UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MIRELLA BARONI MILAN

Avaliação do envolvimento das quinases MST1 e MST2 no Meduloblastoma e seu papel na regulação de vias moleculares associadas

Ribeirão Preto – SP

2019

MIRELLA BARONI MILAN

Avaliação do envolvimento das quinases MST1 e MST2 no Meduloblastoma e seu papel na regulação de vias moleculares associadas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Genética.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto – SP

2019

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

Milan, Mirella Baroni

Avaliação do envolvimento das quinases MST1 e MST2 no Meduloblastoma e seu papel na regulação de vias moleculares associadas. Ribeirão Preto, 2019.

121 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga.

1. Meduloblastoma. 2. Quinases MST1 e MST2. 3. Silenciamento gênico. 4. Droga XMU-MP-1. 5. Vias moleculares de desenvolvimento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mirella Baroni Milan

Título: Avaliação do envolvimento das quinases MST1 e MST2 no Meduloblastoma e seu papel na regulação de vias moleculares associadas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Genética.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico minha tese ao meu marido Victor. Obrigada pelo apoio, incentivo e carinho, que permitiram que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Amo muito você!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. *Luiz Gonzaga Tone* pela orientação desse trabalho, pelo apoio, e por colaborar imensamente com meu amadurecimento profissional. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. *Carlos Alberto Scrideli* pelo incentivo e ajuda no desenvolvimento do trabalho. Obrigada pela colaboração.

Às técnicas, *Rosane de Paula Gomes* e *Veridiana Kiill Suazo*, pela amizade e pelo apoio e auxílio nos procedimentos técnicos.

Aos amigos e colegas de laboratório, *Karina, Graziella, Ricardo, Luis, Andrea, Kleiton, Gustavo, Taciani e Pablo,* pela amizade e pela ajuda e aprendizado nesses anos de convivência.

Aos meus amados pais, *Adelcio* e *Silvana*, pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo e cuidado. Amo muito vocês!

Aos amigos especiais, *Carol, Keteryne, Gabriela, Luciana* pela grande amizade, pelo suporte nos momentos difíceis, e pelos incontáveis momentos felizes que passei com vocês. Adoro muito vocês!

Às minhas irmãs de coração, *Mariella (Pepita), Patricia (Pesq), Patricia (Son) e Maysa (Tete),* pelo apoio, pela amizade sincera e pelas lembranças tão boas da melhor fase da minha vida. Amo vocês!

À minha amiga *Carla (Póket)* e minha vó *Assumpção* que estarão sempre no meu coração. Obrigada por olharem por mim, mesmo de longe.

À minha família, *Rosana*, *Júnior*, *Aline, Adriano, Adé, Cleusa, Márcio*, *Débora*, *Marina, Moacir, Marco e Gabi.* Obrigada a todos pelo apoio, carinho e amor.

À toda equipe do *Centro Infantil Boldrini* pela disponibilização das amostras.

Às funcionárias do laboratório de citometria do Hemocentro de Ribeirão Preto, *Camila*, *Natália* e *Patrícia* por todo os conselhos, apoio e auxílio nos procedimentos técnicos.

Ao Prof. Dr. *Luiz Penalva* que contribui muito para meu amadurecimento profissional durante meu estágio nos EUA.

Ao *CNPq*, *FAPESP, CAPES* e *FAEPA* pelo suporte financeiro.

"Nosso objetivo não é apenas entender o mundo coletando dados, criando modelos. Nossa busca define: a paixão e o drama, os desafios, a sensação tão especial do momento da descoberta, o desespero do fracasso, a urgência que temos de prosseguir, a sensação sedutora de que sabemos tão pouco, que grandes revelações nos esperam, escondidas além da Ilha do Conhecimento, em meio ao misterioso Oceano do Desconhecido."

Marcelo Gleiser

Resumo/Abstract

MILAN, M. B. **Avaliação do envolvimento das quinases MST1 e MST2 no Meduloblastoma e seu papel na regulação de vias moleculares associadas.** 2019. 121 p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O Meduloblastoma (MB) é a neoplasia maligna do sistema nervoso central mais frequente na infância. Apesar dos avanços, cerca de um terço dos pacientes vão à óbito devido à recorrência do tumor e a maioria dos sobreviventes sofre efeitos secundários a longo prazo. A biologia tumoral do MB está associada com a desregulação de vias de sinalização que controlam o desenvolvimento embrionário, como as vias Wnt, Shh, Notch, TGF-β e Hippo. Estudos mostram que essas vias cooperam na carcinogênese e progressão do MB, mas ainda faltam dados de como ocorre a interação dessas vias e quais proteínas podem estar envolvidas nessas redes. Alguns trabalhos apontam as quinases MST1 e MST2 como proteínas chave na regulação dessas vias moleculares em diferentes tumores. Portanto o objetivo do presente estudo foi analisar o envolvimento das quinases MST1 e MST2 no MB e avaliar seu papel na regulação das vias moleculares associadas. Primeiro foi realizada a análise da expressão gênica de *MST1* e *MST2* nas amostras e subgrupos moleculares de MB e nos cerebelos não-neoplásicos. Em seguida, foram realizados ensaios *in vitro* após inibição farmacológica de MST1/2 e após transfecção com siRNA nas linhagens celulares de MB. Foi realizada análise *in silico* de enriquecimento de vias com os genes correlacionados com a expressão de *MST2* e alguns desses genes foram validados. Os principais resultados foram que *MST2* possui uma maior expressão gênica nas amostras tumorais e linhagens celulares de MB quando comparada com a expressão nos cerebelos, e a expressão gênica de *MST2* é maior nos subgrupos moleculares WNT e SHH. Não existe diferença na expressão de *MST1* nas amostras de MB quando comparada com cerebelos e entre os subgrupos moleculares. A inibição farmacológica de MST1/2 e o silenciamento gênico de MST2 promoveram uma diminuição na viabilidade celular e na formação de colônias e provocou alterações no ciclo celular. Na análise *in silico*, os genes mais correlacionados com *MST2* participam das vias moleculares Wnt, Hippo, TGF-β e Shh, e a inibição de MST1/2 promoveu alteração da expressão de alvos dessas vias. Com esses dados pode-se observar que a MST2 regula mecanismos importantes para a progressão tumoral e está envolvido com relevantes vias em MB, sendo um promissor alvo terapêutico para este tumor.

Palavras chave: Meduloblastoma. Quinases MST1 e MST2. Silenciamento Gênico. Droga XMU-MP-1. Vias moleculares de desenvolvimento.

MILAN, M. B. **Evaluation of MST1 and MST2 kinases involvement in Medulloblastoma and their role regulating associated molecular pathways.** 2019**.** 121 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumor of the central nervous system in childhood. Despite the advances, about one third of patients die due to tumor recurrence and most survivors suffer long-term side effects. Biology of MB is associated with the dysregulation of signaling pathways that control embryonic development, such as the Wnt, Shh, Notch, TGF-β, and Hippo pathways. Studies show that these pathways cooperate in the carcinogenesis and progression of MB, but data are still lacking on how this interaction occurs and which proteins may be involved in this network. Some studies point to MST1 and MST2 kinases as key proteins in the regulation of these molecular pathways in different tumors. Therefore, the aim of the present study was to analyze the involvement of MST1 and MST2 kinases in MB and to evaluate their role in the regulation of associated molecular pathways. First, we analyzed the gene expression of *MST1* and *MST2* in MB samples and molecular subgroups and in non-neoplastic cerebellum. Subsequently, in vitro assays were performed after pharmacological inhibition of MST1/2 and after siRNA transfection in MB cell lines. Pathway enrichment in silico analysis was performed with genes correlated with *MST2* expression and some of these genes were validated. The main results were that *MST2* has a higher expression in MB tumor samples and cell lines when compared with expression in the cerebellum, and *MST2* expression is higher in the WNT and SHH molecular subgroups. There is no difference in *MST1* expression in MB samples compared to cerebellum and between molecular subgroups. Pharmacological inhibition of MST1/2 and gene silencing of MST2 promoted a decrease in cell viability and colony formation and caused changes in the cell cycle. In silico analysis showed that the genes most correlated with *MST2* participate in the Wnt, Hippo, TGF-β and Shh pathways, and inhibition of MST1/2 promoted expression alteration of some target pathways. With these data it can be observed that MST2 regulates important mechanisms for tumor progression and is involved with relevant pathways in MB, being a promising therapeutic target for this tumor

Keywords: Medulloblastoma. MST1 and MST2 Kinase. Knockdown. XMU-MP-1 Drug. Developmental signaling pathways.

Lista de Siglas e Abreviaturas

µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACG	Anaplásico de células grandes
Akt	Proteína quinase B
APC	*Adenomatous polyposis coli gene*
ATCC	*American type culture collection*
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	*B-cell lymphoma protein 2*
BMP	*Bone morphogenetic protein*
c-Abl	*Abelson tyrosine kinase*
c-AMP	*Cyclic adenosine monophosphate*
CCG	Camada das células granulares
CCND1	Ciclina D1
CCNE1	Ciclina E1
CCP	Camadas das células de purkinje
CDK	*Cyclin-dependent kinase*
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEG	Camada externa granular
CK1α	*Casein kinase 1 alpha 1*
CM	Camada Molecular
CO_2	Dióxido de Carbono
CTNNB1	*Catenin beta 1*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Desmoplásico nodular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	*Epidermal growth factor*
FGF	*Fibroblast growth factor*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FoxO	*Forkhead box O*
Frz	*Frizzled*

GAPDH	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GCKII	*Germinal Centre Kinase*
GFI1	*Growth factor independent 1 transcriptional repressor*
GFI1B	*Growth factor independent 1B*
GLI	*GLI family zinc finger*
GNPs	Células progenitoras de neurônios granulares
GSK3	*Glycogen synthase kinase 3 beta*
GUSB	*Glucuronidase beta*
h	Horas
HES1	*Hes family bHLH transcription factor 1*
HPRT1	*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
IC50	*Half Maximal Inhibitory Concentration*
KDM6A	*Lysine demethylase 6A*
KEEG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LATS	*Large tumor suppressor kinase*
LEF1	*Lymphoid enhancer binding factor 1*
LRP	*LDL receptor related protein*
MAPK	*Mitogen activated kinase-like protein*
MB	Meduloblastoma
MBEN	MB com extensa nodularidade
mg	Miligrama
mg/ml	Miligramas por mililitro
mM	Milimolar
MOB1	*MOB kinase activator 1*
MST	*Mammalian Sterile Twenty-Like Kinase*
NDR	*N-myc downstream regulated*
NICD	*Intracellular domain of the notch protein*
nM	Nanomolar
OTX2	*Orthodenticle homeobox 2*
p21	(*CDKN1A*) *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*
PBS	*Phosphate-buffered saline*

PI	Iodeto de Propídeo
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase 2A
PTCH1	*Patched 1*
qRT-PCR	*Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*
RASSF	*Ras association domain family*
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SAV1	*Salvador family WW domain containing protein 1*
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
Shh	*Sonic hedgehog*
siRNA	*Small interfering RNA*
SMO	Smoothened
STK	*Serine/threonine kinase*
TAOK	*TAO kinase*
TAZ	(WWTR1) *WW domain containing transcription regulator 1*
TBS-T	*Tris-buffered Saline - Tween*
TEAD	*TEA domain transcription factor*
TGFBR	*Transforming growth factor beta receptor*
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
TP53	*Tumor Protein p53*
UBC	*Unipolar brush cells*
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
Wnt	*Wingless*
YAP	*Yes associated protein 1*

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Características clínicas e moleculares dos subgrupos de Meduloblastoma..... 26

Figura 2. Categorias de risco clínico dos subgrupos de Meduloblastoma 29

Figura 3. Vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do cerebelo e quando desreguladas favorecem a formação do Meduloblastoma 33

Figura 4. Domínios e sítios de ativação das proteínas quinases MST1 e MST2 35

Figura 5. Regulação das quinases MST1 e MST2 e dos seus alvos envolvidos nos mecanismos celulares 37

Figura 6. Expressão gênica de *MST1* nas amostras de cerebelo não neoplásico, nas amostras de MB e nas linhagens celulares de MB 53

Figura 7. Expressão gênica de *MST2* nas amostras de cerebelo não neoplásico, nas amostras de MB e nas linhagens celulares de MB 54

Figura 8. Curvas de sobrevivência global e livre de eventos relacionadas à mediana de expressão relativa do gene *MST1*..... 55

Figura 9. Curvas de sobrevivência global e livre de eventos relacionadas à mediana de expressão relativa do gene *MST2*..... 56

Figura 10. Expressão gênica de *MST1* nos diferentes subgrupos moleculares de MB..... 57

Figura 11. Expressão gênica de *MST1* nos diferentes subgrupos moleculares de MB..... 58

Figura 12. Análise da expressão da proteína fosforilada de MST1 e MST2 e da proteína total de MST2 nas linhagens celulares de MB e nas amostras de cerebelos não neoplásico 59

Figura 13. Viabilidade celular relativa após tratamento com a droga XMU-MP-1 nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)**..... 60

Figura 14. Valores do IC50 da droga XMU-MP-1 para as linhagens DAOY, ONS-76, UW228 e UW473 após 72 horas de tratamento 60

Figura 15. Número de colônias formadas após tratamento com a droga XMU-MP-1 nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)**..... 61

Figura 16. Análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)** 62

Figura 17. Análise da apoptose através da porcentagem células positivas para Anexina e/ou PI após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 1 e 5µM nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)**..... 63

Figura 18. Análise da expressão gênica de *MST2* após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY, ONS-76 e UW228..... 64

Figura 19. Análise da expressão proteica de MST2 após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY, ONS-76 e UW228..... 64

Figura 20. Viabilidade celular relativa ao tempo zero após transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C)** 65

Figura 21. Número de colônias formadas após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C)** 66

Figura 22. Análise do ciclo celular após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C)** 66

Figura 23. Análise de enriquecimento de vias com os genes correlacionados com MST2. . 68

Figura 24. Rede de interação proteica das vias moleculares Wnt, TGF-β, Hippo e Shh que tem uma alta correlação com *MST2* no MB 69

Figura 25. Expressão gênica de GLI1 **(A)**, GLI2 **(B)**, YAP1 **(C)**, SMAD3 **(D)** e LEF1 **(E)** nas linhagens de MB após tratamento com a droga XMU-MP-1..... 70

Figura 26. Expressão gênica de GLI1, GLI2, YAP1, SMAD3 e LEF1 nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C)** após a transfecção com siRNA..... 70

Figura 27. Expressão proteica da DAOY **(A)** e ONS-76 **(B)** após 48 horas de tratamento com XMU-MP-1. 71

Figura 28. Expressão proteica da DAOY **(A)** e ONS-76 **(B)** após 48 horas da transfecção com siRNA. 72

Tabela 1. Características clínicas e moleculares dos pacientes portadores de MB 44

Tabela 2. Características clínicas e moleculares das linhagens celulares de MB 44

Tabela 3. Lista de anticorpos primários utilizados neste estudo 46

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes de MB e os valores de p das expressões de *MST1* e *MST2* analisados nos diferentes parâmetros 54

Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes de MB e os valores de p das expressões de MST1 e MST2 analisados nos diferentes parâmetros 63

Tabela 6. Correlação da expressão gênica dos alvos com a expressão de *MST2* nas amostras de MB nos banco de dados 69

Sumário

1. Introdução 23
1.1. Meduloblastoma 24
1.2. Vias Moleculares de Sinalização 30
1.2.1. Via Wnt 30
1.2.2. Via Shh 31
1.2.3. Via Notch 31
1.2.4. Via TGF-β 32
1.2.5. Via Hippo 32
1.3. Quinases MST1 e MST2 34
2. Objetivos do Estudo 38
2.1. Objetivo Geral 39
2.2. Objetivos Específicos 39
3. Delineamento Experimental 40
4. Materiais e Métodos 42
4.1. Amostras de Pacientes e Linhagens Celulares de MB 43
4.2. Análise da expressão gênica 45
4.2.1. Extração do RNA e síntese do cDNA 45
4.2.2. qRT-PCR 45
4.3. Western Blot 45
4.4. Modulação das quinases MST1 e MST2 46
4.4.1. Tratamento com a Droga XMU-MP-1 46
4.4.2. Transfecção com siRNA 47
4.5. Ensaios Funcionais 47
4.5.1. Viabilidade Celular 47
4.5.2. Ensaio Clonogênico 48
4.5.3. Ciclo Celular 48
4.5.4. Apoptose 49
4.6. Análise *In Silico* 49
4.7. Validação dos alvos 50
4.8. Análise estatística 50
4.8.1. Expressão gênica diferencial 51
4.8.2. Sobrevida Global e Livre de Eventos 51
4.8.3. Correlação entre os valores das expressões gênicas 51
4.8.4. Análise dos ensaios funcionais 51
5. Resultados 52
5.1. Análise da expressão gênica de *MST1* e *MST2* 53

5.1.1. Análise dos níveis de expressão gênica de *MST1* e *MST2* nas amostras de MB 53
5.1.2. Análise dos níveis de expressão gênica de *MST1* e *MST2* e as características clínicas dos pacientes 54
5.1.3. Análise dos níveis de expressão gênica de *MST1* e *MST2* e a Sobrevida Livre de Eventos e Global dos Pacientes 55
5.1.4. Análise dos níveis de expressão gênica de *MST1* e *MST2* nos Subgrupos Moleculares de MB 56
5.2. Análise da expressão proteica de MST1 e MST2 nas linhagens de MB 58
5.3. Inibição farmacológica da atividade de MST1/2 nas linhagens de MB 59
5.3.1. Viabilidade Celular após o tratamento com droga XMU-MP-1 59
5.3.2. Ensaio Clonogênico após tratamento com a droga XMU-MP-1 60
5.3.3. Ciclo Celular após tratamento com a droga XMU-MP-1 61
5.3.4. Apoptose após tratamento com a droga XMU-MP-1 62
5.4. Transfecção com siRNA nas linhagens de MB 64
5.4.1. Confirmação do silenciamento de MST2 64
5.4.2. Viabilidade Celular após transfecção com siRNA 65
5.4.3. Ensaio Clonogênico após transfecção com siRNA 65
5.4.4. Ciclo Celular após transfecção com siRNA 66
5.5. Análise das vias moleculares de sinalização 67
5.5.1. Análise *in silico* dos genes correlacionados e enriquecimento de vias 67
5.5.2. Expressão gênica dos alvos após inibição de MST1/2 69
5.5.3. Expressão proteica dos alvos após inibição de MST1/2 71
6. Discussão 73
7. Conclusões 81
8. Referências Bibliográficas 83
9. Anexo 98
10. Apêndice 100

1. Introdução

1.1. Meduloblastoma

O Meduloblastoma (MB) é um tumor embrionário de origem cerebelar e apresenta-se como a neoplasia maligna do sistema nervoso central mais frequente na infância. Tem incidência anual de 5 casos em 1 milhão de indivíduos e representa aproximadamente 63% dos tumores embrionários intracranianos dos pacientes pediátricos. Tem dois picos de incidência entre 1-4 anos e 5-9 anos, com uma média de idade no diagnóstico de 6 anos. Raramente é diagnosticado em adultos, como uma incidência anual de 0.05 casos em cem mil indivíduos (Northcott *et al.*, 2019).

O diagnóstico do MB é baseado nos sintomas clínicos, exames de imagem e citologia do fluido cérebro espinhal integrados com a análise histopatológica e molecular. Os sinais e sintomas iniciais são caracterizados por cefaleias, náuseas ou vômitos matinais provocados pelo aumento da pressão intracraniana ou pela própria presença do tumor. Além disso, alguns sinais e sintomas são mais específicos do MB por ser provocados pela disfunção cerebelar, entre eles a ataxia, caracterizada pelo comprometimento do equilíbrio e da coordenação motora, e problemas na visão (Wilne *et al.*, 2007; Northcott *et al.*, 2019).

Os pacientes com MB são tratados com modalidades combinadas envolvendo ressecção máxima do tumor, com o mínimo de danos para tecidos cerebelares, em conjunto com a quimioterapia citotóxica (multidrogas), e a irradiação crânio espinhal, que é realizada somente em pacientes com mais de 3 anos de idade (Gajjar e Robinson, 2014). Os principais quimioterápicos utilizados para o tratamento do MB são cisplatina, vincristina, carboplatina, ciclofosfamida e lomustina (Northcott *et al.*, 2019).

Embora terapias convencionais possam curar uma grande proporção dos pacientes, a maioria dos sobreviventes sofre efeitos secundários a longo prazo, incluindo déficits neurológicos, neuroendócrinos e psicossociais, como por exemplo atraso no desenvolvimento e aprendizado intelectual, dificuldades motoras e no processamento de informações (Moxon-Emre *et al.*, 2014; King *et al.*, 2017; Kieffer *et al.*, 2019).

Além dos efeitos secundários, cerca de um terço dos pacientes pode ir a óbito devido à recorrência do tumor (Massimino *et al.*, 2016). Essa recorrência ocorre pela natureza invasiva e metastática do MB, mas também devido às restrições da irradiação em crianças (Habrand e De Crevoisier, 2001). No MB, a metástase ocorre

quase que exclusivamente na superfície das leptomeninges do eixo cérebro espinhal, e acredita-se que a disseminação ocorra pela difusão de células do tumor primário para o líquido cérebro espinhal, contudo um recente estudo mostrou que existem células tumorais circulantes em pacientes com MB que possuem uma disseminação hematológica e formam as metástases nas leptomeninges (Garzia *et al.*, 2018).

Para realizar o estadiamento do MB é avaliada a citologia do líquido cérebro espinhal no momento do diagnóstico juntamente com resultados de imagem. O estadiamento é realizado usando a classificação de Chang e colaboradores (1969), que define as metástases macro e microscopicamente e classifica os pacientes em cinco grupos, variando de M0 a M4 (Chang *et al.*, 1969).

A estratificação dos pacientes em grupos de risco leva em consideração a ressecção do tumor, idade do paciente e presença de metástase ao diagnóstico. Pacientes menores de três anos, com ressecção incompleta do tumor e presença de metástase ao diagnóstico são classificados como alto risco e possuem em média <70% de sobrevida global de cinco anos. Já o grupo de baixo risco que teve ressecção completa do tumor, maiores de três anos e sem metástase ao diagnóstico possui em média 70-85% de sobrevida global de cinco anos (Gajjar *et al.*, 2006; Northcott *et al.*, 2019). Porém, a histologia e a classificação molecular do tumor devem ser consideradas para a estratificação em grupos de risco.

Histologicamente, o MB pode ser separado em quatro subtipos distintos: clássico, anaplásico de células grandes (ACG), desmoplásico nodular (DN) e MB com extensa nodularidade (MBEN) (Ellison *et al.*, 2011). Pacientes com MB anaplásico estão associados com um pior prognóstico, enquanto aqueles com a variante desmoplásico nodular e MB com extensa nodularidade, têm um prognóstico melhor (Ajeawung *et al.*, 2013).

A relevância da questão molecular no MB surgiu quando observou-se que algumas síndromes genéticas possuem uma predisposição de desenvolver o MB, o que ofereceu indícios iniciais de alguns genes e vias moleculares que estavam envolvidos com a origem do MB. Como por exemplo a Síndrome de Gorlin, que possui mutações nos genes *PTCH1* e *SUFU* da via Shh e a Síndrome de Turcot que possui mutações no gene *APC* da via Wnt, vias que atualmente são sabidamente envolvidas com a patogênese do MB. Esses dados e alguns dados iniciais de *arrays* mostraram que o MB possuía características moleculares heterogêneas e distintas de outros

tumores embrionários, impulsionando as pesquisas para área molecular (Pomeroy *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2006; Kool *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2011).

Após diversos estudos que mostram as diferenças genéticas, demográficas e clínicas dos pacientes com MB, em 2012, chegou-se ao consenso da classificação molecular do MB (Northcott *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012). Atualmente, essa classificação é utilizada pela Organização Mundial da Saúde, que divide o MB em quatro principais subgrupos moleculares: WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4 (Figura 1) (Louis *et al.*, 2016).

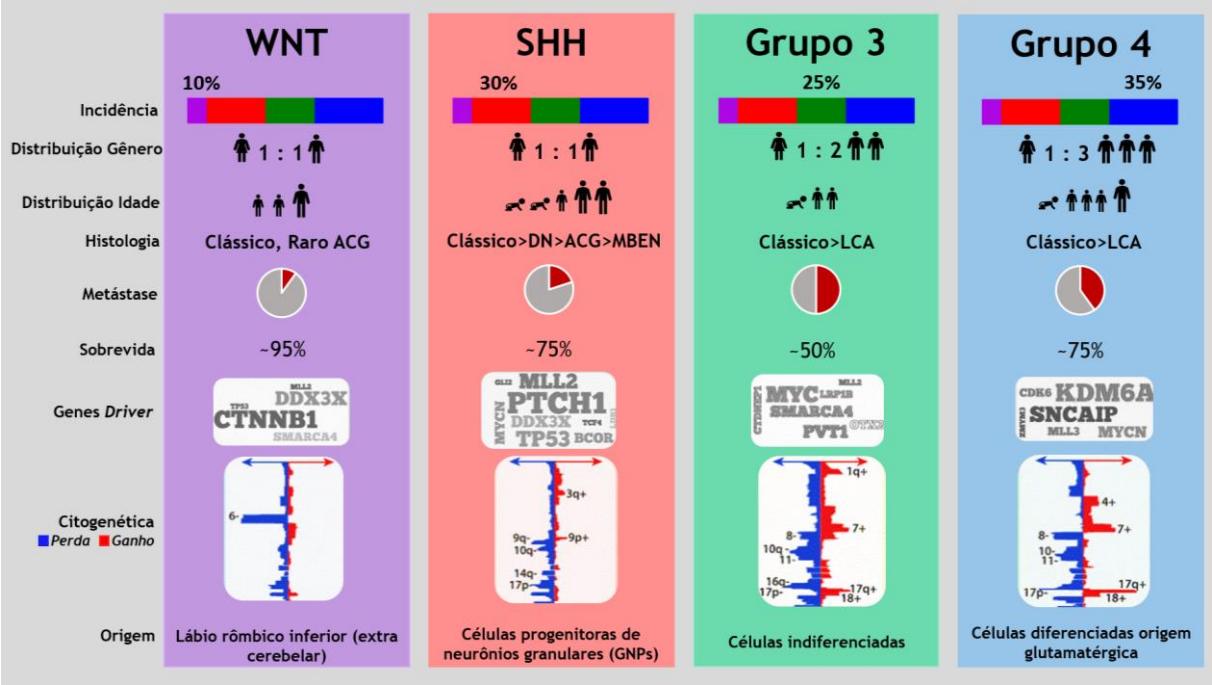


Figura 1. Características clínicas e moleculares dos subgrupos de Meduloblastoma. Figura adaptada de Taylor et al., 2012. ACG - Anaplásico de células grandes, MBEN - Meduloblastoma de extensa modularidade, DN - Desmoplásico nodular.

