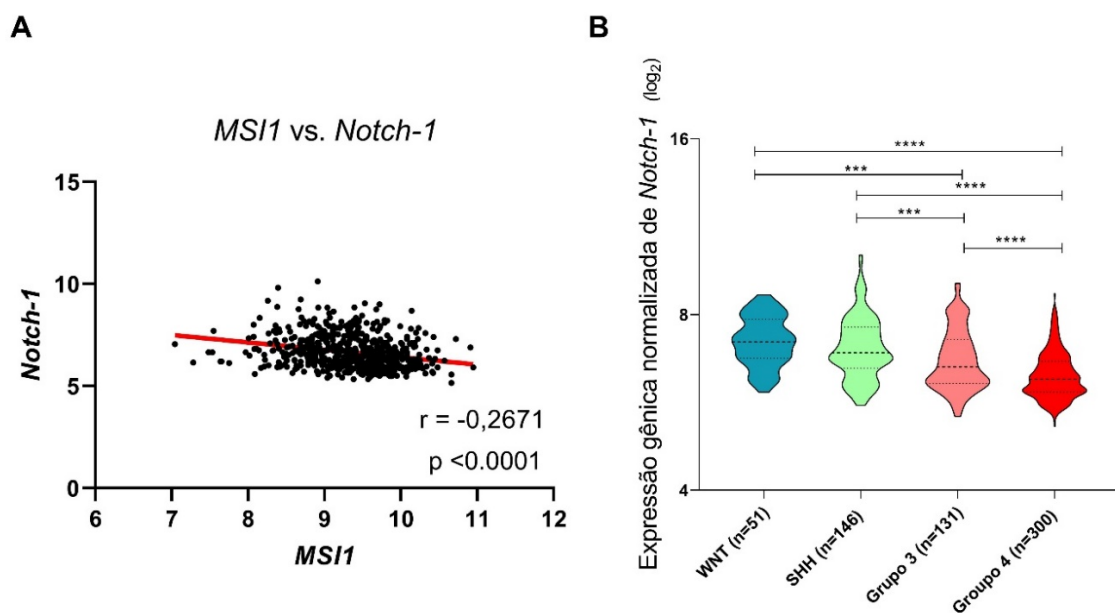


Figura 24 - Análise de correlação entre *MSI1* e *Notch-1* e avaliação do perfil de expressão de *Notch-1* no banco de dados públicos de MB GSE85217. (A) Correlação negativa significativa ($r = -0,2671$) entre a expressão gênica de *MSI1* e *Notch-1* ($P < 0,0001$). (B) Análise de expressão gênica de *Notch-1* utilizando banco de dados público de MBs pediátrico GSE85217. Os valores da expressão gênica estão em escala logarítmica. *($p < 0,01$), **($p < 0,001$) e **($p < 0,0001$).**

6.15 Identificação de genes diferencialmente expressos entre células shRNA *Scramble* e shRNA *MSI1#2*

Nossos resultados preliminares demonstram que, possivelmente, *Notch-1* é um promissor alvo de modulação pós-transcricional de *MSI1* em MBs de Grupos 3 e 4. Portanto, para desvendar este enigma, foi realizado o RNA-*Sequencing* (RNA-Seq), utilizando as linhagens shRNA *Scramble* e shRNA *MSI1#2*, clone este que demonstrou os resultados de eficiência de *knockdown* de *MSI1* e diferenças funcionais mais pronunciadas. Considerando p -ajustado $< 0,05$ e *threshold* de \log_2 *Fold Change* (\log_2FC) $< 0,3$ ou $> 0,3$ para identificação de genes hipoexpressos e hiperexpressos, respectivamente, foi observado um total de 677 genes *downregulados* e 545 genes *upregulados* entre shRNA *Scramble* vs. shRNA *MSI1#2*, como ilustrado pelo *volcano plot* e *heatmap* da **Figura 25 A-B**.

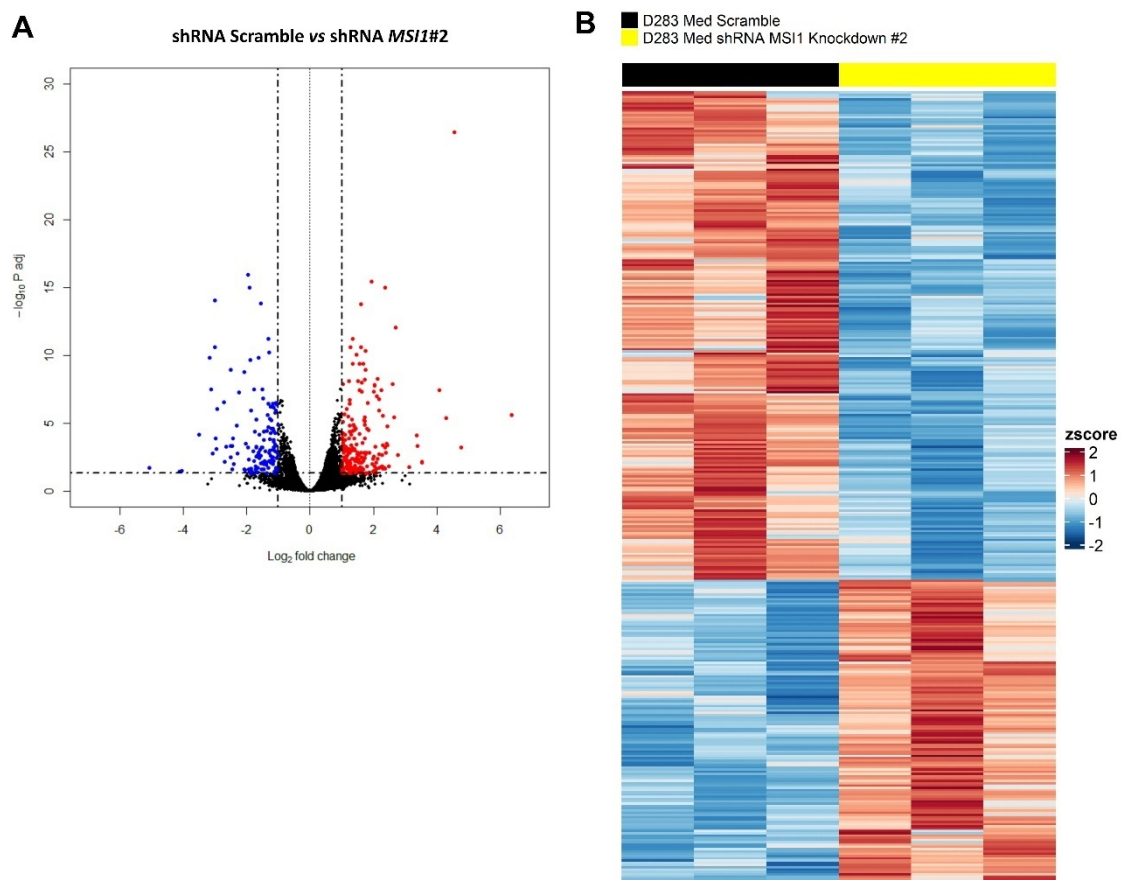


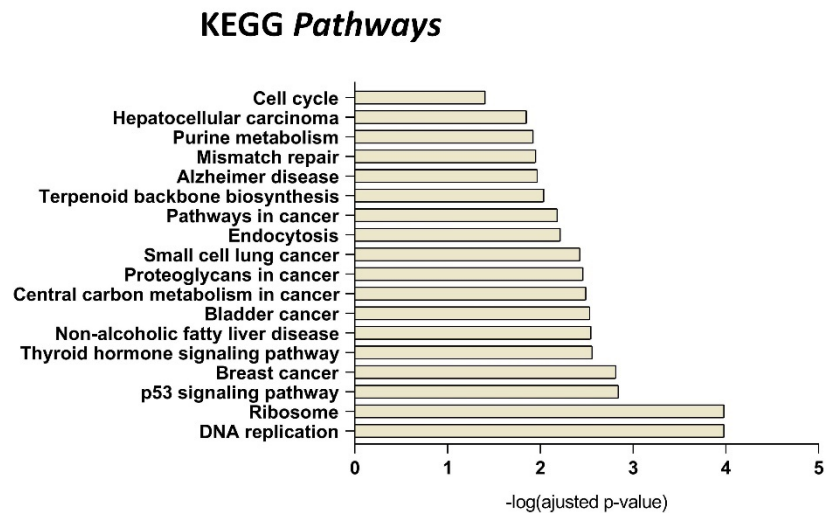
Figura 25 - Expressão gênica diferencial entre shRNA *Scramble* e shRNA *MSII#2*. (A) *Volcano plot* representando os genes diferencialmente expressos entre shRNA *Scramble* vs. shRNA *MSII#2*. (B) Representação gráfica por *heatmap* dos 677 genes downregulados e 545 genes upregulados entre shRNA *Scramble* vs. shRNA *MSII#2*. *Heatmap* gerado utilizando o pacote ComplexHeatmap no *software* RStudio e a distância de *Pearson* e algoritmo Ward.D2 de clusterização.

6.16 Análise de enriquecimento de vias e processos celulares

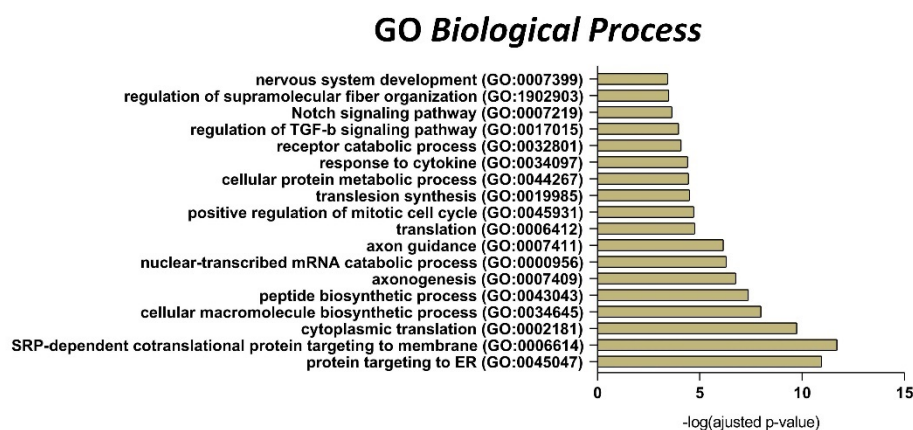
De maneira complementar, foi realizado análises de enriquecimento destes genes diferencialmente expressos pelo *software* EnrichR, o qual permitiu a identificação de vias enriquecidas (KEGG), tais como: ciclo celular, via de p53, ribossomo e replicação do DNA (**Figura 26A**); além de processos biológicos (de acordo com o *Gene Ontology* - GO) relacionados ao desenvolvimento do SNC, via *Notch*, regulação positiva de células mitóticas e tradução (**Figura 26B**). Ainda, o enriquecimento também revelou funções moleculares enriquecidas, incluindo a ligação de fator de transcrição de ligação ao DNA, atividade do

inibidor de proteínas quinase, ligação de caderina, ligação de actina, ligação ATPase e ligação de proteína quinase (Figura 26C).

A



B



C

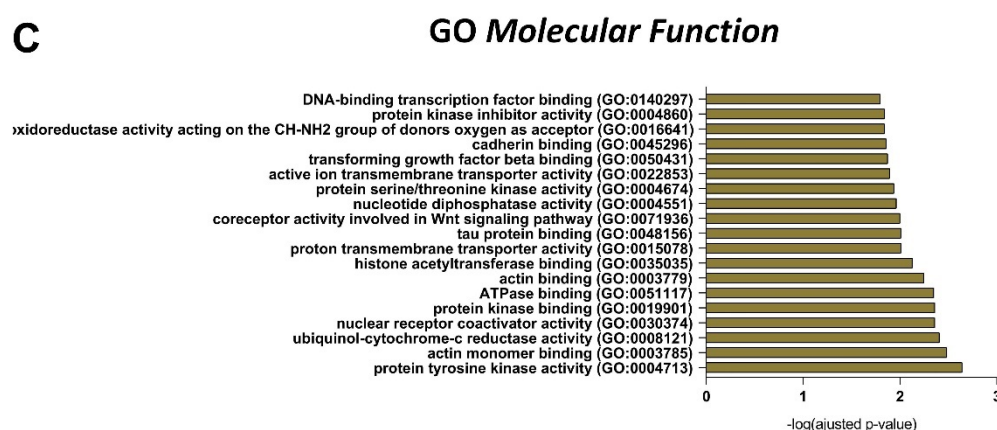


Figura 26 - Análise de enriquecimento de vias com os dados de RNA-Seq dos genes correlacionados com *MSII* (A) Enriquecimento de vias pelo KEEG *pathways* e (B) *Gene ontology Biological process* e (C) *Molecular function*. São exibidas vias enriquecidas para os genes que apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com o gene *MSII*.

6.17 Avaliação do perfil de expressão de *Notch-1* nos dados de RNA-Seq

Uma vez que a via *Notch* foi identificada como significativamente enriquecida pelos genes diferencialmente expressos entre shRNA *Scramble* e shRNA *MSI1#2*, nós observamos também que, além de *Notch-1*, o perfil de expressão de outros genes dessa via foram alterados pelo silenciamento de *MSI1* na linhagem de D283 Med, tais como *NCSTN*, *DTX3*, *TLE1*, *HEY1*, *JAG1* e *MAML2* (**Figura 27A**). Como ilustrado no *heatmap* *MSI1* encontra-se hiperexpresso nas células shRNA *Scramble* e hipoexpresso em shRNA *MSI1#2* (o que confirma novamente a eficiência do silenciamento gênico), enquanto o perfil de expressão dos genes *TLE1*, *HEY1*, *Notch-1*, *JAG1* e *MAML2* apresenta um perfil oposto: hipoexpressos em shRNA *Scramble* e hiperexpressos em shRNA *MSI1#2*. Para melhor visualizar estes dados e avaliá-los estatisticamente, os valores de expressão também foram plotados, e como pode ser observado na **Figura 27B**, *Notch-1* encontra-se de fato, hiperexpresso nas linhagens *knockdown* de *MSI1* comparados ao controle ($p < 0,05$).

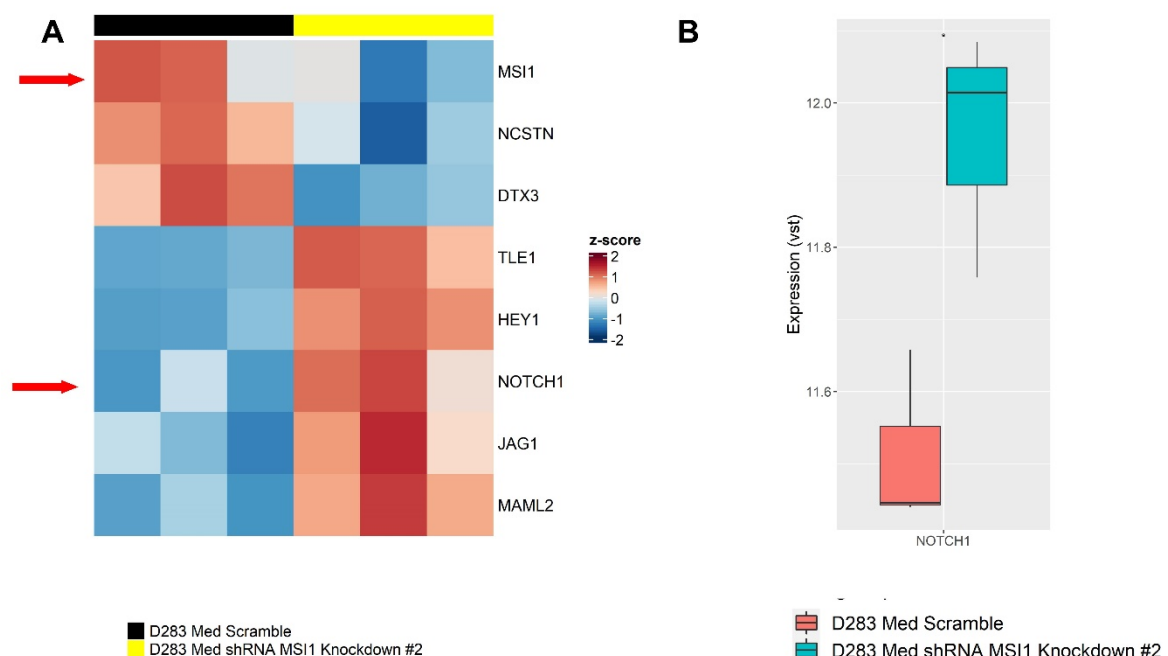


Figura 27 – Perfil de expressão de genes da via *Notch* entre células shRNA *Scramble* e shRNA *MSI1#2*. (A) Representação gráfica por *heatmap* de 8 genes da via *Notch* diferencialmente expressos entre shRNA *Scramble* vs. shRNA *MSI1#2*. *Heatmap* gerado utilizando o pacote ComplexHeatmap no *software* RStudio e a distância de Pearson e algoritmo Ward.D2 de clusterização. (B) Box plot com os valores da expressão gênica de *Notch-1* nas amostras de shRNA *Scramble* vs. shRNA *MSI1#2*. * $p < 0,05$.

6.18 Validação da expressão gênica e proteica de *Notch-1*

Para validar nossos resultados de RNA-Seq, buscamos avaliar o perfil de expressão de *Notch-1* por qRT-PCR e *Western Blot* nas linhagens transduzidas. Embora somente a triplicata das linhagens shRNA *Scramble* e shRNA *MSI1#2* tenham sido submetidas à análise de RNA-Seq, achamos crucial incluir a linhagem shRNA *MSI1#1* com o intuito de não apenas reforçar nossos dados, como também, avaliar em mais um modelo, o perfil de expressão de *Notch-1*. Surpreendentemente, foi possível observar um aumento do nível de expressão gênica de *Notch-1* nas duas linhagens moduladas. Entretanto, somente a expressão da linhagem shRNA *MSI1#2* demonstrou-se estatisticamente significativa quando comparado ao controle (**Figura 28A**, $p=0,0001$). Adicionalmente, observamos, por *Western blot*, que o silenciamento proteico de MSI1 levou a um aumento significativo dos níveis da proteína Notch-1 para o clone 1 (shRNA *MSI1#1*, $p < 0,01$) e para o clone 2 (shRNA *MSI1#2*, $p < 0,001$; **Figura 28B**). Dados em conjunto, é possível sugerir que de fato, a diminuição da expressão gênica e proteica de MSI1 aumenta a expressão gênica e proteica de Notch-1 em MBs Grupo 3 e 4 *in vitro*.

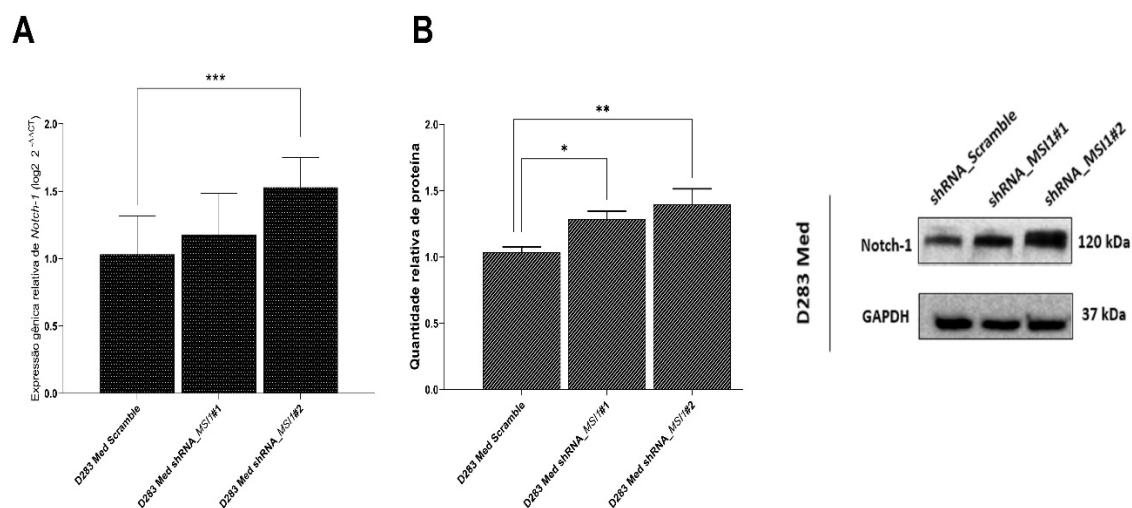


Figura 28 - Confirmação do aumento da expressão de Notch-1. (A) Expressão gênica relativa de *Notch-1* por RT-qPCR. (B) Níveis relativos da proteína Notch-1 por *Western blot* nas linhagens celulares de MBs pediátricos D283 Med após modulação gênica. A quantificação relativa da expressão proteica foi realizada utilizando o *software* ImageJ. Como controle endógeno da técnica de *Western blot* foi utilizado a proteína GAPDH. Os gráficos mostram a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *($p < 0,01$), **($p < 0,001$) e ***($p < 0,0001$).

7 Discussão



7. DISCUSSÃO

O MB é um tumor maligno, multifacetado altamente heterogêneo e de complexo direcionamento terapêutico. Logo, uma melhor compreensão biológica e clínica dos quatro subgrupos moleculares do MB torna-se necessária, pois o prognóstico desta neoplasia difere drasticamente conforme sua identificação e classificação molecular (Northcott *et al.*, 2017). O objetivo deste projeto de pesquisa foi investigar os mecanismos moleculares intrínsecos a biogênese dos MBs de Grupos 3 e 4, subgrupos que apresentam alterações moleculares e fenotípicas não totalmente compreendidas até o momento, e se caracterizam por serem altamente metastáticos e de maior frequência ao diagnóstico, respectivamente (Cavalli *et al.*, 2017).

Além disso, por não apresentarem uma via de sinalização celular comumente associada ao início e progressão tumoral, e por não existirem até o momento potenciais terapias-alvo subgrupo-específica, a prática clínica dos tratamentos atuais disponíveis para estes subgrupos baseiam-se em protocolos altamente citotóxicos e agressivos (Ramaswamy *et al.*, 2016; Ramaswamy and Taylor, 2017). Conseqüentemente, estas abordagens terapêuticas corroboram para o aumento dos efeitos secundários a longo prazo (comorbidades) aos pacientes sobreviventes (Northcott *et al.*, 2017). Ademais, uma considerável parcela dos pacientes acometidos pelo MB pode ir a óbito dado a recorrência do tumor (Garzia *et al.*, 2018). Sendo assim, a identificação e a caracterização de moléculas chave associadas ao início e progressão do MBs de Grupo 3 e 4 (biomarcadores de pior prognóstico e/ou promissores alvos terapêuticos), são de extrema relevância no atual contexto clínico. Um desafio, para a neuro-oncologia contemporânea.

Sabe-se que o MB é um tumor maligno de origem embrionária, e por isso, no microambiente tumoral é observado uma heterogênea população de células-tronco primordiais indiferenciadas (Bahmad and Poppiti, 2020). Através da utilização de técnicas moleculares robustas de análises de transcriptoma como, por exemplo, *Single-cell RNA sequencing*, foi levantado a hipótese de que os MBs do Grupo 3 e 4 se originam de células-tronco progenitoras da camada granular externa, e de células-tronco progenitoras do lábio rômico superior, respectivamente (Hovestadt *et al.*, 2019). No entanto, um grande nó-crítico no conhecimento até a presente data na história do MB é compreender como e porque estas células-tronco neurais adquirem um potencial tumoral, e quais as principais moléculas envolvidas neste processo.

Nos últimos anos as proteínas RBP's se demonstraram promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer (Kang *et al.*, 2020; Bley *et al.*, 2021). Isso porque as proteínas RBP's sobrepõem a região 3'UTR do RNAm e, conseqüentemente, são responsáveis por influenciar na modulação da expressão gênica à nível pós-transcricional, corroborando para o bloqueio e/ou expressão aberrante dos respectivos genes alvos (Kudinov *et al.*, 2017). À face do exposto, destaca-se *MSI1*, uma proteína RBP caracterizada como biomarcador de pior prognóstico e/ou potencial alvo terapêutico em diversos tumores sólidos e em neoplasias hematopoiéticas (Das Chagas *et al.*, 2020).

MSI1 é um gene chave na manutenção da proliferação de células-tronco progenitoras neurais, e por isso foi caracterizado como um biomarcador de célula-tronco neural (Sakakibara *et al.*, 2001). Portanto, levando em consideração que *MSI1* exerce essas funções cruciais para o desenvolvimento do SNC durante o período embrionário, e que quando a célula-tronco adquire um potencial tumoral é evidenciado a expressão aberrante deste gene (Fox *et al.*, 2015), nós geramos a hipótese que *MSI1* poderia estar envolvido no início e progressão tumoral dos MBs Grupos 3 e 4. Digno de nota, até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que busca investigar *MSI1* como um condutor oncogênico em comum para os MBs de Grupos 3 e 4.

Inicialmente, demonstramos que *MSI1* encontra-se hiperexpresso em MBs Grupos 3 e 4 em contraste aos outros subgrupos moleculares de MB, e em comparação ao tecido normal. Corroborando com nossos resultados iniciais, foi observado o aumento da expressão de *MSI1* em outros tumores pediátricos que acometem o SNC, como por exemplo, glioblastomas, gliomas e ependimomas, sendo a hiperexpressão de *MSI1* associada a um pior prognóstico e maior agressividade tumoral (Toda *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2007; Dahlrot *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2019). Embora a hiperexpressão de *MSI1* não tenha sido estatisticamente associada com os parâmetros clínico-patológicos avaliados dentro de nossa coorte, foi demonstrado através da análise de curva ROC um significativo valor de discriminação e acurácia de *MSI1* entre os MBs de Grupos 3 e 4 dos demais subgrupos, WNT e SHH. Portanto, este resultado sugere que *MSI1* possa vir a ser um potencial biomarcador para os MBs de Grupo 3 e 4, apoiando ainda mais sua relevância biológica e clínica.

Digno de nota, qualquer desregulação da expressão de *MSI1* pode comprometer a homeostase tecidual e contribuir para o início e progressão tumoral (Kudinov *et al.*, 2017). Deste modo, ressaltamos que a hiperexpressão de *MSI1* pode ser um fator agravante para que estas células-tronco primordiais do SNC, sofram uma rápida e desordenada expansão

proliferativa durante o período de desenvolvimento cerebelar. Entretanto, futuras abordagens experimentais são necessárias para esclarecer melhor estes achados.

Vo Dat e colaboradores (2012) demonstraram que o aumento da expressão proteica de MSI1 avaliado pela técnica de IHQ em biópsias de MB foi associado a uma pior sobrevida global e livre de eventos dos pacientes dentro da coorte avaliada (Vo *et al.*, 2012). Infelizmente, o número de casos de biópsia de MBs em nossa coorte foi limitado e insuficiente para ser correlacionado a qualquer parâmetro clínico. Por outro lado, nossos dados demonstraram uma maior intensidade de imuno-marcação positiva para MSI1 em MBs Grupos 3 e 4 (subgrupos moleculares de pior prognóstico). De maneira similar, recentemente Lin e colaboradores (2019), demonstraram que MSI1 apresenta uma maior intensidade de imuno-marcação positiva em glioblastoma grau IV (pior prognóstico) (Lin *et al.*, 2019). Portanto, sugerimos que o aumento da expressão proteica de MSI1 pode estar associado ao pior prognóstico de tumores de alto grau de malignidade que acometem o SNC.

Sabe-se que MSI1 comporta-se de forma heterogênea dependendo do contexto celular investigado, e modula à nível pós-transcricional RNAs mensageiros alvos tanto no núcleo quanto no citoplasma (Cragle *et al.*, 2019). Neste estudo, foi observado por imunofluorescência a intensidade e a localização celular de MSI1 de maneira difusa e heterogênea entre as linhagens celulares analisadas. Conseqüentemente, MSI1 pode ser um forte condutor da heterogeneidade molecular dos MBs de Grupos 3 e 4, pois biologicamente e funcionalmente pode estar influenciando na modulação de genes responsáveis pelo ciclo celular, proliferação e morte celular nestes subgrupos em específico.

O câncer é o resultado de múltiplas alterações genéticas, e proteínas RBP's encontram-se envolvidas na modulação de importantes processos celulares (Kudinov *et al.*, 2017). A fim de explorar estes pressupostos, foi realizado o *knockdown* de *MSI1* para investigar seu papel biológico/funcional. Observamos que o silenciamento de *MSI1* promoveu a interrupção do ciclo celular na transição de G1/S e, conseqüentemente, diminuiu o número de células na fase G2/M em MBs Grupos 3 e 4 *in vitro*. É descrito que p21 e p27 são alvos preditos de MSI1 (Niu *et al.*, 2017). Além disso, o impacto do silenciamento gênico e proteico de MSI1 proporcionou uma leve redução da expressão proteica de p27 e uma diminuição quase que total da proteína p21 nas linhagens celulares moduladas quando comparadas ao controle.

Indo ao encontro aos nossos resultados, o *knockdown* de *MSI1* bloqueou a progressão do ciclo celular em carcinoma endometrial, e modulou a expressão de p21 (Götte *et al.*, 2011), proporcionou a parada do ciclo celular na fase G1/S em células de carcinoma hepatocelular (Li

et al., 2019), e também inibiu a progressão do ciclo celular em células de osteossarcoma, (Niu *et al.*, 2017). Recentemente, um trabalho demonstrou que as quinases dependentes de ciclina: CDK2, CDK6, CCNA1, CCNA2, bem como p21 e p27 são alguns dos principais alvos de MSII em glioblastoma (Baroni *et al.*, 2021). Vale ressaltar que a parada do ciclo celular é um dos mecanismos mais importantes para suprimir o crescimento das células cancerosas (Williams and Stoeber, 2012). Portanto, estes dados em conjunto sugerem que, de fato, MSII modula pós-transcricionalmente genes essenciais para o controle do ciclo celular em MBs de Grupos 3 e 4.

Foi descrito que a hiperexpressão de *MSII* foi associada ao aumento da proliferação e quimiorresistência em câncer colorretal (Chiou *et al.*, 2017), glioblastoma (Chen *et al.*, 2018), e câncer gástrico (Xu *et al.*, 2015). Digno de nota, a quimioterapia é um processo vital e amplamente utilizada para induzir a morte celular. No entanto, em doses não letais, as células cancerosas podem continuar em constante processo de proliferação e/ou em senescência (Hsu *et al.*, 2019). Neste estudo nós avaliamos o impacto do *knockdown* de *MSII* na quimiosensibilidade ao tratamento com cisplatina, um quimioterápico clássico utilizado na maioria dos protocolos atuais de tratamento de tumores cerebrais, como por exemplo, o MB (Bass *et al.*, 2014). Apesar da cisplatina exercer efeitos anticâncer por meio de múltiplos mecanismos biológicos e moleculares, destacando-se os danos a molécula de DNA (uma das ações mais proeminentes e mais bem compreendida), e consequentemente a indução da apoptose mitocondrial, infelizmente, o frequente uso da cisplatina pode promover o desenvolvimento da quimioresistência das células tumorais o que reflete no fracasso terapêutico (Galluzzi *et al.*, 2014).

Neste estudo, foi observado que as linhagens celulares *knockdown* de *MSII* demonstraram uma diminuição na taxa de viabilidade celular, uma maior sensibilidade de resposta ao tratamento com cisplatina e um aumento significativo da taxa de morte celular por apoptose. É reportado que o aumento da expressão de p21 pode promover o aumento da proliferação de células tumorais (Aburatani *et al.*, 2017). Ao analisarmos nossos dados, é possível interpretar que em nosso modelo de estudo o silenciamento de *MSII* contribuiu para a diminuição da expressão de p21, tornou as células mais sensíveis ao tratamento com cisplatina e, consequentemente, aumentou a taxa de apoptose celular.

Resultados similares foram evidenciados em câncer de mama, no qual foi demonstrado através do *knockdown* de *MSII* que houve aumento da taxa de apoptose celular (Troschel *et al.*, 2021). Por outro lado, em carcinoma de ovário o silenciamento da expressão gênica de *MSII* inibiu a proliferação celular, promoveu o aumento da taxa de apoptose celular e reduziu a migração e invasão de células cancerosas (Chen *et al.*, 2019). Por conseguinte, o *knockdown* de

MSII em câncer colorretal (Chiou *et al.*, 2017), carcinoma endometrial (Götte *et al.*, 2011), câncer gástrico (Shou *et al.*, 2017), câncer de pulmão (Wang *et al.*, 2014) e osteossarcoma (Niu *et al.*, 2017), também diminuiu a proliferação celular, crescimento e invasão tumoral *in vitro* e *in vivo*. Portanto, sugerimos que a hiperexpressão de *MSII* contribui para o aumento dos processos proliferativos, invasivos, anti-apoptóticos e quimioresistentes. Mecanismos celulares que em conjunto, são responsáveis por proporcionar a existência de fenótipos tumorais altamente agressivos. Além disso, reforçamos o quão importante e necessário seria testar esta proposta e abordagem terapêutica (*knockdown* de *MSII* + tratamento com cisplatina) em modelos *in vivo*, como xenoinxertos derivados de pacientes (MBs de Grupos 3 e 4) em camundongos (PDX).

Uma outra incógnita presente no atual contexto da carcinogênese dos MBs de Grupos 3 e 4 é que estes subgrupos moleculares não apresentam, até o momento, uma via de sinalização celular comumente associada ao início e progressão tumoral. Entretanto, demonstramos anteriormente através de um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, que *MSII* pode exercer *cross-talks* com os principais genes (receptores e ligantes) de vias de sinalização celular que são cruciais pela manutenção do desenvolvimento embrionário, incluindo a via *Notch* (Das Chagas *et al.*, 2020).

A via *Notch* exerce um papel fisiológico crucial nos processos de diferenciação e proliferação de células-tronco progenitoras neurais durante o desenvolvimento embrionário e pós-fetal, e para nossa surpresa, é crescente o número de relatos na literatura que demonstram que na biogênese dos MBs de Grupos 3 e 4, o receptor *Notch-1* é um dos principais genes da via *Notch* evidenciado com um perfil de expressão alterado (Kahn *et al.*, 2018; Ballabio *et al.*, 2021). Contextualizando os tumores que acometem o SNC, *Notch-1* foi evidenciado como um promissor alvo terapêutico em gliomas (Purow *et al.*, 2005) e encontra-se como um dos principais genes diferencialmente expressos, e associado ao processo de iniciação e progressão tumoral em glioblastomas (Lin *et al.*, 2011), o que nos despertou o interesse em aprofundar nossas análises frente a estes achados.

Inicialmente, identificamos uma correlação negativa de expressão entre *MSII* e *Notch-1* em MBs de Grupos 3 e 4, sugerindo que quanto maior a expressão de *MSII*, menor é a expressão de *Notch-1*. Em continuidade, para avaliar e validar esta análise prévia, nós confirmamos um menor perfil de expressão de *Notch-1* em MBs de Grupos 3 e 4 quando comparado aos subgrupos moleculares de MBs WNT e SHH, através de análises *in silico*. Isso nos chamou a atenção, porque o perfil de expressão de *Notch-1* e *MSII* em MBs de Grupos 3 e

4 de fato, são opostos. Portanto, nossos resultados sugerem que *MSII* pode estar modulando negativamente a expressão de *Notch-1* em MBs de Grupos 3 e 4.

Em busca de decifrar este fenômeno e elucidar as principais relações moleculares entre *MSII* e *Notch-1* em MBs de Grupos 3 e 4, realizamos o RNA-Seq após silenciamento gênico de *MSII* em nosso modelo experimental. Como esperado, identificamos nesse sequenciamento, o aumento da expressão de *Notch-1* nas linhagens *knockdown* de *MSII* em contraste a linhagem controle, o que foi também validado por qRT-PCR e *Western Blot*. Anteriormente, já foi demonstrado por Sureban et al (2008) que o *knockdown* de *MSII*, além de diminuir a proliferação celular e aumentar a taxa de morte celular por apoptose *in vivo*, diminui a expressão de *Notch-1* em adenocarcinoma de cólon (Sureban et al., 2008).

É importante mencionar que *MSII* e os genes chave da cascata de sinalização de *Notch*, são moléculas dependentes de interação no microambiente celular bem como da densidade celular e do contato célula-célula, o que conseqüentemente é esperado que cada molécula seja evidenciada com um perfil de expressão diferenciado, dependendo do contexto celular normal e/ou tumoral investigado. Portanto, nós sugerimos que *MSII* além de possuir propriedades oncogênicas em MBs de Grupos 3 e 4, provavelmente, ao modular a expressão de *Notch-1* e outros genes da via *Notch*, contribui para que os processos de diferenciação, proliferação e migração de células-tronco primordiais sejam afetados. Principalmente ao considerar o papel ímpar que a via *Notch* desempenha durante os processos iniciais de desenvolvimento do SNC durante o período embrionário (Teodorczyk and Schmidt, 2014; Majumder et al., 2021).

Em continuidade, exploramos os nossos dados de RNA-Seq, e identificamos os genes diferencialmente expressos entre as linhagens *knockdown* de *MSII* e controle, e utilizamos abordagens de bioinformática integrativas para identificar as principais vias e processos celulares alterados após o silenciamento gênico de *MSII*. Digno de nota, uma das principais vias alteradas foi a do ciclo celular e de p53. O ciclo celular é um processo complexo e estritamente controlado, composto por diferentes fases. Conseqüentemente, alterações na expressão de genes do ciclo celular podem influenciar para que as células tumorais adquiram fenótipos tumorais altamente agressivos e invasivos (Zheng et al., 2019). Por outro lado, a via do p53 também exerce um papel crucial desde a vigilância da linha germinativa em organismos multicelulares simples até seu papel pluripotencial em humanos. Por conseguinte, quando desregulada encontra-se associada entre um dos principais *hallmarks* câncer (Mantovani et al., 2019). Analisados em conjunto, estas informações sugerem que *MSII* destaca-se como um

promissor gene central, envolvido nestes importantes processos celulares, ao qual impactam significativamente na iniciação e progressão tumoral.

Um outro dado interessante observado através das nossas análises de enriquecimento, é que a via *Notch* destacou-se entre os processos biológicos identificados, reforçando novamente o impacto potencial de MSI1 na modulação desta via. Embora os papéis de MSI1 em diferentes cânceres estejam amplamente correlacionados com a proliferação celular tumoral, seu papel na migração e invasão de células cancerígenas oferece um campo de investigação complexo a ser explorado. Em nossas análises de enriquecimento também evidenciamos a interação/ligação com caderina e actina entre as funções biológicas identificadas que ocorrem à nível molecular.

É notório que nos últimos anos foi crescente o interesse em explorar cada vez mais o papel das caderinas em várias condições patológicas incluindo o câncer, principalmente por exercerem um papel importante na transição epitélio-mesenquimal (*epithelial-to-mesenchymal transition* - EMT) (Mendonça *et al.*, 2018; Vanniya S *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento normal e progressão do câncer, as células passam por transições de estado marcadas por perfis de expressão gênica distintos e mudanças na morfologia, motilidade e outras propriedades. A EMT é uma dessas transições, que é essencial durante as fases iniciais do desenvolvimento e é considerada um fator crucial para o aumento da invasão e metástase tumoral (Lu and Kang, 2019).

Foi reportado anteriormente que MSI1 modula pós-transcricionalmente a expressão de genes responsáveis pela manutenção da EMT (Katz *et al.*, 2014). Vale reforçar o que explanamos anteriormente: a presença de disseminação leptomenígea e metástases ao diagnóstico são uma das principais barreiras para o sucesso terapêutico em MBs (Sabel *et al.*, 2016). Dado que MSI1 pode ser um promissor condutor de modulação direta e/ou indireta da EMT, estes achados poderiam ser explorados com mais intensidade, pois estudos que buscam explorar MSI1 com a EMT em MBs de Grupos 3 e 4 *in vitro* e *in vivo* são escassos até a presente data.

Frente a um contexto histórico, a proteína MSI1 recebeu este nome em homenagem ao grande espadachim da cultura oriental Miyamoto Musashi (Nakamura *et al.*, 1994). MSI1 é um biomarcador de célula-tronco por excelência, dado sua funcionalidade biológica e molecular de controlar a sobrevivência e autorrenovação celular. Em contraste, sustenta o crescimento e recorrência do câncer. O nosso trabalho realizado até agora, não só trouxe uma melhor compreensão sobre os mecanismos e processos celulares intrínsecos ao qual MSI1 encontra-se

envolvido na biogênese de MBs de Grupos 3 e 4, como também nos revelou dados acerca de sua vulnerabilidade.

Em resumo, nossos resultados demonstram que *MSII* hiperexpresso em MBs de Grupos 3 e 4 é um biomarcador e promissor alvo terapêutico. Além disso, fornecemos evidências de que o silenciamento gênico de *MSII* combinado ao tratamento com cisplatina pode vir a ser uma potencial abordagem terapêutica a ser avaliada por meio de estudos *in vivo* e pré-clínicos, com potencial para auxiliar na terapia de pacientes acometidos com MBs de Grupos 3 e 4 no futuro. Portanto, os resultados deste estudo poderão ajudar na definição de uma nova geração de protocolos clínicos de tratamento para o MB, além de auxiliar no melhor processo de estratificação dos pacientes dentro dos grupos de risco.

Concomitantemente, evidenciamos que *Notch-1* é um alvo de modulação pós-transcricional de *MSII* nestes tumores subgrupos-específicos. Conseqüentemente, sabendo que a via *Notch* exerce um papel crucial no início do desenvolvimento do SNC durante o período embrionário, nosso trabalho demonstrou que, *MSII* hiperexpresso pode estar modulando negativamente um eixo canônico da cascata de sinalização de *Notch*. Entretanto, novos estudos se fazem necessários para elucidar, à nível molecular, os exatos processos moleculares atuantes neste complexo enigma, e o impacto desta modulação no início e progressão do MBs Grupo 3 e 4 *in vivo*.

8 Conclusões



8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- ✓ *MSI1* encontra-se hiperexpresso em MBs de Grupos 3 e 4 quando comparado às amostras de cerebelos não neoplásicos e aos outros subgrupos moleculares de MB;
- ✓ *MSI1* é um potencial biomarcador, e apresenta um significativo valor de acurácia para discriminação entre os MBs de Grupos 3 e 4 dos demais subgrupos de MB (WNT e SHH);
- ✓ Nas linhagens celulares investigadas por imunofluorescência, *MSI1* é expresso de forma difusa, estando presente tanto no núcleo, quanto no citoplasma celular;
- ✓ O silenciamento da expressão gênica e proteica de *MSI1* alterou as fases do ciclo celular, e proporcionou uma diminuição quase que total da expressão da proteína p21;
- ✓ O *knockdown* de *MSI1* promoveu a redução da viabilidade celular e aumentou a quimiosensibilidade de MBs Grupos 3 e 4 *in vitro*, ao se observar menores valores de IC_{50} para as linhagens moduladas;
- ✓ O silenciamento da expressão gênica e proteica de *MSI1* combinado ao tratamento com cisplatina aumentou a taxa de apoptose celular de MBs Grupos 3 e 4 *in vitro*;
- ✓ O *knockdown* de *MSI1* promoveu o aumento da expressão gênica e proteica de Notch-1;
- ✓ A diminuição da expressão de *MSI1* alterou a expressão de genes correlacionados com a via de desenvolvimento *Notch*, e de funções moleculares e biológicas responsáveis pela manutenção do ciclo celular.

9 Referências Bibliográficas



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURATANI, T. et al. High expression of P21-activated kinase 5 protein is associated with poor survival in gastric cancer. **Oncol Lett**, v. 14, n. 1, p. 404-410, Jul 2017. ISSN 1792-1074. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28693183> >.
- ADACHI, T. et al. Notch Signaling between Cerebellar Granule Cell Progenitors. **eNeuro**, v. 8, n. 3, 2021 May-Jun 2021. ISSN 2373-2822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33762301> >.
- ADAMASZEK, M. et al. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. **Cerebellum**, v. 16, n. 2, p. 552-576, 04 2017. ISSN 1473-4230. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27485952> >.
- ALBRIGHT, A. L. et al. Effects of medulloblastoma resections on outcome in children: a report from the Children's Cancer Group. **Neurosurgery**, v. 38, n. 2, p. 265-71, Feb 1996. ISSN 0148-396X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8869053> >.
- ANDERSSON, E. R.; LENDAHL, U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 5, p. 357-78, May 2014. ISSN 1474-1784. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781550> >.
- APPS, R.; HAWKES, R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 670-81, Sep 2009. ISSN 1471-0048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693030> >.
- ARCHER, T. C.; MAHONEY, E. L.; POMEROY, S. L. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 265-273, 04 2017. ISSN 1878-7479. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386677> >.
- ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina (Kaunas)**, v. 56, n. 1, Dec 30 2019. ISSN 1648-9144. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31906017> >.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M. D.; LAKE, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science**, v. 284, n. 5415, p. 770-6, Apr 30 1999. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221902> >.
- ASTER, J. C.; PEAR, W. S.; BLACKLOW, S. C. The Varied Roles of Notch in Cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 12, p. 245-275, Jan 24 2017. ISSN 1553-4014. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959635> >.

BADIALI, M. et al. N-myc and c-myc oncogenes amplification in medulloblastomas. Evidence of particularly aggressive behavior of a tumor with c-myc amplification. **Tumori**, v. 77, n. 2, p. 118-21, Apr 30 1991. ISSN 0300-8916. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2048223> >.