O grupo WNT é o subtipo mais raro, compreende cerca de 10% dos MBs, e possui o melhor prognóstico dentre os subgrupos. Tem maior incidência em crianças mais velhas (> 3 anos), e a histologia mais frequente é do tipo clássica (Gajjar e Robinson, 2014). Apresenta mutações somáticas no gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β-catenina e, frequentemente está associado com monossomia do cromossomo 6. Essas mutações conduzem à hiperativação da via *Wingless* (Wnt), tornando a proteína β-catenina resistente à degradação e levando à transcrição de genes envolvidos na proliferação celular (Mosimann *et al.*, 2009). Uma possível explicação para o melhor prognóstico seria pela maior vascularização tumoral e a

perda de uma barreira hematoencefálica funcional nesse subgrupo, permitindo um maior acúmulo intratumoral dos quimioterápicos levando a uma resposta terapêutica mais eficiente (Phoenix *et al.*, 2016).

A maioria dos pacientes do grupo SHH possui mutações germinativas ou somáticas em um ou mais genes que compõem a via *Sonic Hedgehog* (Shh), incluindo mutações com perda de função ou deleção de *PCTH1* (43%), mutações com perda de função ou deleção de *SUFU* (10%), mutações ativadoras de *SMO* (9%), amplificação de *GLI1* ou *GLI2* (9%) e amplificação de *MYCN* (7%). Além disso, presença ou não de mutações no *TP53* é utilizada para subdivisão desse grupo (Louis *et al.*, 2016). O grupo SHH compreende 30% dos MBs e é o único grupo que pode apresentar todos os subtipos histológicos. Apresenta uma distribuição etária bifásica, com uma maior frequência de recém-nascidos/crianças muito jovens (<3 anos) e adultos. Muitos dos pacientes não desenvolvem metástase e possuem um prognóstico bom. Porém, por ser um grupo heterogêneo, outros fatores devem ser considerados para determinação do prognóstico (Figura 2), tais como mutação no *TP53*, idade, subtipo histológico, presença de metástase no diagnóstico e alterações moleculares, (Taylor *et al.*, 2012; Louis *et al.*, 2016), à vista disso alguns estudos propõem a subdivisão em mais subtipos (Cavalli *et al.*, 2017; Schwalbe *et al.*, 2017). O estudo de Cavalli e colaboradores (2017) divide em quatro subtipos SHHα, SHHβ, SHHγ, SHHδ, após análise do perfil de metilação do DNA, dados de expressão gênica de *arrays* e dados clínicos (Cavalli *et al.*, 2017).

Testes com inibidores moleculares de SMO estão sendo realizados em ensaios clínicos, os quais demonstram que pacientes adultos têm uma boa resposta ao tratamento, isso ocorre devido a esses pacientes normalmente possuírem mutações *upstream* na via Shh, não afetando a resposta ao inibidor (Lou *et al.*, 2016; Petrirena *et al.*, 2018). Contudo, os pacientes pediátricos possuem normalmente mutações em genes *downstream* da via, como *GLI1* e *GLI2*, assim são resistentes ao tratamento. Em adição, a via Shh é fundamental para o desenvolvimento infantil, assim pacientes muito novos possuem efeitos colaterais graves, como má formação óssea (Robinson *et al.*, 2017). Portanto, novas estratégias de abordagem terapêutica são de fundamental importância já que esse subgrupo apresenta uma grande heterogeneidade clínica e biológica.

Pacientes do grupo 3 apresentam o pior prognóstico entre os subgrupos e observa-se uma alta incidência de metástase no momento do diagnóstico. O tumor acomete quase que exclusivamente recém-nascidos e crianças. É um subgrupo caracterizado por apresentar amplificação do gene *MYC* na maioria dos casos (Northcott *et al.*, 2011). Alguns estudos subdividem esse subgrupo em dois subtipos conforme a presença ou não da amplificação de MYC, sendo que a amplificação deste oncogene é relacionado com pior prognóstico (Figura 2). Existem outros genes que são amplificados nesse subgrupo como *MYCN* e *OTX2*. Variantes estruturais promovem a aproximação de regiões de *enhancers* e regiões codificadoras que normalmente estão distantes, promovendo hiperativação de alguns genes, como *GFI1* e *GFI1B*. A superexpressão de *GFI1* ou *GFI1B* em combinação com MYC, nas células tronco neurais de camundongo, promoveu a formação de tumores agressivos de MB do subgrupo 3 (Northcott *et al.*, 2014). O Grupo 3 é a forma da doença mais desafiadora, pois as estratégias terapêuticas têm se mostrado pouco eficazes.

O grupo 4 constitui o mais frequente entre os MB, ocorrendo em todas as idades e associado a um prognóstico intermediário. Estudos fazem a subdivisão conforme características moleculares e clínicas, diferenciando o grupo 4 em subtipo de melhor e pior prognóstico. Apesar de se constituir o grupo biologicamente menos compreendido, algumas alterações moleculares são observadas com frequência, como a mutação no gene *KDM6A*, a formação do isocromossomo 17q, e amplificação dos proto-oncogenes *CDK6* e *MYCN (Northcott et al., 2012; Gajjar e Robinson, 2014)*. Ensaios pré-clínicos com inibidores de CDK6/CDK4 mostram resultados promissores no tratamento do MB (Cook Sangar *et al.*, 2017) e agora estão sendo testados em ensaios clínicos (NCT03434262).

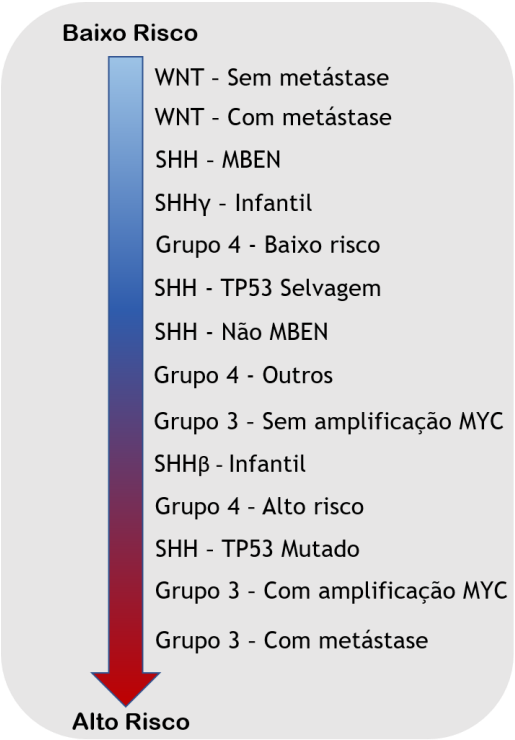


Figura 2. Categorias de risco clínico dos subgrupos de Meduloblastoma. Figura adaptada de Northcott et al., 2019. MBEN - Meduloblastoma de extensa nodularidade.

Além das diferenças moleculares e clínicas, existem alguns trabalhos que mostram que os subgrupos se originam de diferentes localizações (Gibson *et al.*, 2010) e tipos celulares durante o desenvolvimento do cerebelo (Hovestadt *et al.*, 2019).

O desenvolvimento do cerebelo se inicia na fase pré-natal e somente finaliza após um 1 ano do nascimento. Os neurônios cerebelares se originam de duas zonas germinativas distintas, o lábio rômbico superior que dá origem aos neurônios glutamatérgicos e a zona ventricular que dá origem aos neurônios GABAérgicos. Os neurônios glutamatérgicos, ou excitatórios, são as células granulares, células unipolares em escova (UBC – *unipolar brush cells*) e os neurônios grandes do núcleo cerebelar profundo. Os neurônios GABAérgicos, ou inibitórios, são as células de Purkinje, células de golgi, e outros. No cerebelo maduro, todas essas células formam as três camadas que cobrem o núcleo interno, composto pela substância branca e 3 pares de núcleos cerebelares profundos. A camada mais externa do cerebelo é a camada molecular (CM), a intermediária é a camada das células de Purkinje (CCP) e mais interna é a camada das células granulares (CCG) (Bihannic e Ayrault, 2016).

A origem do subgrupo SHH é a partir das células progenitoras de neurônios granulares (GNPs) da camada externa granular do cerebelo (CEG). O tumor do subgrupo WNT tem origem no lábio rômbico inferior (extra cerebelar) e é formado principalmente por células progenitoras de neurônios. O tumor do grupo 3 é formado por células mais indiferenciadas, porém não foi possível até o momento inquirir o tipo das células de origem, isso pode ser devido a transformação e reprogramação que ocorre por oncogenes específicos, como MYC, ou por talvez ter uma origem extra cerebelar. O MB do grupo 4 é formado principalmente por células diferenciadas de origem glutamatérgica, como as UBCs. Alguns tumores possuem proporções variadas de células indiferenciadas e diferenciadas o que poderia explicar a dificuldade da subclassificação do grupo 3 e 4 (Gibson *et al.*, 2010; Hovestadt *et al.*, 2019).

Como pode-se observar a patogênese do MB está intimamente relacionada com o desenvolvimento do cerebelo, e as vias de sinalização que regulam esse desenvolvimento são peças chave na formação e crescimento deste tumor. Além das vias moleculares Wnt e Shh já mencionadas, as vias Notch, TGF-β e Hippo também participam do desenvolvimento embrionário normal do cerebelo e quando desreguladas promovem tumorigênese e propagação do MB (Figura 3) (Roussel e Hatten, 2011).

1.2. Vias moleculares de sinalização

1.2.1. Via Wnt

A via de sinalização Wnt possui um papel central no controle do desenvolvimento embrionário e homeostase tecidual em organismos adultos. A ativação da via canônica de Wnt acontece quando o ligante Wnt se liga aos receptores Frz e LRP5/6, ocorrendo acúmulo de β-catenina no citoplasma da célula e sua eventual translocação para o núcleo, onde a β-catenina atua como co-ativador transcricional de fatores de transcrição da família TCF/LEF. Sem o ligante, a β-catenina não se acumula no citoplasma, uma vez que um complexo de proteínas a marca para degradação. Este complexo é formado pelas proteínas AXIN, APC, PP2A, GSK3 e CK1α e, tem sua função interrompida, quando Wnt se liga aos receptores (Macdonald *et al.*, 2009). No núcleo a β-Catenina coopera com outras proteínas para induzir a expressão de genes regulados por esta via. A via Wnt é crucial para diferenciação e sinaptogênese durante o desenvolvimento do cerebelo (Wang e Liu,

2019) e como visto anteriormente, mutações que provocam superativação dessa via estão envolvidos na tumorigênese do MB.

1.2.2. Via Shh

A via Shh (*Sonic Hedgehog*) participa do processo da embriogênese e é composta por um complexo de cascatas de sinalização que regula o desenvolvimento e diferenciação celular. O SHH é o ligante da via hedgehog que ativa a sinalização se ligando a proteína de transmembrana denominada Patched-1 (Ptch1). A Patched-1 ao receber o sinal, libera Smoothened (Smo), uma outra proteína de transmembrana de receptor acoplado a proteína G. Smo ocasiona a ativação da família de fatores de transcrição GLI. Assim, Smo leva a estabilização do fator de transcrição GLI3 que juntamente com GLI2 age como ativador canônico do gene GLI1 e outros alvos. Na ausência de Shh, GLI3 e formas truncadas de GLI2 podem intermediar agindo como repressores (Niyaz *et al.*, 2019). Durante o desenvolvimento do cerebelo, na fase pós-natal, a expressão de Shh pelas células de Purkinje é essencial para a proliferação das GNPs para formar a CEG. Posteriormente, essas células migram e atravessam camadas de células mais internas para formar a CCG, essencial para completa diferenciação e maturação do cerebelo (Yang e Joyner, 2019).

1.2.3. Via Notch

A sinalização Notch constitui uma via de desenvolvimento que controla a proliferação e apoptose. É composta pelos receptores de transmembrana Notch 1-4, dos ligantes Delta 1-4 e Jagged 1-2. A interação de Notch com os ligantes, ocasiona a clivagem dos receptores de Notch e este processo resulta na produção de Notch intracelular (NICD), que é translocado para o núcleo. No núcleo, NICD interage com a proteína recombinante DNA-ligante CBF-1 e ativa fatores transcricionais alvos da via, como por exemplo HES1 (Li *et al.*, 2017). Estudos mostram que ocorre a expressão de Notch pelas células progenitoras granulares da CEG na fase pós-natal, promovendo a proliferação e inibindo a diferenciação dessas células, sendo essencial para o desenvolvimento normal do cerebelo (Solecki *et al.*, 2001; Gazit *et al.*, 2004; Wang e Liu, 2019) e desregulação desta via está associada com formação e/ou crescimento do MB (Schreck *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2014; Fiaschetti *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).

1.2.4. Via TGF-β

A via TGF-β desempenha papéis críticos em uma variedade de processos como crescimento, sobrevivência, migração, reprogramação e diferenciação celular. A ativação da via canônica ocorre a partir da ligação de uma das três isoformas do TGF-β ao receptor tipo II (TGFBR2), que recruta e fosforila o receptor tipo I (TGFBR1). A ativação do TGFBR1, por sua vez, causa a fosforilação das proteínas intracelulares SMADs (Yu e Feng, 2019). Os complexos SMADs translocam para o núcleo, onde se ligam ao DNA e outros fatores, regulando a transcrição gênica, a síntese de proteínas e modificações pós-traducionais (Ragazzon *et al.*, 2009; Principe *et al.*, 2014). Outras moléculas que podem ativar a via e provocar a fosforilação dos SMADs são as BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*). As BMPs estão envolvidas diretamente com o desenvolvimento do cerebelo. A alta expressão das BMPs é detectada durante a embriogênese e na fase determinada favorece a diferenciação das células tronco em células granulares cerebelares. Tem uma ação antagonista ao estímulo de Shh para a proliferação das GNPs, por bloquear a divisão celular e favorecer a maturação final dessas células (Hatten e Roussel, 2011; Tong *et al.*, 2015).

Estudos em tumores levaram à descoberta de um fenômeno chamado Paradoxo do TGF-β. O TGF-β funciona como um supressor tumoral, inibindo o ciclo celular em tumores epiteliais benignos ou em estágios iniciais do câncer. Já em células malignas, há alterações na via do TGF-β que induzem a progressão para estágios tumorais avançados e metástase. Apesar de muitos estudos confirmarem este paradoxo, ainda não há uma explicação lógica para o evento. Trabalhos mostram que alterações na via TGF- β promovem a progressão tumoral do MB (Gate *et al.*, 2014; Merve *et al.*, 2014; Ferrucci *et al.*, 2018; Santhana Kumar *et al.*, 2018).

1.2.5. Via Hippo

A via Hippo pode ser ativada por diferentes sinais como polaridade celular, junções aderentes, citoesqueleto, sinais de estresse e outros. É um regulador chave no controle do tamanho de muitos órgãos através da regulação da proliferação e sobrevivência celular (Harvey *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015; Zheng e Pan, 2019). A via Hippo é composta por diversas quinases, entre elas estão a MST1/2, LATS1/2 e MOB1A/B que quando ativadas, provocam uma cascata de fosforilação que marca o alvo YAP/TAZ para ser degradado ou retido no citoplasma. Desta forma, YAP/TAZ

não transloca para o núcleo e não ativa a transcrição de genes, entre eles os genes da família TEAD, o que leva a diminuição da proliferação celular (Bae *et al.*, 2017). Ensaios *in vivo* demonstraram que a inativação de LATS1/2 promove um aumento da atividade transcricional global, durante o desenvolvimento encefálico, devido a ativação de YAP/TAZ. Essa hipertranscrição levou ao aumento da expressão de genes relacionados com a proliferação e crescimento celular. Porém, nas células progenitoras neurais, após transiente aumento da proliferação, a hipertranscrição provocou estresse na replicação, danos ao DNA e ativação de p53, resultando na apoptose maciça das células (Lavado *et al.*, 2018). Trabalhos mostraram que a superexpressão de YAP1 aumenta a proliferação das GNPs, e protege essas células dos danos provocados pela irradiação por manter a proliferação e sobrevivência celular (Fernandez-L *et al.*, 2009; Fernandez-L *et al.*, 2012; Yang e Joyner, 2019).

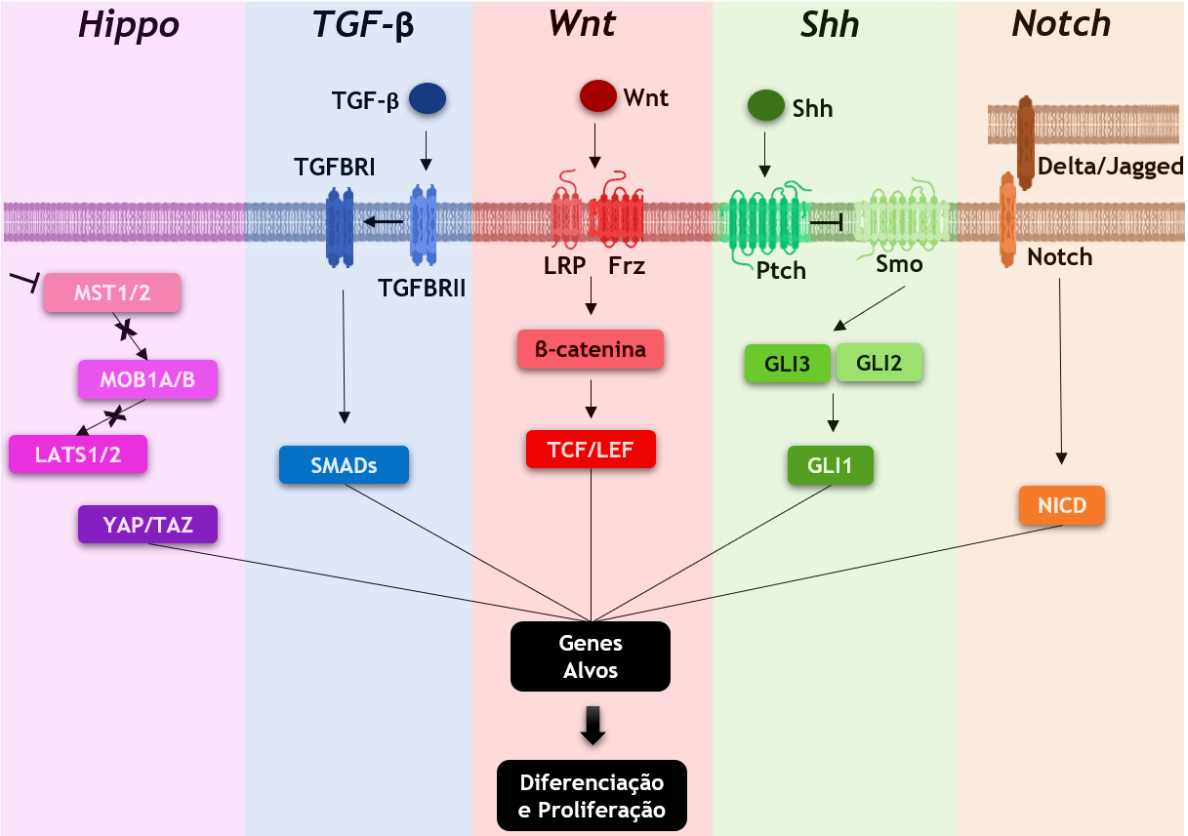


Figura 3. Vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do cerebelo e quando desreguladas favorecem a formação do Meduloblastoma.

Muitos trabalhos mostram a conexão das vias moleculares com o MB do subgrupo SHH. Como por exemplo o estudo de Rodriguez-Blanco e colaboradores (2017) que mostra que a inibição da via Wnt promove uma redução da progressão e crescimento tumoral levando a uma maior taxa de sobrevida no subgrupo SHH de MB (Rodriguez-Blanco *et al.*, 2017). Já ativação da via canônica TGF-β é um preditor de sobrevida (Aref *et al.*, 2013) e as vias Hippo e Notch contribuem para a tumorigênese desse mesmo subgrupo molecular (Fernandez-L *et al.*, 2009; Fernandez-L *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2013; Zhang, Y. *et al.*, 2018). Um outro estudo mostra que inibição da via TGF-β promove ativação da via Notch provocando um aumento da proliferação celular no MB (Adesina *et al.*, 2007).

Em outros tumores essa interação das vias também ocorre, como no caso do câncer hepatocelular. Esse trabalho mostra que a deleção dos genes que codificam as proteínas quinases MST1 e MST2 (via Hippo) promove progressão tumoral através da ativação das vias moleculares Wnt, Hippo e Notch (Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017).

Adicionalmente, MST1 e MST2 inibem diretamente a via WNT/β-catenina, levando à uma supressão do crescimento celular (Xu *et al.*, 2014). Outro estudo evidenciou que a ativação da MST1 juntamente com outras moléculas leva à inibição da atividade da β-catenina (pertencente a via Wnt) e do Smad (pertence a via TGF-β), diminuindo a migração e proliferação celular e a quimiorresistência nos ensaio *in vitro* com linhagens de neuroblastoma, câncer de mama, câncer de cólon e melanoma. Nos ensaios *in vivo,* a ativação da MST1 mostrou atividade anti-tumoral (Basu *et al.*, 2014). Essas proteínas quinases parecem ser peças chave no intercâmbio dessas vias moleculares.

1.3. Quinases MST1 e MST2

As quinases MST (*Mammalian Sterile Twenty-Like)* foram clonadas e caracterizadas em 1995 e recebem essa nomenclatura pela similaridade com as quinases STE20 (*Sterile Twenty*) das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Creasy e Chernoff, 1995a; b). O gene *MST1*, também conhecido como *STK4*, *KRS2* ou *YSK3,* está localizado no cromossomo 20 e possui 17 éxons. O gene *MST2*, também conhecido como *STK3* ou *KRS1*, está localizado no cromossomo 8 e possui 27 éxons.

As proteínas quinases MST1 e MST2 pertencem a subfamília GCKII (*Germinal Centre Kinase*) e são compostas por 487 e 491 aminoácidos respectivamente, compartilhando >95% de domínios catalíticos idênticos e sendo, aproximadamente, 75% globalmente idênticas. São formadas por 2 domínios principais: o domínio catalítico na região N terminal, onde ocorre a reação enzimática e o domínio de homologia SARAH, que recebe essa nomenclatura a partir dos genes que compartilham esse domínio (*SAV1*, *RASSF1-6* e *Hippo*), e os dois domínios principais são conectados por uma região flexível (Rawat e Chernoff, 2015; Galan e Avruch, 2016). A fosforilação/ativação das quinases ocorre principalmente pelo mecanismo de trans-autofosforilação, o qual ocorre através do domínio SARAH que medeia a homodimerização das quinases MST, provocando um rearranjo conformacional no *loop* de ativação, que ocorre normalmente no resíduo Treonina-183 (T-183) na MST1 e Treonina-180 (T-180) na MST2 (Figura 4). O controle da ativação das quinases MST também ocorre pela formação de heterodímeros, com SAV1 ou com componentes da família RASSF, através do domínio SARAH. Outro mecanismo descrito é ativação através de diferentes quinases como Akt, c-Abl e TAOK1-3 que fosforilam diretamente as quinases MST (Figura 5) (Rawat e Chernoff, 2015; Bae e Luo, 2018).

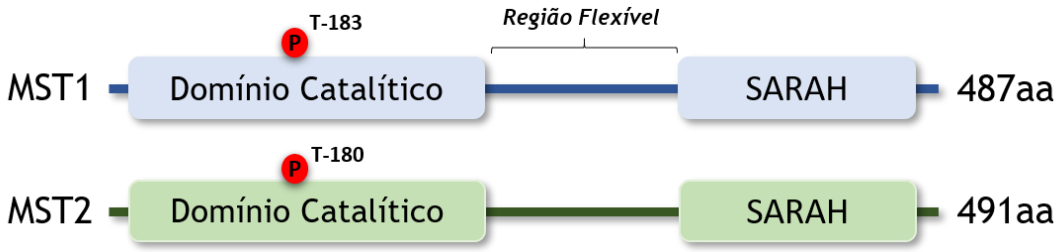


Figura 4. Domínios e sítios de ativação das proteínas quinases MST1 e MST2. Adaptado de Bae e Luo *et al*., 2018.

As quinases MST1 e MST2 possuem diferentes alvos na célula, os mais descritos na literatura são MOB1 e LATS1/2 que participam da via Hippo. A fosforilação desses substratos leva a degradação ou retenção de YAP1 que então não transloca para o núcleo, não ativando a transcrição de genes que controlam os mecanismos de proliferação celular e apoptose. Como pôde ser observado no estudo de Zhou e colaboradores (2011) onde ficou demonstrado que a ausência da atividade das quinases MST1 e MST2 leva à um aumento do crescimento celular e das colônias

tumorigênicas em tumor de intestino. Neste estudo foi relatado que a inativação das MSTs causa acúmulo da proteína YAP1 no núcleo, promovendo ativação do fator de transcrição TEAD, que por consequência, induz o aumento da expressão de genes responsáveis pela proliferação celular (Zhou *et al.*, 2011). Outros tumores descrevem a atividade supressora de MST1 e MST2 através da ativação da via Hippo, como por exemplo câncer de mama (Li, F. *et al.*, 2016), carcinoma hepatocelular (Song *et al.*, 2010; Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017), câncer colorretal (Liu *et al.*, 2018) e outros. No MB não há dados específicos sobre o papel das quinases MST1 e MST2, porém Fernandez-L e colaboradores (2009 e 2013) mostraram que a expressão elevada do gene *YAP1*, alvo das MST1 e MST2, no subgrupo SHH está relacionada com a proliferação celular, radioresistência e instabilidade genômica nesse tumor (Fernandez-L *et al.*, 2009; Fernandez-L *et al.*, 2012).

Outro alvo importante das quinases MST são os fatores transcricionais FoxO1 e FoxO3 que estão envolvido com ciclo celular, apoptose e quimiorresistência (Beretta *et al.*, 2019). As quinases MST, através da ativação de FoxO, controlam a morte celular por estresse oxidativo dos neurônios primários e astrócitos (Lehtinen *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014). Além da morte celular, a ativação de FoxO pelo estresse oxidativo, mediada pela MST1, pode alterar o ciclo celular, diminuindo a proliferação celular e promovendo a senescência (Yamaguchi *et al.*, 2016). No estudo de Zhu e colaboradores, hiperexpressão de MST1 diminuiu a viabilidade e elevou a taxa de apoptose através de FoxO3 nas células de glioma (Zhu *et al.*, 2019).

A via da apoptose mitocondrial (intrínseca) é essencial na regulação da morte e sobrevivência celular. A família das proteínas BCL-2 é uma das principais reguladoras desse mecanismo e há alguns estudos que relatam a associação direta das MST e proteínas dessa família. A ativação das MSTs está relacionada com um aumento da ação das proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-XL e Beclin1, diminuindo a taxa de apoptose dos cardiomiócitos e protegendo o miocárdio contra possíveis injúrias (Maejima *et al.*, 2013; Del Re *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2016). Recentemente foi demonstrado que BCL-2 pode controlar a atividade de MST2 ao invés de ser regulado pelas MSTs, neste estudo a inibição de BCL-2 ativou MST2 e promoveu a morte celular (Won *et al.*, 2019).