BAHMAD, H. F.; POPPITI, R. J. Medulloblastoma cancer stem cells: molecular signatures and therapeutic targets. **J Clin Pathol**, v. 73, n. 5, p. 243-249, May 2020. ISSN 1472-4146. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32034059> >.

BALLABIO, C. et al. Notch1 switches progenitor competence in inducing medulloblastoma. **Sci Adv**, v. 7, n. 26, Jun 2021. ISSN 2375-2548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34162555> >.

BARONI, M. et al. Musashi1 Contribution to Glioblastoma Development via Regulation of a Network of DNA Replication, Cell Cycle and Division Genes. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 7, Mar 24 2021. ISSN 2072-6694. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33804958> >.

BASS, J. K. et al. Concordance between the chang and the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) ototoxicity grading scales in patients treated with cisplatin for medulloblastoma. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, n. 4, p. 601-5, Apr 2014. ISSN 1545-5017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504791> >.

BEBY, F.; LAMONERIE, T. The homeobox gene Otx2 in development and disease. **Exp Eye Res**, v. 111, p. 9-16, Jun 2013. ISSN 1096-0007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523800> >.

BECKINGHAUSEN, J.; SILLITOE, R. V. Insights into cerebellar development and connectivity. **Neurosci Lett**, v. 688, p. 2-13, 01 01 2019. ISSN 1872-7972. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29746896> >.

BIGNER, S. H.; VOGELSTEIN, B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. **Brain Pathol**, v. 1, n. 1, p. 12-8, Sep 1990. ISSN 1015-6305. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1669688> >.

BIHANNIC, L.; AYRAULT, O. Insights into cerebellar development and medulloblastoma. **Bull Cancer**, v. 103, n. 1, p. 30-40, Jan 2016. ISSN 1769-6917. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26688373> >.

BLEY, N. et al. Musashi-1-A Stemness RBP for Cancer Therapy? **Biology (Basel)**, v. 10, n. 5, May 05 2021. ISSN 2079-7737. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34062997> >.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-20, Aug 01 2014. ISSN 1367-4811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695404> >.

BOLÓS, V.; GREGO-BESSA, J.; DE LA POMPA, J. L. Notch signaling in development and cancer. **Endocr Rev**, v. 28, n. 3, p. 339-63, May 2007. ISSN 0163-769X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409286> >.

BOUFFET, E. Management of high-risk medulloblastoma. **Neurochirurgie**, v. 67, n. 1, p. 61-68, Feb 2021. ISSN 1773-0619. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31229532> >.

BRANDT, W. D. et al. Notch signaling activation in pediatric low-grade astrocytoma. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 74, n. 2, p. 121-31, Feb 2015. ISSN 1554-6578. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575134> >.

BRAY, S. J. Notch signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 11, p. 722-735, 11 2016. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507209> >.

BROWD, S. R. et al. N-myc can substitute for insulin-like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog-induced medulloblastoma. **Cancer Res**, v. 66, n. 5, p. 2666-72, Mar 01 2006. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510586> >.

CANALE, D. J.; LONGO, L. D. Harvey Cushing and pediatric neurosurgery. **Neurosurgery**, v. 27, n. 4, p. 602-10; discussion 610-1, Oct 1990. ISSN 0148-396X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234366> >.

CAPASSO, L.; MARIANI COSTANTINI, R. [Paleopathology of human tumors]. **Med Secoli**, v. 6, n. 1, p. 1-52, 1994. ISSN 0394-9001. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11640162> >.

CARLOTTI, C. G.; SMITH, C.; RUTKA, J. T. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. **Neurosurg Rev**, v. 31, n. 4, p. 359-68; discussion 368-9, Oct 2008. ISSN 0344-5607. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548301> >.

CARTA, R. et al. Cancer Predisposition Syndromes and Medulloblastoma in the Molecular Era. **Front Oncol**, v. 10, p. 566822, 2020. ISSN 2234-943X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33194646> >.

CAVALLI, F. M. G. et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 737-754.e6, 06 12 2017. ISSN 1878-3686. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28609654> >.

CHANG, C. H.; HOUSEPIAN, E. M.; HERBERT, C. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. **Radiology**, v. 93, n. 6, p. 1351-9, Dec 1969. ISSN 0033-8419. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4983156> >.

CHEN, H. et al. Inhibition of RNA-Binding Protein Musashi-1 Suppresses Malignant Properties and Reverses Paclitaxel Resistance in Ovarian Carcinoma. **J Cancer**, v. 10, n. 6, p. 1580-1592, 2019. ISSN 1837-9664. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31031868> >.

CHEN, H. Y. et al. Musashi-1 promotes chemoresistant granule formation by PKR/eIF2 α signalling cascade in refractory glioblastoma. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1864, n. 5 Pt A, p. 1850-1861, May 2018. ISSN 0925-4439. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29486283> >.

CHENG, H.; FAN, R.; WEI, W. Cancer Systems Biology in the Era of Single-Cell Multi-Omics. **Proteomics**, v. 20, n. 13, p. e1900106, 07 2020. ISSN 1615-9861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32957162> >.

CHIOU, G. Y. et al. Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2172, 05 19 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526879> >.

CHOWDHURY, S.; SARKAR, R. R. Exploring Notch Pathway to Elucidate Phenotypic Plasticity and Intra-tumor Heterogeneity in Gliomas. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 9488, 07 01 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31263189> >.

COON, V. et al. Molecular therapy targeting Sonic hedgehog and hepatocyte growth factor signaling in a mouse model of medulloblastoma. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 9, p. 2627-36, Sep 2010. ISSN 1538-8514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807782> >.

CRAGLE, C. E. et al. Musashi interaction with poly(A)-binding protein is required for activation of target mRNA translation. **J Biol Chem**, v. 294, n. 28, p. 10969-10986, 07 12 2019. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31152063> >.

CRUZEIRO, G. A. V. et al. A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma subgrouping. **Acta Neuropathol Commun**, v. 7, n. 1, p. 33, 03 04 2019. ISSN 2051-5960. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832734> >.

CUI, D. et al. Notch Pathway Inhibition Using PF-03084014, a γ -Secretase Inhibitor (GSI), Enhances the Antitumor Effect of Docetaxel in Prostate Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 20, p. 4619-29, Oct 15 2015. ISSN 1557-3265. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26202948> >.

DAHLROT, R. H. et al. Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. **J Neurooncol**, v. 115, n. 3, p. 453-61, Dec 2013. ISSN 1573-7373. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24057325> >.

DAKUBO, G. D.; MAZEROLLE, C. J.; WALLACE, V. A. Expression of Notch and Wnt pathway components and activation of Notch signaling in medulloblastomas from heterozygous patched mice. **J Neurooncol**, v. 79, n. 3, p. 221-7, Sep 2006. ISSN 0167-594X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598417> >.

DAS CHAGAS, P. F. et al. Interplay between the RNA binding-protein Musashi and developmental signaling pathways. **J Gene Med**, v. 22, n. 1, p. e3136, 01 2020. ISSN 1521-2254. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31692135> >.

DE ALMEIDA MAGALHÃES, T. et al. Notch pathway in ependymoma RELA-fused subgroup: upregulation and association with cancer stem cells markers expression. **Cancer Gene Ther**, v. 27, n. 6, p. 509-512, 06 2020. ISSN 1476-5500. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31308481> >.

EVANS, A. E. et al. The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. **J Neurosurg**, v. 72, n. 4, p. 572-82, Apr 1990. ISSN 0022-3085. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2319316> >.

EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-8, 10 01 2016. ISSN 1367-4811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312411> >.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. **Int J Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2022-36, May 01 2015. ISSN 1097-0215. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113657> >.

FAUST, D. S. et al. Radiation therapy in the management of medulloblastoma. **Neurology**, v. 20, n. 5, p. 519-22, May 1970. ISSN 0028-3878. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5462245> >.

FERGUSON, S.; LESNIAK, M. S. Percival Bailey and the classification of brain tumors. **Neurosurg Focus**, v. 18, n. 4, p. e7, Apr 15 2005. ISSN 1092-0684. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15844870> >.

FORBES, A. J. et al. The role of segment polarity genes during early oogenesis in *Drosophila*. **Development**, v. 122, n. 10, p. 3283-94, Oct 1996. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898240> >.

FOULADI, M. et al. Phase I trial of MK-0752 in children with refractory CNS malignancies: a pediatric brain tumor consortium study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 26, p. 3529-34, Sep 10 2011. ISSN 1527-7755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21825264> >.

FOULKES, W. D. et al. Cancer Surveillance in Gorlin Syndrome and Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 12, p. e62-e67, Jun 15 2017. ISSN 1557-3265. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620006> >.

FOX, R. G. et al. Musashi signaling in stem cells and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 31, p. 249-67, 2015. ISSN 1530-8995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566113> >.

FRIEDMAN, H. S. et al. Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 44, n. 6, p. 592-605, Nov 1985. ISSN 0022-3069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4056828> >.

GAJJAR, A. et al. Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 6, p. 984-93, Mar 15 2004. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970185> >.

GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1257, May 29 2014. ISSN 2041-4889. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874729> >.

GALMARINI, C. M. Lessons from Hippocrates: Time to Change the Cancer Paradigm. **Int J Chronic Dis**, v. 2020, p. 4715426, 2020. ISSN 2356-6981. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32566644> >.

GARZIA, L. et al. A Hematogenous Route for Medulloblastoma Leptomeningeal Metastases. **Cell**, v. 173, n. 6, p. 1549, 05 31 2018. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29856958> >.

GERSTBERGER, S.; HAFNER, M.; TUSCHL, T. A census of human RNA-binding proteins. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 12, p. 829-45, 12 2014. ISSN 1471-0064. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365966> >.

GILBERTSON, R. J.; GAJJAR, A. Molecular biology of medulloblastoma: will it ever make a difference to clinical management? **J Neurooncol**, v. 75, n. 3, p. 273-8, Dec 2005. ISSN 0167-594X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195803> >.

GILLET, J. P.; VARMA, S.; GOTTESMAN, M. M. The clinical relevance of cancer cell lines. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, n. 7, p. 452-8, Apr 03 2013. ISSN 1460-2105. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434901> >.

GRABENBAUER, G. G. et al. Postoperative radiotherapy of medulloblastoma. Impact of radiation quality on treatment outcome. **Am J Clin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 73-7, Feb 1996. ISSN 0277-3732. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554041> >.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847-9, 09 15 2016. ISSN 1367-4811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207943> >.

GUPTA, T. et al. Indian Society of Neuro-Oncology consensus guidelines for the contemporary management of medulloblastoma. **Neurol India**, v. 65, n. 2, p. 315-332, 2017 Mar-Apr 2017. ISSN 0028-3886. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28290395> >.

GÓMEZ-PINEDO, U. et al. Notch Signalling in the Hippocampus of Patients With Motor Neuron Disease. **Front Neurosci**, v. 13, p. 302, 2019. ISSN 1662-4548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31024234> >.

GÖTTE, M. et al. The adult stem cell marker Musashi-1 modulates endometrial carcinoma cell cycle progression and apoptosis via Notch-1 and p21WAF1/CIP1. **Int J Cancer**, v. 129, n. 8, p. 2042-9, Oct 15 2011. ISSN 1097-0215. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21165952> >.

HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1097-102, Mar 01 2011. ISSN 0008-543X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960499> >.

HALLAHAN, A. R. et al. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. **Cancer Res**, v. 64, n. 21, p. 7794-800, Nov 01 2004. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520185> >.

HAN, S. P.; TANG, Y. H.; SMITH, R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. **Biochem J**, v. 430, n. 3, p. 379-92, Sep 15 2010. ISSN 1470-8728. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795951> >.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HANIGAN, W. C.; WRIGHT, S. M.; WRIGHT, R. M. Clinical utility of magnetic resonance imaging in pediatric neurosurgical patients. **J Pediatr**, v. 108, n. 4, p. 522-9, Apr 1986. ISSN 0022-3476. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3958824> >.

HART, M. N.; EARLE, K. M. Primitive neuroectodermal tumors of the brain in children. **Cancer**, v. 32, n. 4, p. 890-7, Oct 1973. ISSN 0008-543X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4751919> >.

HOVESTADT, V. et al. Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics. **Nature**, v. 572, n. 7767, p. 74-79, 08 2019. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31341285> >.

HSU, C. H.; ALTSCHULER, S. J.; WU, L. F. Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. **Cell**, v. 178, n. 2, p. 361-373.e12, 07 11 2019. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31204100> >.

INGRAHAM, F. D.; BAILEY, O. T.; BARKER, W. F. Medulloblastoma cerebelli; diagnosis, treatment and survivals, with a report of 56 cases. **N Engl J Med**, v. 238, n. 6, p. 171-4, Feb 05 1948. ISSN 0028-4793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18899228> >.

IWAOKA, R. et al. Backbone and side chain assignments of the second RNA-binding domain of Musashi-1 in its free form and in complex with 5-mer RNA. **Biomol NMR Assign**, v. 11, n. 2, p. 265-268, Oct 2017. ISSN 1874-270X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808919> >.

JENKIN, R. D. Medulloblastoma in childhood: radiation therapy. **Can Med Assoc J**, v. 100, n. 2, p. 51-3, Jan 11 1969. ISSN 0008-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5762471> >.

KABIR, T. F. et al. Immunotherapy for Medulloblastoma: Current Perspectives. **Immunotargets Ther**, v. 9, p. 57-77, 2020. ISSN 2253-1556. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32368525> >.

KAHN, S. A. et al. Notch1 regulates the initiation of metastasis and self-renewal of Group 3 medulloblastoma. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 4121, 10 08 2018. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30297829> >.

KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D353-D361, 01 04 2017. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899662> >.

KANEKO, Y. et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. **Dev Neurosci**, v. 22, n. 1-2, p. 139-53, 2000. ISSN 0378-5866. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657706> >.

KANG, D.; LEE, Y.; LEE, J. S. RNA-Binding Proteins in Cancer: Functional and Therapeutic Perspectives. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 9, Sep 21 2020. ISSN 2072-6694. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32967226> >.

KATZ, Y. et al. Musashi proteins are post-transcriptional regulators of the epithelial-luminal cell state. **Elife**, v. 3, p. e03915, Nov 07 2014. ISSN 2050-084X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380226> >.

KAWAUCHI, D. et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 2, p. 168-80, Feb 14 2012. ISSN 1878-3686. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22340591> >.

KHARAS, M. G.; LENGNER, C. J. Stem Cells, Cancer, and MUSASHI in Blood and Guts. **Trends Cancer**, v. 3, n. 5, p. 347-356, 05 2017. ISSN 2405-8025. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28718412> >.

KIEFFER, V. et al. Intellectual, educational, and situation-based social outcome in adult survivors of childhood medulloblastoma. **Dev Neurorehabil**, v. 22, n. 1, p. 19-26, Jan 2019. ISSN 1751-8431. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29336639> >.

KIM, D. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. **Nat Biotechnol**, v. 37, n. 8, p. 907-915, 08 2019. ISSN 1546-1696. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31375807> >.

KOCH, A. et al. Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. **Int J Cancer**, v. 121, n. 2, p. 284-91, Jul 15 2007. ISSN 0020-7136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373666> >.

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**, v. 123, n. 4, p. 473-84, Apr 2012. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358457> >.

KRATZ, C. P. et al. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 11, p. e38-e45, 06 01 2017. ISSN 1557-3265. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28572266> >.

KUDINOV, A. E. et al. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 9, p. 2143-2153, May 01 2017. ISSN 1557-3265. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143872> >.

LAI, E. C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. **Development**, v. 131, n. 5, p. 965-73, Mar 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973298> >.

LAMBERT, N. et al. RNA Bind-n-Seq: quantitative assessment of the sequence and structural binding specificity of RNA binding proteins. **Mol Cell**, v. 54, n. 5, p. 887-900, Jun 05 2014. ISSN 1097-4164. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837674> >.

LAN, L. et al. Natural product (-)-gossypol inhibits colon cancer cell growth by targeting RNA-binding protein Musashi-1. **Mol Oncol**, v. 9, n. 7, p. 1406-20, Aug 2015. ISSN 1878-0261. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25933687> >.

_____. Identification and Validation of an. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 8, Aug 08 2020. ISSN 2072-6694. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32784494> >.

LEONG, K. G.; KARSAN, A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2223-33, Mar 15 2006. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291593> >.

LI, J. et al. [Musashi-1 positively regulates growth and proliferation of hepatoma cells. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 39, n. 12, p. 1436-1442, Dec 30 2019. ISSN 1673-4254. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31907147> >.

LIN, H. et al. Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. **Oncol Rep**, v. 26, n. 4, p. 925-30, Oct 2011. ISSN 1791-2431. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743969> >.

LIN, J. C. et al. Musashi-1 Enhances Glioblastoma Migration by Promoting ICAM1 Translation. **Neoplasia**, v. 21, n. 5, p. 459-468, 05 2019. ISSN 1476-5586. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30959276> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOEFFLER, J. S. et al. Pre-radiation chemotherapy for infants and poor prognosis children with medulloblastoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 15, n. 1, p. 177-81, Jul 1988. ISSN 0360-3016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391815> >.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 781-810, 2004. ISSN 1081-0706. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473860> >.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, 06 2016. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931> >.

_____. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncol**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 08 02 2021. ISSN 1523-5866. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34185076> >.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014. ISSN 1474-760X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281> >.

LU, W.; KANG, Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. **Dev Cell**, v. 49, n. 3, p. 361-374, 05 06 2019. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31063755> >.

MAJUMDER, S. et al. Targeting Notch in oncology: the path forward. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, n. 2, p. 125-144, 02 2021. ISSN 1474-1784. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33293690> >.

MANTOVANI, F.; COLLAVIN, L.; DEL SAL, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell Death Differ**, v. 26, n. 2, p. 199-212, 01 2019. ISSN 1476-5403. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30538286> >.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483-9, Sep 25 2015. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404825> >.

MASSIMINO, M. et al. Childhood medulloblastoma. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 105, p. 35-51, Sep 2016. ISSN 1879-0461. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375228> >.

MCALLISTER, R. M. et al. Establishment of a human medulloblastoma cell line. **Int J Cancer**, v. 20, n. 2, p. 206-12, Aug 15 1977. ISSN 0020-7136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/892931> >.

MCCAWE, T. R. et al. Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance. **Oncologist**, v. 26, n. 4, p. e608-e621, 04 2021. ISSN 1549-490X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33284507> >.

MENDONSA, A. M.; NA, T. Y.; GUMBINER, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 35, p. 4769-4780, 08 2018. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29780167> >.

MENYHÁRT, O.; GYÖRFFY, B. Molecular stratifications, biomarker candidates and new therapeutic options in current medulloblastoma treatment approaches. **Cancer Metastasis Rev**, v. 39, n. 1, p. 211-233, 03 2020. ISSN 1573-7233. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31970590> >.

MITRUS, I. et al. Evolving models of tumor origin and progression. **Tumour Biol**, v. 33, n. 4, p. 911-7, Aug 2012. ISSN 1423-0380. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492238> >.

MOTOYAMA, J. et al. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. **Nat Genet**, v. 18, n. 2, p. 104-6, Feb 1998. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462734> >.

NAKAMURA, M. et al. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. **Neuron**, v. 13, n. 1, p. 67-81, Jul 1994. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043282> >.

NAKANO, A. et al. Expression of the Neural RNA-binding protein Musashi1 in pediatric brain tumors. **Pediatr Neurosurg**, v. 43, n. 4, p. 279-84, 2007. ISSN 1016-2291. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627143> >.

NIU, J. et al. Knockdown of MSI1 inhibited the cell proliferation of human osteosarcoma cells by targeting p21 and p27. **Oncol Lett**, v. 14, n. 5, p. 5271-5278, Nov 2017. ISSN 1792-1074. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113163> >.

NORTHCOTT, P. A. et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. **Nature**, v. 547, n. 7663, p. 311-317, 07 19 2017. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28726821> >.

_____. Medulloblastomics: the end of the beginning. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 12, p. 818-34, Dec 2012. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175120> >.

_____. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 11, p. 1408-14, Apr 10 2011. ISSN 1527-7755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823417> >.

_____. Medulloblastoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 1, p. 11, 02 14 2019. ISSN 2056-676X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30765705> >.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985-999, Jun 01 2017. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28575679> >.

OCAÑA, A.; PANDIELLA, A. Personalized therapies in the cancer "omics" era. **Mol Cancer**, v. 9, p. 202, Jul 29 2010. ISSN 1476-4598. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670437> >.

OHYAMA, T. et al. Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: the role of aromatic stacking interactions. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 7, p. 3218-31, Apr 2012. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140116> >.

OKANO, H.; IMAI, T.; OKABE, M. Musashi: a translational regulator of cell fate. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 7, p. 1355-9, Apr 01 2002. ISSN 0021-9533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896183> >.

OKANO, H. et al. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. **Exp Cell Res**, v. 306, n. 2, p. 349-56, Jun 10 2005. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925591> >.

PACKER, R. J.; BATNITZKY, S.; COHEN, M. E. Magnetic resonance imaging in the evaluation of intracranial tumors of childhood. **Cancer**, v. 56, n. 7 Suppl, p. 1767-72, Oct 01 1985. ISSN 0008-543X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4027908> >.

PACKER, R. J. et al. Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 7, p. 2127-36, Jul 1999. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561268> >.

_____. Prognostic importance of cellular differentiation in medulloblastoma of childhood. **J Neurosurg**, v. 61, n. 2, p. 296-301, Aug 1984. ISSN 0022-3085. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6737054> >.

PARIS, L. et al. Transgenerational inheritance of enhanced susceptibility to radiation-induced medulloblastoma in newborn Ptch1^{+/-} mice after paternal irradiation. **Oncotarget**, v.

6, n. 34, p. 36098-112, Nov 03 2015. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26452034> >.

PARK, T. S. et al. Medulloblastoma: clinical presentation and management. Experience at the hospital for sick children, toronto, 1950-1980. **J Neurosurg**, v. 58, n. 4, p. 543-52, Apr 1983. ISSN 0022-3085. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6827349> >.

PATERSON, E.; FARR, R. F. Cerebellar medulloblastoma: treatment by irradiation of the whole central nervous system. **Acta radiol**, v. 39, n. 4, p. 323-36, Apr 1953. ISSN 0001-6926. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13057640> >.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicol Sci**, v. 165, n. 2, p. 272-276, 10 01 2018. ISSN 1096-0929. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30629266> >.

PETRIRENA, G. J. et al. Recurrent extraneural sonic hedgehog medulloblastoma exhibiting sustained response to vismodegib and temozolomide monotherapies and inter-metastatic molecular heterogeneity at progression. **Oncotarget**, v. 9, n. 11, p. 10175-10183, Feb 09 2018. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515801> >.

PFAFF, E. et al. TP53 mutation is frequently associated with CTNNB1 mutation or MYCN amplification and is compatible with long-term survival in medulloblastoma. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 35, p. 5188-96, Dec 10 2010. ISSN 1527-7755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060032> >.

POMEROY, S. L.; STURLA, L. M. Molecular biology of medulloblastoma therapy. **Pediatr Neurosurg**, v. 39, n. 6, p. 299-304, Dec 2003. ISSN 1016-2291. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734863> >.

PUROW, B. W. et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. **Cancer Res**, v. 65, n. 6, p. 2353-63, Mar 15 2005. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781650> >.

RAFFEL, C. Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. **Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 310-22, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 1522-8002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256053> >.

RAMASWAMY, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 821-31, 06 2016. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040285> >.

RAMASWAMY, V.; TAYLOR, M. D. Medulloblastoma: From Myth to Molecular. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 21, p. 2355-2363, Jul 20 2017. ISSN 1527-7755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640708> >.

REMKE, M.; RAMASWAMY, V.; TAYLOR, M. D. Medulloblastoma molecular dissection: the way toward targeted therapy. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n. 6, p. 674-81, Nov 2013. ISSN 1531-703X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076581> >.

RICE, J. M. Causation of nervous system tumors in children: insights from traditional and genetically engineered animal models. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 199, n. 2, p. 175-91, Sep 01 2004. ISSN 0041-008X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313589> >.

ROBINSON, G. W. et al. Irreversible growth plate fusions in children with medulloblastoma treated with a targeted hedgehog pathway inhibitor. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69295-69302, Sep 19 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050204> >.

RORKE, L. B. The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 42, n. 1, p. 1-15, Jan 1983. ISSN 0022-3069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6296325> >.

ROTHSCHILD, B. M. et al. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. **Naturwissenschaften**, v. 90, n. 11, p. 495-500, Nov 2003. ISSN 0028-1042. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610645> >.

ROUAH, E. et al. N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. **Cancer Res**, v. 49, n. 7, p. 1797-801, Apr 01 1989. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924321> >.

RUTKA, J. T.; HOFFMAN, H. J. Medulloblastoma: a historical perspective and overview. **J Neurooncol**, v. 29, n. 1, p. 1-7, Jul 1996. ISSN 0167-594X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817411> >.

SABEL, M. et al. Relapse patterns and outcome after relapse in standard risk medulloblastoma: a report from the HIT-SIOP-PNET4 study. **J Neurooncol**, v. 129, n. 3, p. 515-524, 09 2016. ISSN 1573-7373. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423645> >.

SAKAKIBARA, S. et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. **Dev Biol**, v. 176, n. 2, p. 230-42, Jun 15 1996. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660864> >.

_____. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. **J Neurosci**, v. 21, n. 20,

p. 8091-107, Oct 15 2001. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588182> >.

SCHÜLLER, U. et al. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 123-34, Aug 12 2008. ISSN 1878-3686. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691547> >.

SENGUPTA, S.; POMERANZ KRUMMEL, D.; POMEROY, S. The evolution of medulloblastoma therapy to personalized medicine. **F1000Res**, v. 6, p. 490, 2017. ISSN 2046-1402. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28713553> >.

SHAYA, O. et al. Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning. **Dev Cell**, v. 40, n. 5, p. 505-511.e6, 03 13 2017. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28292428> >.

SHONKA, N.; BRANDES, A.; DE GROOT, J. F. Adult medulloblastoma, from spongioblastoma cerebelli to the present day: a review of treatment and the integration of molecular markers. **Oncology (Williston Park)**, v. 26, n. 11, p. 1083-91, Nov 2012. ISSN 0890-9091. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330353> >.

SHOU, Z. et al. Overexpression of Musashi-1 protein is associated with progression and poor prognosis of gastric cancer. **Oncol Lett**, v. 13, n. 5, p. 3556-3566, May 2017. ISSN 1792-1074. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28521458> >.

SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. **Physiol Rev**, v. 97, n. 4, p. 1235-1294, 10 01 2017. ISSN 1522-1210. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28794168> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA Cancer J Clin**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 01 2019. ISSN 1542-4863. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30620402> >.

SILVA, P. B. et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1545-60, Aug 2016. ISSN 0920-9069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358937> >.

SKODA, A. M. et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. **Bosn J Basic Med Sci**, v. 18, n. 1, p. 8-20, Feb 20 2018. ISSN 1840-4812. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29274272> >.

SULLIVAN, R. et al. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 11, p. 1193-224, Sep 2015. ISSN 1474-5488. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26427363> >.

SUREBAN, S. M. et al. Knockdown of RNA binding protein musashi-1 leads to tumor regression in vivo. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1448-58, May 2008. ISSN 1528-0012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471519> >.

TABIN, C. J.; MCMAHON, A. P. Recent advances in hedgehog signalling. **Trends Cell Biol**, v. 7, n. 11, p. 442-6, Nov 1997. ISSN 0962-8924. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709003> >.

TAYLOR, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 4, p. 465-72, Apr 2012. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134537> >.

TEODORCZYK, M.; SCHMIDT, M. H. H. Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. **Front Oncol**, v. 4, p. 341, 2014. ISSN 2234-943X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601901> >.

TODA, M. et al. Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. **Glia**, v. 34, n. 1, p. 1-7, Apr 01 2001. ISSN 0894-1491. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284014> >.

TROSCHER, F. M. et al. Knockdown of the prognostic cancer stem cell marker Musashi-1 decreases radio-resistance while enhancing apoptosis in hormone receptor-positive breast cancer cells via p21. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 147, n. 11, p. 3299-3312, Nov 2021. ISSN 1432-1335. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34291358> >.

VAN DEN HEUVEL, M.; INGHAM, P. W. smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 547-51, Aug 08 1996. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8700230> >.

VANNIYA S, P.; SRISAILAPATHY, C. R. S.; KUNKA MOHANRAM, R. The tip link protein Cadherin-23: From Hearing Loss to Cancer. **Pharmacol Res**, v. 130, p. 25-35, 04 2018. ISSN 1096-1186. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29421162> >.

VO, D. T. et al. The RNA-binding protein Musashi1 affects medulloblastoma growth via a network of cancer-related genes and is an indicator of poor prognosis. **Am J Pathol**, v. 181, n. 5, p. 1762-72, Nov 2012. ISSN 1525-2191. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985791> >.

WANG, L.; WANG, S.; LI, W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. **Bioinformatics**, v. 28, n. 16, p. 2184-5, Aug 15 2012. ISSN 1367-4811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743226> >.

WANG, X. et al. Cancer stem cell marker Musashi-1 rs2522137 genotype is associated with an increased risk of lung cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e95915, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24787949> >.

WANG, Y.; CHEN, H.; LIANG, Q. Endothelial Cells Promote Formation of Medulloblastoma Stem-Like Cells via Notch Pathway Activation. **J Mol Neurosci**, v. 63, n. 2, p. 152-158, Oct 2017. ISSN 1559-1166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28856557> >.

WASSON, J. C. et al. Oncogene amplification in pediatric brain tumors. **Cancer Res**, v. 50, n. 10, p. 2987-90, May 15 1990. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2334901> >.

WASZAK, S. M. et al. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. **Lancet Oncol**, v. 19, n. 6, p. 785-798, 06 2018. ISSN 1474-5488. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29753700> >.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012. ISSN 1096-9896. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990031> >.

XIE, J. et al. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. **Cancer Res**, v. 57, n. 12, p. 2369-72, Jun 15 1997. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192811> >.

XU, M. et al. Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. **Cancer Lett**, v. 369, n. 1, p. 124-33, Dec 01 2015. ISSN 1872-7980. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276718> >.

YAO, L. et al. Notch signaling in the central nervous system with special reference to its expression in microglia. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, n. 6, p. 807-14, Sep 2013. ISSN 1996-3181. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24047525> >.

YI, C. et al. Luteolin inhibits Musashi1 binding to RNA and disrupts cancer phenotypes in glioblastoma cells. **RNA Biol**, v. 15, n. 11, p. 1420-1432, 2018. ISSN 1555-8584. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30362859> >.

ZHENG, K. et al. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 1, p. 104-125, 2019. ISSN 1838-7640. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30662557> >.

ZUGAZAGOITIA, J. et al. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clin Ther**, v. 38, n. 7, p. 1551-66, Jul 2016. ISSN 1879-114X. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158009>>.

10. ANEXOS

Anexo I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Projeto Temático



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 04 de abril de 2017.

Ofício nº 1001/2017
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 15509/2016

Prezado Pesquisador,

O trabalho intitulado “**INTERAÇÃO ENTRE ALVOS TERAPÊUTICOS EMERGENTES E VIAS DE DESENVOLVIMENTO ASSOCIADAS À TUMORIGÊNESE: ÊNFASE EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**” – Projeto de Pesquisa Versão 2 – 08/03/2017, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 447ª Reunião Ordinária realizada em 03/04/2017, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – 09/03/2017.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

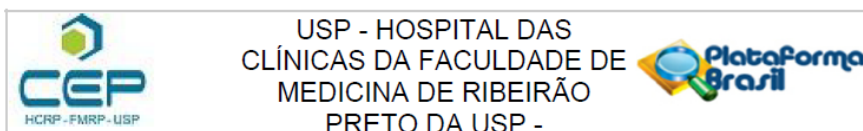
Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE
Depto. de Puericultura e Pediatria

Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Projeto de Doutorado



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Gene Musashi-1 em Meduloblastomas de Grupo 3 e 4

Pesquisador: PABLO FERREIRA DAS CHAGAS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 39356920.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

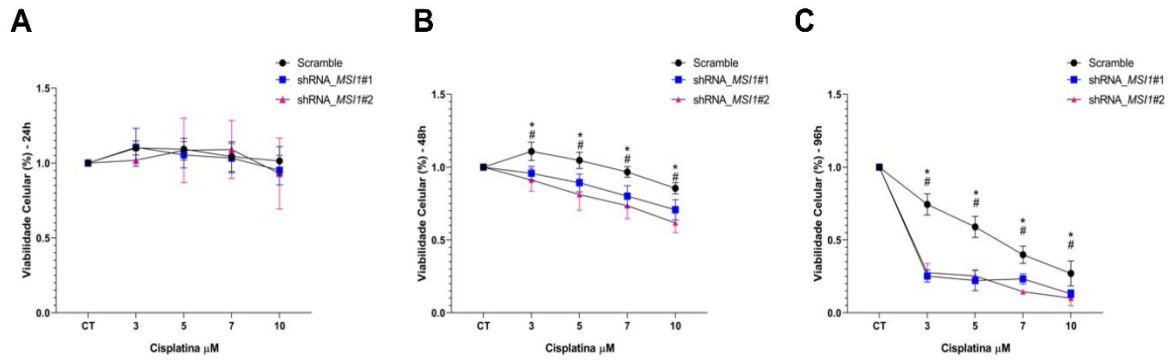
Não

RIBEIRAO PRETO, 23 de Novembro de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo III: Ensaio de viabilidade celular após o tratamento com cisplatina



Anexo III - Avaliação do efeito do *knockdown* de *MSI1* na viabilidade celular em resposta à cisplatina na linhagem celular D283 Med. Redução da viabilidade celular nas linhagens *knockdown* de *MSI1* (shRNA *MSI1* #1 e #2) tratadas com cisplatina nas doses de 3, 5, 7 e 10 μM por (A) 24h, (B) 48h e (C) 96h, comparado ao controle (*Scramble*). O gráfico mostra a média \pm do desvio padrão de três experimentos independentes. #,* $p < 0,05$.

11 Apêndice



11. APENDICES

11.1 Artigo publicado durante o doutorado – Revisão Musashi

Received: 29 August 2019 | Revised: 19 October 2019 | Accepted: 20 October 2019

DOI: 10.1002/jgm.3136

REVIEW ARTICLE

WILEY

Interplay between the RNA binding-protein Musashi and developmental signaling pathways

Pablo Ferreira das Chagas¹ | Mirella Baroni¹ | María Sol Brassesco² | Luiz Gonzaga Tone^{1,3}¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil²Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil³Department of Pediatrics, Ribeirão Preto Medical School, São Paulo, Brazil

Correspondence

P. F. das Chagas, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil – 3900 Bandeirantes Avenue, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Email: pabloferreiradaschagas@hotmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2014/20341-0; Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; FAPESP; Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award Number: 2014/20341-0; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); CAPES (Finance Code 001)

Abstract

Musashi comprises an evolutionarily conserved family of RNA-binding proteins (RBP) that regulate cell fate decisions during embryonic development and play key roles in the maintenance of self-renewal and differentiation of stem cells and adult tissues. More recently, several studies have shown that any dysregulation of MSI1 and MSI2 can lead to cellular dysfunctions promoting tissue instability and tumorigenesis. Moreover, several reports have characterized many molecular interactions between members of the Musashi family with ligands and receptors of the signaling pathways responsible for controlling normal embryonic development: Notch, Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Wingless (Wnt) and Hedgehog Signaling (Hh); all of which, when altered, are strongly associated with cancer onset and progression, especially in pediatric tumors. In this context, the present review aims to compile possible cross-talks between Musashi proteins and members of the above cited molecular pathways for which dysregulation plays important roles during carcinogenesis and may be modulated by these RBP.

KEYWORDS

cancer, Musashi gene, Notch, SHH, signaling pathways, TGF- β , WNT

1 | INTRODUCTION: THE RNA BINDING-PROTEIN MUSASHI

Twenty-four years ago, when analyzing the genes responsible for maintaining the asymmetric division of sensory organs in *Drosophila* sp., Nakamura *et al.*¹ identified an RNA binding protein (RBP) that, when mutated, lead to the formation of two shafts and either one or two sockets in a single bristle. This phenotype was proposed to be associated with the characteristic battle technique of the legendary Miyamoto Musashi, a great swordsman of the Eastern culture who used two blades in combat, and thus the gene was named after him.

This RBP, also called heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) Musashi (Msi), is highly conserved and has been demonstrated to be essential for controlling the asymmetric division of precursor cells of sensory organs. Msi is vastly expressed in neural progenitor cells in the central nervous system of vertebrates, characterizing it as a marker of neural stem cells (SC).²⁻⁶

In mammals, Musashi-1 (Msi1) and its homologue Musashi-2 (Msi2) share 90% of homology (75% homology at amino acid level, 85% similarity).^{5,7,8} These proteins act cooperatively for the maintenance of self-renewal and differentiation of SC and adult tissues, together or independently.⁸⁻¹⁰

The MSI1 and MSI2 proteins (Figure 1) are composed of 362 and 328 amino acids, respectively. Both have two RNA-recognition motifs,

das Chagas and Baroni contributed equally to this work.

defined as RRM1 and RRM2, in the N-terminal region that mediate the binding of Musashi to target RNAs. The RRM1 of MSI1 protein contains 20–110 amino acid residues and RRM2 contains 109–186 amino acid residues. Alternatively, the RRM1 and RRM2 of MSI2 contain 21–111 and 110–187 amino acids respectively. In Musashi targeted genes, RRM1 and RRM2 recognition sequences are found in a close proximity at the 3'-end of the mRNAs.¹¹ The C-terminal region of the Musashi-1 protein harbors two main domains of protein interaction: one that interacts with the polyA tail binding protein (PAPB) and another domain (LD) of interaction with LIN28. Although LIN28 works in conjunction with MSI1 to regulate the post transcriptional biogenesis of microRNAs (miRNA), the interaction of Musashi-1 with PAPB prevents the binding between PAPB and the translation initiation factor, eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma), inhibiting the translation start of several genes.¹²

Msi1 and Msi2 bind to the 3'-UTR of several target mRNAs increasing or attenuating their expression either during pre-mRNA processing or alternative splicing, interfering with their transport into the cytoplasm, or affecting the stability and turnover of the target gene itself.^{6,13,14} Thus, by controlling these mechanisms, Musashi proteins act for the maintenance of self-renewal and differentiation of SC and adult tissues, together or independently.^{9,10}

Both proteins are considered biomarkers of stemness and are expressed in diverse cell types at different levels of tissue differentiation. Nonetheless, although Msi1 preferably exhibits increased expression affinity in somatic cells, Msi2 is preferentially expressed during maintenance and differentiation of primitive cells from the hematopoietic tissue.^{15–19} In germ cells, however, both, can influence translational modulation during the differentiation and maintenance of maturation of these cells^{20–22} and any dysregulation can lead to cellular dysfunctions promoting tissue instability, as well as the onset of tumor progression. As shown in Table 1, both Msi proteins have been described as over-expressed and prognostic of outcome in numerous cancer types, contributing significantly to the progression and aggressiveness of tumors.^{46,47}

Msi1 is preferentially dysregulated in tumors of the central nervous system, and Msi2 in hematopoietic neoplasms^{15–17,48} Thus, in addition to maintaining tumor stem cell populations, and the tumor itself, Msi proteins can regulate cancer invasion, metastasis and drug resistance, as well as promote more aggressive cancer phenotypes.^{12,19,49–51}

Many Msi targets have been described, among which, PTEN/mTOR, TGF β /SMAD3, MYC and cMET have been best studied.¹² Moreover, over the last decade, many reports have characterized many molecular interactions between members of Musashi family with ligands and receptors of the signaling pathways responsible for controlling normal embryonic development: Notch, Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Wingless (Wnt) and Hedgehog Signaling (Hh); all of which are strongly associated with cancer onset and progression, especially in pediatric tumors.^{52–55}

In this context, the present review aims to compile possible cross-talks between Musashi proteins and members of the above cited molecular pathways whose dysregulation plays important roles during carcinogenesis and may be modulated by these RBPs.

2 | MUSASHI TARGETS THE NOTCH PATHWAY

The Notch signaling pathway was first identified as playing important roles in the maintenance of cellular self-renewal during the asymmetric divisions of neuronal precursor cells of insects and mammals.^{56,57} This pathway is also responsible for maintaining and regulating cellular homeostasis through self-renewal, apoptosis, differentiation and cell proliferation of somatic and hematopoietic cells.^{58,59}

In mammals, the Notch pathway is highly conserved and comprises four receptors (Notch1–4) and at least five ligands (Jagged1–2, delta-like 1, 3 and 4). Increased aberrant expression of the activity of any of these ligands and receptors is associated with high activation of the pathway, which in turn, is related to imbalance of cell cycle, malignancy and tumor progression.^{60,61}

Msi1 is the only RBP protein that regulates the Notch signaling pathway during the early stages of development in the post-fetal period and the maintenance of tissues in adulthood.^{1,62,63}

The co-localization of Msi1 and Notch1 was demonstrated in endometrial proliferative cells, suggesting an important association of these genes in the process of differentiation of endothelial SC, which is also associated with the onset of endometriosis and endometrial carcinoma.⁶⁴ Later, the knockdown of Msi1 on endometrial carcinoma cells suggested that it was a strong modulator of cell cycle progression by altering the expression of Notch-1 and its downstream targets, the

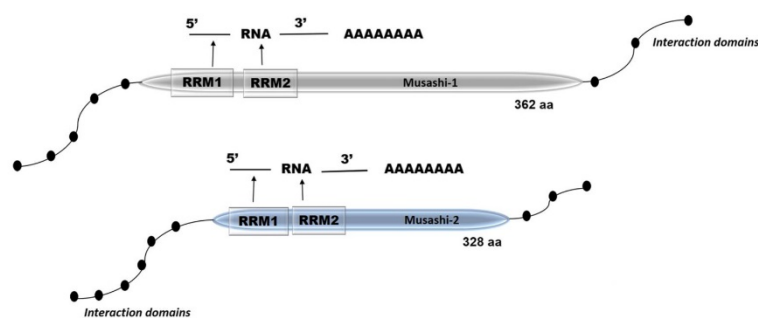


FIGURE 1 Schematic representation of Musashi-1 and Musashi-2 proteins: Molecular structure of MSI1 and MSI2 with their interaction domains with RNA. RRM - RNA recognition motif, and interaction domains with others mRNAs targets

TABLE 1 Overexpression of Musashi protein associated with carcinogenesis

Tumor	Gene	Biological importance	References
B-acute lymphoblastic leucemia; acute myeloid leucemia	MSI2	Clinical prognostic biomarker	Aly and Ghazy ²³ and Ye <i>et al.</i> ²⁴
Astrocytoma; chronic myeloid leucemia; esophageal adenocarcinoma; gallbladder adenocarcinoma; colon cancer; glioma; lung cancer	MSI1/ MSI2	Markers of tumorigenesis	Other studies ²⁵⁻³²
Bladder cancer	MSI2	Induces cell migration and invasion	Yang <i>et al.</i> ³³
Breast cancer	MSI2	Influences cell growth	Kang <i>et al.</i> ³⁴
Cervical cancer	MSI2	Prognostic biomarker, increases migration and invasion	Liu <i>et al.</i> ³⁵
Cervical carcinoma; osteosarcoma	MSI1	Promotes cell proliferation modulating p21, p27	Liu and Yang <i>et al.</i> ³⁶ and Niu <i>et al.</i> ³⁷
Colon adenocarcinoma	MSI1	Increases proliferation, inhibits apoptosis	Sureban <i>et al.</i> ³⁸
Colorectal cancer	MSI1	Enhances chemoresistance	Chiou <i>et al.</i> ³⁹
Endometrioid adenocarcinoma; Medulloblastoma	MSI1	Increases proliferation, associated with poor survival	Sanchez-Diaz ¹⁸ and Ma <i>et al.</i> ⁴⁰
Gastric cancer	MSI1	Associated with progression and poor prognosis	Shou <i>et al.</i> ⁴¹
Glioblastoma	MSI1	Marker for aggressiveness of GBM	Lee <i>et al.</i> ⁴²
Hepatocellular carcinoma	MSI2	Predictive biomarker of invasion and prognosis	He <i>et al.</i> ⁴³
Liver cancer	MSI2	Contributes to the stemness and chemoresistance	Fang <i>et al.</i> ⁴⁴
Pancreatic cancer	MSI2	Promotes progression and metastasis	Guo ⁴⁵

transcription factor Hes-1 and the cell cycle regulators p21 (WAF1/CIP1).⁶⁵

The expression of Msi1 in SCs from the intestinal epithelium was also associated with the aberrant activation of the Notch pathway, conditioning these cells to acquire oncogenic characteristics.⁶⁶ Especially in diffuse-type gastric cancer, Msi1 regulates the expression of the delta-like ligand 1 and Jagged-2, which are both involved in the activation of the Notch pathway.⁶⁷

However, the most investigated and understood Msi target within this signaling pathway is NUMB mRNA (mNumb), a Notch activation antagonist repressor, which plays key roles controlling cell fate during the early stages of development of some tissues.⁶⁸ The Msi1 recognizes the 3'-UTR region of Numb mRNA and prevents its translation, contributing drastically to the aberrant activation of this signaling pathway, and consequently affecting mechanisms of cell differentiation.^{62,69,70}

Msi1 also modulates the expansion and proliferation of mammary progenitor cells concomitant with the activation of the Notch pathway.¹⁹ In animal models, the proliferation and differentiation of mammary progenitor cells with estrogen and progesterone positive receptors is influenced by the modulation of Msi1 and Numb, which contributes to a level of expression differentiated and conserved from Notch-1.⁷¹

Moreover, the Msi1, Jagged-1 and Notch-1 genes are associated with the regulation of the asymmetric division of tumor cells.^{51,72,73}

On the other hand, Msi1 and Numb expression levels are also differentially expressed (both at mRNA and protein levels) in medulloblastoma cell lines compared to normal cerebellum.⁷⁴ Notably, the knockdown of Msi increased Numb expression in that tumor,¹⁸ and

many others, including glioblastoma,⁴⁸ colorectal cancer⁵⁰ and bladder cancer,⁷⁵ leading to the consequent attenuation of the Notch pathway.