Além dos mecanismos de proliferação e apoptose, as MSTs regulam proteínas chave dos *checkpoints* mitóticos, como por exemplo as quinases Aurora B e NDR1/2, controlando assim o ciclo e a divisão celular. MST1 regula Aurora quinase B de modo que os microtúbulos fiquem estáveis durante a metáfase, promovendo a integridade genômica e progressão do ciclo celular (Oh *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). A relação de MST1 e MST2 com NDR é essencial para duplicação correta do centrossomo e alinhamento dos cromossomos durante a divisão celular (Chiba *et al.*, 2009; Hergovich *et al.*, 2009), além disso NDR previne o acúmulo de p21 e promove a estabilidade de cMyc levando a progressão da fase G1 do ciclo celular (Cornils *et al.*, 2011).

Em suma, as funções das MSTs são de grande relevância, atuando no controle da proliferação, apoptose e ciclo celular. Sendo de fundamental importância para a manutenção da homeostase celular e tecidual.

Compreender a função e regulação destas quinases é essencial, dado que perturbações nas MSTs implicam na alteração da expressão de diferentes vias moleculares que estão associadas com o crescimento e progressão do câncer. Portanto, acredita-se que as quinases MST podem estar envolvidas na progressão do MB e que possuem um papel importante na regulação de vias moleculares associadas.

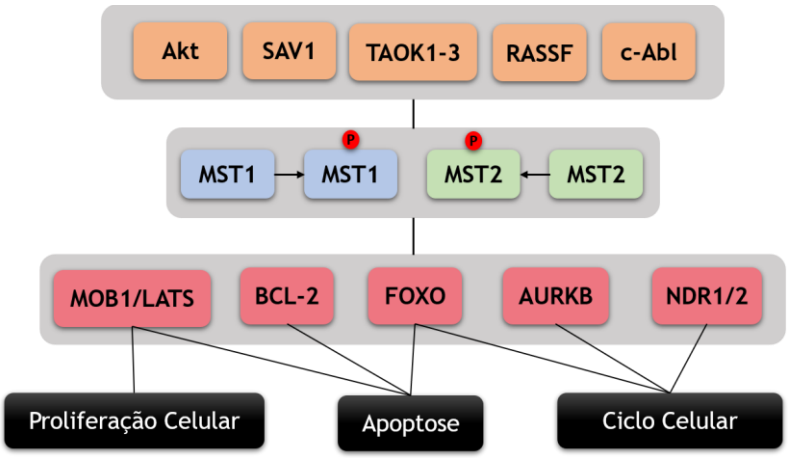


Figura 5. Regulação das quinases MST1 e MST2 e dos seus alvos envolvidos nos mecanismos celulares.

2. Objetivos do Estudo

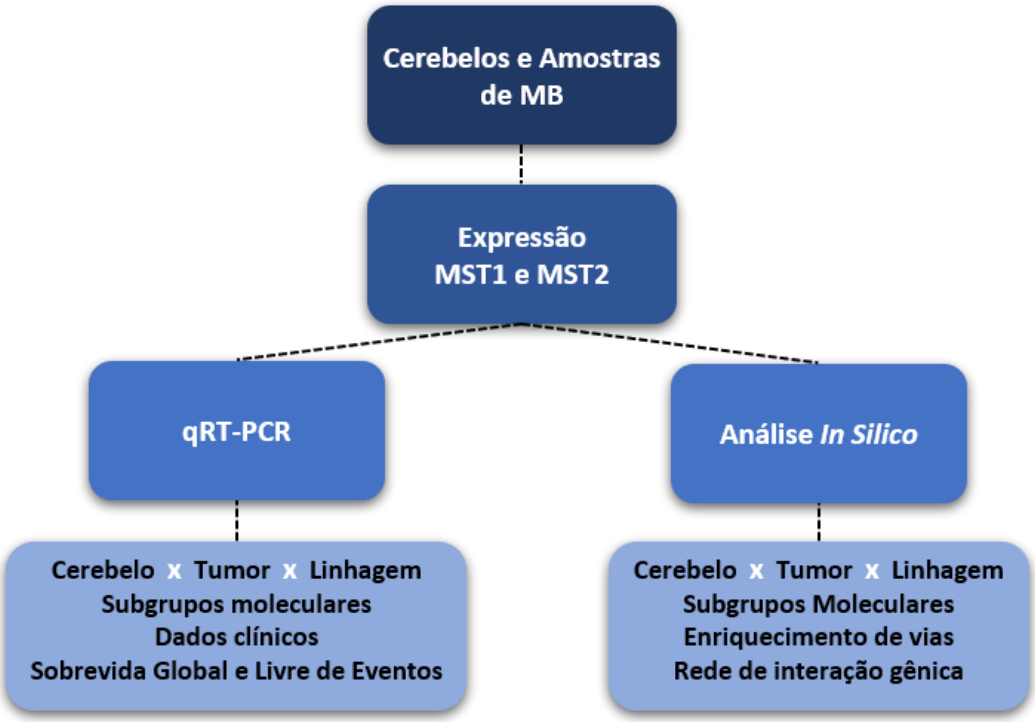
2.1. Objetivo Geral

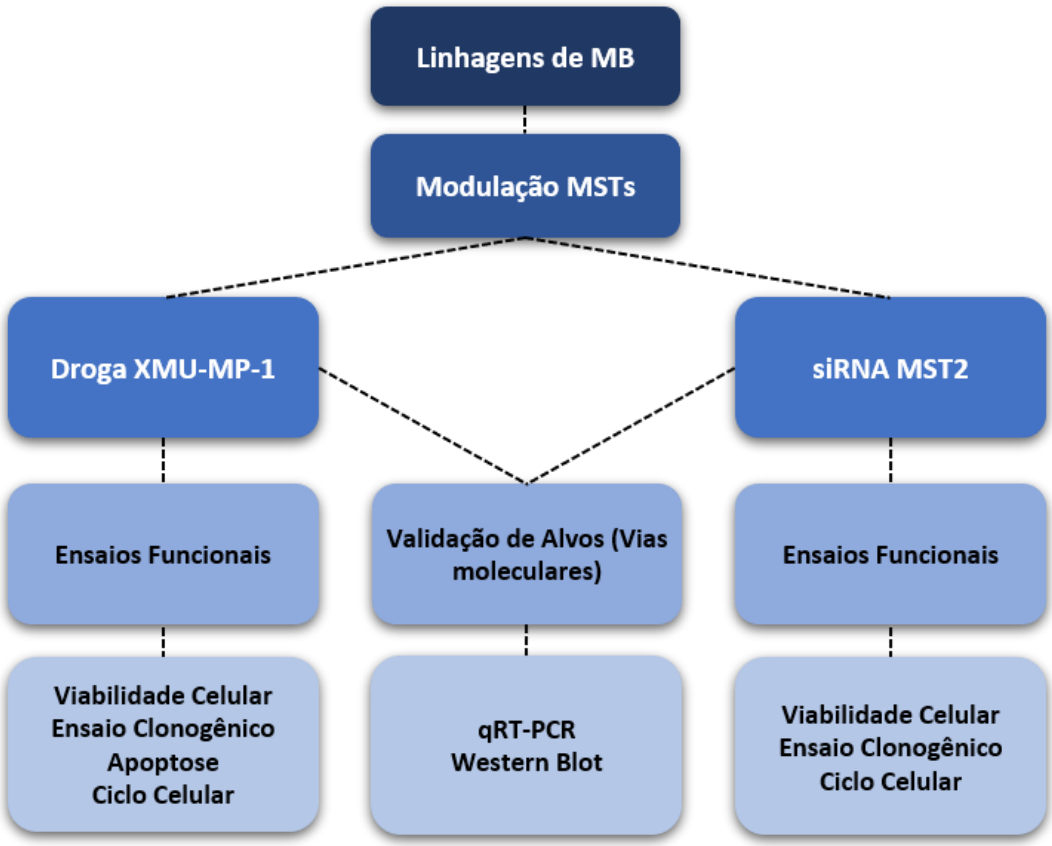
Analisar o envolvimento das quinases MST1 e MST2 na progressão tumoral do Meduloblastoma e avaliar seu papel na regulação das vias moleculares associadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica de *MST1* e *MST2* nas amostras e nas linhagens celulares de MB e nos subgrupos moleculares de MB;
- Comparar os dados de expressão obtidos com dados de expressão dos bancos de dados públicos;
- Modular MST1 e MST2 e analisar, por ensaios funcionais in vitro, o possível envolvimento das MSTs na progressão tumoral de MB;
- Avaliar o papel das MSTs nas vias associadas ao MB através de análises *in silico*;
- Validar a relação das MSTs com alvos das vias moleculares por qRT-PCR e Western Blot.

3. Delineamento experimental


Cerebelos e Amostras de MB
Expressão MST1 e MST2
qRT-PCR
Análise *In Silico*
Cerebelo x Tumor x Linhagem
Subgrupos moleculares
Dados clínicos
Sobrevida Global e Livre de Eventos
Cerebelo x Tumor x Linhagem
Subgrupos Moleculares
Enriquecimento de vias
Rede de interação gênica


Linhagens de MB
Modulação MSTs
Droga XMU-MP-1
siRNA MST2
Ensaios Funcionais
Validação de Alvos (Vias moleculares)
Ensaios Funcionais
Viabilidade Celular
Ensaio Clonogênico
Apoptose
Ciclo Celular
qRT-PCR
Western Blot
Viabilidade Celular
Ensaio Clonogênico
Ciclo Celular

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras de Pacientes e Linhagens Celulares de MB

As amostras utilizadas são provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e do Centro Infantil Boldrini - Campinas/SP. Foram utilizadas amostras de 45 pacientes portadores de MB pediátrico e 5 cerebelos não neoplásicos. As amostras citadas se encontram armazenadas em um biorepositório no Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP vinculado ao projeto temático da FAPESP (14/20341-0) "Interação entre alvos terapêuticos emergentes e vias de desenvolvimento associadas à tumorigênese: ênfase em neoplasias da criança e do adolescente", o qual possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Processo n° 15509/2016 (Anexo 1). As amostras de MB foram classificadas pelo nosso grupo de pesquisa pela técnica de PCR-*Array* e através dessa metodologia foi possível classificar 42 das 45 amostras de MB, das quais 10 são do subgrupo Wnt, 12 do subgrupo Shh, 9 do subgrupo 3 e 11 do subgrupo 4 (Cruzeiro *et al.*, 2019). Os dados clínicos e a classificação molecular dos pacientes utilizados neste projeto estão listados na Tabela 1.

Neste estudo foram utilizadas as linhagens DAOY, ONS-76 (adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ), UW473 (gentilmente cedida pelo Dr. Michael Bobola – Seattle Children's Hospital), UW228, D283 (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rafael Roesler – Departamento de Farmacologia/UFRGS), USP-13 e CHLA-01-Med (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto – Instituto de Biociências/USP). As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM/F12 com 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (SBF) em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37ºC. Para cultivar a linhagem CHLA-01-Med foi adicionado no meio de cultura 20ng/ml dos recombinantes humanos FGF e EGF (fatores de crescimento) e 1% do suplemento B27. As linhagens celulares foram autenticadas por meio de marcadores STR e validadas pela checagem do perfil na ATCC. Não foram verificadas contaminações cruzadas. As características específicas de cada linhagem celular está descrita na Tabela 2 (Xu, Margol, Asgharzadeh*, et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2016).

Tabela 1. Características clínicas e moleculares dos pacientes portadores de MB.

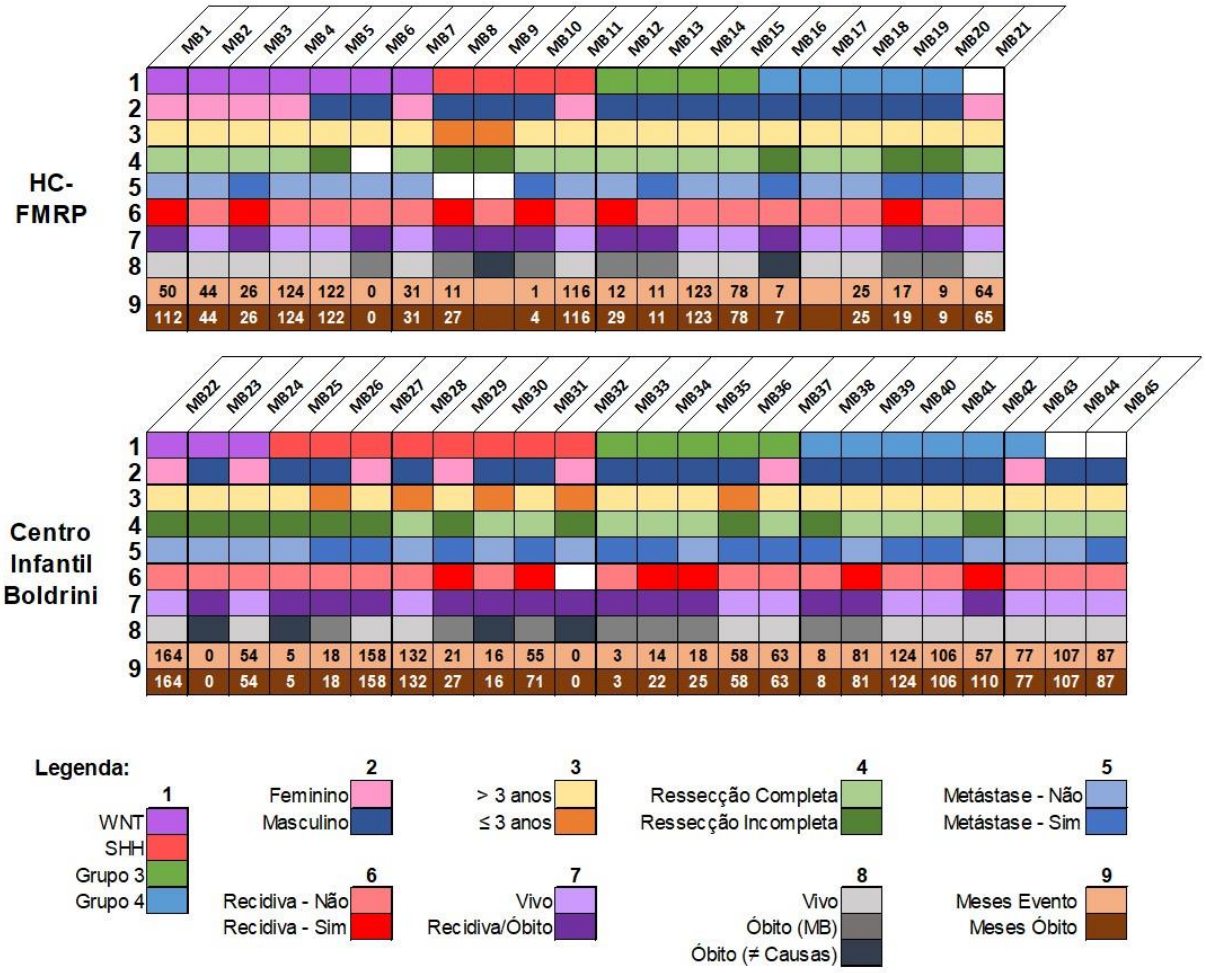


Tabela 2. Características clínicas e moleculares das linhagens celulares de MB.

Linhagem celular	Idade	Gênero	Subgrupo Molecular	Mutação TP53	Amplificação MYC	Referências
DAOY	4 anos	Masculino	SHH	Sim	Não	(Jacobsen *et al.*, 1985; Triscott *et al.*, 2013)
ONS-76	2 anos	Feminino	SHH	Não	Não	(Yamada *et al.*, 1989; Triscott *et al.*, 2013)
UW228	9 anos	Feminino	SHH	Sim	Não	(Keles *et al.*, 1995; Triscott *et al.*, 2013)
UW473	5 anos	Masculino	SHH	Sim	Não	(Bobola *et al.*, 2005; Castro-Gamero *et al.*, 2013)
D283	6 anos	Masculino	Grupo 3/4	Não	Não	(Friedman *et al.*, 1985; Sengupta *et al.*, 2014)
USP-13	3 anos	Masculino	Grupo 3/4	Não	Sim	(Silva *et al.*, 2016)
CHLA-01-Med	8 anos	Masculino	Grupo 4	Não	Sim	(Xu, Margol, Shukla, *et al.*, 2015)

4.2. Análise da expressão gênica

4.2.1. Extração do RNA e síntese do cDNA

As amostras de cerebelos não-neoplásicos, amostras dos tumores de MB e linhagens celulares de MB tiveram seu RNA total extraído utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, EUA) segundo as especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o kit High Capacity® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

4.2.2. qRT-PCR

Para quantificar a expressão dos genes foi realizada a técnica de qRT-PCR com a utilização do equipamento ABI PRISMTM 7500 *Sequence Detection Systems* por monitorização contínua de fluorescência por sondas *Taqman*® (*Appplied Biosystems*, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As diferenças na quantidade de cDNA total adicionada a cada reação foram normalizadas utilizando-se 2 genes de referência (*GUSB* e *HPRT1*) como controle interno. Foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação relativa da expressão gênica, sendo utilizada como calibrador a média das expressões dos cerebelos não neoplásicos ou a média dos controles negativos. Sondas Taqman® utilizadas foram *STK3 (MST2)* (Hs00169491), *STK4 (MST1)* (Hs00178979), *YAP1* (Hs00902712), *GLI1* (Hs00171790), *GLI2* (Hs01119974), *SMAD3* (Hs00969210), *LEF1* (Hs01547250), *GUSB* (Hs00939627) e *HPRT1* (Hs02800695).

4.3. Western Blot

Expressão proteica foi realizada através da metodologia de Western Blot. Primeiramente foi realizada a extração das proteínas das culturas celulares por meio do reagente RIPA *Lysis and Extraction Buffer*® (*Pierce Biotechnology*, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise proteica, 40-50µg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e então incubadas em TBST 1% contendo 5% de solução bloqueadora 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 (Tabela 3). As membranas foram então lavadas com TBST 1% e incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do Kit ECL™ Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Foi analisada a intensidade das bandas para a quantificação da expressão proteica através do software ImageJ 1.52a (NIH).

Tabela 3. Lista de anticorpos primários utilizados neste estudo.

Anticorpo	Código	Diluição	Especificações	Empresa
MST1/MST2 Fosforilado (T-183)/(T-180)	#49332	1:1000 BSA	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
MST2	#3952	1:1000 BSA	Rabbit Policlonal	Cell Signaling
YAP Fosforilado (Ser-127)	#13008	1:1000 BSA	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
YAP	#14074	1:1000 BSA	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
SMAD3 Fosforilado (S423/S425)	ab52903	1:1000 Leite	Rabbit Monoclonal	Abcam
SMAD2/3	#8685	1:1000 Leite	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
GLI1	#2534	1:1000 BSA	Rabbit Policlonal	Cell Signaling
p21	#2947	1:1000 Leite	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
GAPDH	sc-47724	1:1000 Leite	Mouse Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology

4.4. Modulação das quinases MST1 e MST2

4.4.1. Tratamento com a Droga XMU-MP-1

Para os diferentes ensaios funcionais as linhagens celulares foram tratadas com a droga XMU-MP-1 (*4-((5,10-dimethyl-6-oxo-6,10-dihydro-5H-pyrimido[5,4-b]thieno[3,2-e][1,4]diazepin-2-yl)amino)benzenesulfonamide*) da empresa MedChem Express ® (HY-100526), um inibidor seletivo da atividade de MST1 e MST2. A droga foi dissolvida em DMSO na concentração de 10mM conforme recomendação do fabricante. Após o tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular, capacidade clonogênica, ciclo celular e apoptose nas 4 linhagens celulares de MB: DAOY, ONS-76, UW228 e UW473.

4.4.2. Transfecção com siRNA

Foi realizado o silenciamento gênico de *MST2* através da transfecção com siRNA. Foi realizado o protocolo de transfecção reversa, o qual as células foram plaqueadas juntamente com o mix de transfecção composto por 25nM de siRNA *Silencer® Select* (*ThermoFisher Scientific*), lipofectamina RNAiMAX® (*ThermoFisher Scientific*) e OPTI-MEM™ (Gibco™). As quantidades dos reagentes foram de acordo com a recomendação do fabricante. As células foram transfectadas com siRNA alvo de *MST2* (s13567) e com siRNA controle negativo (4390843) que não possui um alvo específico. Após a confirmação do silenciamento gênico por qRT-PCR e Western blot, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, capacidade clonogênica e ciclo celular nas 3 linhagens celulares de MB: DAOY, ONS-76 e UW228.

4.5. Ensaios Funcionais

4.5.1. Viabilidade Celular

As linhagens celulares foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular em placas de 96 poços. Foi realizado os experimentos com a droga XMU-MP-1 nas doses de 0, 0.25, 0.5, 1, 5 e 10µM e com siRNA na concentração de 25nM. Foram semeadas em triplicata 1-3 x 10^3 células/poço e, em seguida, incubadas por 24, 48, 72, 96 horas a 37°C. A cada intervalo de 24 horas, foi realizada a adição, no meio de cultura, de 30µL do reagente CellTiter-Glo® (Promega) em temperatura ambiente. As placas foram agitadas e incubadas por 10 minutos, segundo instruções do fabricante, e a leitura de luminescência foi realizada utilizando o aparelho SpectraMax® L Microplate Reader. Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

A detecção é baseada no uso da reação de luciferase para medir a quantidade de ATP de células viáveis. Em poucos minutos após a perda da integridade da membrana, as células perdem a capacidade de sintetizar o 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) inibe as ATPases endógenas e 3) fornece luciferina, luciferase e outros reagentes necessários para medir o ATP usando uma reação bioluminescente.

- **IC50:** Para o cálculo do IC50 (concentração inibitória para 50% das células) da droga XMU-MP-1 foi utilizado o software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). Para cada experimento foram utilizados os dados obtidos na viabilidade celular, através da análise da fração celular afetada após o tratamento com as diferentes doses da droga XMU-MP-1 em comparação com controle (DMSO).

4.5.2. Ensaio Clonogênico

Para o ensaio de clonogênica, foram plaqueadas 300-500 células/poço em placas de cultura de 6 poços em triplicata. Após plaqueamento as células foram tratadas com a droga XMU-MP-1 por 72 horas nas doses de 0, 0.25, 0.5 e 1µM. Para o experimento com siRNA, as células foram plaqueadas para o ensaio clonogênico após 48 horas de transfecção com siRNA na concentração de 25nM. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 7-15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização e contagem das colônias, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol, e coradas com Giemsa. Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

4.5.3. Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo após marcação com PI. Primeiramente as células foram plaqueadas em placas de seis poços (3-4x10^4 células/poço). Foram realizados os experimentos após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 0, 1 e 5µM e com siRNA (25nM) após 48 horas. Depois do tempo de experimento essas células foram coletadas, lavadas com PBS duas vezes, fixadas com solução de etanol a 70% e depois mantidas a -20°C *overnight*. As células foram centrifugadas (400g durante 5 minutos) e o pellet resultante foi ressuspenso em PBS com RNAse A (10 ng/mL) e incubado a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e foi adicionado PBS com PI a uma concentração final de 50µg/ml para marcação das células. 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. Os experimentos foram repetidos três

vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

4.5.4. Apoptose

Para o ensaio de apoptose, 3-5x10^4 células foram plaqueadas em placas de 6 poços. Foi realizado os experimentos após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 0, 1 e 5µM. Após o tempo de ensaio, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas com PBS gelado e depois ressuspendidas em 250uL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). As células foram então incubadas e marcadas com 5µL de Anexina FITC (BD Biosciences Pharmigen, USA) e 50µL de solução de iodeto de propídio (PI) a uma concentração de 50µM. As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e foram obtidas as porcentagens das células marcadas ou não com Anexina e ou PI. Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados com os resultados das células do controle negativo.

4.6. Análise In Silico

Foi utilizada a plataforma R2: *Genomics Analysis and Visualization* para avaliar se os dados de expressão das MSTs obtidos nas amostras de MB e nos subgrupos moleculares correspondem com os dados de bancos públicos. Nessa plataforma é possível analisar a expressão de diversos genes em diferentes bancos de dados. Para a análise de comparação da expressão entre as amostras de MB e cerebelo foi utilizado o banco de dados de Pfister (Northcott *et al.*, 2017) que possui a análise de 223 amostras de MB (190 amostras de MB pediátrico). Sendo que este banco era o que possuía o maior número de amostras de MB que poderia ser comparado com os dados de cerebelo não neoplásico do banco de dados de Roth (Roth *et al.*, 2006) que apresenta análise de expressão de 9 amostras, e com o banco de dados de Versteeg (ps_avgpres_itcccellline86_u133p2) que possui a análise de 14 linhagens celulares de MB. Outros bancos com grande número de amostras, como Cavalli com 763 amostras de MB (563 amostras de MB pediátrico) e Pfister com 167 amostras de MB (137 amostras de MB pediátrico), utilizaram diferentes metodologias e/ou normalizações não possibilitando essa mesma comparação (Cavalli *et al.*, 2017;

Waszak *et al.*, 2018). Esses dois bancos em adição ao banco de Pfister com 190 amostras de MB pediátrico foram utilizados para a análise da expressão das MSTs nos subgrupos moleculares. Nessas análises foram utilizados dados somente dos pacientes pediátricos.

Foi utilizada também a plataforma R2: *Genomics Analysis and Visualization* para avaliar quais genes eram os mais correlacionados com a expressão de *MST2* nas amostras de MB. Nesta análise foram avaliados quais genes em comum dos dois bancos de dados, Cavalli com 763 amostras (*microarray*) e Pfister com 167 amostras de MB (sequenciamento do transcriptoma), possuíam o fator de correlação de expressão R≥0.4 e R≤-0.4 com *MST2*. Esses dois bancos de dados foram escolhidos por possuírem metodologias diferentes, corroborando para dados mais robustos. Com os genes em comum foi realizada a análise de enriquecimento de vias pelo *KEEG pathways,* através da ferramenta online *DAVID Bioinformatics Resources 6.8 e* foi possível elaborar uma rede de interação proteica através da ferramenta online STRING 11.0 juntamente com o programa Cytoscape 3.6.1.

4.7. Validação dos alvos

Após análise *in silico* foi avaliada a expressão de alguns alvos das vias de sinalização pelas metodologias de qRT-PCR e Western Blot citadas acima. A expressão gênica dos genes *GLI1*, *GLI2*, *SMAD3*, *YAP1* e *LEF1* foi avaliada de duas formas, a primeira foi após 12 horas de tratamento com diferentes doses da droga XMU-MP-1 (1 e 5µM) e foi utilizado como controle a média da expressão das células tratadas somente com DMSO. A segunda forma foi após 48 horas da transfecção com siRNA e foi utilizado como controle a média da expressão das células transfectadas com siRNA controle (siContr). A expressão foi avaliada em triplicata experimental.

A expressão proteica foi realizada após 48 horas do tratamento com a droga XMU-MP-1 (0-10µM) e da transfecção com siRNA. Foram avaliadas as expressões das proteínas MST1/2 fosforilada, MST2, YAP fosforilado, YAP, SMAD3 fosforilado, SMAD2/3, GLI1, p21 e como controle endógeno foi utilizado GAPDH. Foi analisada a intensidade das bandas para a quantificação da expressão proteica através do software ImageJ 1.52a (NIH).

4.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) e do programa GraphPad Prism® 5.

4.8.1. Expressão gênica diferencial

Para a análise da expressão gênica das amostras e linhagens de MB em comparação com as amostras de cerebelos não-neoplásicos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de P≤0,05. Esse mesmo teste foi utilizado para análise da expressão diferencial das MSTs com as características clínicas dos pacientes. As variáveis analisadas dos pacientes foram: Gênero (Feminino ou Masculino); Idade ao diagnóstico (≥ 3 anos ou < 3 anos); Grau de Ressecção (Completa ou Incompleta); Metástase (Presente ou Ausente); 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 faleceu pelo MB) e Subgrupos Moleculares.

4.8.2. Sobrevida Global e Livre de Eventos

Para análise da sobrevida global em 5 anos e sobrevida livre de eventos em 5 anos dos pacientes foi realizada a análise univariada onde foi aplicado o teste Log-Rank e construídas curvas de Kaplan-Meier, foi considerada a mediana de expressão de cada MST nos tumores como valor de corte para hipoexpressão ou hiperexpressão. Foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de P≤0,05.

4.8.3. Correlação entre os valores das expressões gênicas

A correlação foi analisada através do coeficiente de Spearman Rho. Foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de P≤0,05.

4.8.4. Análise dos ensaios funcionais

Para os ensaios funcionais de viabilidade celular, ensaio clonogênico, apoptose e ciclo celular foram utilizados os testes *t-student*, *Anova One Way* e pós-teste de Bonferroni. Foram considerados valores significativamente estatísticos aqueles com valor de P≤0,05.

5. Resultados

5.1. Análise da expressão gênica de MST1 e MST2

5.1.1. Análise dos níveis de expressão gênica de MST1 e MST2 nas amostras de MB

Foi realizada a análise da expressão gênica de *MST1* e *MST2* nas amostras tumorais e linhagens de MB comparada com a expressão de amostras de cerebelos não neoplásicos por qRT-PCR e *in silico* (Figuras 6 e 7). Pela análise por qRT-PCR, foi possível observar diferença significativa na expressão de *MST2*, o qual está mais expresso nas amostras tumorais (p=0.0236) e nas linhagens celulares de MB (p=0.0025) (Figura 7A) quando comparado com os dados de expressão dos cerebelos. A diferença de expressão de *MST1* não foi significativa nas amostras de MB (Figura 6A). Na análise *in silico*, a expressão de *MST2* também foi mais elevada nas amostras tumorais e nas linhagens de MB (p< 0.0001) quando comparado com as amostras de cerebelo (Figura 7B), e a expressão de *MST1* não teve diferença significativa, similar aos dados de qRT-PCR (Figura 6B).

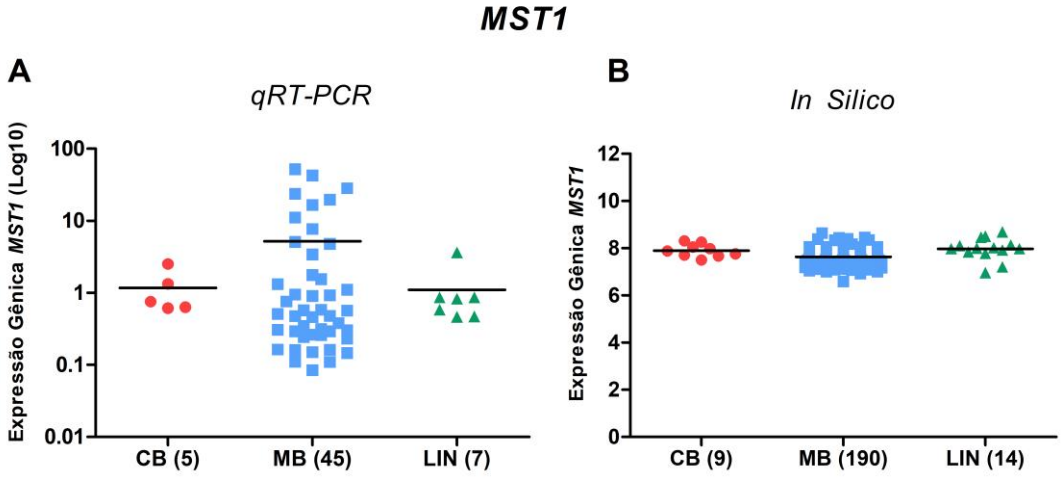


Figura 6. Expressão gênica de ***MST1*** nas amostras de cerebelo não neoplásico (CB), nas amostras de MB (MB) e nas linhagens celulares de MB (LIN) pela análise de qRT-PCR **(A)** e pela análise *in silico* **(B)**. Os valores da expressão gênica da análise de qRT-PCR estão em escala logarítmica.

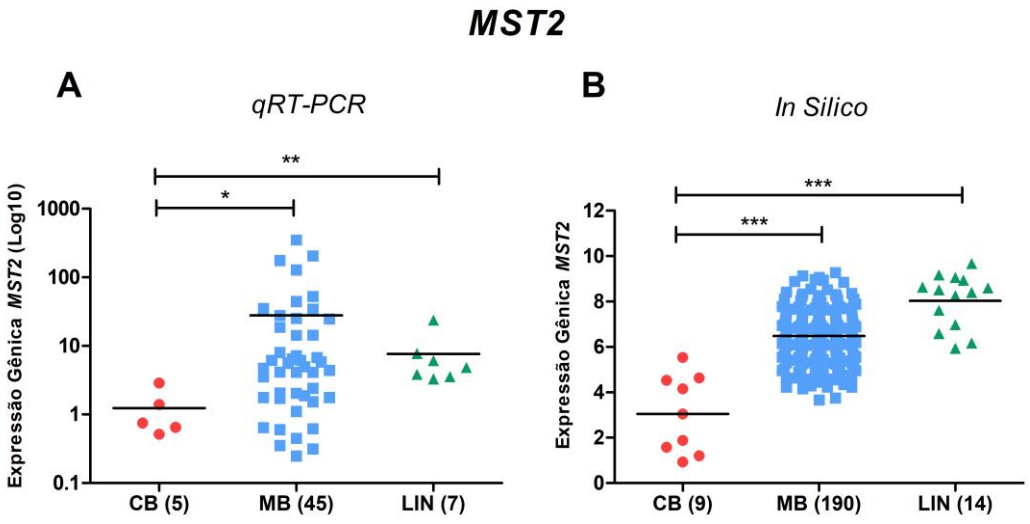


Figura 7. Expressão gênica de ***MST2*** nas amostras de cerebelo não neoplásico (CB), nas amostras de MB (MB) e nas linhagens celulares de MB (LIN) pela análise de qRT-PCR **(A)** e pela análise *in silico* **(B)**. Os valores da expressão gênica da análise de qRT-PCR estão em escala logarítmica. * p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,001

5.1.2. Análise dos níveis de expressão gênica de MST1 e MST2 e as características clínicas dos pacientes

Ao analisar a expressão diferencial de *MST1* e *MST2* com as características clínicas dos pacientes não foi observado nenhum parâmetro que possui diferença estatística como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes de MB e os valores de p das expressões de *MST1* e *MST2* analisados nos diferentes parâmetros.

Parâmetro	Variáveis	Número de casos (%)	Valor de p	
			MST1	*MST2*
Gênero	Masculino	31 (69%)	0.111	0.825
	Feminino	14 (31%)		
Idade ao Diagnóstico	< 3 anos	38 (84%)	0.074	0.234
	> 3 anos	7 (16%)		
Grau da Ressecção	Completo	27 (60%)	0.8	0.588
	Incompleto	17 (38%0		
	Sem informação	1 (2%)		
Metástase	Sim	18 (40%)	0.941	0.058
	Não	25 (56%)		
	Sem informação	2 (4%)		
Recidiva	Sim	12 (27%)	0.356	0.752
	Não	32 (71%)		
	Sem informação	1 (2%)		
Evento	Vivo	20 (44%)	0.732	0.873
	Recidiva/Óbito	25 (56%)		
Status da Doença	Vivo	24 (53%)	0.184	0.795
	Óbito pelo MB	15 (33%)		

5.1.3. Análise dos níveis de expressão gênica de MST1 e MST2 e a Sobrevida Livre de Eventos e Global dos Pacientes

Para relacionar os dados clínicos dos pacientes e as expressões de *MST1* e *MST2* com a sobrevida dos mesmos foi realizada uma análise pelo teste Log Rank, a partir do qual foram construídas curvas de Kaplan-Meier a partir da mediana de expressão dos genes analisados como ponto de referência. Não houve nenhum dado estatístico significante entre as expressões gênicas de *MST1* (Figura 8) e *MST2* (Figura 9) e a sobrevida livre de eventos e globais dos pacientes.

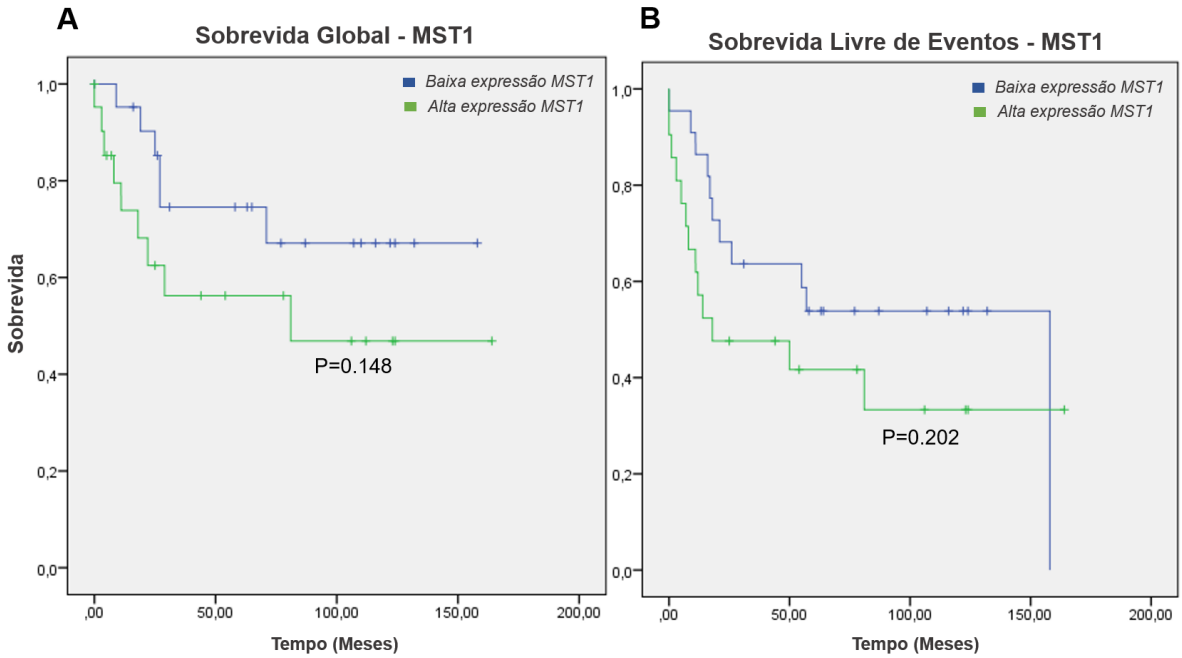


Figura 8. Curvas de sobrevivência global **(A)** e livre de eventos **(B)** pelo tempo em meses, relacionadas à mediana de expressão relativa do gene ***MST1***.

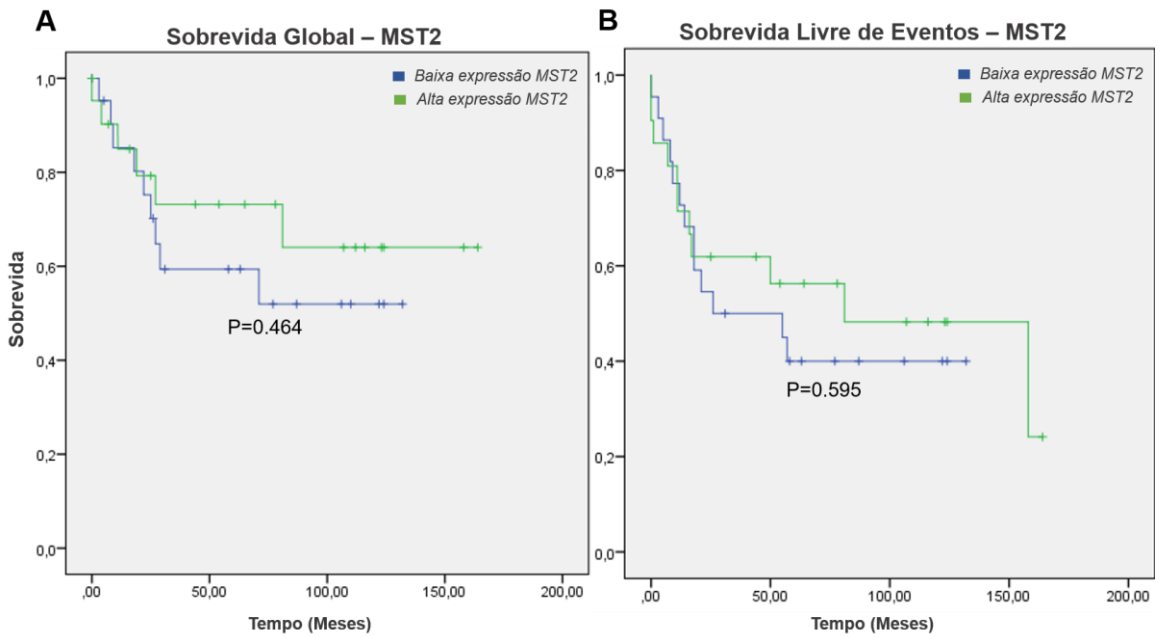


Figura 9. Curvas de sobrevivência global **(A)** e livre de eventos **(B)** pelo tempo em meses, relacionadas à mediana de expressão relativa do gene ***MST2***.

5.1.4. Análise dos níveis de expressão gênica de MST1 e MST2 nos Subgrupos Moleculares de MB

Foi realizada a análise da expressão diferencial de *MST1* e *MST2* entre os subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4 tanto pelos dados obtidos pelo qRT-PCR quanto pela análise *in silico*. Não existe diferença na expressão de *MST1* entre os subgrupos moleculares tanto na análise por qRT-PCR (Figura 10A) quanto na análise *in silico* dos três banco de dados (Figura 10B-D). A expressão gênica de *MST2* foi maior no subgrupo WNT(p=0.0027) e SHH (p=0.0098) quando comparado com a expressão nas amostras de cerebelo não neoplásico na análise por qRT-PCR (Figura 11A). Na análise *in silico,* com dados de Pfister_190, a diferença da expressão de *MST2* foi significativa (p< 0.0001) na comparação de todos os subgrupos entre si e com o cerebelo (Figura 11B). Nos outros bancos de dados a expressão de *MST2* também é mais elevada nos subgrupos WNT e SHH comparado com os subgrupos 3 e 4 (Figura 11C e 11D).

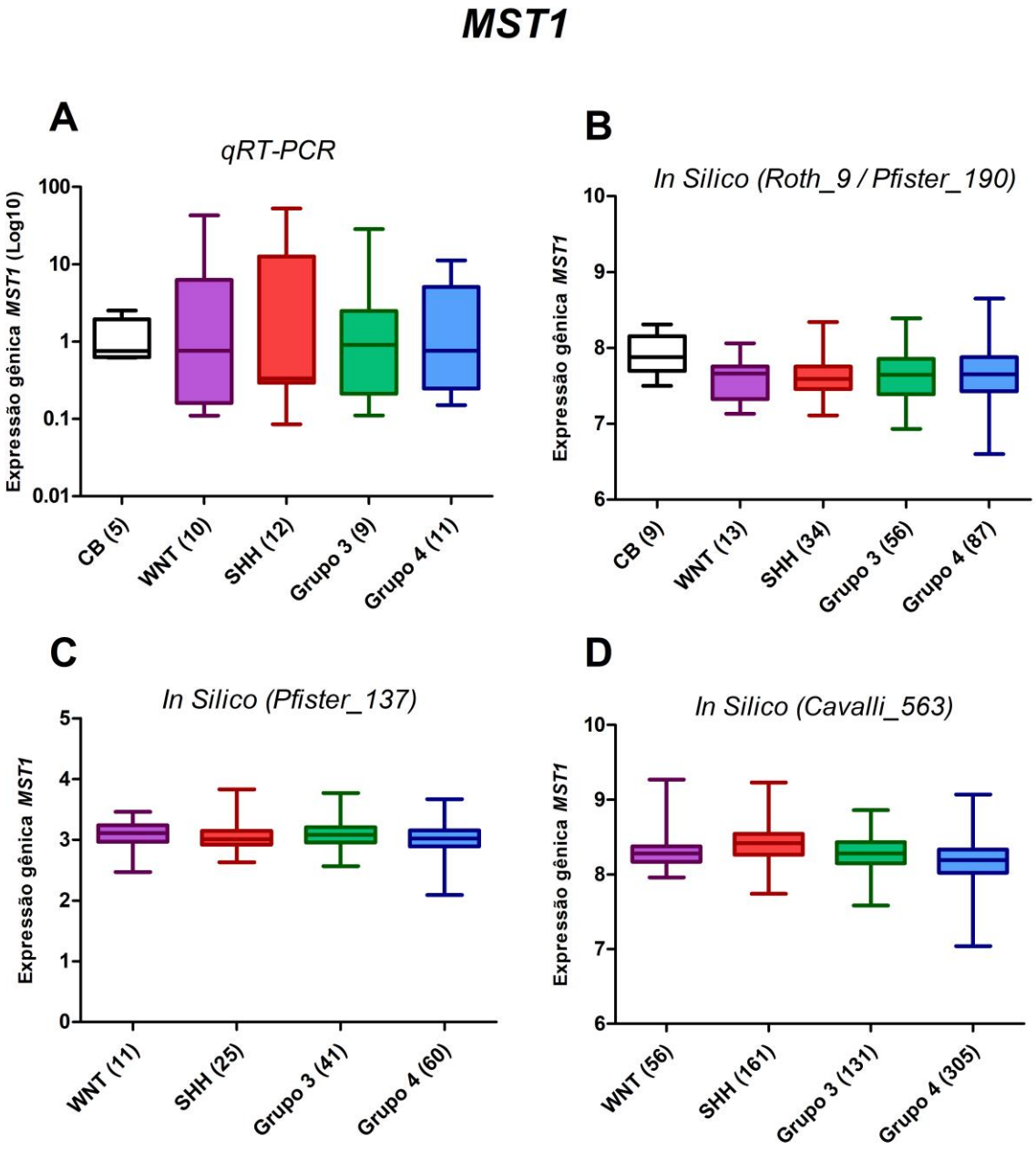


Figura 10. Expressão gênica de ***MST1*** nos diferentes subgrupos moleculares de MB pela análise por qRT-PCR **(A)** e nos diferentes banco de dados: Pfister_190 **(B)**, Pfister_137 **(C)** e Cavalli_563 **(D)**. CB - Cerebelo não neoplásico. Os valores da expressão gênica da análise por qRT-PCR estão em escala logarítmica.

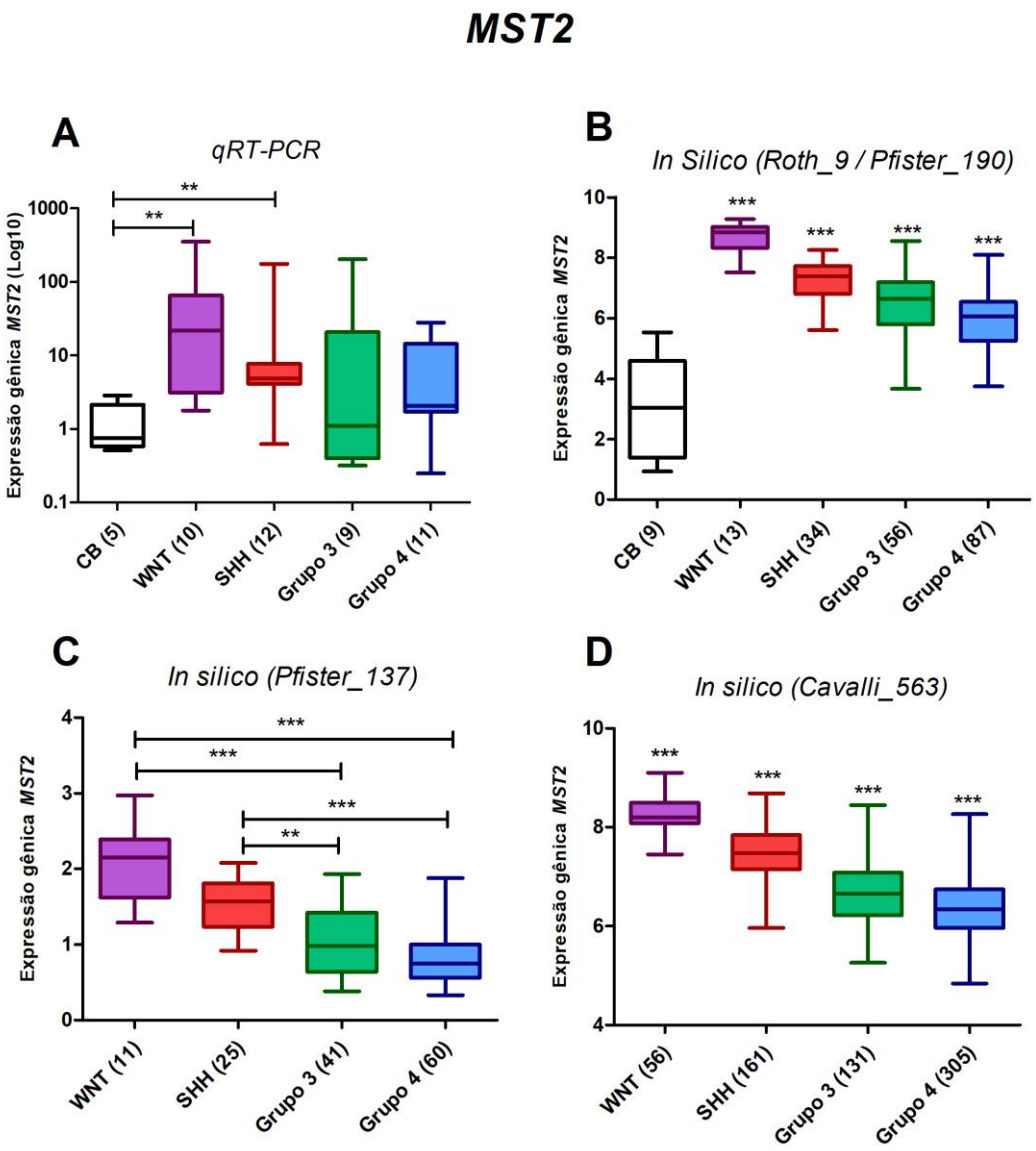


Figura 11. Expressão gênica de ***MST2*** nos diferentes subgrupos moleculares de MB pela análise por qRT-PCR **(A)** e nos diferentes banco de dados Pfister_190 **(B)**, Pfister_137 **(C)** e Cavalli_563 **(D)**. CB - Cerebelo não neoplásico. Os valores da expressão gênica da análise por qRT-PCR estão em escala logarítmica. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

5.2. Análise da expressão proteica de MST1 e MST2 nas linhagens de MB

Foi realizada a análise da expressão proteica através da metodologia do Western Blot para avaliar se as quinases MST1 e MST2 estão fosforiladas nas linhagens celulares de MB. Na figura 12 é possível observar que as quinases estão fosforiladas/ativas nas linhagens celulares de MB, com exceção da linhagem USP-13. E nas amostras de cerebelos não neoplásicos não há expressão proteica de MST1 e MST2 tanto da proteína fosforilada quanto da proteína total.

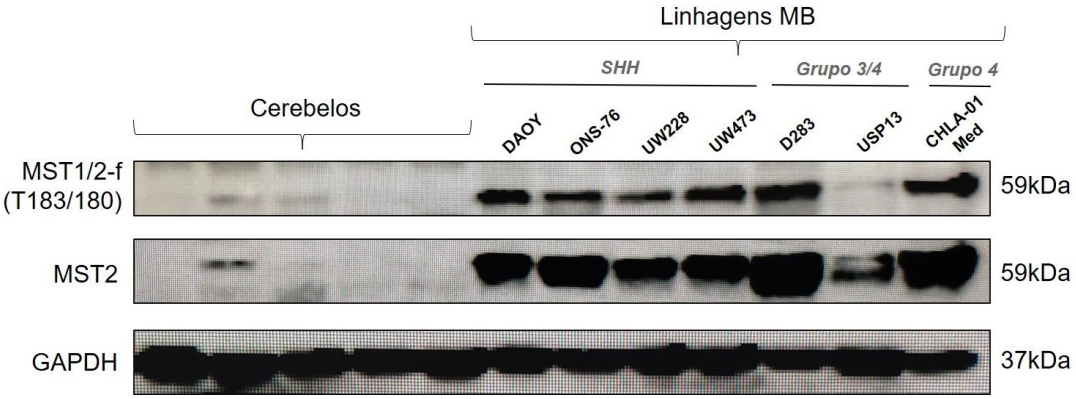


Figura 12. Análise da expressão da proteína fosforilada de MST1 e MST2 e da proteína total de MST2 nas 7 linhagens celulares de MB e nas 5 amostras de cerebelos não neoplásicos.

5.3. Inibição farmacológica da atividade de MST1/2 nas linhagens de MB

Como foi observado uma maior expressão gênica de MST2 nas amostras de MB e uma maior expressão proteica nas linhagens em comparação com cerebelo foi realizada a inibição farmacológica das quinases MSTs. Foi utilizada a droga XMU-MP-1, inibidor seletivo da atividade de MST1 e MST2, para avaliar se as quinases tem envolvimento na progressão tumoral de MB através de ensaios funcionais *in vitro*. Como foi observado uma maior expressão de *MST2* no subgrupo SHH foram utilizadas quatro linhagens celulares desse subgrupo: DAOY, ONS-76, UW228 e UW473.

5.3.1. Viabilidade Celular após o tratamento com droga XMU-MP-1

Após o tratamento com a droga XMU-MP-1 houve uma diminuição da viabilidade celular nas quatro linhagens de MB com uma maior evidência a partir de 48 horas de tratamento (Figura 13). Com os dados da viabilidade celular, foi realizado o cálculo do IC50 nas quatro linhagens após 72 horas de tratamento (Figura 14). As linhagens celulares DAOY (Figura 13A) e ONS-76 (Figura 13B) foram as mais sensíveis com valor de IC50 de 2.21µM e 2.67µM respectivamente, a linhagem UW473 (Figura 13D) foi mais resistente com IC50 de 7.64µM após 72 horas de tratamento, a linhagem UW228 (Figura 13C) também teve uma diminuição significativa na viabilidade celular com IC50 de 3.14 µM. Todas as linhagens tiveram uma diminuição da viabilidade celular de pelo menos 70% após 96 horas de tratamento.