Therefore, Msi1 influences the activation and repression of the Notch pathway, compromising the fate of undifferentiated cells in the process of expansion, and contributes to the aberrant proliferation of tumor cells during the normal and correct functioning of associated genes that control of self-renewal, differentiation, cell cycle and apoptosis.

3 | TARGETS OF MUSASHI: TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF- β) PATHWAY

The TGF- β pathway in mammals is composed of several essential accessory molecules that contribute to a complex signaling network responsible for regulating several important cellular processes, such as differentiation, cell growth and proliferation, as well as activation of the immune response, acting as a tumor suppressor in the early stages of cancer.⁷⁶⁻⁷⁸ This pathway is a strong promoter and stimulator of cell proliferation, apoptosis, motility, angiogenesis, cell invasion and, in advanced stages of cancer, contributes directly to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and a greater aggressiveness during tumor progression.^{49,79,80}

When the canonical pathway is activated, TGF- β induces the communication of its ligands with their receptors by activating and phosphorylating them. In doing so, they associate with SMAD4,

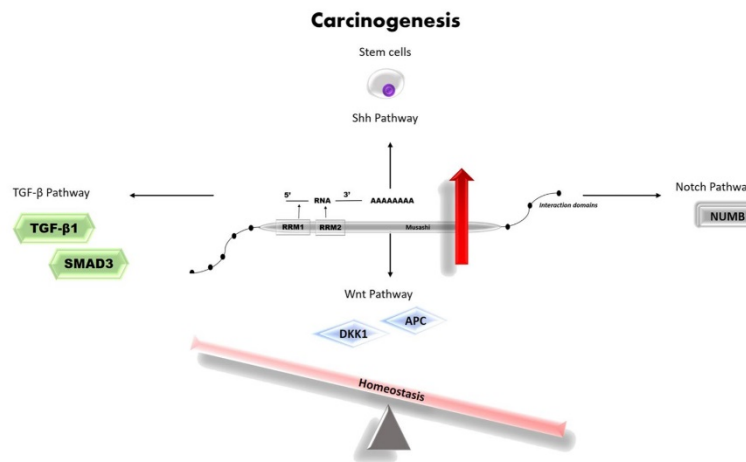


FIGURE 2 Imbalance between Musashi and developmental pathways in carcinogenesis. Musashi increased in the nucleus cytoplasm influences an expression de genes responsible for activation or repression of developmental pathways promoting carcinogenesis of different tumors

forming complex heterodimers that translocate into the nucleus, and act as transcriptional co-factors that influence the transcription of several target genes.^{76,78,81}

It is known that both the TGF- β and Msi2 pathways are associated with the control of auto-renewal, proliferation, differentiation and asymmetric cell division of hematopoietic SCs.^{82,83} Msi2 knock-down compromises hematopoietic SC homeostasis and contributes to oncogenic transformation *in vivo* and *in vitro*. Moreover, deletion of Msi1 leads to the loss of TGF-beta signaling and impaired myeloid hematopoiesis.⁸⁴ Indeed, in metastatic lung cancer cells, the aberrant expression of Msi2 is associated with increased invasion and motility potential. Also, Msi2 knockdown decreases the expression of TGFBR1/SMAD3 and has mixed effects on EMT gene expression.³²

4 | WINGLESS (WNT) PATHWAY

The Wnt Protein Wingless (Wg) was discovered in *Drosophila* sp. as a key regulator of embryonic development and normal morphological formation.^{85,86} Over time, Wnt has been shown to be a highly conserved pathway responsible for cell renewal, proliferation and cell differentiation during embryogenesis, and also is important with respect to adult tissue homeostasis.⁸⁷ Thus, any change in its activity, either by mutation and/or by expression dysregulation of its components, can lead to tumor progression and other diseases.⁵² To date, multiple functionally divergent Wnt-based signaling pathways have been identified. The best characterized of these is the Wnt- β -catenin pathway, which is often referred to as the 'canonical' Wnt pathway.⁸⁸

The activation of canonical pathway occurs when the Wnt ligand binds to the Fz (Frizzled) and LRP5/6 receptors. This leads to the accumulation of β -catenin in the cell cytoplasm and its eventual translocation into the nucleus, where it acts as a co-activator of the TCF/LEF transcription factors. Without the ligand or the presence of the DKK family inhibitors the β -catenin does not accumulate in the

cytoplasm, and the complex formed by AXIN, APC, PP2A, GSK3 and CK1 α leads to its degradation. Alternatively, when Wnt binds to its receptors, the function of the complex is interrupted.⁸⁹

Most studies showing the relationship of Wnt signaling and Musashi have so far focused on intestinal epithelial cells and shown an altered expression of Musashi and components of the pathway without demonstrating direct control.⁹⁰⁻⁹³ Rezza *et al.*⁶⁶ demonstrated that Msi1 expression is regulated by the Wnt ligand and vice versa. Other important studies demonstrated a negative feedback between Msi1 and APC, a component of Wnt pathway. Hence, the decrease of Msi1 leads to increased APC activity, which promotes β -catenin degradation and reduction in the activity of the Wnt pathway. This feedback is responsible for maintaining the balance of the intestinal epithelial tissue, and, when this balance is lost, there is an increase in the number of polyps and tumorigenesis.^{94,95}

Musashi has also been related to the Wnt pathway in other tumors, including breast,^{19,51} lung,⁹⁶ cervical,⁹⁷ medulloblastoma^{18,98} and hepatocellular carcinoma.⁹⁹ Chen *et al.*⁹⁹ demonstrated the over-expression of Msi1 in the tumor samples is associated with increased proliferation, cell cycle progression and tumor formation, via the inhibition of APC and DKK1, which are direct targets.

Other studies have shown that treatment with some drugs may also lead to alteration of both Msi and Wnt pathway.^{29,98,100} For example Lan *et al.*²⁹ showed that treatment with the natural product (-) Gossypol inhibits Msi1 and the Wnt and Notch pathways, leading to lower proliferation rates and increased apoptosis of the colon tumor cells.

Moreover, Msi2 knockdown decreases migration and invasion via the Wnt pathway, controlling the EMT mechanism of hepatocellular and esophageal squamous cell carcinoma.^{101,102}

5 | HEDGEHOG (HH) PATHWAY

The Hh pathway is also highly conserved and crucial for the normal development of both invertebrates and vertebrates. Through the

transmission of signals from the cell membrane to the nucleus, this pathway promotes the proper segregation, polarity and development of various tissues and organs.¹⁰³

In adults, Hh is usually deactivated, although it participates in the maintenance of somatic and pluripotent SC for tissue repair, in mammary,¹⁰⁴ skin,¹⁰⁵ neural,¹⁰⁶ erythropoietic¹⁰⁷ and lung.¹⁰⁸ In other tissues, components of the Hh pathway are present only in the primary cilia, an organelle that consist of microtubules and emanate from the cell surface, receiving chemical, mechanical and thermal signals.¹⁰⁹

The Hh pathway has three different ligands: SHh (Sonic Hedgehog), IHh (Indian Hedgehog) and DHh (Desert Hedgehog). When the pathway is deactivated and there is no ligand, PTCH1 is located at the base of the primary cilia and represses SMO activity, preventing it from translocating. However, when the pathway is activated the ligand connects to PTCH1 and the complex is internalized and degraded. SMO becomes free and the signal is transmitted via the cytoplasm through the complex composed of Kif7, Sufu and GliF1. Sufu is phosphorylated and releases Gli activator (GliA), which migrates to the nucleus and activates the transcription of target genes.¹⁰³

Dysregulation of any component of Hh the pathway leads to aberrant activation resulting in malignant transformation in one third of all human tumors.¹¹⁰

To date, every study relating Msi and the Hh pathway is correlated with gastric tumor SC,¹¹¹ hair follicle SC,¹¹² human embryonic SC¹¹³ and neural precursors.¹¹⁴ Some of them report that, when the Hh pathway is increased in SC, the expression of neural precursors markers raises, including Msi.¹¹³⁻¹¹⁵ Furthermore, this increase in stem cell marking may promote chemoresistance, as shown in gastric tumor SCs, where Msi1 expressing cells present greater activity of the Shh pathway and resistance to doxorubicin.¹¹¹

6 | MUSASHI AND OTHER SIGNALING PATHWAYS

AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) signaling is expressed in many tissues during embryonic development and in adulthood. Ligand binding causes the translocation of AHR into nucleus and its binding to the promoter region of downstream target genes, directly upregulating their expression. Activated AHR regulates different cellular functions such as cell proliferation, adhesion and cell migration.^{116,117} MSI2 promotes the post-transcriptional downregulation of canonical AHR pathway components in human pluripotent stem cells. This has been shown to mediate *ex vivo* expansion by regulating the post-transcriptional expression of proteins belonging to a self-renewal regulatory pathway.¹¹⁸

The mammalian target of rapamycin, mTOR, is a serine/threonine kinase that regulates a variety of fundamental cellular processes including protein synthesis, growth, metabolism, aging, regeneration and autophagy, and plays important roles during the early stages of brain development.¹¹⁹ According to the literature, the activation of

the Pten-AKT-mTORC1 axis is necessary for MSI2-transformation of the intestinal epithelium.¹²⁰ In addition, activation of the PDK1-AKT axis downstream of Pten by Msi1 contributes to the observed increase in mTORC1 activity in the intestinal¹²¹ via the activation of the PDK1-AKT axis, downstream of Pten.¹²²

7 | CONCLUSIONS

As outlined in the present review, several studies have shown direct interactions between Musashi proteins and different members of pathways responsible for controlling normal embryonic development: Notch, Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Wingless (Wnt) and Hedgehog Signaling (Hh). Importantly, any imbalance of these interplays can contribute to tumor progression in different tissues (Figure 2).

Therefore, it is of utmost importance and relevance to direct research to corroborate these findings and determine the possible mechanisms of gene modulation by the RBP proteins and genes of these signaling pathways, both in adult and pediatric tumors. These investigations may subsequently clarify whether these interactions contribute to greater tumor growth and aggressiveness, as well as lead to the characterization of new biomarkers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This collaborative study was supported by the Public Research Agencies: CAPES (Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP) process number 2014/20341-0, and FAEPA (Brazil).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PFC and MB drafted and critically read the manuscript. MSB and LGT helped to designed and correct the review and critically read the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ORCID

Pablo Ferreira das Chagas  <https://orcid.org/0000-0002-0652-728X>

REFERENCES

1. Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C. Musashi, a neural RNA-binding protein required for drosophila adult external sensory organ development. *Neuron*. 1994;13:67-81.
2. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999;96:25-34.
3. Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*. 2000;22:139-153.
4. Okabe M, Imai T, Kurusu M, Hiromi Y, Okano H. Translational repression determines a neuronal potential in drosophila asymmetric cell division. *Nature*. 2001;411:94-98.

5. Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol*. 1996;176:230-242.
6. Shyu AB, Wilkinson MF. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell*. 2000;102:135-138.
7. Good P, Yoda A, Sakakibara S, et al. The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics*. 1998;52:382-384.
8. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci*. 2001;21:8091-8107.
9. Moore MA. A cancer fate in the hands of a samurai. *Nat Med*. 2010;16(9):963-965.
10. Okano H, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci*. 2002;115:1355-1359.
11. Sengupta U, Montalbano M, McAllen S, Minuesa G, Kharas M, Kaye R. Formation of toxic oligomeric assemblies of RNA-binding protein: Musashi in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6:113-127.
12. Kudinov AE, Karanicolos J, Golemis EA, Boumber Y. Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. *Clin Cancer Res*. 2017;23:2143-2153.
13. Díaz-Muñoz MD, Turner M. Uncovering the role of RNA-binding proteins in gene expression in the immune system. *Front Immunol*. 2018;9:1094-1110.
14. Zhou H, Mangelsdorf M, Liu J, Zhu L, Wu JY. RNA-binding proteins in neurological diseases. *Sci China Life Sci*. 2014;57:432-444.
15. Barbouti A, Höglund M, Johansson B, et al. A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a result of the cryptic t(7;17)(p15;q23). *Cancer Res*. 2003;63:1202-1206.
16. De Weer A, Speleman F, Cauwelier B, et al. EVI1 overexpression in t(3;17) positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EVI1 to the MSI2 locus at 17q22. *Haematologica*. 2008;93:1903-1907.
17. Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med*. 2010;16:903-908.
18. Sanchez-Diaz PC, Burton TL, Burns SC, Hung JY, Penalva LO. Musashi1 modulates cell proliferation genes in the medulloblastoma cell line Daoy. *BMC Cancer*. 2008;8:280-292.
19. Wang XY, Yin Y, Yuan H, Sakamaki T, Okano H, Glazer RI. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. *Mol Cell Biol*. 2008;28:3589-3599.
20. Gunter KM, McLaughlin EA. Translational control in germ cell development: a role for the RNA-binding proteins Musashi-1 and Musashi-2. *IUBMB Life*. 2011;63:678-685.
21. Sutherland JM, Fraser BA, Sobinoff AP, et al. Developmental expression of Musashi-1 and Musashi-2 RNA-binding proteins during spermatogenesis: analysis of the deleterious effects of dysregulated expression. *Biol Reprod*. 2014;90:92-104.
22. Sutherland JM, Siddall NA, Hime GR, McLaughlin EA. RNA binding proteins in spermatogenesis: an in depth focus on the Musashi family. *Asian J Androl*. 2015;17:529-536.
23. Aly RM, Ghazy HF. Prognostic significance of MSI2 predicts unfavorable outcome in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2015;37:272-278.
24. Ye AF, Han YX, Zhang SH, Li HY, Chen CQ, Wu JB. Expression of musashi-2 gene in leukemia stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;22:1235-1238.
25. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*. 2008;86:31-45.
26. Kaeda J, Ringel F, Oberender C, et al. Up-regulated MSI2 is associated with more aggressive chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:2105-2113.
27. Mokrowiecka A, Veits L, Falkeis C, et al. Expression profiles of cancer stem cell markers: CD133, CD44, Musashi-1 and EpCAM in the cardiac mucosa-Barrett's esophagus-early esophageal adenocarcinoma-advanced esophageal adenocarcinoma sequence. *Pathol Res Pract*. 2017;213:205-209.
28. Liu DC, Yang ZL, Jiang S. Identification of musashi-1 and ALDH1 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma. *Cancer Biomark*. 2010;8:113-121.
29. Lan L, Appelman C, Smith AR, et al. Natural product (-)-gossypol inhibits colon cancer cell growth by targeting RNA-binding protein Musashi-1. *Mol Oncol*. 2015;9:1406-1420.
30. Lagadec C, Vlashi E, Frohnen P, Alhiyari Y, Chan M, Pajonk F. The RNA-binding protein Musashi-1 regulates proteasome subunit expression in breast cancer- and glioma-initiating cells. *Stem Cells*. 2014;32:135-144.
31. Zhang MR, Xi S, Shukla V, et al. The pluripotency factor Musashi-2 is a novel target for lung cancer therapy. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15(Supplement_2):S124.
32. Kudinov AE, Deneka A, Nikonova AS, et al. Musashi-2 (MSI2) supports TGF- β signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:6955-6960.
33. Yang C, Zhang W, Wang L, et al. Musashi-2 promotes migration and invasion in bladder cancer via activation of the JAK2/STAT3 pathway. *Lab Invest*. 2016;96:950-958.
34. Kang MH, Jeong KJ, Kim WY, et al. Correction: Musashi RNA-binding protein 2 regulates estrogen receptor 1 function in breast cancer. *Oncogene*. 2019;38:4427-4428.
35. Liu Y, Fan Y, Wang X, Huang Z, Shi K, Zhou B. Musashi-2 is a prognostic marker for the survival of patients with cervical cancer. *Oncol Lett*. 2018;15:5425-5432.
36. Liu X, Yang WT, Zheng PS. Msi1 promotes tumor growth and cell proliferation by targeting cell cycle checkpoint proteins p21, p27 and p53 in cervical carcinomas. *Oncotarget*. 2014;5:10870-10885.
37. Niu J, Zhao X, Liu Q, Yang J. Knockdown of MSI1 inhibited the cell proliferation of human osteosarcoma cells by targeting p21 and p27. *Oncol Lett*. 2017;14:5271-5278.
38. Sureban SM, May R, George RJ, et al. Knockdown of RNA binding protein musashi-1 leads to tumor regression in vivo. *Gastroenterology*. 2008;134:1448-1458.
39. Chiou GY, Yang TW, Huang CC, et al. Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells. *Sci Rep*. 2017;7:2172-2185.
40. Ma L, Xu YL, Ding WJ, Shao HF, Teng YC. Prognostic value of Musashi-1 in endometrioid adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:4564-4572.
41. Shou Z, Jin X, He X, et al. Overexpression of Musashi-1 protein is associated with progression and poor prognosis of gastric cancer. *Oncol Lett*. 2017;13:3556-3566.
42. Lee SJ, Seo BR, Choi EJ, Koh JY. The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes. *Glia*. 2014;62:639-648.
43. He L, Zhou X, Qu C, et al. Musashi2 predicts poor prognosis and invasion in hepatocellular carcinoma by driving epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*. 2014;18:49-58.
44. Fang T, Lv H, Wu F, et al. Musashi 2 contributes to the stemness and chemoresistance of liver cancer stem cells via LIN28A activation. *Cancer Lett*. 2017;384:50-59.

45. Guo K, Cui J, Quan M, et al. The novel KLF4/MSI2 signaling pathway regulates growth and metastasis of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23:687-696.
46. de Andrés-Aguayo L, Varas F, Graf T. Musashi 2 in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2012;19:268-272.
47. Fox RG, Park FD, Koechlein CS, Kritzik M, Reya T. Musashi signaling in stem cells and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:249-267.
48. Muto J, Imai T, Ogawa D, et al. RNA-binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways. *PLoS ONE.* 2012;7:1-14, e33431.
49. Loomans HA, Andl CD. Intertwining of activin A and TGF β signaling: dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. *Cancers (Basel).* 2014;7:70-91.
50. Pastò A, Serafin V, Pilotto G, et al. NOTCH3 signaling regulates MUSASHI-1 expression in metastatic colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74:2106-2118.
51. Wang XY, Penalba LO, Yuan H, et al. Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Mol Cancer.* 2010;9:221-233.
52. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell.* 2017;169:985-999.
53. Zhao HZ, Jia M, Luo ZB, et al. Prognostic significance of the Musashi-2 (MSI2) gene in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma.* 2016;63:150-157.
54. Slemmons KK, Crose LES, Riedel S, Sushnitha M, Belyea B, Linardic CM. A novel Notch-YAP circuit drives Stemness and tumorigenesis in embryonal rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Res.* 2017;15:1777-1791.
55. Tanyildiz HG, Kaygusuz G, Unal E, Tacyildiz N, Dincaslan H, Yavuz G. The prognostic importance of TGF- β , TGF- β receptor, and fascin in childhood solid tumors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2017;34:238-253.
56. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.
57. Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron.* 2000;26:395-404.
58. Ohishi K, Katayama N, Shiku H, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14:143-150.
59. Okumoto K, Saito T, Hattori E, et al. Expression of Notch signalling markers in bone marrow cells that differentiate into a liver cell lineage in a rat transplant model. *Hepatol Res.* 2005;31:7-12.
60. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, et al. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:6315-6320.
61. Song HY, Wang Y, Lan H, Zhang YX. Expression of Notch receptors and their ligands in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Ther Med.* 2018;16:53-60.
62. Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, et al. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3888-3900.
63. McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem.* 2003;278:23196-23203.
64. Götte M, Wolf M, Staebler A, et al. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2008;215:317-329.
65. Götte M, Greve B, Kelsch R, et al. The adult stem cell marker Musashi-1 modulates endometrial carcinoma cell cycle progression and apoptosis via Notch-1 and p21WAF1/CIP1. *Int J Cancer.* 2011;129:2042-2049.
66. Rezza A, Skah S, Roche C, Nadjar J, Samarut J, Plateroti M. The over-expression of the putative gut stem cell marker Musashi-1 induces tumorigenesis through Wnt and Notch activation. *J Cell Sci.* 2010;123:3256-3265.
67. Tanabe S, Aoyagi K, Yokozaki H, Sasaki H. Regulated genes in mesenchymal stem cells and gastric cancer. *World J Stem Cells.* 2015;7:208-222.
68. Wakamatsu Y, Maynard TM, Jones SU, Weston JA. NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron.* 1999;23:71-81.
69. Berdnik D, Török T, González-Gaitán M, Knoblich JA. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in drosophila. *Dev Cell.* 2002;3:221-231.
70. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res.* 2005;306:349-356.
71. Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 2003;36(Suppl 1):45-58.
72. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med.* 2011;17:867-874.
73. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res.* 2005;65:8530-8537.
74. Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, et al. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene.* 2004;23:3444-3453.
75. Nikipour P, Baygi ME, Steinhoff C, et al. The RNA binding protein Musashi1 regulates apoptosis, gene expression and stress granule formation in urothelial carcinoma cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15:1210-1224.
76. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002;296:1646-1647.
77. Massagué J, Andres J, Attisano L, et al. TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev.* 1992;32:99-104.
78. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616-630.
79. Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett.* 2012;586:1959-1970.
80. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8:24, pii: a021873.
81. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2015;147:22-31.
82. Hope KJ, Cellot S, Ting SB, et al. An RNAi screen identifies Msi2 and Prox1 as having opposite roles in the regulation of hematopoietic stem cell activity. *Cell Stem Cell.* 2010;7:101-113.
83. Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood.* 1996;88:82-88.
84. Park SM, Deering RP, Lu Y, et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF- β signaling in HSCs. *J Exp Med.* 2014;211:71-87.
85. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 1976;48:461-465.
86. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *drosophila*. *Nature.* 1980;287:795-801.
87. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781-810.
88. Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development.* 2018;145:8, dev146589.

89. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17:9-26.
90. Davies PS, Dismuke AD, Powell AE, Carroll KH, Wong MH. Wnt-reporter expression pattern in the mouse intestine during homeostasis. *BMC Gastroenterol*. 2008;8:57-115.
91. Lee G, White LS, Hurov KE, Stappenbeck TS, Piwnica-Worms H. Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4701-4706.
92. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, et al. Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*. 2009;44:173-182.
93. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*. 2010;9:212-213.
94. Spears E, Neufeld KL. Novel double-negative feedback loop between adenomatous polyposis coli and Musashi1 in colon epithelia. *J Biol Chem*. 2011;286:4946-4950.
95. Wolfe AR, Erlund A, McGuinness W, et al. Suppression of intestinal tumorigenesis in. *J Cell Sci*. 2017;130:805-813.
96. Wang XY, Yu H, Linnoila RI, et al. Musashi1 as a potential therapeutic target and diagnostic marker for lung cancer. *Oncotarget*. 2013;4:739-750.
97. Gong P, Wang Y, Gao Y, et al. Msi1 promotes tumor progression by epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer. *Hum Pathol*. 2017;65:53-61.
98. Asuthkar S, Gondi CS, Nalla AK, Velpula KK, Gorantla B, Rao JS. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)-mediated regulation of WNT/ β -catenin signaling is enhanced in irradiated medulloblastoma cells. *J Biol Chem*. 2012;287:20576-20589.
99. Chen K, Gao Q, Zhang W, et al. Musashi1 regulates survival of hepatoma cell lines by activation of Wnt signalling pathway. *Liver Int*. 2015;35:986-998.
100. Silva AK, Yi H, Hayes SH, Seigel GM, Hackam AS. Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Vis*. 2010;16:36-45.
101. Wang MH, Qin SY, Zhang SG, et al. Musashi-2 promotes hepatitis Bvirus related hepatocellular carcinoma progression via the Wnt/ β -catenin pathway. *Am J Cancer Res*. 2015;5:1089-1100.
102. Li Z, Jin H, Mao G, Wu L, Guo Q. Msi2 plays a carcinogenic role in esophageal squamous cell carcinoma via regulation of the Wnt/ β -catenin and hedgehog signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2017;361:170-177.
103. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18:8-20.
104. Lewis MT, Visbal AP. The hedgehog signaling network, mammary stem cells, and breast cancer: connections and controversies. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2006;5:181-217.
105. Zhou JX, Jia LW, Liu WM, et al. Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum Reprod*. 2006;21:1698-1704.
106. Stecca B, Mas C, Clement V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5895-5900.
107. Detmer K, Thompson AJ, Garner RE, Walker AN, Gaffield W, Dannawi H. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;34:60-70.
108. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003;422:313-317.
109. Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN. Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res*. 2008;68:2058-2061.
110. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:1026-1033.
111. Xu M, Gong A, Yang H, et al. Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2015;369:124-133.
112. Ma X, Tian Y, Song Y, et al. Msi2 maintains quiescent state of hair follicle stem cells by directly repressing the Hh signaling pathway. *J Invest Dermatol*. 2017;137:1015-1024.
113. Wu SM, Choo AB, Yap MG, Chan KK. Role of sonic hedgehog signaling and the expression of its components in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2010;4:38-49.
114. Bambakidis NC, Wang X, Lukas RJ, Spetzler RF, Sonntag VK, Preul MC. Intravenous hedgehog agonist induces proliferation of neural and oligodendrocyte precursors in rodent spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2010;67:1709-1715.
115. Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, et al. Transfection with pax6 gene of mouse embryonic stem cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cells, in vitro. *Ophthalmic Res*. 2010;43:79-91.
116. Schneider AJ, Branam AM, Peterson RE. Intersection of AHR and Wnt signaling in development, health, and disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15:17852-17885.
117. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. Ahr signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 2018;7:1-9.
118. Rentas S, Holzapfel N, Belew MS, et al. Musashi-2 attenuates AHR signalling to expand human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016;532:508-511.
119. Murugan AK. mTOR: role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin Cancer Biol*. 2019;92-111, Aug 10. pii: S1044-579X(18)30135-4.
120. Wang S, Li N, Yousefi M, et al. Transformation of the intestinal epithelium by the MSI2 RNA-binding protein. *Nat Commun*. 2015;6:6517-6535.
121. Li N, Yousefi M, Nakauka-Ddamba A, et al. The Msi family of RNA-binding proteins function redundantly as intestinal Oncoproteins. *Cell Rep*. 2015;13:2440-2455.
122. Kharas MG, Lengner CJ. Stem cells, cancer, and MUSASHI in blood and guts. *Trends Cancer*. 2017;3:347-356.

How to cite this article: das Chagas PF, Baroni M, Brassesco MS, Tone LG. Interplay between the RNA binding-protein Musashi and developmental signaling pathways. *J Gene Med*. 2020;22:e3136. <https://doi.org/10.1002/jgm.3136>

11.2 Artigo submetido para publicação – 1ª parte dos resultados da presente pesquisa

27 Oct 2021

Dear Mr Chagas:

This is to acknowledge receipt of your manuscript titled "Knockdown of Musashi-1 inhibits cell cycle progression and decreases cisplatin chemoresistance while enhancing apoptosis in Group 3 and 4 medulloblastomas." Your manuscript number will be sent to you in a second email.

The submission id is: MOLN-D-21-01272

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: pablochagas30

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/moln/>.

Thank you very much for your contribution.

Sincerely,
Benedict C. Albeni, PhD, BCMAS, CRQM
Editor in Chief

P.S.: If your manuscript is accepted for publication in Molecular Neurobiology, you may wish to have it published with open access in our Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>.

Molecular Neurobiology

Knockdown of Musashi-1 inhibits cell cycle progression and decreases cisplatin chemoresistance while enhancing apoptosis in Group 3 and 4 medulloblastomas --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	Grp3-MB; Grp4-MBs; RNA Binding-protein; Musashi-1.
Corresponding Author:	Pablo Ferreira das Chagas Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Ribeirão Preto, São Paulo BRAZIL
First Author:	Pablo Ferreira das Chagas, MSc
Order of Authors:	Pablo Ferreira das Chagas, MSc Luciana Chain Veronez, PhD Graziella Ribeiro de Sousa, MSc Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro, PhD Carolina Alves Pereira Corrêa, PhD Fabiano Pinto Saggioro, MD, PhD Rosane Gomes de Paula Queiroz, PhD Suely Kazue Nagahashi Marie, MD, PhD Silvia Regina Brandalise, MD, PhD Izilda Aparecida Cardinali, MD, PhD Carlos Gilberto Carlotti Júnior, MD, PhD Hélio Rubens Machado, MD, PhD Marcelo Volpon Santos, MD, PhD Carlos Alberto Scrideli, MD, PhD Luiz Gonzaga Tone, MD, PhD Elvis Terci Valera, MD, PhD
Abstract:	Groups (Grp) 3 and 4 are the deadliest molecular subgroups of medulloblastoma (MB), with high rates of leptomeningeal dissemination. To date, there is still a paucity of biomarkers for these subtypes of MBs. The RNA-binding protein Musashi-1 (MSI1) is a neural stem cell marker, characterized as a regulator of gene translation and associated with high oncogenicity in several human cancers. In this study, we investigated the clinical significance and biological functions of MSI1 in Grp3/Grp4-MBs. First, we assessed the expression profile of MSI1 in 59 primary MB samples (15-WNT, 18-SHH, 9-Grp3, 17-Grp4 subgroups) by qRT-PCR and immunohistochemistry. MSI1 mRNA expression levels were also validated in an additional dataset of MBs (GSE85217). The ROC curve was used to validate the diagnostic standards of MSI1 expression. Cell cycle, cell viability, and apoptosis were evaluated in D283 Med cell-line (Grp3/Grp4-MBs) after shRNA-mediated knockdown of MSI1 plus cisplatin treatment. We identified an overexpression of MSI1 with a high diagnostic accuracy to discriminate Grp3/Grp4-MBs from non-Grp3/Grp4-MBs. In addition, MSI1 knockdown promoted cell cycle interruption in the G1/S transition and, consequently, decreased the number of cells in the G2/M phase, repressed cell proliferation and sensitized D283 Med cells to cisplatin treatment by enhancing cell apoptosis. In conclusion, the results of the present study are the first to demonstrate that MSI1 may act as a diagnostic biomarker for Grp3/Grp4-MBs. In addition, MSI1 knockdown combined with cisplatin may offer a potential strategy to be further research of individualized therapy to Grp3/Grp4-MBs.

[Click here to access/download;Manuscript;Chagas_et al_2021.docx](#)

✱

1

Knockdown of Musashi-1 inhibits cell cycle progression and decreases cisplatin chemoresistance while enhancing apoptosis in Group 3 and 4 medulloblastomas

Pablo Ferreira das Chagas^{1*}, Luciana Chain Veronez², Graziella Ribeiro de Sousa¹, Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro^{2,3,4}, Carolina Alves Pereira Corrêa²; Fabiano Pinto Saggioro^{5,6}, Rosane Gomes de Paula Queiroz², Suely Kazue Nagahashi Marie⁷, Sílvia Regina Brandalise⁸; Izilda Aparecida Cardinali⁸; Carlos Gilberto Carlotti Júnior⁹, Hélio Rubens Machado¹⁰; Marcelo Volpon Santos¹¹; Carlos Alberto Scrideli^{1,2}, Luiz Gonzaga Tone^{1,2}, Elvis Terci Valera²

¹ Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Department of Genetics, Ribeirão Preto, Brazil.

² Clinics Hospital - Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Department of Pediatrics, Ribeirão Preto, Brazil.

³ Harvard Medical School - Dana-Farber Cancer Institute, Department of Pediatric Oncology, Boston, MA, United States of America.

⁴ Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA.

⁵ Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto 3900 Bandeirantes Avenue, SP 14049-900, Brazil

⁶ Department of Pathology, Rede D'Or São Luiz Hospital, São Paulo Rua das Perobas, SP 04321-120, Brazil

⁷ Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Department of Neurology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁸ Boldrini's Children Center, Campinas, SP.

⁹ Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

¹⁰ Division of Pediatric Neurosurgery, Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

¹¹ Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Bandeirantes Av., 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

*Corresponding author: Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Bandeirantes Avenue, 3900, Ribeirão Preto, 14048-900, São Paulo, Brazil. e-mail: pablochagas@usp.br

Abstract

Groups (Grp) 3 and 4 are the deadliest molecular subgroups of medulloblastoma (MB), with high rates of leptomeningeal dissemination. To date, there is still a paucity of biomarkers for these subtypes of MBs. The RNA-binding protein Musashi-1 (*MSI1*) is a neural stem cell marker, characterized as a regulator of gene translation and associated with high oncogenicity in several human cancers. In this study, we investigated the clinical significance and biological functions of *MSI1* in Grp3/Grp4-MBs. First, we assessed the expression profile of *MSI1* 59 primary MB samples (15-WNT, 18-SHH, 9-Grp3, 17-Grp4 subgroups) by qRT-PCR and immunohistochemistry. *MSI1* mRNA expression levels were also validated in an additional dataset of MBs (GSE85217). The ROC curve was used to validate the diagnostic standards of *MSI1* expression. Cell cycle, cell viability, and apoptosis were evaluated in D283 Med cell-line (Grp3/Grp4-MBs) after shRNA-mediated knockdown of *MSI1* plus cisplatin treatment. We identified an overexpression of *MSI1* with a high diagnostic accuracy to discriminate Grp3/Grp4-MBs from non-Grp3/Grp4-MBs. In addition, *MSI1* knockdown promoted cell cycle interruption in the G1/S transition and, consequently, decreased the number of cells in the G2/M phase, repressed cell proliferation and sensitized D283 Med cells to cisplatin treatment by enhancing cell apoptosis. In conclusion, the results of the present study are the first to demonstrate that *MSI1* may act as a diagnostic biomarker for Grp3/Grp4-MBs. In addition, *MSI1* knockdown combined with cisplatin may offer a potential strategy to be further research of individualized therapy to Grp3/Grp4-MBs.

Keywords: Grp3-MB; Grp4-MBs; RNA Binding-protein; Musashi-1.

Introduction

Medulloblastoma (MB, World Health Organization grade IV) is the most common malignant brain tumor in the pediatric population [1]. MBs originate in the cerebellum and are classified into four different molecular subgroups: Wingless signaling activated WNT, Sonic Hedgehog SHH, Groups 3 (Grp3-MBs) and 4 (Grp4-MBs) [1, 2]. Grp3 accounts for 25% of all MB cases, representing the deadliest of all molecular subgroups with an overall survival (OS) of <60% (poor prognosis). On the other hand, although accounting for around 40% of MBs cases, Grp4-MBs are still poorly biologically characterized with an OS of >70% (intermediate prognosis). Intriguingly, both subgroups have a high propensity to metastasize [3-5]. Currently, the treatment options for MBs are based on multimodal strategies that include maximal safe resection, chemotherapy and radiotherapy [3]. However, surviving patients often suffer severe treatment-related side effects, including permanent cognitive and motor disabilities, particularly infants and children of pre-scholar age [5, 6]. In this context, it is of note the scantiness of effective targeted-therapies for Grp3/Grp4-MBs that could provide better overall survival, aligned with an improvement in patients' life quality. In fact, this reflects a challenge in the daily clinical practice due to the limited understanding of tumorigenesis and the inconclusive molecular stratification for Grp3/Grp4-MBs [1, 3].

Musashi-1 (*MSI1*) is an evolutionarily highly-conserved gene and member of the RNA-binding proteins (RBP) family, that was first identified in *Drosophila* sp. in 1994. Interestingly, this group of proteins received this name in honor to Miyamoto Musashi, a great swordsman of the Eastern culture [7]. *MSI1* is crucial in the initiation of the development of the central nervous system (CNS) and is vastly expressed in neural progenitor cells of vertebrates, being characterized as neuronal stem cell (SC) marker [8-10]. *MSI1* acts through its direct interaction with the 3'-UTR (3' untranslated region) in several mRNA targets in a post-transcriptional level, inducing the increase or silencing the expression of these genes. For this reason, *MSI1* is recognized as a translational regulator of cell fate decisions and maintenance of the stem cell state [11, 12]. Dysregulations in *MSI1* expression can lead to cellular dysfunctions promoting tissue instability, as well as tumorigenesis [13]. Additionally, *MSI1* have been reported to regulate cell cycle, chemoresistance, proliferation and cell death in several tumors, including tumors of the CNS such as gliomas, glioblastomas and astrocytomas. Thus, in recent years, the role of *MSI1* in cancer has gained increasing interest [14-16].

Herein, we identified an overexpression of *MSI1* in Grp3/Grp4-MBs in a Brazilian cohort and in an independent dataset (GSE85217) of pediatric MBs. Next, the overexpression of *MSI1* in Grp3/Grp4-MBs tumor samples were confirmed by immunohistochemistry. Besides, we also observed a significant diagnostic importance of *MSI1* expression in the discrimination between Grp3/Grp4-MBs from non-Grp3/Grp4-MBs. knockdown of *MSI1* by short-hairpin (sh) RNA in D283 Med cell-line (classified as Grp3/Grp4-MBs) promoted cell cycle interruption in the G1/S transition and, consequently, decreased the number of cells in the G2/M phase, repressed cell growth and sensitized these cells to cisplatin treatment by enhancing cell apoptosis. Overall, our study provides for the first time, new insights of *MSI1* as potential target involved in Grp3/Grp4-MBs carcinogenesis.

Materials and Methods

Case Series / RNA extraction and cDNA synthesis

MSII mRNA levels were evaluated in a total of 59 pediatric patients (0-19 years) diagnosed with MBs in three Brazilian institutions that were previously classified as WNT (n=15), SHH (n=18), Grp3 (n=9), and Grp4 (n=17) [17], and in five non-neoplastic cerebellum, serving as controls. Total RNA was extracted from pediatric MB tissues and cell-lines using Trizol reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, USA) or AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturers' specifications. RNA concentrations were determined by using the ND-1000 Spectrophotometer device (NanoDrop 1000 Technologies, Wilmington, DE, USA). The reverse transcription reaction for the synthesis of complementary DNA strand (cDNA) was performed using 500ng of total RNA and the High Capacity kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Additionally, expression data of an independent cohort of pediatric MBs (GSE85217, n=629) was downloaded from R2 Platform (Analysis and Visualization Platform – <http://r2.amc.nl>) [2] and used to validate *MSII* expression levels between the different molecular subgroups of MBs.

Cell lines and culture conditions

The pediatric MB cell lines D283 Med and USP-13-MED 4 [18, 19] (Grp3/4-MBs), and the Human Embryonic Kidney 293 cell (HEK93T) were used in this study. D283 Med (ATCC HTB-185) and HEK-293 (ATCC CRL-1573) cells were obtained from the American Type Culture Collection, and the USP 13-MED cell line was kindly provided by Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto - Biosciences Institute of the University of São Paulo. The cell lines authentications were performed to validate the Short Tandem Repeat (STR) profile. All cells were maintained in DMEM/F12 medium (Gibco™, Thermo Fisher®, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and kept in a humid atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Relative mRNA expression levels were measured by quantitative PCR using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA- *MSII* Hs01045894_m1) in 59 pediatric MB samples, and in D283 Med and USP-13-MED cell lines. The reactions were performed on QuantStudio™ 12k Flex system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using two internal controls: *GUSB* (Beta Glucuronidase) (Hs4333767F_m1) and *HIPRT* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) (Hs4310809E_m1). The data were analyzed using the 2^{-ΔΔCT} method and non-neoplastic cerebellum samples were used as calibrators [20].

Immunohistochemistry (IHC)

IHC staining was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FPFE) tissue sections (4 μ m) of eight MB samples (WNT n=2; SHH n=1; Grp3 n=3 and Grp4 n=2) using the detection system EnVision™ polymer (Dako, Glostrup, Denmark), following the manufacturers' recommendations. The antigen retrieval was carried out using citrate buffer (pH 6.0). The slides were incubated with anti-MSI1 antibody (dilution 1:70 cat. no. #5663, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Cerebral cortex was used as positive control [21]. The immunostaining was analyzed by a savvy neuropathologist, considering as positive cells those with cytoplasmic and/or nuclear staining for MSI1. Positive cells were scored according to the percentage of stained cells as following: Score (+) %, percentage of MSI1 positive tumor cells. + (< 25%), ++ (< 25-50%), +++ (< 50-75%) and ++++ (< 75-100%). Intensity of immunostaining (immunoreactivity) in tumor cells: Low (+), Strong (+ +). Representative cases were captured at \times 40 magnification using Nikon ECLIPSE 80i.

Western blot (WB)

The wild type and transduced cells lines were lysed on ice in lysis buffer containing freshly added protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA). Protein extracts (50 μ g) were size-fractionated by SDS-PAGE and proteins were immunoblotted with anti-MSI1 (dilution 1:1000, cat. no. #5663, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). All antibodies were diluted according to manufacturer's instructions and HRP-conjugated goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used as a secondary antibody. The results were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.), and the relative quantification of protein expression was determined using ImageJ® software (National Institutes of Health).

Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, D283 Med and USP-13-MED cells were grown on glass coverslips and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 1X for 15 minutes. After fixation, cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 at room temperature, washed with PBS 1X, and incubated with a blocking buffer (2% bovine serum albumin) for two hours. Samples were then incubated with primary antibody (1:500, Anti-Musashi-1 (D46A8) Rabbit mAb #5663, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) in blocking buffer at 4°C overnight. Finally, cells were washed three times with PBS 1X and then stained with Alexa Fluor 647 anti-rabbit secondary antibodies (1:2500) diluted in blocking buffer containing Alexa Fluor™ 488 Phalloidin – ThermoFisher (1:40) for 1 hour, followed by three washes in PBS 1X. Coverslips were mounted in ProLong Gold Mounting Medium containing the nuclear stain 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Images were obtained using a laser scanning confocal microscope Leica DM2500 (LeicaBiosystems, Wetzlar, Alemanha) and the software LAS (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Negative controls included incubation with secondary antibodies alone.

Lentivirus-mediated short hairpin RNA (shRNA) knockdown of gene expression

Silencing of *MSI1* was performed using two shRNA vectors (pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>hMSI1[shRNA#1] and pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>hMSI1[shRNA#2]), and their respective control (pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Bsd-U6>Scramble_shRNA#1) acquired from Vector Builder (<https://en.vectorbuilder.com>) containing a gene for blasticidin resistance. Plasmids were expanded in LB medium supplemented with 100 µg/mL of Ampicillin; and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit protocol (Qiagen Company, Hilden, Germany, #Cat. 27104), following manufacturer's instructions. To analyze the yield and purity of the plasmids, the NanoDrop Spectrophotometer device (Thermo Scientific, DE, USA) was used. Lentiviral particles were produced by co-transfection of the trans-lentiviral packaging mix with a shRNA transfer vector into HEK 293T packaging cells (OpenBiosystems). For cell infection, viral supernatants were supplemented with 6 µg/mL polybrene and incubated with cells for 24 hours. D283 Med transduced cells were selected with blasticidin (10 µg/mL) for 7 days.

Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, 17.5×10^4 (D283 Med *MSI1* knockdown and control shRNA Scramble) cells were plated in 6-well plates and kept in culture for 72h, without treatment. Then, cells were trypsinized and centrifuged at 1200 rpm/5 min and washed with PBS 1X. Cells were fixed with 70% cold ethanol and incubated at -20° C overnight. Cells were then centrifuged at 800rpm/5 min, washed with PBS 1X, and incubated with 25 µL of RNase A (10 ng/mL) at 37° C for 30 min. Next, centrifugation step was repeated and cells were stained with 100 µL of PI (50 µg/mL) shortly before acquisition by BD FACS Calibur™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The assay was performed in triplicate. Data were analyzed using FlowJo software.

Cell viability Assay

Cell viability was detected using CellTiter Glo® reagent (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 6×10^3 (D283 Med *MSI1* knockdown and control shRNA Scramble) cells were plated in 96-well plates. The cells were treated with cisplatin at different concentrations (3 µM, 5 µM, 7 µM and 10 µM) for 72h, and the results were obtained through SpectraMax® L Microplate Reader device. The assay was performed in triplicate. Furthermore, the concentration of cisplatin that inhibited 50% of cell viability (IC_{50}) was determined by using the CalcuSyn Software (Biosoft, Cambridge, UK).