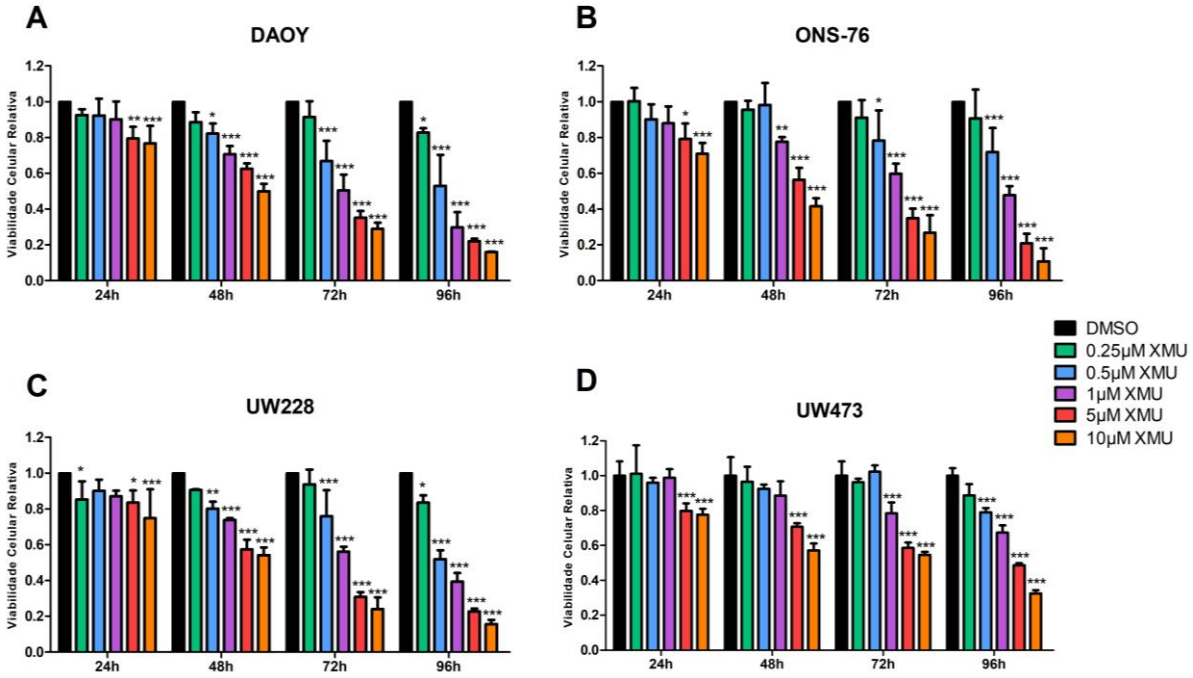


Figura 13. Viabilidade celular relativa ao DMSO após tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 0.25µM-10µM nos tempos de 24 horas a 96 horas nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D).** * p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,001

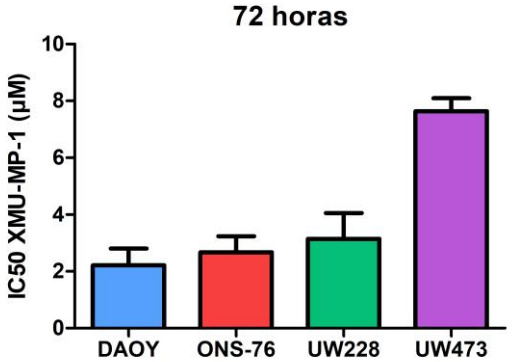


Figura 14. Valores do IC50 da droga XMU-MP-1 para as linhagens DAOY, ONS-76, UW228 e UW473 após 72 horas de tratamento. Representativo de 3 experimentos independentes em triplicata nas linhagens celulares**.**

5.3.2. Ensaio Clonogênico após tratamento com a droga XMU-MP-1

Após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 houve uma diminuição na formação de colônias nas quatro linhagens de MB, nos gráficos e nas imagens é possível observar que na dose de 1µM não há formação de colônias nas quatro linhagens celulares (Figura 15).

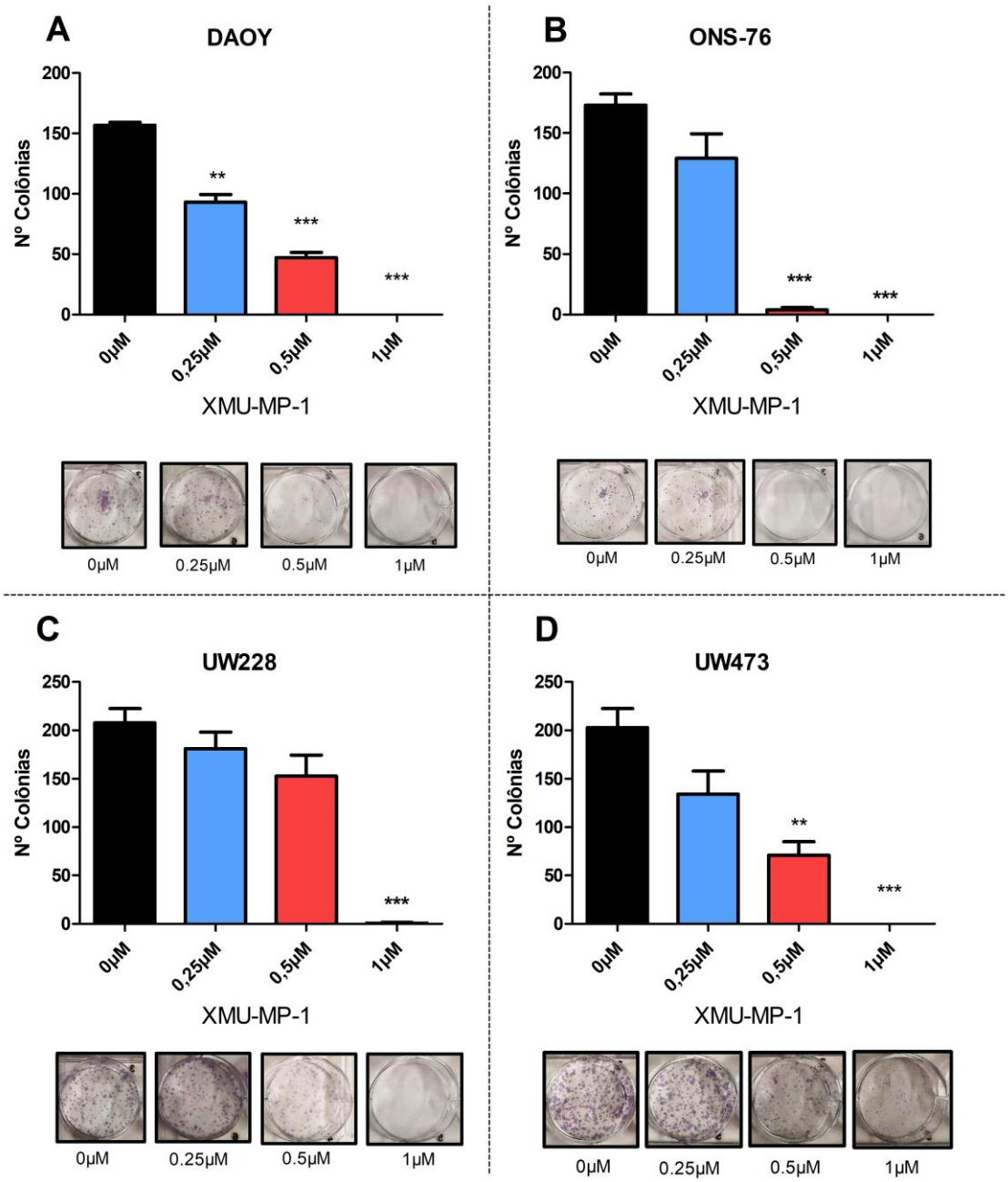


Figura 15. Número de colônias formadas após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 0.25 a 1µM nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)** e abaixo do gráfico foto representativa das colônias de cada dose da droga nas respectivas linhagens. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

5.3.3. Ciclo Celular após tratamento com a droga XMU-MP-1

Análise do ciclo celular foi realizada após 72 horas de tratamento nas doses 1 e 5 µM de XMU-MP-1. As linhagens DAOY (Figura 16A), ONS-76 (Figura 16B) e UW228 (Figura 16C) tiveram uma diminuição de 20 a 30% no número de células em G1 e um aumento de 15 a 30% na fase G2/M após o tratamento com XMU-MP-1 em

comparação com as células tratadas somente com DMSO. Em adição, foi possível observar um aumento de células na fase subG1 na linhagem DAOY (Figura 16A). Na linhagem UW473 o tratamento não promoveu alterações no ciclo celular (Figura 16D).

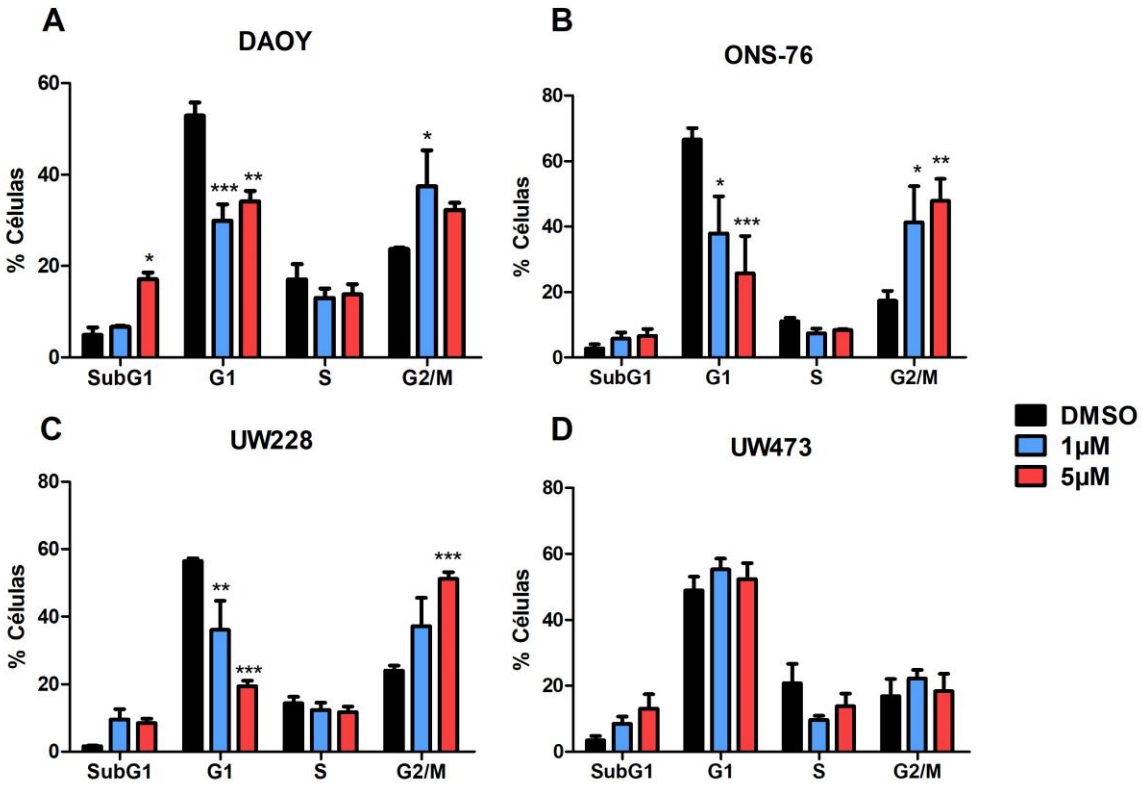


Figura 16. Análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 1 e 5µM nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)**. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

5.3.4. Apoptose após tratamento com a droga XMU-MP-1

Foi realizado o experimento de apoptose através da análise por citometria de fluxo da marcação de Anexina e PI após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 foi. Houve uma diminuição das células viáveis (sem marcação), porém a taxa de apoptose, marcação de Anexina e PI, não foi significativa após o tratamento. Foi possível observar um aumento da marcação de PI após o tratamento nas linhagens DAOY e UW473, e a linhagem UW228 teve um aumento da marcação de Anexina. (Figura 17 e Tabela 5).

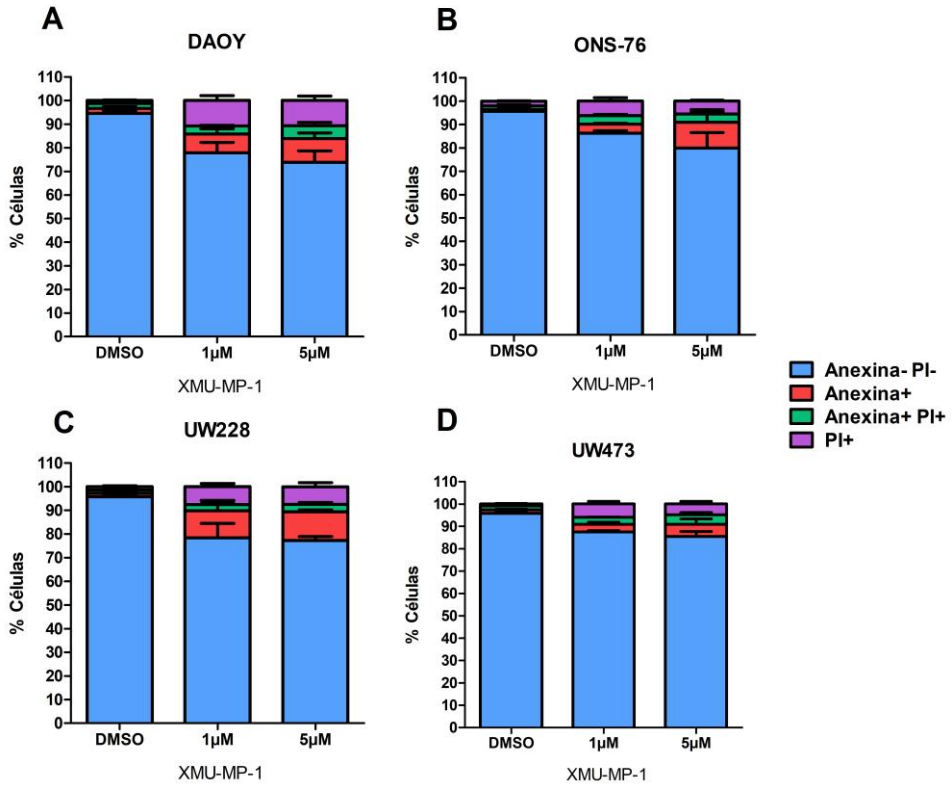


Figura 17. Análise da apoptose através da porcentagem células positivas para Anexina e/ou PI após 72 horas de tratamento com a droga XMU-MP-1 nas doses de 1 e 5µM nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)**, UW228 **(C)** e UW473 **(D)**.

Tabela 5. Porcentagens de células marcadas com Anexina e/ou PI no ensaio de Apoptose após tratamento com a droga XMU-MP-1.

		% Células Marcadas			
	XMU-MP-1	**Anexina- PI-**	**Anexina +**	**Anexina+ PI+**	**PI+**
DAOY	**DMSO**	94.5±1.52	2.06±1.02	2.08±0.51	1.28±0.27
	1µM	77.8±6.31 ***	8.00±3.14	3.40±0.40	10.78±2.94 *
	5µM	73.8±6.9 ***	10.15±3.29	5.35±2.04	10.74±2.65 *
ONS-76	**DMSO**	95.61±1.13	0.72±0.28	1.57±0.76	2.09±0.14
	1µM	86.23±1.57 *	3.87±0.52	3.66±0.69	6.22±1.93
	5µM	79.98±9.24 ***	10.98±7.55	3.54±1,29	5.49±0.44
UW228	**DMSO**	95.74±0.95	1.49±0.63	1.36±0.66	1.4±0.52
	1µM	78.29±8.67 ***	11.51±6.23 *	2.63±0.54	7.55±1.90
	5µM	77.12±2.41 ***	12.2±1.21 *	3.19±1.07	7.48±2.44
UW473	**DMSO**	95.77±0.59	1.63±0.33	1.71±0.62	0.87±0.25
	1µM	87.49±0.84 ***	3.42±1.30	3.15±0.07	5.92±1.53 *
	5µM	85.46±3.18 ***	5.49±3.24	4.2±1.47	4.84±1.55

Valores comparados com controle (DMSO) * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

5.4. Transfecção com siRNA nas linhagens de MB

Para confirmar e corroborar que a diminuição da viabilidade, formação de colônias e mudança no ciclo celular ocorre devido a inibição das MSTs foi realizado o *knockdown* de *MST2* através da transfecção com siRNA. Após a confirmação do silenciamento gênico e proteico foram realizados os ensaios funcionais nas 3 linhagens celulares de MB: DAOY, ONS-76 e UW228.

5.4.1. Confirmação do silenciamento de MST2

Foi realizado qRT-PCR e Western blot para confirmar que a transfecção com siRNA diminui a expressão de MST2. Para isso foi analisada a expressão gênica e proteica após 48 horas das células transfectadas com siRNA do alvo *MST2* comparada com a expressão das células transfectadas com siRNA controle negativo (siContr). A transfecção com siRNA do alvo *MST2* foi eficiente nas três linhagens celulares de MB, como uma inibição da expressão gênica de *MST2* maior que 70% (Figura 18) e promoveu uma diminuição da expressão proteica (Figura 19).

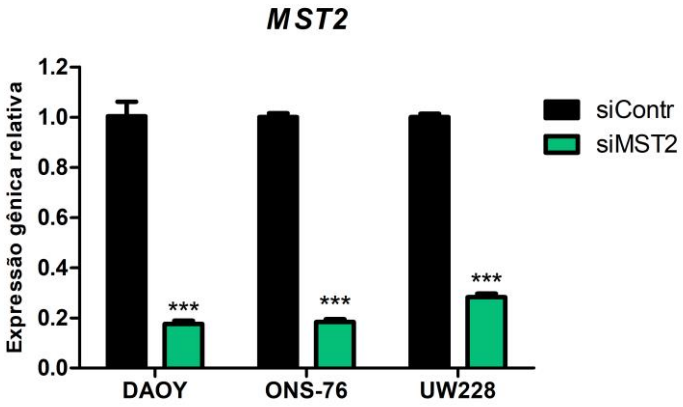


Figura 18. Análise da expressão gênica de ***MST2*** após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY, ONS-76 e UW228.

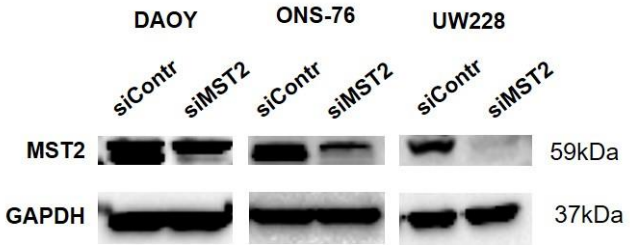


Figura 19. Análise da expressão proteica de ***MST2*** após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY, ONS-76 e UW228.

5.4.2. Viabilidade Celular após transfecção com siRNA

Após confirmação do silenciamento gênico foi efetuado o ensaio de viabilidade celular. Esse experimento foi realizado por 96 horas sendo avaliada a viabilidade celular a cada 24 horas, e o cálculo da viabilidade celular foi relativo ao tempo zero (0h). O silenciamento de *MST2* promoveu uma diminuição na viabilidade celular em todas as linhagens celulares, com o efeito mais significativo após 72 horas. DAOY (Figura 20A), ONS-76 (Figura 20B) e UW228 (Figura 20C) tiveram uma redução de mais de 50% na viabilidade celular.

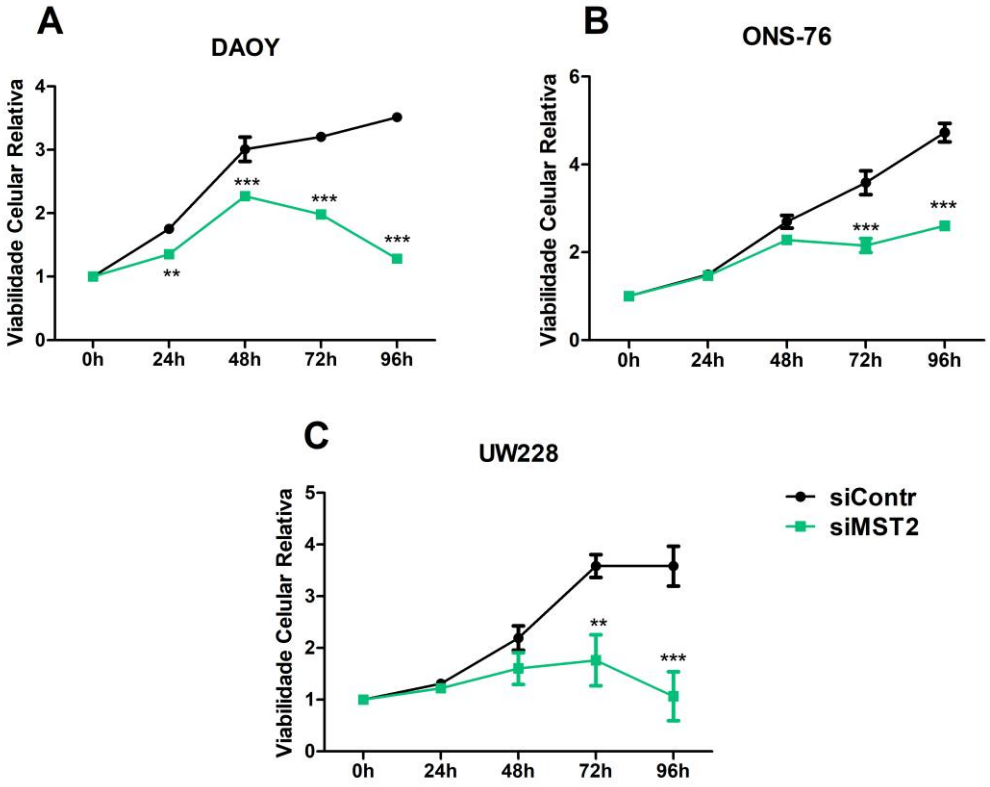


Figura 20. Viabilidade celular relativa ao tempo zero após transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C).**

5.4.3. Ensaio Clonogênico após transfecção com siRNA

Foi realizado o ensaio clonogênico para avaliar se o silenciamento de MST2 promoveria alteração na capacidade das células de formar colônias. O experimento foi realizado após 48 horas da transfecção com siRNA, e foi possível observar uma redução significativa no número de colônias nas 3 linhagens DAOY (Figura 21A), ONS-76 (Figura 21B) e UW228 (Figura 21C) após *knockdown* de *MST2*.

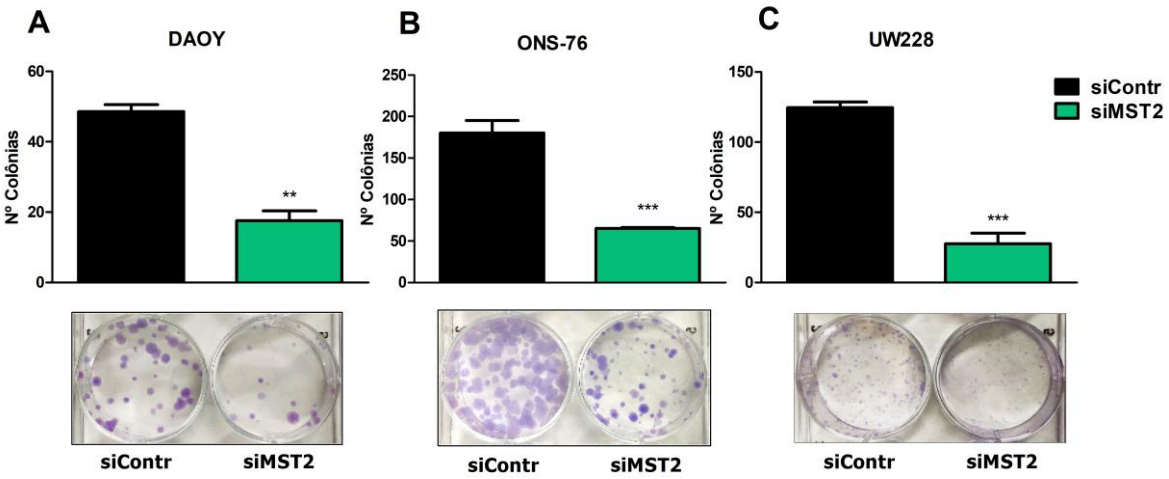


Figura 21. Número de colônias formadas após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C)** e abaixo do gráfico foto representativa das colônias nas respectivas linhagens. ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,001

5.4.4. Ciclo Celular após transfecção com siRNA

O ciclo celular foi avaliado após a transfecção das células com siRNA, todas as linhagens tiveram uma diminuição no número de células na fase S após inibição da expressão de *MST2*. A linhagem ONS-76, além da fase S, teve um aumento de células na fase G1 e uma diminuição na fase G2/M enquanto que a linhagem UW228 teve um aumento de células nessa fase do ciclo celular (Figura 22).

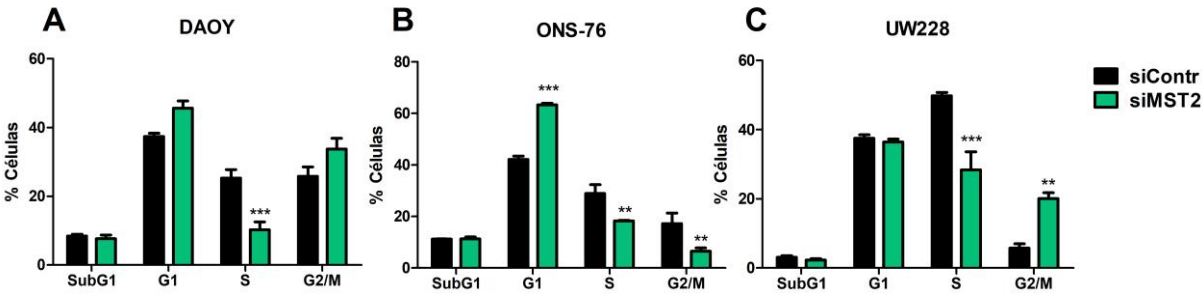


Figura 22. Análise do ciclo celular após 48 horas da transfecção com siRNA (siMST2 e siContr) nas linhagens celulares DAOY **(A)**, ONS-76 **(B)** e UW228 **(C).** ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,001

5.5. Análise das vias moleculares de sinalização

5.5.1. Análise in silico dos genes correlacionados e enriquecimento de vias

Como os dados de expressão gênica mostraram dados significativos somente de *MST2* quando comparada expressão gênica de MB e cerebelos e entre os subgrupos moleculares, a análise *in silico* foi realizada apenas com os dados de *MST2*. Foi utilizada a plataforma R2: *Genomics Analysis and Visualization* para avaliar quais genes são os mais correlacionados com *MST2*, para isso foi utilizado dois bancos de dados públicos como explicado anteriormente.