Apoptosis detection

In total 17.5×10^4 cells (D283 Med *MSI1* knockdown and control shRNA Scramble) were plated and treatment for 72h with cisplatin at a dose of 4.1 µM. The detection of cell death was performed by labeling apoptotic cells with Annexin V (APC) (BD Biosciences Pharmingen, USA) and Propidium Iodide (PI). Cells were trypsinized and centrifuged at 1200 rpm for 5 min at 4°C, washed with ice-cold PBS 1X

and then resuspended in 200 μ L of 1X binding buffer (BD Biosciences Pharmingen, USA) with 5 μ L of annexin-V and 50 μ L of a solution of PI (50 μ M), and incubated for 15 minutes, protected from light, at room temperature. Cells were analyzed by BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The experiments were carried out in triplicate. Data were analyzed using FlowJo 8.7 software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software's (Graph Prism 5.0 GraphPad Software, San Diego, CA USA) and SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Comparisons between two or more groups were carried out using Kruskal-Wallis and One-way-ANOVA, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate the discrimination of Grp3/Grp4-MBs from the other molecular subgroups according to *MSI1* expression levels. The accuracy was determined by the area under the curve (AUC). A p-value ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Clinicopathological features of a Brazilian cohort of MBs cases

Clinical data of our cohort of pediatric MB are summarized in (Fig. 1a). The cohort included 59 primary cases of MBs, in which 15/59 (25.5%) were WNT-MBs, 18/59 (30.5%) SHH-MBs, 9/59 (15.3%) Grp3-MBs and 17/59 (28.7%) Grp4-MBs. Thirty-five children were male and 24 were female, and 13/59 (22%) were younger than 3 years at diagnosis. Thirty-eight patients (38/57, 66.6%) achieved gross total and 19 (19/57, 33.4%) subtotal resection. Twenty patients showed metastasis at diagnosis (20/59, 33%). In addition, 90% (18/20) of these cases were classified as high-risk. Survival data analysis were performed for all the 59 patients with a median follow-up of 53.9 months (ranging from 3 to 163 months) for progression-free survival (PFS), and 56.4 months (ranging from 3 to 168 months) for overall survival (OS) in 5 years (data not shown).

MSI1 is overexpressed in Grp3/Grp4-MBs subtypes: analysis of an in-house cohort

In order to examine the expression profile of *MSI1* in pediatric MBs, we determined its mRNA expression levels in a Brazilian cohort of 59 MB samples (WNT: n=15; SHH: n=18; Grp3: n=9 and Grp4: n=17) and five non-neoplastic cerebellums. Furthermore, we explored *MSI1* expression level between different pediatric MB subgroups in a public available dataset (GSE85217: WNT n=51; SHH n=146; Grp3 n=131 and Grp4 n=300). Interestingly, an overexpression of *MSI1* was observed in MBs tissues when compared to normal cerebellum ($P < 0.05$, Fig. 1b). Within tumors, *MSI1* expression was higher in Grp3/Grp4-MBs ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively) when compared to WNT and SHH-MBs subtypes in our cohorts and we also confirmed the overexpression of *MSI1* to Grp3/Grp4-MBs using the GSE85217 dataset (Figs. 1b,c).

Once we observed that *MSI1* was overexpressed in both Grp3/Grp4-MBs, we further evaluated its potential significance as a predictive biomarker for those MB subgroups. Thus, receiver operating characteristic (ROC) analysis was employed to examine the discrimination accuracy of the *MSI1* as a diagnostic marker for Grp3/Grp4-MBs. As shown in (Fig.1d), the area under the ROC curve was 0.856 ($p < 0.001$), suggesting a significant high diagnostic accuracy in the discrimination between Grp3/Grp4-MBs from non-Grp3/Grp4-MBs.

To reinforce our initial hypothesis, we evaluated the Immunoreactivity of monoclonal anti-*MSI1* antibody in formalin-fixed paraffin-embedded samples of pediatric MBs (WNT $n=2$; SHH $n=1$; Grp3 $n=3$ and Grp4 $n=2$) by the immunological staining, as summarized in Table 1. At the proteomic level, *MSI1* staining was strong with score (+) %, percentage of *MSI1* positive tumor cells of the +++ (<50-75%) and ++++ (<75-100%) in Grp3 ($n=3$) and Grp4-MBs ($n=2$) tissues (both in nucleus and in the cytoplasm) and low in WNT ($n=2$) and SHH ($n=1$) tumors with score (+) %, percentage of *MSI1* positive tumor cells of the + (<25%), ++ (<25-50%), both in nucleus and in the cytoplasm as well (Fig. 2a-h and Table 1). Of note, the number of MBs biopsies included in the immunohistochemical staining was limited and insufficient to be correlated to any clinical feature. In sum, this finding suggests that *MSI1* may be a promising diagnostic biomarker for patients with Grp3/Grp4-MBs.

***MSI1* is overexpressed in D283 Med: Grp3/Grp4-MBs cell lines**

The mRNA and protein levels by *western blot* and immunofluorescence of the *MSI1* were also evaluated in two MB cell lines classified as Grp3/Grp4-MBs available in our laboratory: D283 Med and USP-13-MED [18, 19]. The D283-Med cells showed an increased expression of *MSI1* in contrast to USP-13-MED ($p < 0.01$), as shown in (Fig. 3a). At the proteic level, the D283 Med cell line consistently showed higher concentrations of *MSI1* when compared to USP-13-MED cells (Figs. 3b, c) by *western blot* analysis. Interestingly, our results of immunofluorescence in the D283 Med cell line, showed *MSI1* strongly stained in the cytoplasmic and nuclei, while in the USP-13-MED, weak *MSI1* staining was observed in the cytoplasm, with punctual staining in apical cell extensions of cell-to-cell contact (Figs. 3d, e). According to these data, we selected the D283-Med cell line to explore the functional roles of *MSI1* into Grp3/Grp4-MBs cells.

Thus, the knockdown of *MSI1* was performed in D283 Med cell line by using lentiviral transduction with two different vectors named as shRNA_ *MSI1*#1 constructed to the Exon 4 region and shRNA_ *MSI1*#2 to the Exon 8 of *MSI1* gene structure (Fig. 4a), as well as an empty vector (pure/empty vector - shRNA_Scramble) as a control. After transduction, no morphologic changes were observed in the cells (Figs. 4 b-d). The qRT-PCR analysis showed a reduction of approximately 60% in shRNA_ *MSI1*#1 and 85% of *MSI1* mRNA levels in shRNA_ *MSI1*#2 ($p < 0.001$) cells relative to control (shRNA_Scramble; Fig. 4e). Similarly, the *western blot* analysis of transduced cells revealed a significant reduction of *MSI1* protein levels in both shRNA_ *MSI1*#1 ($p < 0.05$) and shRNA_ *MSI1*#2 ($p < 0.001$) cells compared with the control (Figs. 4f-g). Of note, the silencing of *MSI1* was more significant in the cells transduced with the second clone (shRNA_ *MSI1*#2).

***MSI1* knockdown decreased the number of cells in G2/M phase**

Remarkably, *MSI1* is known to be associated with cell cycle dysfunction [11]. Thus, we next investigated whether the genetic silencing of *MSI1* would affect cell cycle progression. A higher percentage of D283 Med shRNA_ *MSI1*#1 cells were observed in the G0/G1 ($p < 0.0001$) and S phase ($p < 0.001$) compared to control (Figs. 5a-d). However, *MSI1* knockdown decreased the number of cells in G2/M phase in both D283 Med shRNA_ *MSI1*#1 and D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively; Fig. 5d).

***MSI1* knockdown decreases chemoresistance to cisplatin and increases cell death by apoptosis**

Once MBs frequently present resistance to cisplatin treatment [22], we attempted to investigate whether the overexpression of *MSI1* is involved in chemoresistance of Grp3/Grp4-MBs cancer cells. To this end, we performed cell viability assays to uncover the effect of the *MSI1* silencing on cellular sensitivity to cisplatin and MB progression in vitro. As shown in (Fig. 5c), D283 Med shRNA_ *MSI1*#1 and D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 cells were more sensitive to chemotherapy compared to shRNA_ Scramble ($p < 0.05$) when treated with different concentrations (3, 5, 7 and 10 μM) of cisplatin for 72h. In addition, we observe that knockdown *MSI1* cells were more sensitive to treatment with cisplatin (shRNA_ *MSI1*#1 | IC_{50} 4.1 μM and shRNA_ *MSI1*#2 | IC_{50} 6.6 μM) when compared to control shRNA_ Scramble, IC_{50} 10.98 μM (Fig. 5e and Table 02).

To further investigate the mechanism by which *MSI1* knockdown decreases cisplatin resistance, we evaluated the role *MSI1* silencing in triggering cell apoptosis. Annexin V/PI-positive cells were counted as an index of cell death, at the time of 72h treatment, using cisplatin at 4.1 μM (lower dose). As expected, cisplatin treatment induced a significant increase in the apoptosis ratio in the shRNA_ Scramble (30%, $p < 0.01$), shRNA_ *MSI1*#1 (12%, $p < 0.001$) and shRNA_ *MSI1*#2 (63%, $p < 0.001$) compared to untreated cells (Figs. 5f, g). However, this effect was more pronounced in shRNA_ *MSI1*#2 (63%, $p < 0.001$) cells, in which we observed an induction around 9 times greater in the rate of apoptosis after cisplatin treatment, while in the shRNA_ Scramble this increase was of approximately 5 times (Fig. 5g). Collectively, our findings suggest that *MSI1* knockdown represses D283 Med cells progression whereas sensitizes these cells to cisplatin by enhancing apoptosis of Grp3/Grp4-MBs cancer cells.

Discussion

Currently, the paucity of specific target therapies associated to an increased tumor resistance to current chemotherapeutic regimens are key clinical challenges of Grp3/Grp4-MBs treatment [2, 23]. In this study, we investigated the expression profile and functional roles of *MSI1*, a marker and a regulator of neural stem cells [8, 10-12], in Grp3/Grp4-MBs. *MSI1* is recognized as a key regulator of neural stem cell proliferation and maintenance within the Dentate Gyrus, a part of the hippocampal formation in the temporal lobe of the brain and the Sub-Ventricular Zone [24]. Of note, any dysregulation of *MSI1* expression is associated with tissue instability and can lead to tumorigenesis [13, 25].

Recent insights into molecular subtype MBs origins hypothesized that during early cerebellar development, the Grp3-MBs arise from progenitor cells of the outer granular layer while Grp4-MBs originate from cells of the upper rhombic lip (uRL) [26, 27]. Herein, we demonstrated that *MSI1* is upregulated in MB tissues compared to normal cerebellum and highlighted its overexpression specifically in Grp3/Grp4-MBs, in contrast to the other MBs subtypes. Thus, we suggest that the overexpression of *MSI1* may be involved in some level of deregulation of neural progenitor's stem cells in the postnatal cerebellum and may contribute MB tumorigenesis.

Consistently with our results, the overexpression of *MSI1* was found in different pediatric brain tumors, such as glioblastomas, gliomas and ependymomas, as well as MBs [14, 15, 28-30]. VO Dat T. *et al.*, (2012) have shown that increased levels *MSI1* in MBs tissues were associated with poor overall and progression-free survival [30]. Due to the limited number of MB biopsies available for immunostaining in our cohort, it was not possible to correlate the levels of *MSI1* expression to any clinical feature in Grp3/Grp4-MBs. On the other hand, by using ROC analysis we demonstrated a very high diagnostic value of *MSI1* expression in identifying Grp3/Grp4 cases of MBs, indicating that *MSI1* may be a potential biomarker and could be useful as a therapeutic target not only for Grp3-MBs, but possibly to Grp4-MBs as well. To our knowledge, the present study is the first to demonstrate the *MSI1* as a common oncogenic driver for Grp3/Grp4-MBs.

Given that cancer is the result of multiple genetic alterations, there are a lot of transcriptional and post-transcriptional mechanisms modulated by RBP's that are involved into important cellular processes, such as cell proliferation and cell fate [11]. However, the role and the underlying molecular mechanisms in which the overexpression of *MSI1* could lead to Grp3/Grp4-MBs carcinogenesis remained unexplored. Surprisingly, we observed that the knockdown of *MSI1* promoted cell cycle interruption in the G1/S transition and, consequently, decreased the number of cells in the G2/M phase in Grp3/Grp4-MBs cells. Cell cycle arrest is one important mechanisms by which cancer cells growth may be suppressed [31]. Interestingly, *MSI1* has been proposed to act as a repressor of the translation of mRNAs encoding inhibitors of cell cycle progression [32, 33]. Curiously, previous reports have shown that *MSI1* modulates endometrial carcinoma cell cycle progression by p21^(WAF1/CIP1) regulation [34]. In addition, the knockdown of *MSI1* induced cell cycle arrest at the G1/S phase in hepatoma cells *in vitro* [35], as well as inhibited cell cycle progression by targeting p21 and p27 in human osteosarcoma cells [36]. Recently, a robust study has demonstrated that many of the main target genes of *MSI1* in glioblastoma are involved in cell cycle control, highlighting the cyclin-dependent kinases: *CDK2*, *CDK6*, *CCNA1*, *CCNA2*, as well as p21, and p27 [37].

Another crucial aspect of our study was to investigate whether *MSI1* is involved in the progression, drug resistance and induction of programmed cell death in Grp3/Grp4-MBs carcinogenesis. Interestingly, we found that the knockdown of *MSI1* in Grp3/Grp4-MBs cell lines decreased cell survival rate (cell viability) and enhanced cell death by apoptosis in response to cisplatin treatment. Although more studies are clearly necessary to unravel the mechanistic relationships between these phenomena, in agreement with our findings, it has been reported that *MSI1* is involved in drug resistance of colorectal cancer cells [38], glioblastoma [39] as well as gastric cancer [40].

Likewise, detailed understanding on how *MSI1* may contribute to the processes of drug resistance and cell death in cancer remains an unanswered question. Thereby, one of the main goals of this research was to investigate MB cell-line behavior following *MSI1* silencing in association to cisplatin. More recently, new compounds were described to be able to disrupt *MSI1* regulatory functions. These novel *MSI1* inhibitors may be interesting drugs to be tested in animal models, in association to classical chemotherapeutic agents (i.e. cisplatin) for Grp3/4 MB, in order to define if this association may recapitulate tumor arrest and decrease of cisplatin chemoresistance in this setting. Certainly, it would be interesting to test this hypothesis with appropriate patient-derived models of Grp3/Grp4-MBs, in order to translate our finding from bench-side to bedside. Our study has some limitations: the number of patients with MB we were able to include in this study is small. Also, we were able to validate *MSI1* expression by IHC only in a few numbers of cases.

Taken together, our results demonstrated that *MSI1* is overexpressed in Grp3/Grp4-MBs when compared to non- Grp3/Grp4 tumors. In addition, our findings provide for the first time, experimental evidence indicating that *MSI1* knockdown in association to cisplatin enhances tumor apoptosis by promoted cell cycle interruption and ultimately decreasing cisplatin chemoresistance. These *in-vitro* evidences may support further investigation on the potential role of combining *MSI1* inhibitors to chemotherapy for Grp3/Grp4-MBs.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Mirella Baroni Milan, Dr. Karina Bezerra Salomão, Dr. Ricardo Bonfim Silva, Me. Veridiana Kiill Suazo, Elizabeth Perna and Deise Chesca for the laboratorial assistance. In addition, we thanks to Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto for kindly have provided the USP-13-MED cell line for our research. To Dr Luciano Neder for his diagnostic support on neuropathology. Finally, we would like to thank the patients and families affected by medulloblastomas for their generous contributions to this study.

Author contribution

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: P.F.C designed, conducted, interpreted all experiments, and wrote the manuscript. L.C.V; G.R.S; G.A.V.C; and C.A.P.C wrote and organized the data, created the figures/tables, edited and critically revised the manuscript. FPS performed the histopathologic analysis. R.G.P.Q, S.K.N.M, S.R.B, I.A.C; C.G.C.J, H.R.M, M.V.S and C.A.S revised the text for important intellectual content. L.G.T and E.T.V designed the study and critically read the manuscript. All authors critically read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), Grant numbers: 2014/20341-0, 2017/26160-5; the Brazilian Research Council (CNPq); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Finance Code 001; and the Foundation for Support of Education, Research and Assistance (FAEPA) of the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical

School - USP, Brazil.

Data availability statement

The data and other items supporting the results of the study will be made available upon reasonable request.

Declarations

Ethics Approval

This study was approved by the HC/FMRP-USP Research Ethics Committee (Approval number: CAAE: 39356920.0.0000.5440) and informed consent was obtained from all patients included.

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, et al. (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23: 1231-1251. DOI 10.1093/neuonc/noab106
2. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, Garzia L, Torchia J, Nor C, Morrissy AS, et al. (2017) Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 31: 737-754. e736. DOI 10.1016/j.ccell.2017.05.005
3. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, Gröbner S, Segura-Wang M, Zichner T, Rudneva VA, et al. (2017) The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 547: 311-317. DOI 10.1038/nature22973
4. Sharma T, Schwalbe EC, Williamson D, Sill M, Hovestadt V, Mynarek M, Rutkowski S, Robinson GW, Gajjar A, Cavalli F, et al. (2019) Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathol* 138: 309-326. DOI 10.1007/s00401-019-02020-0
5. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, Kool M, Dufour C, Vassal G, Milde T, et al. (2016) Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 131: 821-831. DOI 10.1007/s00401-016-1569-6
6. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, et al. (2011) Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol* 29: 1424-1430. DOI 10.1200/JCO.2010.28.5148
7. Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C (1994) Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. *Neuron* 13: 67-81. DOI 10.1016/0896-6273(94)90460-x
8. Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H (2000) Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 22: 139-153. DOI 10.1159/000017435

9. Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, et al. (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176: 230-242. DOI 10.1006/dbio.1996.0130
10. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H (2001) Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci* 21: 8091-8107
11. Kudinov AE, Karanicolas J, Golemis EA, Bumber Y (2017) Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clin Cancer Res* 23: 2143-2153. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-16-2728
12. Okano H, Imai T, Okabe M (2002) Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci* 115: 1355-1359
13. das Chagas PF, Baroni M, Brassesco MS, Tone LG (2020) Interplay between the RNA binding-protein Musashi and developmental signaling pathways. *J Gene Med* 22: e3136. DOI 10.1002/jgm.3136
14. Dahlrot RH, Hansen S, Herrstedt J, Schröder HD, Hjelmberg J, Kristensen BW (2013) Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. *J Neurooncol* 115: 453-461. DOI 10.1007/s11060-013-1246-8
15. Lin JC, Tsai JT, Chao TY, Ma HI, Liu WH (2019) Musashi-1 Enhances Glioblastoma Migration by Promoting ICAM1 Translation. *Neoplasia* 21: 459-468. DOI 10.1016/j.neo.2019.02.006
16. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008) Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 86: 31-45. DOI 10.1007/s11060-007-9439-7
17. Cruzeiro GAV, Salomão KB, de Biagi CAO, Baumgartner M, Sturm D, Lira RCP, de Almeida Magalhães T, Baroni Milan M, da Silva Silveira V, Saggiaro FP, et al. (2019) A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma subgrouping. *Acta Neuropathol Commun* 7: 33. DOI 10.1186/s40478-019-0681-y
18. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, Halperin EC, Bigner DD (1985) Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 592-605. DOI 10.1097/00005072-198511000-00005
19. Silva PB, Rodini CO, Kaid C, Nakahata AM, Pereira MC, Matushita H, Costa SS, Okamoto OK (2016) Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology* 68: 1545-1560. DOI 10.1007/s10616-015-9914-5
20. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108. DOI 10.1038/nprot.2008.73
21. Lovell MA, Markesbery WR (2005) Ectopic expression of Musashi-1 in Alzheimer disease and Pick disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 675-680. DOI 10.1097/01.jnen.0000173891.17176.5b
22. Gilbertson RJ (2004) Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol* 5: 209-218. DOI 10.1016/S1470-2045(04)01424-X
23. Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, Lin JC, Boca SM, Carter H, Samayoa J, Bettgowda C, et al. (2011) The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 331: 435-439. DOI 10.1126/science.1198056

24. Sakakibara S, Okano H (1997) Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *J Neurosci* 17: 8300-8312
25. Fox RG, Park FD, Koechlein CS, Kritzik M, Reya T (2015) Musashi signaling in stem cells and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31: 249-267. DOI 10.1146/annurev-cellbio-100814-125446
26. Marino S (2005) Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11: 17-22. DOI 10.1016/j.molmed.2004.11.008
27. Lin CY, Erkek S, Tong Y, Yin L, Federation AJ, Zapatka M, Haldipur P, Kawachi D, Risch T, Warnatz HJ, et al. (2016) Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature* 530: 57-62. DOI 10.1038/nature16546
28. Nakano A, Kanemura Y, Mori K, Kodama E, Yamamoto A, Sakamoto H, Nakamura Y, Okano H, Yamasaki M, Arita N (2007) Expression of the Neural RNA-binding protein Musashi1 in pediatric brain tumors. *Pediatr Neurosurg* 43: 279-284. DOI 10.1159/000103307
29. Toda M, Iizuka Y, Yu W, Imai T, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Okano H, Uyemura K (2001) Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia* 34: 1-7. DOI 10.1002/glia.1034
30. Vo DT, Subramaniam D, Remke M, Burton TL, Uren PJ, Gelfond JA, de Sousa Abreu R, Burns SC, Qiao M, Suresh U, et al. (2012) The RNA-binding protein Musashi1 affects medulloblastoma growth via a network of cancer-related genes and is an indicator of poor prognosis. *Am J Pathol* 181: 1762-1772. DOI 10.1016/j.ajpath.2012.07.031
31. Williams GH, Stoeber K (2012) The cell cycle and cancer. *J Pathol* 226: 352-364. DOI 10.1002/path.3022
32. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T (2005) Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res* 306: 349-356. DOI 10.1016/j.yexcr.2005.02.021
33. MacNicol MC, Cragle CE, MacNicol AM (2011) Context-dependent regulation of Musashi-mediated mRNA translation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 10: 39-44. DOI 10.4161/cc.10.1.14388
34. Götte M, Greve B, Kelsch R, Müller-Uthoff H, Weiss K, Kharabi Masouleh B, Sibrowski W, Kiesel L, Buchweitz O (2011) The adult stem cell marker Musashi-1 modulates endometrial carcinoma cell cycle progression and apoptosis via Notch-1 and p21WAF1/CIP1. *Int J Cancer* 129: 2042-2049. DOI 10.1002/ijc.25856
35. Li J, Yan K, Yang Y, Li H, Wang Z, Xu X (2019) [Musashi-1 positively regulates growth and proliferation of hepatoma cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 39: 1436-1442. DOI 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.12.07
36. Niu J, Zhao X, Liu Q, Yang J (2017) Knockdown of MSII inhibited the cell proliferation of human osteosarcoma cells by targeting p21 and p27. *Oncol Lett* 14: 5271-5278. DOI 10.3892/ol.2017.6870
37. Baroni M, Yi C, Choudhary S, Lei X, Kostic A, Grieshaber D, Velasco M, Qiao M, Burns SS, Araujo PR, et al. (2021) Musashi1 Contribution to Glioblastoma Development via Regulation of a Network of DNA Replication, Cell Cycle and Division Genes. *Cancers (Basel)* 13. DOI 10.3390/cancers13071494
38. Chiou GY, Yang TW, Huang CC, Tang CY, Yen JY, Tsai MC, Chen HY, Fadhilah N, Lin CC, Jong YJ (2017) Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells. *Sci Rep* 7: 2172. DOI 10.1038/s41598-017-02057-9

39. Chen HY, Lin LT, Wang ML, Tsai KL, Huang PI, Yang YP, Lee YY, Chen YW, Lo WL, Lan YT, et al. (2018) Musashi-1 promotes chemoresistant granule formation by PKR/eIF2 α signalling cascade in refractory glioblastoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864: 1850-1861. DOI 10.1016/j.bbdis.2018.02.017
40. Xu M, Gong A, Yang H, George SK, Jiao Z, Huang H, Jiang X, Zhang Y (2015) Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. *Cancer Lett* 369: 124-133. DOI 10.1016/j.canlet.2015.08.005

Figure Legends

Fig. 1 Clinicopathological features and *MSI1* expression overview in a Brazilian cohort of MBs. (a) Summary of clinical features and molecular characteristics of tumor samples from 59 pediatric patients: Molecular classification (WNT-MBs; SHH-MBs; Grp3-MBs and Grp4-MBs); Sex of patient (female or male); Age at diagnosis (below or above 3 years); Resection (Gross total resection GTR or subtotal resection STR); Metastasis (Absence or Present); Risk (Average or High); Relapse presence of postoperative disease (yes or no); Progressive event (alive or relapse/dead); Disease status (alive; dead for MBs or others). Samples used for the evaluation of *MSI1* expression by IHC (immunohistochemistry). (b) Relative gene expression of *MSI1* in an in-house cohort of MBs and normal cerebellum (Cerebellum n=5; WNT n=15; SHH n=18; Grp3 n=9 and Grp4 n=17) by qRT-PCR. ANOVA were conducted using the Tukey multiple comparisons posttest to assess the statistical significance between groups. *indicates (p<0.01), ** (p<0.001) and **** (p<0.0001). (c) Evaluation of *MSI1* expression profiling in pediatric MBs using data expression of dataset GSE85217 (MBs samples: WNT n=51; SHH n=146; Grp3 n=131 and Grp4 n=300). (d) Receiver operating characteristic (ROC) analysis of the diagnostic value of *MSI1* in distinguishing Grp3/Grp4-MBs and WNT/SHH-MBs based on data expression of an in-house cohort.

Fig. 2 *MSI1* Immunostaining and prediction. (a-h) Representative microscopic images of indicated the *MSI1* staining (brown) showing reactivity levels in MBs tissues by IHQ. WNT/SHH-MBs subtypes exhibited the low immunostaining to *MSI1* (<50%), in contrast the Grp3/Grp4-MBs demonstrate high immunostaining to *MSI1* (<100%). Both of subtypes showed nucleus and cytoplasm labeled. Scale bar, 50 μ m. Original magnification \times 20.

Fig. 3 Characterization of *MSI1* expression in Grp3/Grp4-MBs cell line models: (a) Relative expression of *MSI1* by RT-qPCR in D283 Med and USP-13-MED cell lines. The graph shows the mean \pm standard deviation of three independent experiments (*p<0.01). (b) Relative *MSI1* protein quantification. (c) Representative image of protein profile of *MSI1* by *Western blot* in pediatric MB cell lines D283 Med and USP-13-MED. GAPDH protein was used as an endogenous control. The relative quantification of protein expression was determined by ImageJ software. Representative photomicrographs of the immunofluorescence technique: Fluorescence intensity and location of *MSI1* (magenta). (d) D283 Med – strong intensity for the nucleus and cytoplasm; (e) USP-13-MED – medium intensity for the cytoplasm and

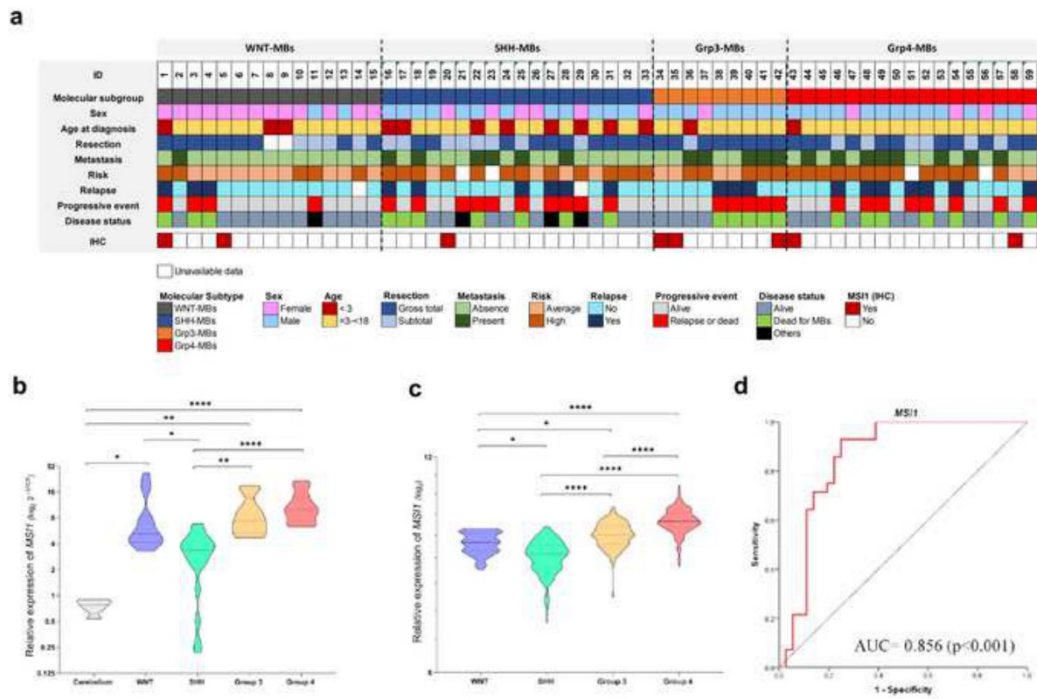
weak for the nucleus. Notes: Expression of *MSI1* in cell lines was examined using indirect immunofluorescence method. Analysis by confocal laser scanning microscopy.

Fig. 4 Conceptual design and workflow of *MSI1* knockdown: (a) Genetic localization and genomic representation of *MSI1*. Lentiviral vectors, shRNA_ *MSI1*#1 and shRNA_ *MSI1*#2, were constructed for Exons 4 and 8, respectively. Morphologic illustration of (b) D283 Med shRNA Scramble, (c) D283Med shRNA_ *MSI1*#1, and (d) D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 after transduction. Images were acquired by inverted microscopy visualized at 10x and 20x magnifications. Confirmation of *MSI1* knockdown: (e) Relative expression of *MSI1* by RT-qPCR (f). (G) Protein quantification of *MSI1* by *Western blot* in D283 Med cell lines after gene modulation. Relative quantification of protein expression was performed using ImageJ software. GAPDH protein was used as an endogenous control. All graphs show mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$, compared to control (Scramble).

Fig. 5 Impact of *MSI1* knockdown in D283 Med (Grp3/Grp4-MBs) cells. (a-c) The cell cycle histograms. (d) The knockdown of *MSI1* in the D283 Med shRNA_ *MSI1*#1 and D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 cells decreased G2/M phase when compared to shRNA_Scramble. (e) Cell viability was assessed by Cell Titer assay. Reduction of cell proliferation of D283 Med shRNA_ *MSI1*#1 and D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 after cisplatin treatment (3, 5, 7 and 10 μM) for 72 hours compared to shRNA_Scramble. The IC_{50} values of cisplatin treatment in D283 Med shRNA_ *MSI1*#1, D283 Med shRNA_ *MSI1*#2 and shRNA_Scramble is 4.1 μM , 6.6 μM and 10.98 μM , respectively. (f-g) knockdown of *MSI1* associated with cisplatin treatment in D283 Med cells increased cell apoptosis. Apoptosis was detected by flow cytometry after Annexin and propidium iodide staining. Two-Way ANOVA Test. The graphs show the mean \pm standard deviation of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ compared to control (shRNA_Scramble).

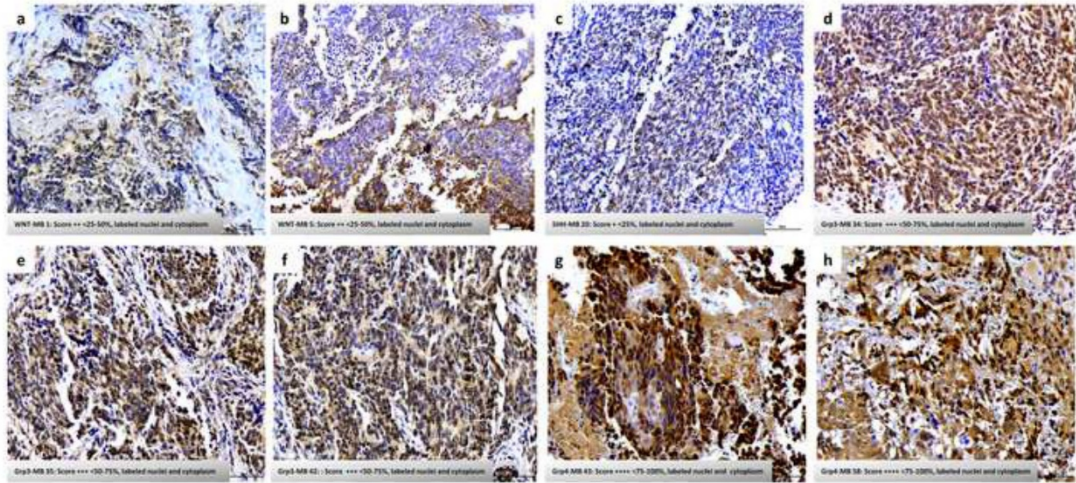
Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.01.jpg](#)

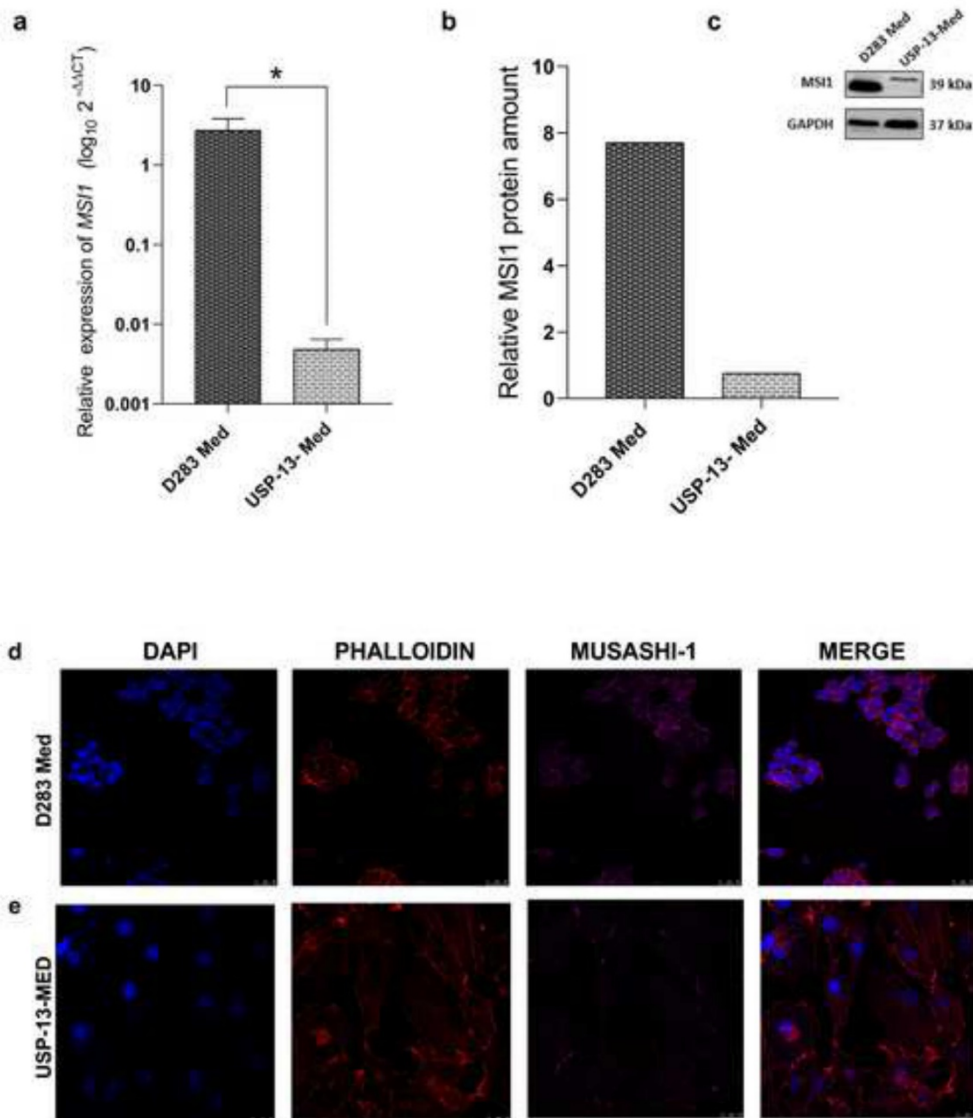


Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.02.jpg](#) ✎

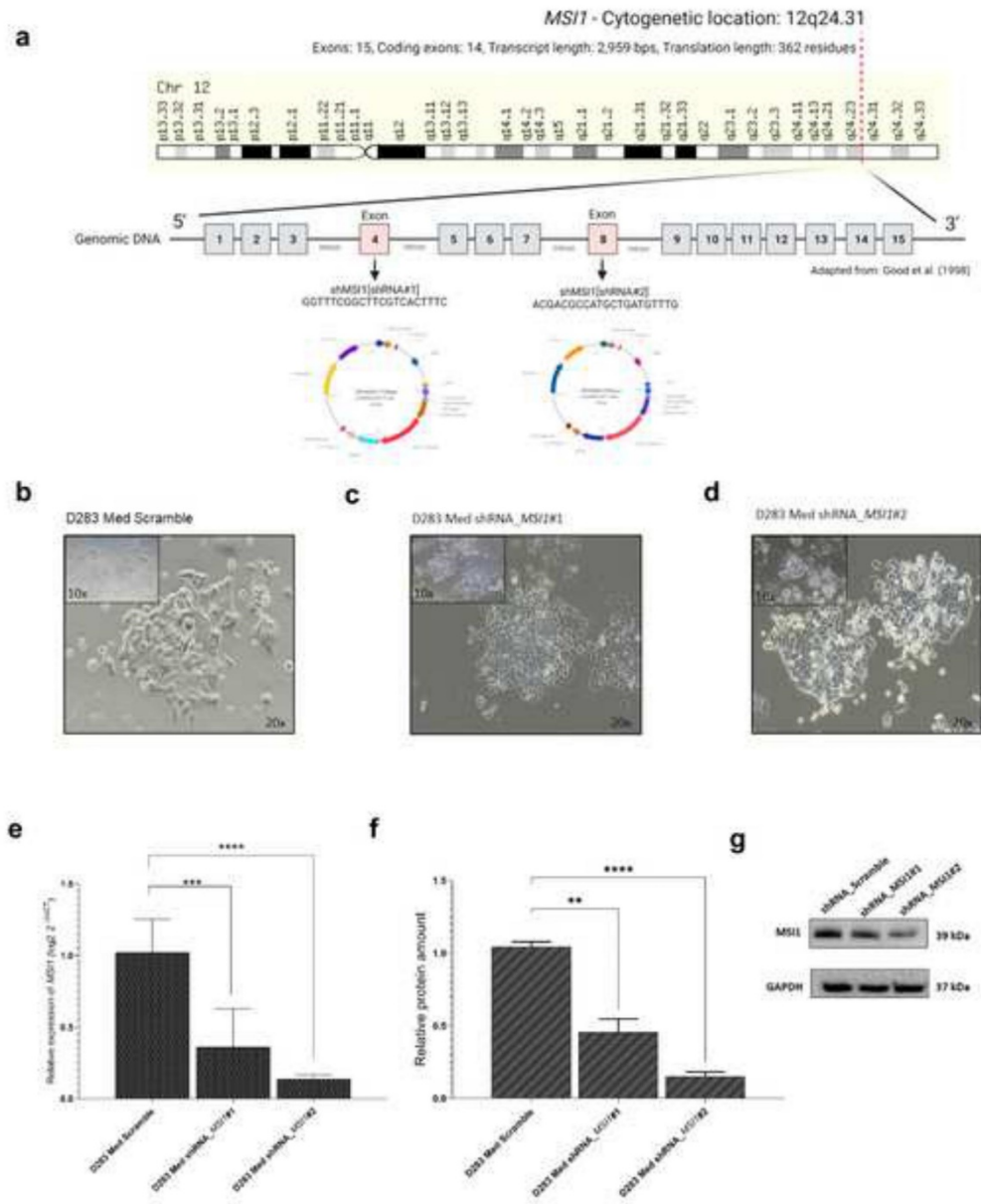


Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.03.jpg](#) 

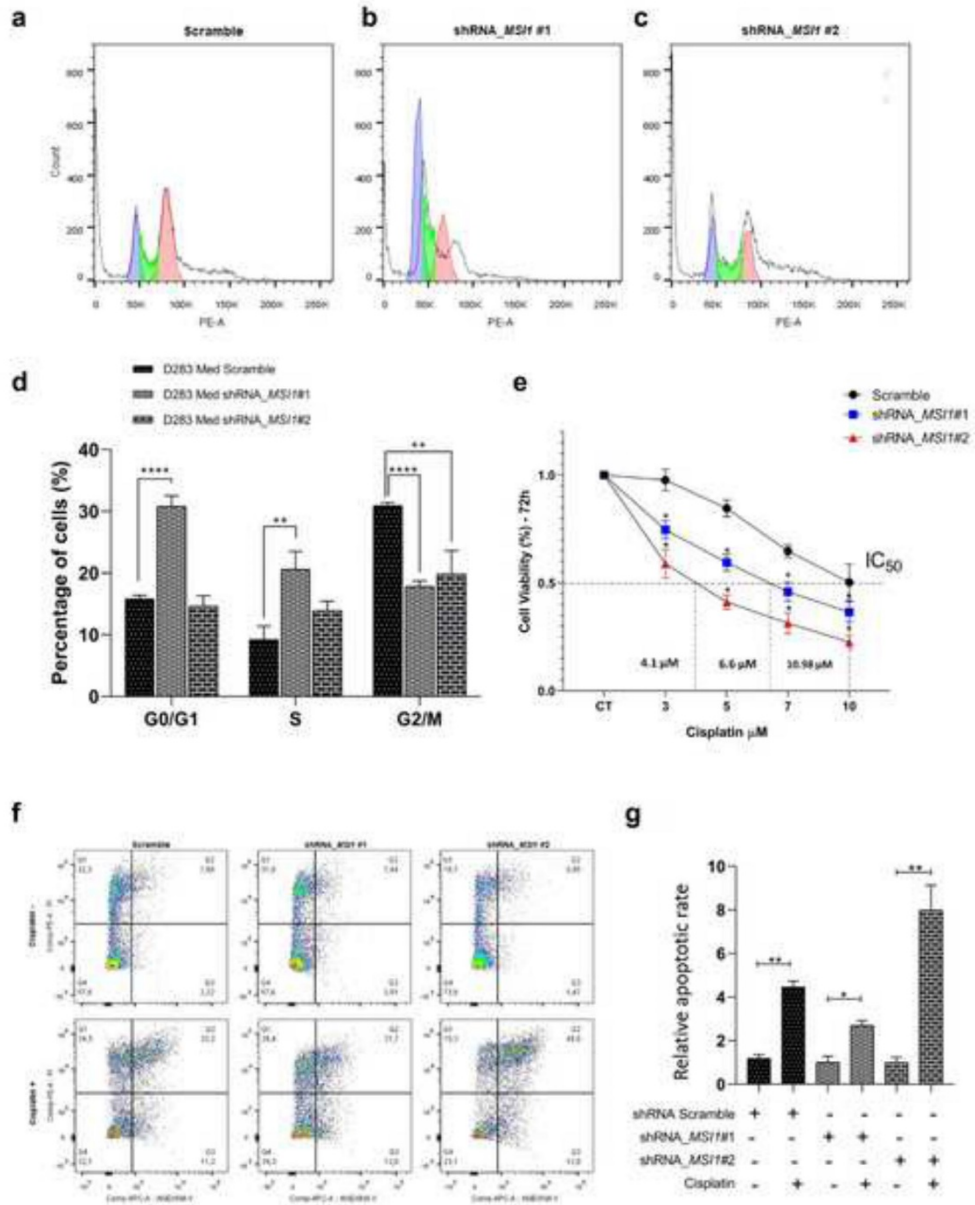
Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.04.jpg](#) ✎



Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.05.jpg](#)



Table

[Click here to access/download;Table;Table 01.docx](#) Table 1: Immunohistochemical analysis of *MSI1* expression in pediatric MBs.

Tumor ID Sample	MB Subtype	Score	Intensity	<i>MSI1</i>	qRT-PCR (RQ)
1	WNT-MBs	++	+	Hipo	4.00
5	SHH-MBs	++	+	Hipo	3.30
20	SHH-MBs	+	+	Hipo	0.27
34	Grp3-MBs	+++	++	Hiper	6.72
35	Grp3-MBs	+++	+	Hiper	7.30
42	Grp3-MBs	+++	+	Hiper	7.38
43	Grp4-MBs	++++	++	Hiper	6.39
58	Grp4-MBs	+++	++	Hiper	6.91

Notes: Expression of *MSI1* was examined on formalin-fixed, paraffin embedded tissue samples of MBs using immunohistochemistry (IHC). Evaluation of IHC: Score (+) %, percentage of *MSI1* positive tumor cells. + (< 25%), ++ (< 25-50%), +++ (< 50-75%) and ++++ (< 75-100%). Intensity of immunostaining (immunoreactivity) in tumor cells: Low (+), Strong (++). The hipo or hiperexpression was based in media of expression values of all MBs sample data by qRT-PCR. Value of media expression data is 6.39. RQ = Quantification Relative. Hipoexpressed (Hipo) and Hiperexpressed (Hiper). MB – Medulloblastoma.

Table

[Click here to access/download;Table;Table 02.docx](#) Table 02: Cell viability in D283 Med Cells (Grp3/Grp4-MBs) and the values of IC_{50} by using cisplatin

Concentration (μ M)	Cell Viability (%)		
	D283 Med shRNA Scramble	D283 Med shRNA_ <i>MSI1</i> #1	D283 Med shRNA_ <i>MSI1</i> #2
0	\pm 100.00	\pm 100.00	\pm 100.00
3	\pm 97.64	\pm 74.59	\pm 51.23
5	\pm 91.23	\pm 64.45	\pm 44.84
7	\pm 81.42	\pm 43.54	\pm 34.86
10	\pm 53.61	\pm 36.54	\pm 26.13
IC_{50} (μM) values	10.98 μ M	6.6 μ M	4.1 μ M

Musashi-1 (*MSI1*); Group (Grp); Medulloblastoma (MB); Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}); micromolar (μ M); mean standard deviation of three independent experiments (\pm).