Os dois bancos de dados têm em comum 2079 genes que possuem correlação de expressão com *MST2*, os quais 1116 genes possuem uma correlação positiva e 963 possuem correlação negativa. Quando realizada a análise de enriquecimento de vias, com os genes em comum, foi possível observar que uma grande parte desses genes estão envolvidos com vias importantes como MAPK, Ribossomo, p53, Ciclo Celular e também com as vias moleculares de desenvolvimento que são relevantes para a biologia tumoral do MB, como a via Wnt, TGF-β, Hippo e Shh (Figura 23). Com os genes que estão correlacionados com *MST2* e que participam dessas vias de desenvolvimento foi possível elaborar uma rede de interação proteica através da ferramenta online STRING 11.0 juntamente com o programa Cytoscape 3.6.1 (Figura 24). Nesta rede há alvos que possuem interação com muitas proteínas, entre eles estão YAP1 da via Hippo, GLI1 e GLI2 da via Shh, SMAD3 da via TGF-β e LEF1 da via WNT, todos possuem uma alta correlação com a expressão de *MST2* como pode ser observado na Tabela 6 e por isso foram escolhidos para verificar se a modulação das MSTs alteraria a expressão desses genes nas linhagens celulares de MB.

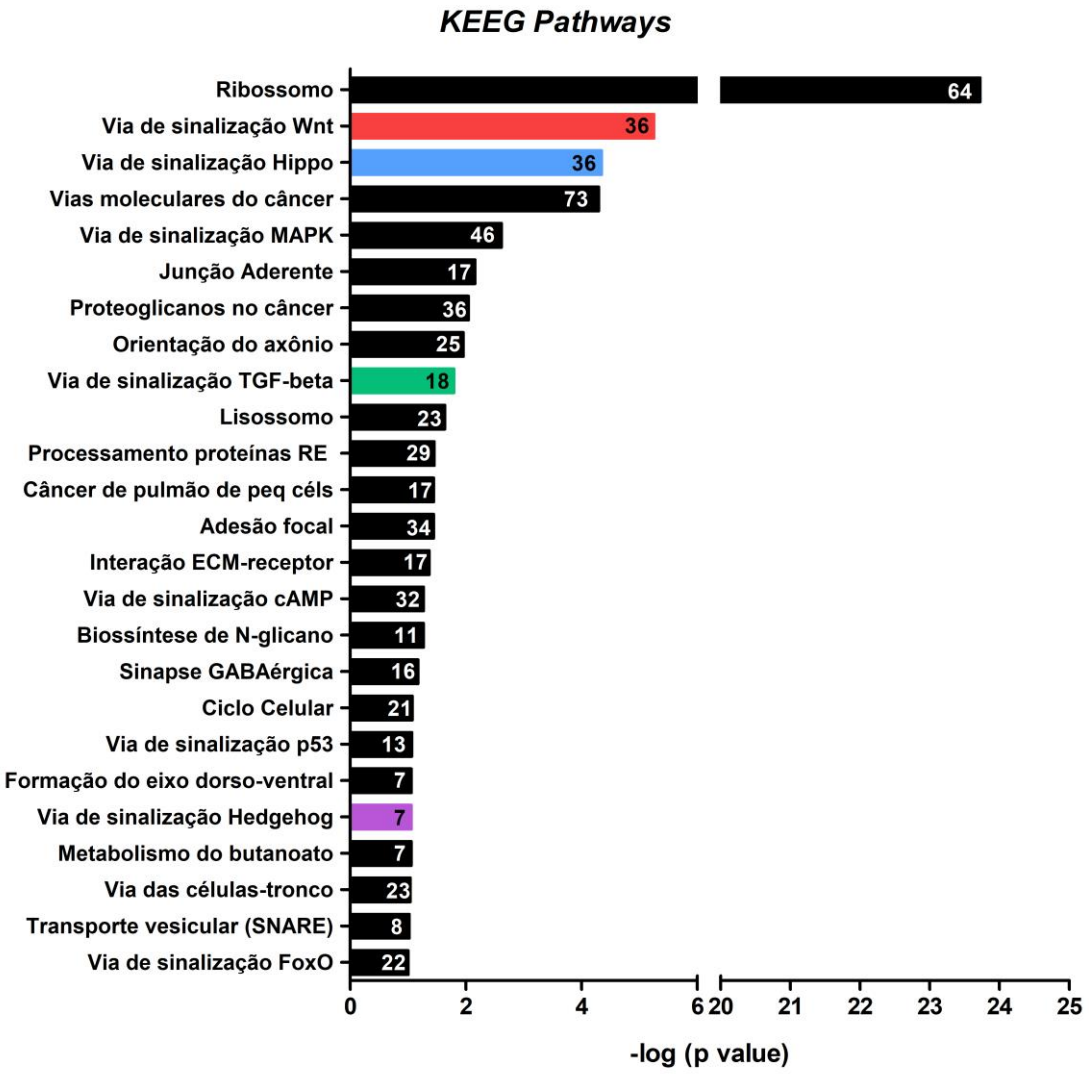


Figura 23. Análise de enriquecimento de vias com os genes correlacionados com *MST2*. Em destaque estão as vias de desenvolvimento associadas com MB. O valor numérico no interior das barras corresponde ao número de genes correlacionados com *MST2* que participam de cada via.

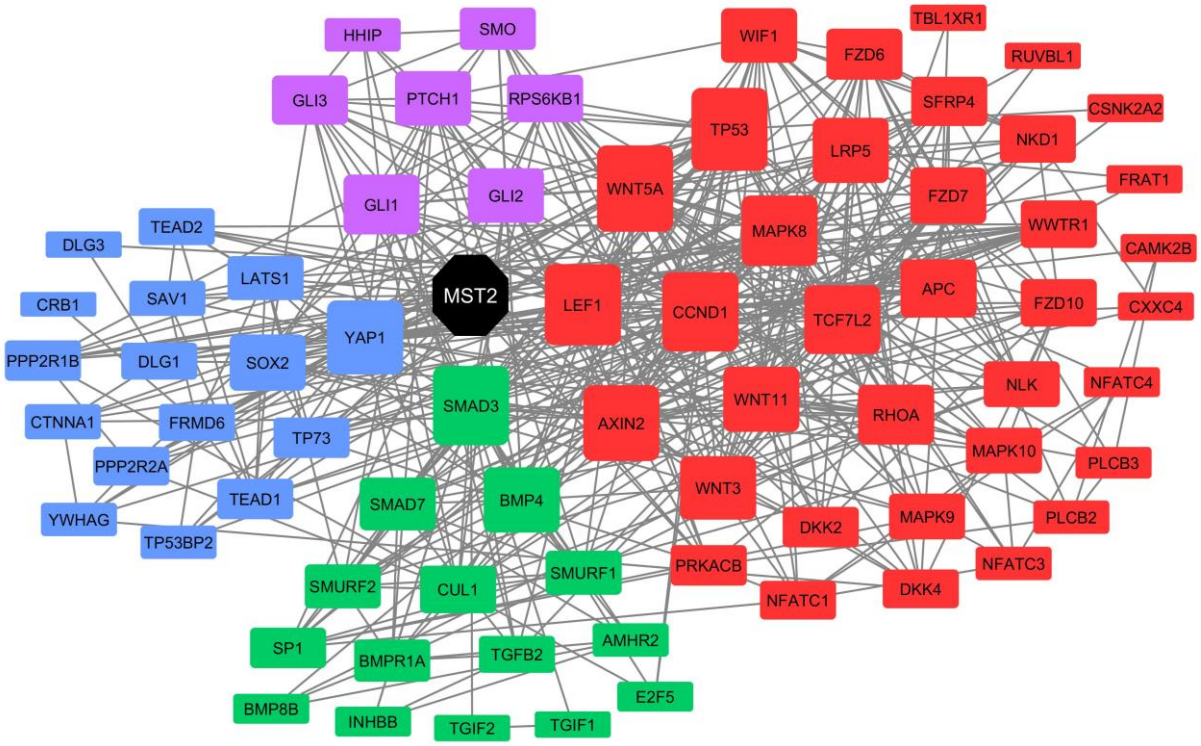


Figura 24. Rede de interação proteica das vias moleculares Wnt (vermelho), TGF-β (verde), Hippo (azul), Shh (roxo) que tem uma alta correlação com *MST2* (preto) no MB. A dimensão do retângulo de cada componente é de acordo com a quantidade de conexões com outras proteínas. Rede realizada pelo programa Cytoscape 3.6.1.

Tabela 6. Correlação da expressão gênica dos alvos com a expressão de *MST2* nas amostras de MB dos banco de dados.

Gene	*Correlação Spearman (R)*	*Valor de P*
GLI1	0.6924	<0.0001
GLI2	0.7232	<0.0001
YAP1	0.8263	<0.0001
SMAD3	0.8064	<0.0001
LEF1	0.8111	<0.0001

5.5.2. Expressão gênica dos alvos após inibição de MST1/2

Foi realizada a análise da expressão gênica por qRT-PCR para verificar se alguns dos genes que apareceram na análise *in silico* sofrem uma mudança na expressão após o tratamento com inibidor de MST1 e MTS2 (XMU-MP-1). Foi realizada a expressão de *GLI1* (Figura 25A) que com o tratamento teve uma redução da expressão nas quatro linhagens de MB quando comparada com a expressão do controle. *GLI2* (Figura 25B) não expressa na linhagem UW228, porém nas outras

linhagens houve uma diminuição da expressão com o tratamento. A expressão de *YAP1* (Figura 25C) diminuiu na maior dose na linhagem ONS-76 e UW473. *SMAD3* (Figura 25D) e *LEF1* (Figura 25E) tiveram uma redução da expressão gênica após o tratamento, exceto na linhagem UW228.

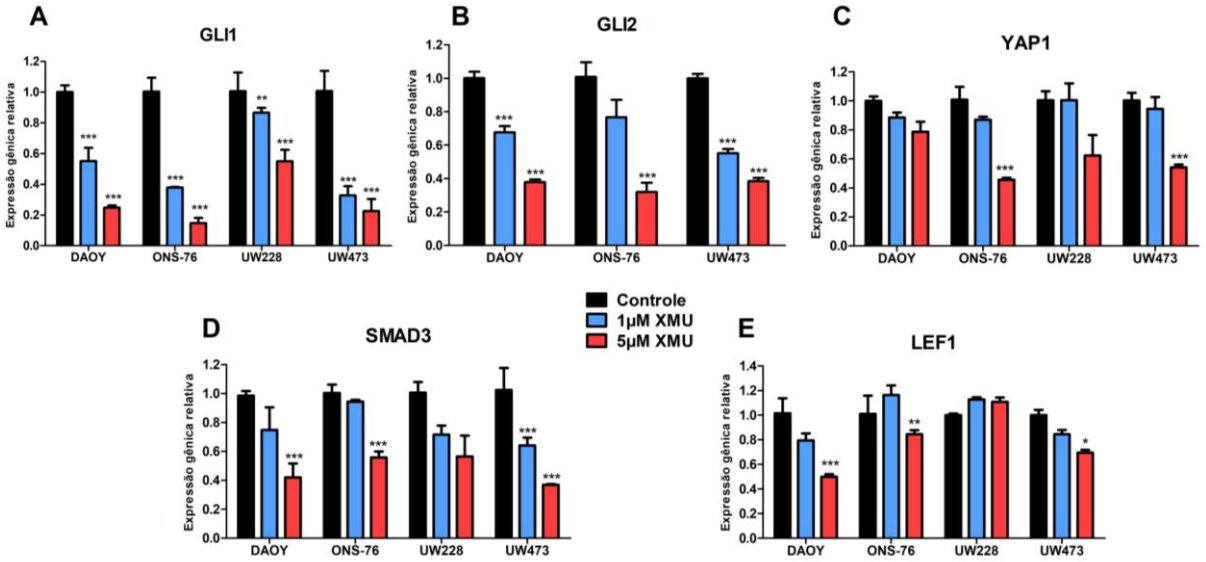


Figura 25. Expressão gênica de *GLI1* **(A)**, *GLI2* **(B)**, *YAP1* **(C)**, *SMAD3* **(D)** e *LEF1* **(E)** nas linhagens de MB após tratamento por 12h com a droga XMU-MP-1 nas doses de 1 e 5μM. Expressão relativa ao controle tratado somente com DMSO. *p<0.05 **P<0.01 ***p<0.001

Foi realizada também a análise da expressão gênica por qRT-PCR desses genes após o silenciamento de *MST2* por siRNA. Na linhagem DAOY houve um aumento da expressão de *GLI1* e *GLI2* (Figura 26A), já na ONS-76 ocorreu uma redução de *GLI1*, *GLI2* e *SMAD3* após *knockdown* de *MST2* (Figura 26B). Na linhagem UW228 (Figura 26C) não teve mudança na expressão dos genes e não houve diferença na expressão de *YAP1* e *LEF1* nas três linhagens após a inibição.

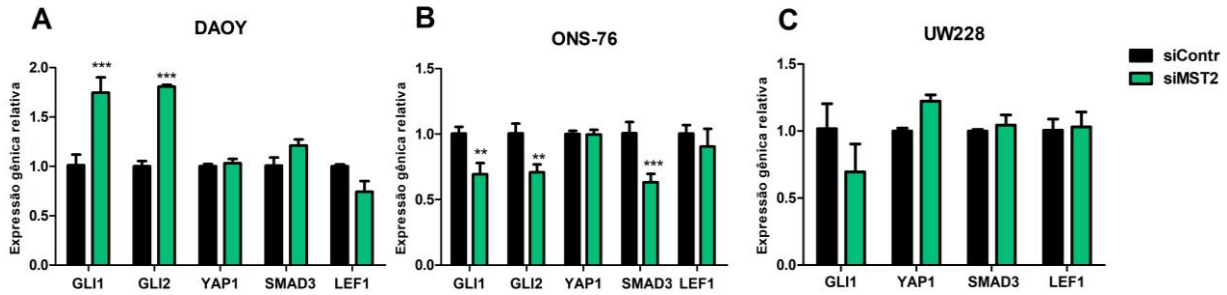


Figura 26. Expressão gênica de *GLI1*, *GLI2*, *YAP1*, *SMAD3* e *LEF1* nas linhagens celulares DAOY (A), ONS-76 (B) e UW228 (C) após 48 horas da transfecção com siRNA (siContr e siMST2). Expressão relativa ao controle negativo (siContr). *p<0.05 **P<0.01 ***p<0.001

5.5.3. Expressão proteica de alvos após inibição de MST1/2

Foi realizada análise da expressão de algumas proteínas após o tratamento com XMU-MP-1. Como é possível observar na Figura 27, a atividade/fosforilação de MST1/2 diminui conforme aumenta a dose do inibidor. O nível de fosforilação de YAP aumenta nas maiores doses e ocorre o contrário com a expressão da proteína total de YAP na DAOY, porém na linhagem ONS-76 diminui tanto a expressão proteína fosforilada quanto a proteína total de YAP. SMAD3 fosforilado, SMAD2/3 total e p21 têm a expressão elevada conforme aumenta as doses da droga. E a expressão de GLI1 diminui com o tratamento.

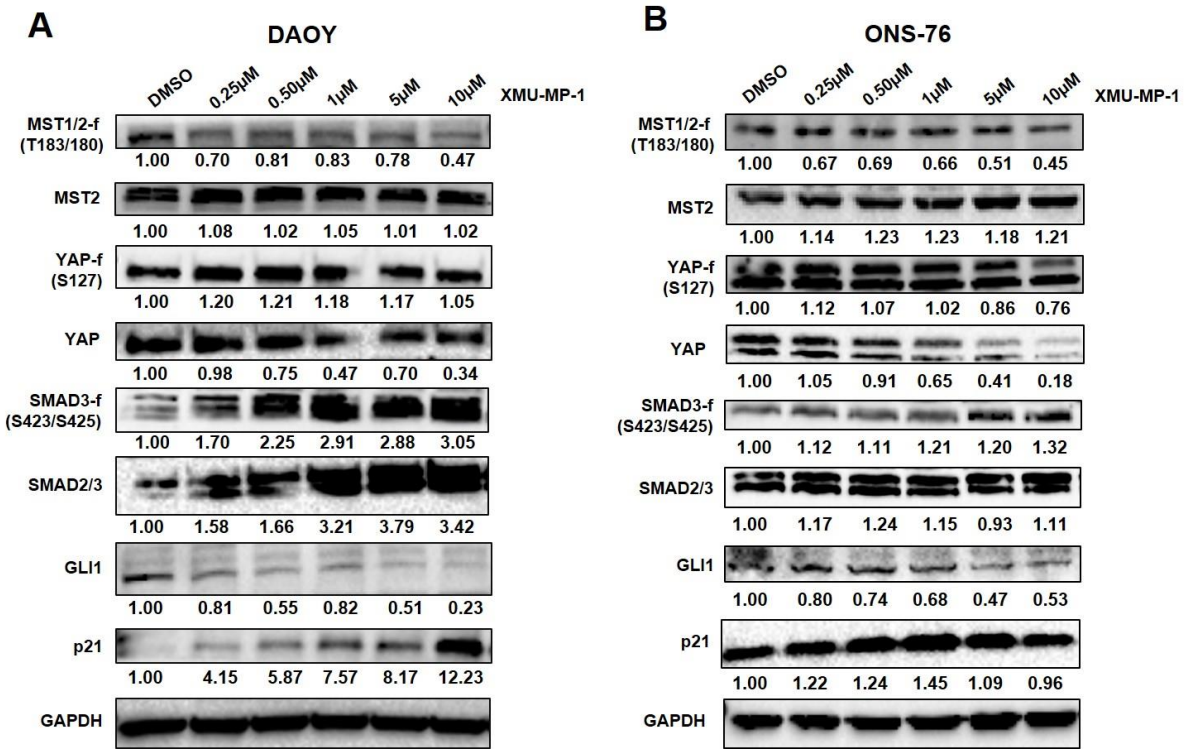


Figura 27. Expressão proteica da DAOY (A) e ONS-76 (B) após 48 horas de tratamento com XMU-MP-1. Na figura estão os valores da quantificação da expressão proteica relativa ao DMSO, foi utilizada a expressão de GAPDH para a normalização.

Também foi realizada análise da expressão proteica após o silenciamento gênico de *MST2*. A expressão de MST2 diminui após a transfecção com siRNA alvo. O nível de fosforilação de YAP e SMAD3 e a expressão da proteína total diminui nas duas linhagens após a inibição de MST2. O *knockdown* de MST2 promoveu aumento da expressão de p21 nas duas linhagens. A expressão de GLI1 só foi possível ser detectada na linhagem ONS-76 e teve sua expressão diminuída quando comparada com o controle (Figura 28).

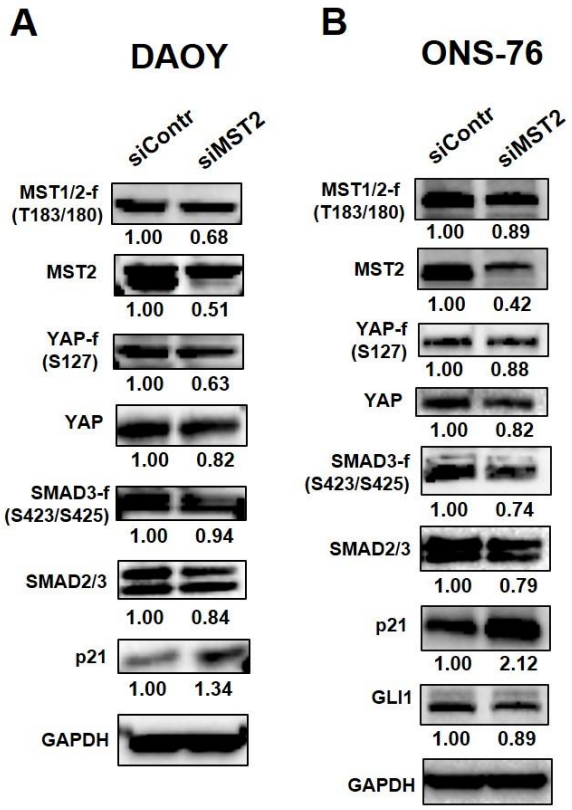


Figura 28. Expressão proteica da DAOY (A) e ONS-76 (B) após 48 horas da transfecção com siRNA. Na figura estão os valores da quantificação da expressão proteica relativa ao controle negativo siRNA, foi utilizada a expressão de GAPDH para a normalização.

6. Discussão

As terapias disponíveis atualmente para o tratamento do MB não resultam em taxas de cura expressivas, sendo que uma parcela considerável destas crianças evolui para óbito por resistência ao tratamento, recidiva ou progressão tumoral, representando uma importante causa de morbi-mortalidade na faixa etária pediátrica. Adicionalmente, a maioria dos sobreviventes sofre efeitos secundários graves a longo prazo.

Por conseguinte, avanços para uma melhor compreensão da biologia do MB, utilizando modelos de ensaios pré-clínicos *in vitro*, têm sido muito úteis para testar a eficácia de novas moléculas terapêuticas, na expectativa de melhorias significativas na regressão do crescimento do tumor e na diminuição do efeito tóxico provocado pelos tratamentos atuais.

À vista disso, estudos que visam o entendimento da biologia tumoral e descoberta de novas abordagens terapêuticas mostra-se necessária, e nessa busca por novos alvos, encontra-se as quinases MST1 e MST2.

As quinases MST estão envolvidas em diversos mecanismos fundamentais para a homeostase do organismo, como proliferação, apoptose, ciclo celular, e participam e regulam vias moleculares importantes. Alterações nesses mecanismos e vias podem levar a defeitos no desenvolvimento dos tecidos e até a promoção e progressão tumoral. Essas alterações podem ocorrer pela mudança na expressão e/ou na atividade das MSTs, como por exemplo, a falta de expressão de MST1/2 altera o fenótipo de diversos órgãos como fígado (Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017), pulmão (Lin *et al.*, 2015), intestino (Zhou *et al.*, 2011), pâncreas (Gao *et al.*, 2013).

No MB encontramos alta expressão de *MST2* nas amostras e linhagens tumorais comparada com a expressão nas amostras de cerebelo não neoplásico, essa expressão elevada foi encontrada na análise de qRT-PCR e na análise *in silico*. Mas não houve diferença na expressão de *MST1* quando as amostras de MB foram comparada com as amostras controle. Dentre as principais atividades de *MST1* e *MST2*, a mais descrita na literatura é sua participação na via Hippo como supressores de tumor (Zheng e Pan, 2019). Assim esperava-se uma menor expressão nas amostras tumorais de MB com relação ao cerebelo não-neoplásico, como visto em <u>câncer colorretal</u> (Yu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018), <u>glioma</u> (Chao *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019), <u>linfoma</u> (Chang *et al.*, 2019), <u>câncer</u>

pancreático (Cui *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Turunen *et al.*, 2019), câncer gástrico (Yao e Yan, 2018; Zhou e Chen, 2019), câncer de pulmão (Xu, C. M. *et al.*, 2013; Zhang, W. *et al.*, 2018), câncer hepático (Xu, C. *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2016; Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017; Kim, Khan e Yang, 2017), câncer de mama (Li, L. *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017) e outros. Porém a maioria dos trabalhos investigam a MST1 e não a MST2 e apesar dos dados contrários do esperado, existem alguns trabalhos na literatura que mostram a relação entre atividade ou expressão de MST1 e MST2 e a progressão tumoral. No estudo de Cottini e colaboradores (2014) foi demonstrado que, em tumores hematológicos, quando MST1 é silenciada ocorre um aumento da expressão de YAP1 que leva a uma diminuição da proliferação e aumento da apoptose em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Cottini *et al.*, 2014). Outros trabalhos mostram a relação do aumento da atividade das MSTs, principalmente de MST2, com favorecimento do crescimento celular e serão abordados ao longo dessa discussão (Kilili e Kyriakis, 2010; Varghese *et al.*, 2016; Camgoz *et al.*, 2018; Pefani *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2018).

Foi observada uma maior expressão de *MST2* nos subgrupos moleculares WNT e SHH. Alguns estudos mostram a correlação entre as quinases MSTs e as vias de desenvolvimento o que explicaria a maior expressão nesses subgrupos (Basu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014; Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017). Já a expressão de *MST1* não teve diferença entre os subgrupos de MB. Mostrando que possivelmente a quinase MST2 têm uma maior relevância no contexto da biologia tumoral do MB.

Como houve uma maior expressão gênica de *MST2* no subgrupo SHH, as linhagens escolhidas para os ensaios pertencem a esse subgrupo. O subgrupo SHH é um grupo muito heterogêneo e dependendo das características clínicas e moleculares pode apresentar um prognóstico ruim similar ao grupo 3, logo é interessante investigar novas estratégias terapêuticas para esse subgrupo.

Neste estudo, realizamos a inibição da atividade de MST1 e MST2 com a droga XMU-MP-1 para avaliar se as quinases estão envolvidas com mecanismos celulares nas linhagens celulares de MB. O tratamento promoveu uma diminuição na viabilidade celular e na formação de colônias e provocou uma parada do ciclo celular na fase G2/M. A droga XMU-MP-1 bloqueia o sítio de ativação, não permitindo que as quinases MST1 e MST2 sejam fosforiladas. Esta droga foi desenvolvida e testada, em

ensaios *in vitro* e *in vivo,* para aumentar a regeneração e reparo do tecido intestinal e hepático (Fan *et al.*, 2016). Zhan e colaboradores (2019) utilizaram-na para proteger o encéfalo de uma injúria secundária após hemorragia intracerebral, um dado relevante desse estudo é que a droga XMU-MP-1 atravessa a barreira hematoencefálica e diminui danos na mesma além de promover uma redução do edema encefálico (Zhang *et al.*, 2019).

O efeito antitumoral desta droga no MB poderia ser explicado pela relação de MST2 no controle do processo de reparo do DNA. Em resposta a danos no DNA, a quinase MST2 fosforila a histona H2B na cromatina nucleolar e provoca uma parada transiente da transcrição, necessária para manutenção da integridade genômica. Quando há inibição de MST2 essa marcação na histona não ocorre, o processo de reparo do DNA fica perturbado e provoca um aumento da letalidade celular (Pefani *et al.*, 2018).

Apesar de termos observado uma redução da viabilidade celular, não houve mudança na taxa de apoptose após o tratamento, o que poderia explicar esse resultado seria que a droga estaria promovendo uma parada no ciclo celular levando a célula a senescência. O trabalho de Sang e colaboradores (2018) associa a inibição de *MST2* com a diminuição da proliferação e aumento da senescência celular (Sang *et al.*, 2018).

Para confirmar se os efeitos da droga nas linhagens celulares ocorrem pela inibição de MST2, realizamos ensaios após transfecção com siRNA alvo de *MST2*. Foi possível observar que o silenciamento gênico de *MST2* promoveu uma redução na viabilidade, na formação de colônias e alterou o ciclo celular nas três linhagens de MB. O estudo de Camgoz e colaboradores (2018) mostrou que tanto o silenciamento gênico quanto a inibição farmacológica de MST2 provocou uma diminuição da proliferação celular e um aumento da taxa de apoptose nas linhagens de leucemia mieloide aguda (Camgoz *et al.*, 2018).

Para entender melhor o papel de MST2 na biologia do MB foi realizada análise *in silico* dos genes correlacionados com a expressão de *MST2* nas amostras de MB, e com esses genes foi realizada a análise de enriquecimento de vias. Além das vias de desenvolvimento Wnt, Hippo, TGF-β e Shh, os genes participam de outras vias importantes como MAPK, Ribossomo, p53, Ciclo Celular e outras.

A via MAPK está hiperativada em aproximadamente 30% dos cânceres humanos. No MB, a via MAPK, está envolvida com desenvolvimento do cerebelo e formação do tumor, mecanismos de proliferação e apoptose, quimiorresistência e componentes dessa via são marcadores de prognóstico (Anne *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015; Antonucci *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2019). Trabalhos mostram a associação de MST2 com RAF-1 que é um componente chave da via de sinalização MAPK e desempenha um papel crucial na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (O'neill e Kolch, 2005; Romano *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Rawat e Chernoff, 2015). Em alguns estudos foi observado que a inibição de MST2 está relacionada com a diminuição da ativação da via MAPK levando à uma menor proliferação e aumento da senescência, isso ocorre em decorrência da menor fosforilação de RAF-1 pela quinase MST2 (Kilili e Kyriakis, 2010; Sang *et al.*, 2018).

Outra via que quando alterada promove a senescência celular é a via do Ribossomo, que foi a mais enriquecida na análise *in silico* dos genes correlacionados com *MTS2*. Perturbações na homeostase do retículo endoplasmático contribui para a parada no ciclo celular, assim induzindo a senescência para prevenir a proliferação de células danificadas ou mutadas (Nishimura *et al.*, 2015; Turi *et al.*, 2018; Pantazi *et al.*, 2019), corroborando com os efeitos encontrados após inibição da MST2 neste estudo.

Na análise de enriquecimento de vias, diversos genes correlacionados com *MST2* estão envolvidos com as vias de sinalização Wnt, Hippo, TGF-β e Shh que estão diretamente envolvidas no desenvolvimento do cerebelo e na formação e crescimento do MB. Em outros tumores essa relação entre MST2 e as vias também ocorre, como no caso do câncer hepatocelular. Nesse tumor, a deleção das quinases MST1 e MST2 promove a progressão tumoral através da ativação das vias moleculares Wnt, Hippo e Notch (Kim, Khan, Gvozdenovic-Jeremic*, et al.*, 2017). Adicionalmente, MST1 e MST2 inibem diretamente a via WNT/β-catenina, levando à uma supressão do crescimento celular (Xu *et al.*, 2014).

Como um dos objetivos desse projeto era verificar relação das quinases com as vias de desenvolvimento acima citadas, primeiramente foi realizada a rede de interação proteica com os componentes dessas vias que tinham uma alta correlação com a expressão de *MST2.* A partir dessa análise *in silico* foram escolhidos, para a

validação, os alvos de cada via que possuíam um maior número de conexões com outras proteínas. A validação da expressão dos alvos foi realizada após inibição de MST2 (droga XMU-MP-1 e siRNA), e a maioria tiverem sua expressão alterada após a modulação das MSTs. Isso demonstra que é possível que a atividade das quinases MST1 e MST2, principalmente MST2, esteja relacionada com a regulação direta ou indireta das vias moleculares investigadas.

Entre os alvos validados após a inibição de MST2 estão GLI1 e GLI2, que são fatores de transcrição da via Shh, que ao regular a expressão de genes importantes como *MYC*, *CCNE1*, *CCND1* controlam diferentes mecanismos celulares, como proliferação, apoptose, migração e diferenciação (Didiasova *et al.*, 2018). A inibição farmacológica de MST1/2 promoveu uma diminuição da expressão gênica de *GLI1* e *GLI2* e uma diminuição da expressão proteica de GLI1. O silenciamento gênico de MST2 também promoveu uma redução da expressão dos genes GLI1 e GLI2 e da proteína GLI1 na linhagem ONS-76. Estudos mostram que menor atividade ou expressão dos fatores de transcrição GLI está relacionado com menor proliferação e sobrevivência celular, correspondendo com os resultados encontrados no presente estudo. Lin e colaboradores observaram que quando a epiderme é exposta ao Arsênico ocorre um aumento da expressão das quinases MST1 e MST2 e também de GLI2, favorecendo a formação de lesões hiperplásicas cutâneas (Li *et al.*, 2013). Porém não há dados da relação direta entre as quinases MST e os fatores de transcrição GLI, contudo existem trabalhos que relatam a ligação entre a via Hippo/MST e a via Shh/GLI (Fernandez-L *et al.*, 2009; Fernandez-L *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Huang e Kalderon, 2014; Tariki *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2016; Swiderska-Syn *et al.*, 2016; Cotton *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2017; Zhang, Y. *et al.*, 2018; Yang e Joyner, 2019).

A conexão entre a via Hippo e Shh ocorre principalmente entre YAP e GLI, pois uns dos alvos descritos de YAP são *GLI1* e *GLI2* (Lin *et al.*, 2012; Swiderska-Syn *et al.*, 2016). Neste presente estudo encontramos que a inibição de MST2 promoveu uma redução da expressão proteica de YAP total, o que também poderia explicar a menor expressão dos fatores de transcrição GLI. YAP juntamente com TAZ regula expressão de genes associados com diferentes processos celulares como proliferação, sobrevivência, ciclo celular e migração (Zheng e Pan, 2019). Na maioria dos estudos é observado que a diminuição da atividade de MST1 e MST2 promove

um aumento da expressão de YAP e de seus alvos, porém foi encontrado o oposto neste estudo. Nos trabalhos de Sang (2018) e Camgoz (2018) a inibição de MST2 não alterou a expressão de YAP em diferentes linhagens celulares (Camgoz *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2018), mostrando que é possível que o papel e ação de MST2 seja tecido dependente.

O seguinte alvo estudado foi SMAD3 da via TGF-β. SMAD3 quando fosforilado transloca para o núcleo e regula a expressão de importantes genes que estão envolvidos com diversos mecanismos celulares relevantes para a homeostase celular (Yu e Feng, 2019). Nas linhagens de MB, a inibição farmacológica de MST1/2 promoveu uma diminuição da expressão gênica de SMAD3, porém houve um aumento da expressão da proteína fosforilada e da proteína total. A redução da expressão gênica pode ter ocorrido devido a um *feedback* negativo provocado pela maior expressão da proteína. Outro dado intrigante é que a inibição de MST2 através da transfecção com siRNA diminui a expressão proteica de SMAD3, diferente do resultado encontrado após o tratamento com a droga. O que poderia explicar esse dado seria que a droga além de inibir MST2 também está inibindo a atividade de MST1, e esta estaria promovendo o aumento da expressão de SMAD3. Estudos mostram que hiperexpressão de MST1 diminui a expressão da via TGF-β/SMAD nas linhagens celulares de câncer de próstata e nas células hepáticas (Perumal *et al.*, 2017; Ready *et al.*, 2017), o que corroboraria com os dados encontrados. Porém, mais estudos devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese.

Último alvo avaliado foi LEF-1 que, juntamente com SMAD2/3 e YAP, coordena a diferenciação embrionária das células-tronco (Estarás *et al.*, 2015). LEF-1 pertence a via Wnt que quando ativada forma o complexo formado entre β-catenina, TCF e LEF que regula a expressão de alvos como Ciclina D1, p21, c-Myc, VEGF e outros (Vlad *et al.*, 2008). O tratamento com a droga XMU-MP-1 diminuiu a expressão gênica de *LEF1* em três linhagens de MB, porém não há dados sobre a relação direta entre LEF-1 e as quinases MST. No MB, a inibição de Wnt promove uma diminuição da propagação e crescimento tumoral no subgrupo SHH (Rodriguez-Blanco *et al.*, 2017). Para investigar mais a fundo o papel da MST2 na via Wnt, uma das vias mais enriquecidas na análise *in silico,* seria interessante utilizar uma linhagem do subgrupo WNT.

Mais um dado interessante foi que p21 que é uma proteína supressora de tumor teve sua expressão elevada após o tratamento e após o silenciamento gênico de MST2. p21 provoca parada no ciclo celular por inibir algumas proteínas CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) que são essenciais para as transições do ciclo celular de G1 para S e de G2 para mitose (Karimian *et al.*, 2016). Assim sua alta expressão após inibição de MST2 explicaria as alterações observadas no ciclo celular nas linhagens celulares de MB. Trabalhos mostram que MST2 está envolvida com mecanismos de controle da divisão celular (Kilili e Kyriakis, 2010; Ram *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016), em adição, ciclo celular é uma das vias que estão enriquecidas na análise *in silico*.

Como p21 regula o ciclo celular, alguns trabalhos associam sua expressão com o aumento da senescência (Shtutman *et al.*, 2017). Sang e colaboradores observaram que a inibição de MST2 promoveu um aumento da expressão de p21 e p27 correlacionando com a diminuição da viabilidade celular e aumento da senescência (Sang *et al.*, 2018), corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

Com todos esses dados pode-se observar que a MST2 regula mecanismos importantes para a progressão tumoral, como viabilidade celular, formação de colônias e ciclo celular e está envolvida com relevantes vias em MB, sendo um potencial alvo terapêutico para este tumor.

7. Conclusões

- ✓ Nas amostras e linhagens de Meduloblastoma há maior expressão de *MST2* quando comparado com as amostras de cerebelos não neoplásicas tanto na análise por qRT-PCR quanto na análise *in silico*;

- ✓ Não há diferença na expressão de *MST1* quando comparado as amostras de Meduloblastoma e as amostras de cerebelos não neoplásicas tanto na análise por qRT-PCR quanto na análise *in silico*;

- ✓ *MST2* está mais expresso nos subgrupos moleculares WNT e SHH de Meduloblastoma tanto na análise por qRT-PCR quanto na análise *in silico*;

- ✓ Não há diferença na expressão de *MST1* entre os subgrupos moleculares de Meduloblastoma tanto na análise por qRT-PCR quanto na análise *in silico;*

- ✓ A inibição da atividade das quinases MST1 e MST2 através da droga XMU-MP-1 promoveu uma diminuição da viabilidade celular, da formação de colônias e provocou uma parada no ciclo celular nas linhagens celulares de Meduloblastoma;

- ✓ A inibição da atividade das quinases MST1 e MST2 através da droga XMU-MP-1 não alterou a taxa de apoptose nas linhagens celulares de Meduloblastoma;

- ✓ Silenciamento gênico de *MST2* por siRNA promoveu uma redução da viabilidade celular, da formação de colônias e provocou uma parada no ciclo celular nas linhagens celulares de Meduloblastoma;

- ✓ Os genes correlacionados com *MST2* estão envolvidos com as vias de desenvolvimento Wnt, Hippo, TGF-β e Shh;

- ✓ Alvos das vias moleculares tiveram sua expressão alterada após inibição farmacológica de MST1 e MST2 e após silenciamento gênico de *MST2* por siRNA.

8. Referências Bibliográficas

ADESINA, A. M. et al. FOXG1 dysregulation is a frequent event in medulloblastoma. **J Neurooncol,** v. 85, n. 2, p. 111-22, Nov 2007. ISSN 0167-594X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522785 >.

AJEAWUNG, N. F.; WANG, H. Y.; KAMNASARAN, D. Progress from clinical trials and emerging non-conventional therapies for the treatment of Medulloblastomas. **Cancer Lett,** v. 330, n. 2, p. 130-40, Apr 2013. ISSN 1872-7980. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211539 >.

ANNE, S. L. et al. WNT3 inhibits cerebellar granule neuron progenitor proliferation and medulloblastoma formation via MAPK activation. **PLoS One,** v. 8, n. 11, p. e81769, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24303070 >.

ANTONUCCI, L. et al. Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 inhibits hedgehog signaling and medulloblastoma growth through GLI1 phosphorylation. **Int J Oncol,** v. 54, n. 2, p. 505-514, Feb 2019. ISSN 1791-2423. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30483764 >.

AREF, D. et al. Canonical TGF-β pathway activity is a predictor of SHH-driven medulloblastoma survival and delineates putative precursors in cerebellar development. **Brain Pathol,** v. 23, n. 2, p. 178-91, Mar 2013. ISSN 1750-3639. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966790 >.

BAE, J. S.; KIM, S. M.; LEE, H. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. **Oncotarget,** v. 8, n. 9, p. 16084-16098, Feb 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28035075 >.

BAE, S. J.; LUO, X. Activation mechanisms of the Hippo kinase signaling cascade. **Biosci Rep,** v. 38, n. 4, 09 2018. ISSN 1573-4935. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038061 >.

BASU, D. et al. Identification, mechanism of action, and antitumor activity of a small molecule inhibitor of hippo, TGF-β, and Wnt signaling pathways. **Mol Cancer Ther,** v. 13, n. 6, p. 1457-67, Jun 2014. ISSN 1538-8514. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694946 >.

BERETTA, G. L. et al. Role of FoxO Proteins in Cellular Response to Antitumor Agents. **Cancers (Basel),** v. 11, n. 1, Jan 2019. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30646603 >.

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

BOBOLA, M. S. et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines. **Clin Cancer Res,** v. 11, n. 7, p. 2747-55, Apr 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814657 >.

CAI, W. F. et al. Manipulating the Hippo-Yap signal cascade in stem cells for heart regeneration. **Ann Palliat Med,** v. 5, n. 2, p. 125-34, Apr 2016. ISSN 2224-5839. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121740 >.

CAMGOZ, A. et al. STK3 is a therapeutic target for a subset of acute myeloid leukemias. **Oncotarget,** v. 9, n. 39, p. 25458-25473, May 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29876001 >.

CASTRO-GAMERO, A. M. et al. Chromosomal heterogeneity and instability characterize pediatric medulloblastoma cell lines and affect neoplastic phenotype. **Cytotechnology,** v. 65, n. 5, p. 871-85, Oct 2013. ISSN 0920-9069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325114 >.

CAVALLI, F. M. G. et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell,** v. 31, n. 6, p. 737-754.e6, 06 2017. ISSN 1878-3686. Disponível em: < 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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4983156 >.

CHANG, Y. et al. Activated hippo signal pathway inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in NK/T cell lymphoma cells. **Cancer Med,** v. 8, n. 8, p. 3892-3904, Jul 2019. ISSN 2045-7634. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31124291 >.

CHAO, Y. et al. Mst1 regulates glioma cell proliferation via the AKT/mTOR signaling pathway. **J Neurooncol,** v. 121, n. 2, p. 279-88, Jan 2015. ISSN 1573-7373. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25373346 >.

CHEN, X.; CHEN, Y.; DONG, J. MST2 phosphorylation at serine 385 in mitosis inhibits its tumor suppressing activity. **Cell Signal,** v. 28, n. 12, p. 1826-1832, 12 2016. ISSN 1873-3913. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566175 >.

CHIBA, S. et al. MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. **Curr Biol,** v. 19, n. 8, p. 675-81, Apr 2009. ISSN 1879-0445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327996 >.

CHO, Y. J. et al. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 11, p. 1424-30, Apr 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098324 >.

COOK SANGAR, M. L. et al. Inhibition of CDK4/6 by Palbociclib Significantly Extends Survival in Medulloblastoma Patient-Derived Xenograft Mouse Models. **Clin Cancer Res,** v. 23, n. 19, p. 5802-5813, Oct 2017. ISSN 1078-0432. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28637687 >.

CORDEIRO, B. M. et al. SHH, WNT, and NOTCH pathways in medulloblastoma: when cancer stem cells maintain self-renewal and differentiation properties. **Childs Nerv Syst,** v. 30, n. 7, p. 1165-72, Jul 2014. ISSN 1433-0350. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695855 >.

CORNILS, H. et al. Downstream of human NDR kinases: impacting on c-myc and p21 protein stability to control cell cycle progression. **Cell Cycle,** v. 10, n. 12, p. 1897-904, Jun 2011. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593588 >.

COTTINI, F. et al. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. **Nat Med,** v. 20, n. 6, p. 599-606, Jun 2014. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813251 >.

COTTON, J. L. et al. YAP/TAZ and Hedgehog Coordinate Growth and Patterning in Gastrointestinal Mesenchyme. **Dev Cell,** v. 43, n. 1, p. 35-47.e4, 10 2017. ISSN 1878-1551. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28943241 >.

CREASY, C. L.; CHERNOFF, J. Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. **J Biol Chem,** v. 270, n. 37, p. 21695-700, Sep 1995a. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665586 >.

_____. Cloning and characterization of a member of the MST subfamily of Ste20-like kinases. **Gene,** v. 167, n. 1-2, p. 303-6, Dec 1995b. ISSN 0378-1119. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566796 >.

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, Mar 2019. ISSN 2051-5960. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832734 >.

CUI, J. et al. MST1 Suppresses Pancreatic Cancer Progression via ROS-Induced Pyroptosis. **Mol Cancer Res,** v. 17, n. 6, p. 1316-1325, Jun 2019. ISSN 1557-3125. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796177 >.

DEL RE, D. P. et al. Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. **Mol Cell,** v. 54, n. 4, p. 639-50, May 2014. ISSN 1097-4164. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813943 >.

DIDIASOVA, M.; SCHAEFER, L.; WYGRECKA, M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. **Molecules,** v. 23, n. 5, Apr 2018. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695137 >.

ELLISON, D. W. et al. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. **Acta Neuropathol,** v. 121, n. 3, p. 381-96, Mar 2011. ISSN 1432-0533. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267586 >.

ESTARÁS, C.; BENNER, C.; JONES, K. A. SMADs and YAP compete to control elongation of β-catenin:LEF-1-recruited RNAPII during hESC differentiation. **Mol Cell,** v. 58, n. 5, p. 780-93, Jun 2015. ISSN 1097-4164. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25936800 >.

FAN, F. et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. **Sci Transl Med,** v. 8, n. 352, p. 352ra108, 08 2016. ISSN 1946-6242. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535619 >.

FERNANDEZ-L, A. et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. **Genes Dev,** v. 23, n. 23, p. 2729-41, Dec 2009. ISSN 1549-5477. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19952108 >.

_____. Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation. **Oncogene,** v. 31, n. 15, p. 1923-37, Apr 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21874045 >.

FERRUCCI, V. et al. Metastatic group 3 medulloblastoma is driven by PRUNE1 targeting NME1-TGF-β-OTX2-SNAIL via PTEN inhibition. **Brain,** v. 141, n. 5, p. 1300-1319, 05 2018. ISSN 1460-2156. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29490009 >.

FIASCHETTI, G. et al. NOTCH ligands JAG1 and JAG2 as critical pro-survival factors in childhood medulloblastoma. **Acta Neuropathol Commun,** v. 2, p. 39, Apr 2014. ISSN 2051-5960. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708907 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4056828 >.

GAJJAR, A. et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. **Lancet Oncol,** v. 7, n. 10, p. 813-20, Oct 2006. ISSN 1470-2045. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012043 >.

GAJJAR, A. J.; ROBINSON, G. W. Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. **Nat Rev Clin Oncol,** v. 11, n. 12, p. 714-22, Dec 2014. ISSN 1759-4782. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348790 >.

GALAN, J. A.; AVRUCH, J. MST1/MST2 Protein Kinases: Regulation and Physiologic Roles. **Biochemistry,** v. 55, n. 39, p. 5507-5519, Oct 2016. ISSN 1520-4995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618557 >.

GAO, T. et al. Hippo signaling regulates differentiation and maintenance in the exocrine pancreas. **Gastroenterology,** v. 144, n. 7, p. 1543-53, 1553.e1, Jun 2013. ISSN 1528-0012. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454691 >.

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

GATE, D. et al. T-cell TGF-β signaling abrogation restricts medulloblastoma progression. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 111, n. 33, p. E3458-66, Aug 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082897 >.

GAZIT, R.; KRIZHANOVSKY, V.; BEN-ARIE, N. Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. **Development,** v. 131, n. 4, p. 903-13, Feb 2004. ISSN 0950-1991. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757642 >.

GIBSON, P. et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. **Nature,** v. 468, n. 7327, p. 1095-9, Dec 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21150899 >.

GUO, Z. et al. TGF-β-mediated repression of MST1 by DNMT1 promotes glioma malignancy. **Biomed Pharmacother,** v. 94, p. 774-780, Oct 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28802229 >.

HABRAND, J. L.; DE CREVOISIER, R. Radiation therapy in the management of childhood brain tumors. **Childs Nerv Syst,** v. 17, n. 3, p. 121-33, Feb 2001. ISSN 0256-7040. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11305764 >.

HARVEY, K. F.; ZHANG, X.; THOMAS, D. M. The Hippo pathway and human cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 13, n. 4, p. 246-57, Apr 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467301 >.

HATTEN, M. E.; ROUSSEL, M. F. Development and cancer of the cerebellum. **Trends Neurosci,** v. 34, n. 3, p. 134-42, Mar 2011. ISSN 1878-108X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315459 >.

HERGOVICH, A. et al. The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. **Curr Biol,** v. 19, n. 20, p. 1692-702, Nov 2009. ISSN 1879-0445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836237 >.

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

HSU, T. H. et al. The Hippo pathway acts downstream of the Hedgehog signaling to regulate follicle stem cell maintenance in the Drosophila ovary. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 4480, 06 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28667262 >.

HUANG, J.; KALDERON, D. Coupling of Hedgehog and Hippo pathways promotes stem cell maintenance by stimulating proliferation. **J Cell Biol,** v. 205, n. 3, p. 325-38, May 2014. ISSN 1540-8140. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798736 >.

IVANOV, D. P. et al. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. **J Biotechnol,** v. 236, p. 10-25, Oct 2016. ISSN 1873-4863. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27498314 >.

JACOBSEN, P. F.; JENKYN, D. J.; PAPADIMITRIOU, J. M. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. **J Neuropathol Exp Neurol,** v. 44, n. 5, p. 472-85, Sep 1985. ISSN 0022-3069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2993532 >.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair (Amst),** v. 42, p. 63-71, 06 2016. ISSN 1568-7856. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156098 >.

KELES, G. E. et al. Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. **Oncol Res,** v. 7, n. 10-11, p. 493-503, 1995. ISSN 0965-0407. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8866661 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29336639 >.

KILILI, G. K.; KYRIAKIS, J. M. Mammalian Ste20-like kinase (Mst2) indirectly supports Raf-1/ERK pathway activity via maintenance of protein phosphatase-2A catalytic subunit levels and consequent suppression of inhibitory Raf-1 phosphorylation. **J Biol Chem,** v. 285, n. 20, p. 15076-87, May 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212043 >.

KIM, W. et al. Hippo signaling interactions with Wnt/β-catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. **J Clin Invest,** v. 127, n. 1, p. 137-152, 01 2017. ISSN 1558-8238. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869648 >.

KIM, W.; KHAN, S. K.; YANG, Y. Interacting network of Hippo, Wnt/β-catenin and Notch signaling represses liver tumor formation. **BMB Rep,** v. 50, n. 1, p. 1-2, Jan 2017. ISSN 1976-670X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881216 >.

KING, A. A. et al. Long-term neurologic health and psychosocial function of adult survivors of childhood medulloblastoma/PNET: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **Neuro Oncol,** v. 19, n. 5, p. 689-698, 05 2017. ISSN 1523-5866. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28039368 >.

KOOL, M. et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. **PLoS One,** v. 3, n. 8, p. e3088, Aug 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769486 >.

LAVADO, A. et al. The Hippo Pathway Prevents YAP/TAZ-Driven Hypertranscription and Controls Neural Progenitor Number. **Dev Cell,** v. 47, n. 5, p. 576-591.e8, 12 2018. ISSN 1878-1551. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30523785 >.

LEE, S. J. et al. The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes. **Glia,** v. 62, n. 4, p. 639-48, Apr 2014. ISSN 1098-1136. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464935 >.

LEE, Y. P. et al. In vivo FRET imaging revealed a regulatory role of RanGTP in kinetochore-microtubule attachments via Aurora B kinase. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e45836, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029267 >.

LEHTINEN, M. K. et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. **Cell,** v. 125, n. 5, p. 987-1001, Jun 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751106 >.

LI, C. et al. Arsenic-induced cutaneous hyperplastic lesions are associated with the dysregulation of Yap, a Hippo signaling-related protein. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 438, n. 4, p. 607-12, Sep 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942117 >.

LI, F. et al. Poly(rC)-Binding Protein 2 Regulates Hippo Signaling To Control Growth in Breast Epithelial Cells. **Mol Cell Biol,** v. 36, n. 16, p. 2121-31, 08 2016. ISSN 1098-5549. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27215387 >.

LI, J. A. et al. TRAF6 regulates YAP signaling by promoting the ubiquitination and degradation of MST1 in pancreatic cancer. **Clin Exp Med,** v. 19, n. 2, p. 211-218, May 2019. ISSN 1591-9528. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30673917 >.

LI, L. et al. Deacetylation of tumor-suppressor MST1 in Hippo pathway induces its degradation through HBXIP-elevated HDAC6 in promotion of breast cancer growth. **Oncogene,** v. 35, n. 31, p. 4048-57, 08 2016. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657153 >.

_____. Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. **Med Oncol,** v. 34, n. 10, p. 180, Sep 2017. ISSN 1559-131X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28918490 >.

LI, Q. et al. Mst1 regulates colorectal cancer stress response via inhibiting Bnip3-related mitophagy by activation of JNK/p53 pathway. **Cell Biol Toxicol,** v. 34, n. 4, p. 263-277, 08 2018. ISSN 1573-6822. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29063978 >.

LIN, C.; YAO, E.; CHUANG, P. T. A conserved MST1/2-YAP axis mediates Hippo signaling during lung growth. **Dev Biol,** v. 403, n. 1, p. 101-13, Jul 2015. ISSN 1095-564X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25912685 >.

LIN, X. Y. et al. Mammalian sterile 20-like kinase 1 expression and its prognostic significance in patients with breast cancer. **Oncol Lett,** v. 14, n. 5, p. 5457-5463, Nov 2017. ISSN 1792-1074. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29098035 >.

LIN, Y. T. et al. YAP regulates neuronal differentiation through Sonic hedgehog signaling pathway. **Exp Cell Res,** v. 318, n. 15, p. 1877-88, Sep 2012. ISSN 1090-2422. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659622 >.

LIU, W. et al. Regulation of neuronal cell death by c-Abl-Hippo/MST2 signaling pathway. **PLoS One,** v. 7, n. 5, p. e36562, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22590567 >.

LIU, Z. et al. Roles of the MST1-JNK signaling pathway in apoptosis of colorectal cancer cells induced by Taurine. **Libyan J Med,** v. 13, n. 1, p. 1500346, Dec 2018. ISSN 1819-6357. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30035680 >.

LOU, E. et al. Complete and sustained response of adult medulloblastoma to first-line sonic hedgehog inhibition with vismodegib. **Cancer Biol Ther,** v. 17, n. 10, p. 1010-1016, Oct 2016. ISSN 1555-8576. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27682250 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931 >.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell,** v. 17, n. 1, p. 9-26, Jul 2009. ISSN 1878-1551. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619488 >.

MAEJIMA, Y. et al. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. **Nat Med,** v. 19, n. 11, p. 1478-88, Nov 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141421 >.

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

MERVE, A. et al. Polycomb group gene BMI1 controls invasion of medulloblastoma cells and inhibits BMP-regulated cell adhesion. **Acta Neuropathol Commun,** v. 2, p. 10, Jan 2014. ISSN 2051-5960. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460684 >.

MOSIMANN, C.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 10, n. 4, p. 276-86, Apr 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305417 >.

MOXON-EMRE, I. et al. Impact of craniospinal dose, boost volume, and neurologic complications on intellectual outcome in patients with medulloblastoma. **J Clin Oncol,** v. 32, n. 17, p. 1760-8, Jun 2014. ISSN 1527-7755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516024 >.

NAKAMURA, M. et al. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. **JCI Insight,** v. 1, n. 5, Apr 2016. ISSN 2379-3708. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27218122 >.

NATARAJAN, S. et al. Notch1-induced brain tumor models the sonic hedgehog subgroup of human medulloblastoma. **Cancer Res,** v. 73, n. 17, p. 5381-90, Sep 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852537 >.

NGUYEN, L. K. et al. Competing to coordinate cell fate decisions: the MST2-Raf-1 signaling device. **Cell Cycle,** v. 14, n. 2, p. 189-99, 2015. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607644 >.

NISHIMURA, K. et al. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. **Cell Rep,** v. 10, n. 8, p. 1310-23, Mar 2015. ISSN 2211-1247. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732822 >.

NIYAZ, M.; KHAN, M. S.; MUDASSAR, S. Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. **Transl Oncol,** v. 12, n. 10, p. 1334-1344, Jul 2019. ISSN 1936-5233. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31352196 >.

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

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

_____. Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. **Nature,** v. 511, n. 7510, p. 428-34, Jul 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043047 >.

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

_____. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. **Nature,** v. 488, n. 7409, p. 49-56, Aug 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832581 >.

O'NEILL, E.; KOLCH, W. Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo. **Cell Cycle,** v. 4, n. 3, p. 365-7, Mar 2005. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701972 >.

OH, H. J. et al. MST1 limits the kinase activity of aurora B to promote stable kinetochore-microtubule attachment. **Curr Biol,** v. 20, n. 5, p. 416-22, Mar 2010. ISSN 1879-0445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171103 >.

PANTAZI, A. et al. Inhibition of the 60S ribosome biogenesis GTPase LSG1 causes endoplasmic reticular disruption and cellular senescence. **Aging Cell,** v. 18, n. 4, p. e12981, Aug 2019. ISSN 1474-9726. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31148378 >.

PARK, A. K. et al. Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. **BMC Cancer,** v. 19, n. 1, p. 571, Jun 2019. ISSN 1471-2407. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31185958 >.

PEFANI, D. E. et al. MST2 kinase suppresses rDNA transcription in response to DNA damage by phosphorylating nucleolar histone H2B. **EMBO J,** v. 37, n. 15, 08 2018. ISSN 1460-2075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29789391 >.

PERUMAL, N. et al. Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/Yap and TGF-β1/Smad signaling. **Biochimie,** v. 140, p. 10-19, Sep 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28552397 >.

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 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515801 >.

PHOENIX, T. N. et al. Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. **Cancer Cell,** v. 29, n. 4, p. 508-522, Apr 2016. ISSN 1878-3686. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050100 >.

POMEROY, S. L. et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. **Nature,** v. 415, n. 6870, p. 436-42, Jan 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807556 >.

PRINCIPE, D. R. et al. TGF-β: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst,** v. 106, n. 2, p. djt369, Feb 2014. ISSN 1460-2105. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511106 >.

RAGAZZON, B. et al. Inactivation of the Carney complex gene 1 (protein kinase A regulatory subunit 1A) inhibits SMAD3 expression and TGF beta-stimulated apoptosis in adrenocortical cells. **Cancer Res,** v. 69, n. 18, p. 7278-84, Sep 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738044 >.

RAM, R. R. et al. RASSF1A inactivation unleashes a tumor suppressor/oncogene cascade with context-dependent consequences on cell cycle progression. **Mol Cell Biol,** v. 34, n. 12, p. 2350-8, Jun 2014. ISSN 1098-5549. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732797 >.

RAO, R. et al. The G protein Gαs acts as a tumor suppressor in sonic hedgehog signaling-driven tumorigenesis. **Cell Cycle,** v. 15, n. 10, p. 1325-30, 05 2016. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27052725 >.

RAWAT, S. J.; CHERNOFF, J. Regulation of mammalian Ste20 (Mst) kinases. **Trends Biochem Sci,** v. 40, n. 3, p. 149-56, Mar 2015. ISSN 0968-0004. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665457 >.

READY, D. et al. Mapping the STK4/Hippo signaling network in prostate cancer cell. **PLoS One,** v. 12, n. 9, p. e0184590, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28880957 >.

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 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050204 >.

RODRIGUEZ-BLANCO, J. et al. Inhibition of WNT signaling attenuates self-renewal of SHH-subgroup medulloblastoma. **Oncogene,** v. 36, n. 45, p. 6306-6314, 11 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28714964 >.

ROMANO, D. et al. Proapoptotic kinase MST2 coordinates signaling crosstalk between RASSF1A, Raf-1, and Akt. **Cancer Res,** v. 70, n. 3, p. 1195-203, Feb 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086174 >.

_____. Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. **Nat Cell Biol,** v. 16, n. 7, p. 673-84, Jul 2014. ISSN 1476-4679. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929361 >.

ROTH, R. B. et al. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. **Neurogenetics,** v. 7, n. 2, p. 67-80, May 2006. ISSN 1364-6745. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572319 >.

ROUSSEL, M. F.; HATTEN, M. E. Cerebellum development and medulloblastoma. **Curr Top Dev Biol,** v. 94, p. 235-82, 2011. ISSN 1557-8933. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295689 >.

SANG, B. et al. Dual functions for OVAAL in initiation of RAF/MEK/ERK prosurvival signals and evasion of p27-mediated cellular senescence. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 115, n. 50, p. E11661-E11670, 12 2018. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30478051 >.

SANTHANA KUMAR, K. et al. TGF-β Determines the Pro-migratory Potential of bFGF Signaling in Medulloblastoma. **Cell Rep,** v. 23, n. 13, p. 3798-3812.e8, Jun 2018. ISSN 2211-1247. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29949765 >.

SCHRECK, K. C. et al. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. **Clin Cancer Res,** v. 16, n. 24, p. 6060-70, Dec 2010. ISSN 1078-0432. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169257 >.

SCHWALBE, E. C. et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. **Lancet Oncol,** v. 18, n. 7, p. 958-971, 07 2017. ISSN 1474-5488. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28545823 >.

SENGUPTA, S. et al. α5-GABAA receptors negatively regulate MYC-amplified medulloblastoma growth. **Acta Neuropathol,** v. 127, n. 4, p. 593-603, Apr 2014. ISSN 1432-0533. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24196163 >.

SHTUTMAN, M. et al. Cellular Model of p21-Induced Senescence. **Methods Mol Biol,** v. 1534, p. 31-39, 2017. ISSN 1940-6029. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812865 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358937 >.

SOLECKI, D. J. et al. Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. **Neuron,** v. 31, n. 4, p. 557-68, Aug 2001. ISSN 0896-6273. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11545715 >.

SONG, H. et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 4, p. 1431-6, Jan 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080598 >.

SWIDERSKA-SYN, M. et al. Hedgehog regulates yes-associated protein 1 in regenerating mouse liver. **Hepatology,** v. 64, n. 1, p. 232-44, 07 2016. ISSN 1527-3350. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970079 >.

TARIKI, M. et al. The Yes-associated protein controls the cell density regulation of Hedgehog signaling. **Oncogenesis,** v. 3, p. e112, Aug 2014. ISSN 2157-9024. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111861 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134537 >.

THOMPSON, M. C. et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. **J Clin Oncol,** v. 24, n. 12, p. 1924-31, Apr 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567768 >.

TONG, K. K.; MA, T. C.; KWAN, K. M. BMP/Smad signaling and embryonic cerebellum development: stem cell specification and heterogeneity of anterior rhombic lip. **Dev Growth Differ,** v. 57, n. 2, p. 121-34, Feb 2015. ISSN 1440-169X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705796 >.

TRISCOTT, J. et al. Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. **Cancer Res,** v. 73, n. 22, p. 6734-44, Nov 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24019381 >.

TURI, Z. et al. Perturbation of RNA Polymerase I transcription machinery by ablation of HEATR1 triggers the RPL5/RPL11-MDM2-p53 ribosome biogenesis stress checkpoint pathway in human cells. **Cell Cycle,** v. 17, n. 1, p. 92-101, 2018. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29143558 >.

TURUNEN, S. P. et al. FGFR4 phosphorylates MST1 to confer breast cancer cells resistance to MST1/2-dependent apoptosis. **Cell Death Differ**, Mar 2019. ISSN 1476-5403. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30903103 >.

VARGHESE, R. T. et al. Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma. **Oncotarget,** v. 7, n. 15, p. 20140-51, Apr 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956052 >.

VLAD, A. et al. The first five years of the Wnt targetome. **Cell Signal,** v. 20, n. 5, p. 795-802, May 2008. ISSN 0898-6568. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160255 >.

WANG, L.; LIU, Y. Signaling pathways in cerebellar granule cells development. **Am J Stem Cells,** v. 8, n. 1, p. 1-6, 2019. ISSN 2160-4150. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31139492 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28856557 >.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29753700 >.

WILNE, S. et al. Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Oncol,** v. 8, n. 8, p. 685-95, Aug 2007. ISSN 1470-2045. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644483 >.

WON, G. W. et al. Mammalian Hippo kinase pathway is downregulated by BCL-2 via protein degradation. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 512, n. 1, p. 87-92, Apr 2019. ISSN 1090-2104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30867124 >.

WONG, K. F. et al. Integrin α2β1 inhibits MST1 kinase phosphorylation and activates Yes-associated protein oncogenic signaling in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget,** v. 7, n. 47, p. 77683-77695, Nov 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765911 >.

XU, C. et al. Effect of Mst1 overexpression on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the sensitivity to cisplatin in vitro. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),** v. 45, n. 4, p. 268-79, Apr 2013. ISSN 1745-7270. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419720 >.

XU, C. M. et al. Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. **Cancer Gene Ther,** v. 20, n. 8, p. 453-60, Aug 2013. ISSN 1476-5500. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928732 >.

XU, F. et al. Mammalian sterile 20-like kinase 1/2 inhibits the Wnt/β-catenin signalling pathway by directly binding casein kinase 1ε. **Biochem J,** v. 458, n. 1, p. 159-69, Feb 2014. ISSN 1470-8728. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180524 >.

XU, J. et al. Pediatric brain tumor cell lines. **J Cell Biochem,** v. 116, n. 2, p. 218-24, Feb 2015. ISSN 1097-4644. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211508 >.

_____. Disseminated Medulloblastoma in a Child with Germline BRCA2 6174delT Mutation and without Fanconi Anemia. **Front Oncol,** v. 5, p. 191, 2015. ISSN 2234-943X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380221 >.

YAMADA, M. et al. [Establishment and biological characterization of human medulloblastoma cell lines]. **No To Shinkei,** v. 41, n. 7, p. 695-702, Jul 1989. ISSN 0006-8969. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2818910 >.

YAMAGUCHI, Y. et al. Arsenic acid inhibits proliferation of skin fibroblasts, and increases cellular senescence through ROS mediated MST1-FOXO signaling pathway. **J Toxicol Sci,** v. 41, n. 1, p. 105-13, Feb 2016. ISSN 1880-3989. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26763397 >.

YANG, Z.; JOYNER, A. L. YAP1 is involved in replenishment of granule cell precursors following injury to the neonatal cerebellum. **Dev Biol**, Jul 2019. ISSN 1095-564X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31376393 >.

YAO, S.; YAN, W. Overexpression of Mst1 reduces gastric cancer cell viability by repressing the AMPK-Sirt3 pathway and activating mitochondrial fission. **Onco Targets Ther,** v. 11, p. 8465-8479, 2018. ISSN 1178-6930. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30555239 >.

YU, F. X.; ZHAO, B.; GUAN, K. L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. **Cell,** v. 163, n. 4, p. 811-28, Nov 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26544935 >.

YU, J. et al. Identification of MST1 as a potential early detection biomarker for colorectal cancer through a proteomic approach. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 14265, 10 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29079854 >.

YU, Y.; FENG, X. H. TGF-β signaling in cell fate control and cancer. **Curr Opin Cell Biol,** v. 61, p. 56-63, Aug 2019. ISSN 1879-0410. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31382143 >.

YUAN, Z. et al. Regulation of neuronal cell death by MST1-FOXO1 signaling. **J Biol Chem,** v. 284, n. 17, p. 11285-92, Apr 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221179 >.

ZHANG, P. et al. Exploration of MST1-Mediated Secondary Brain Injury Induced by Intracerebral Hemorrhage in Rats via Hippo Signaling Pathway. **Transl Stroke Res**, Apr 2019. ISSN 1868-601X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30941717 >.

ZHANG, W. et al. Mst1 regulates non-small cell lung cancer A549 cell apoptosis by inducing mitochondrial damage via ROCK1/F-actin pathways. **Int J Oncol,** v. 53, n. 6, p. 2409-2422, Dec 2018. ISSN 1791-2423. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30320378 >.

ZHANG, Y. et al. Nkx2-2as Suppression Contributes to the Pathogenesis of Sonic Hedgehog Medulloblastoma. **Cancer Res,** v. 78, n. 4, p. 962-973, 02 2018. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229597 >.

ZHAO, X. et al. RAS/MAPK Activation Drives Resistance to Smo Inhibition, Metastasis, and Tumor Evolution in Shh Pathway-Dependent Tumors. **Cancer Res,** v. 75, n. 17, p. 3623-35, Sep 2015. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26130651 >.

ZHENG, Y.; PAN, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. **Dev Cell,** v. 50, n. 3, p. 264-282, Aug 2019. ISSN 1878-1551. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31386861 >.

ZHOU, D. et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, n. 49, p. E1312-20, Dec 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042863 >.

ZHOU, J.; CHEN, Q. Poor expression of microRNA-135b results in the inhibition of cisplatin resistance and proliferation and induces the apoptosis of gastric cancer cells through MST1-mediated MAPK signaling pathway. **FASEB J,** v. 33, n. 3, p. 3420-3436, Mar 2019. ISSN 1530-6860. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30576232 >.

ZHU, D.; SUN, C.; QIAN, X. MST1 suppresses viability and promotes apoptosis of glioma cells via upregulating SIRT6 expression. **J Integr Neurosci,** v. 18, n. 2, p. 117-126, Jun 2019. ISSN 0219-6352. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31321952 >.

9. Anexo

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

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.

Marcia Villanova

DRª 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

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

10. Apêndice

APÊNDICE

Artigo científico submetido para a revista "Targeted Oncology"

Title: MST2 inhibition reduces cell growth through developmental signaling pathways modulation in medulloblastoma cells.

Authors: Mirella Baroni[1], Carolina Alves Pereira Correa[1], Keteryne Rodrigues da Silva[1], Gustavo Alencastro Veiga Cruzeiro[2], Veridiana Kiill Suazo[2], Rosane Gomes de Paula Queiroz[2], José Andrés Yunes[3], Silvia Regina Brandalise[3], Carlos Alberto Scrideli[1,2], Luiz Gonzaga Tone[1,2].

Authors Filiation: [1] Department of Genetics - Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil [2] Department of Pediatrics - Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [3] Department of Pediatrics - Centro Infantil Boldrini, Campinas, São Paulo Brazil

Corresponding Author:

Mirella Baroni – Department of Genetics- Ribeirao Preto Medical Schoo – FMRP - University of Sao Paulo – USP - Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Phone number: +55 16 33152651

E-mail adress: mibaroni@usp.br

ABSTRACT

Background: Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumor of the central nervous system in childhood. Despite the advances, about one third of patients die due to tumor recurrence and most survivors suffer long-term side effects. Biology of MB is associated with the dysregulation of signaling pathways that control embryonic development. Some studies point to MST2 kinase as key proteins in the regulation of these molecular pathways in different tumors.

Objective: The aim of the present study was to analyze the involvement of MST2 kinases in MB and to evaluate their role in the regulation of associated molecular pathways.

Methods: First, we analyzed *MST2* expression in MB samples and molecular subgroups. Subsequently, in vitro assays were performed after pharmacological and siRNA MST2 inhibition in MB cell lines. Pathway enrichment analysis was performed with genes correlated with *MST2* expression and some of these genes were validated.

Results: *MST2* has a higher expression in MB samples when compared with expression in the cerebellum, and *MST2* expression is higher in the WNT and SHH molecular subgroups. Pharmacological inhibition and gene silencing of MST2 promoted a decrease in cell viability and colony formation and caused changes in the cell cycle in SHH MB cell lines. In silico analysis showed that the genes most correlated with MST2 participate in important signaling pathways, and inhibition of MST2 promoted expression modification of important targets.

Conclusion: With these data it can be observed that MST2 regulates important mechanisms for tumor progression and is involved with relevant pathways in MB, being a promising therapeutic target for this tumor.

Key Points:

- MST2 kinase is overexpressed in medulloblastoma.
- MST2 inhibition reduces cell viability, colony formation and promote cell cycle arrest of medulloblastoma cells.
- MST2 inhibition changes the expression of targets of Hippo, Shh, TGF-β and Wnt signaling pathways.

1 INTRODUCTION

Meduloblastoma (MB) is an embryonic tumor of cerebellar origin and is the most frequent malignant tumor of the central nervous system in childhood. Patients with MB are treated with combined modalities involving maximal tumor resection, with minimal damage to cerebellar tissues, in conjunction with cytotoxic chemotherapy, and spinal cranial irradiation (> 3 years) [1, 2]. Although conventional therapies can cure a large proportion of patients, most survivors suffer long-term side effects, including neurological, neuroendocrine and psychosocial deficits [3, 4]. In addition to the side effects, about one third of the patients may die due to recurrence of the tumor [5]. This recurrence occurs by the invasive and metastatic nature of MB, but also due to the restrictions of irradiation in children [6]. After several studies that showed the genetic, demographic and clinical differences of patients with MB, in 2012, the consensus of the Molecular classification of MB [7, 8]. Currently, this classification is used by the World Health Organization, which divides the MB into four main molecular subgroups: WNT, SHH, Group 3 and Group 4 [9]. In addition to the Wnt and Shh molecular pathways already mentioned, the Notch, TGF-β and Hippo pathways also have participation in the normal embryonic development of the cerebellum and when deregulated promote tumorigenesis and spread of MB [10]. These pathways cooperate to pathogenesis and tumor growth in different tumors, and MST2 kinase as key proteins in the regulation of these molecular pathways in different tumors. The kinase MST2 (Mammalian Sterile Twenty-Like) were cloned and characterized in 1995 and received this nomenclature by similarity with the STE20 (Sterile twenty) kinases of yeasts Saccharomyces

cerevisiae [11]. Kinase phosphorylation/activation occurs mainly by the trans-autophosphorylation mechanism, wich occurs through the MST2 homodimerization, causing a conformational rearrangement in the activation loop, which normally occurs in the threonine-180 (T-180). This kinase have different targets in the cell, the most described in the literature are MOB1 and LATS1/2 that are activated by MST1 and MST2 initiating Hippo pathway activation [12]. And regulate others important targets as FoxO1, FoxO3, BCL-2, Aurora B, NDR1/2 kinases and others [13-19]. By controlling these targets MST2 affects important mechanisms such as proliferation, apoptosis and cell cycle. Therefore, it is of fundamental importance for the maintenance of cellular and tissue homeostasis. Understanding the function and regulation of these kinase is essential, given that MST2 disturbances imply the alteration of the expression of different molecular pathways that are associated with the growth and progression of cancer. Therefore, the involvement of MST2 kinase in the progression of MB and regulation of associated molecular pathways was investigated for the first time.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples and Cell Lines

We analyzed samples from 45 patients with pediatric MB and 5 non-neoplastic cerebellums (Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School: Process No. 15509/2016). The samples analyzed come from the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School (University of Sao Paulo - Brazil) and the Boldrini Children's Center (Campinas – Brazil). The molecular subgroups were classified as described in [20]. In this study we used the cell lines DAOY, ONS-76 (purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank - BCRJ / UFRJ), UW473 (kindly provided by Dr. Michael Bobola - Seattle Children's Hospital), UW228, D283 (kindly provided by Prof Dr. Rafael Roesler - Department of Pharmacology - UFRGS), USP-13 and CHLA-01-Med (kindly provided by Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto - Institute of Biosciences - USP). Cell lines were cultured in DMEM/F12 medium with 100 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 10% fetal bovine serum (SBF) in a humid atmosphere containing 5% CO2 at 37 °C. To cultivate CHLA-01-Med cell line, 20ng/ml of human recombinant FGF and EGF and 1% of supplement B27 were added to the culture medium. Cell lines were authenticated using STR markers and validated by ATCC profile checking. No cross contamination was found.

2.2 qRT-PCR

Samples of non-neoplastic cerebellum, MB tumor samples, and MB cell lines had their total RNA extracted using TRIZOL® reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. cDNA synthesis was performed with the High Capacity® kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the protocol suggested by the manufacturer. To quantify gene expression, the qRT-PCR technique was performed using ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection Systems by continuous fluorescence monitoring by TaqMan® probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Differences in the amount of total cDNA added to each reaction were normalized using 2 reference genes (GUSB and HPRT1) as internal control. The 2-ΔΔCT method was used for the relative quantification of gene expression. The mean of non-neoplastic cerebellum expressions or the average of negative controls was used as a calibrator. TaqMan® probes used were STK3 (Hs00169491), YAP1 (Hs00902712), GLI1 (Hs00171790), GLI2 (Hs01119974), SMAD3 (Hs00969210), LEF1 (Hs01547200).

2.3 Western Blot

Protein extraction from cell cultures was first performed by the RIPA Lysis and Extraction Buffer® reagent (Pierce Biotechology, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. For protein analysis, 40-50µg of each sample was separated by SDS-PAGE electrophoresis. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated in 1% TBST containing 5% blocking solution for 1 hour at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody of the protein of interest, diluted according to the manufacturer's instructions (Table 3). The membranes were then washed with 1% TBST and incubated with secondary antibody for 1 hour at room temperature. Secondary antibody was visualized using the ECLTM Western blotting Analysis System Kit (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The intensity of the bands for protein expression quantification was analyzed using ImageJ 1.52a (NIH) software. Antibodies: phospho-MST1/MST2 (T-183)/(T-180) (#49332 - Cell Signaling), MST2 (#3952 - Cell Signaling), phospho-YAP(Ser-127) (#13008 - Cell Signaling), YAP (#14074 - Cell Signaling), phospho-SMAD3 (S423/S425) (ab52903 – Abcam), SMAD2/3 (#8685 - Cell Signaling), GLI1 (#2534 - Cell Signaling), p21 (#2947 - Cell Signaling) and GAPDH (sc-47724 - Santa Cruz Biotechnology).

2.4 MST2 Inhibition

a) Drug Treatment

For the different functional assays, the cell lines were treated with the drug XMU-MP-1 of the company Medchemexpress® (HY-100526), a selective inhibitor of MST2 activity (and MST1). The drug was dissolved in DMSO at 10mM concentration according to the manufacturer's recommendation. After treatment were performed the cell viability, colony formation, apoptosis and cell cycle assays in the 4 cell lines of MB: DAOY, ONS-76, UW228 and UW473.

b) siRNA Transfection

MST2 knockdown was performed through transfection with siRNA by the reverse transfection protocol, which the cells were plated together with the transfection mix consisting of 25nm of siRNA Silencer® Select (Thermofisher Scientific), lipofectamine Rnaimax® (Thermofisher Scientific) and Opti-MEMTM (GibcoTM). The quantities of the reagents were in accordance with the manufacturer's recommendation. The cells were transfected with siRNA target of MST2 (s13567) and with siRNA negative control (4390843) that does not have a specific target. After confirming the gene silencing by qRT-PCR and western blot were performed the cell viability, colony formation and cell cycle assays in the 3 cell lines of MB: DAOY, ONS-76 and UW228.

2.5 Cell Viability Assay

The experiments were performed with the XMU-MP-1 drug at doses of 0, 0.25, 0.5, 1, 5 and 10µM and with siRNA at a concentration of 25nM. They were seed in triplicate 1-3 x 103 cells/well and then incubated for 24, 48, 72, 96 hours at 37 °C. At each interval of 24 hours was done the addition in the culture medium of 30 µL of the reagent CellTiter-Glo® (Promega) at room temperature. The plates were agitated and incubated for 10 minutes, according to the manufacturer's instructions, and the luminescence reading was performed using the Spectramax® L microplate reader. The experiments were repeated three times in triplicate. The results were expressed as mean and standard deviation and compared with the results of the negative control cells.

2.6 Colony Formation assay

For colony formation assay, 300-500 cells/well were plated in 6-well culture plates in triplicate. After the cells were treated with the drug XMU-MP-1 for 72 hours at doses of 0, 0.25, 0.5 and 1 M m. For the siRNA experiment, the cells were plated for the assay after 48 hours of transfection with siRNA at a concentration of 25nM. The cell lines were incubated at 37 °C for 7-15 days, until the colonies were visible, but not confluent. For the visualization and counting of the colonies, the culture medium was removed, the cells were washed with PBS, fixed with methanol, and stained with Giemsa. The experiments were repeated three times in triplicate. The results were expressed as mean and standard deviation and compared with the results of the negative control cells.

2.7 Apoptosis Assay

Apoptosis assay was performed in 6-well plates with 3-5x104 cells per well. The experiments were analyzed after 72 hours of treatment with the XMU-MP-1 drug at doses of 0, 1 and 5µM. After the treatment time the cells were tripsinized and centrifuged at 1000 rpm for 5min at 4°C, washed with cold PBS and then resuspended in 250µl of 1x Annexin Binding Buffer (BD Biosciences Pharmigen, USA). The cells were then incubated and marked with 5µL of Annexin FITC (BD Biosciences Pharmigen, USA) and 50µL of propidium iodide (PI) at a concentration of 50µM. The cells were analyzed by the flow cytometer BD FACScalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the percentages of cells stained or not with annexin and or PI were obtained. The experiments were repeated three times in triplicate. The results were expressed as mean and standard deviation and compared with the results of the negative control cells.

2.8 Cycle Cell Assay

The cell cycle analysis was performed by Flow cytometry after marking with PI. First the cells were plated in six-well plates (3-4x104 cells/well). The experiments were analyzed after 72 hours of treatment with the XMU-MP-1 drug at doses of 0, 1 and 5µM and with siRNA (25nM) after 48 hours. After the experiment time these cells were collected, washed with PBS, fixed with 70% ethanol solution and then maintained at -20°C overnight. The cells were centrifuged, and the resulting pellet was resuspended in PBS with RNase A (10ng/mL) and incubated at 37 ° C for 30 minutes. Then, the cells were centrifuged, and PBS with PI was added to a final concentration of 50µg/ml for cell staining. The cells were analyzed by THE BD FACScalibur™ Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the percentage of cells in each phase of the cell cycle was obtained by the software FlowJoTM V10. The experiments were repeated three times in triplicate. The results were expressed as mean and standard deviation and compared with the results of the negative control cells.

2.9 In Silico Analysis

The R2: Genomics Analysis and Visualization Platform was used to evaluate the expression data of MST2 in the MB samples and in the molecular subgroups. For the analysis of the expression comparison between the samples of MB and cerebellum was used the Pfister database (Northcott et al., 2017) which has the analysis of 223 samples of MB (190 samples of pediatric MB). This bank was the one with the largest number of MB samples that could be compared with the non-neoplastic cerebellum data of the Roth Bank (Roth et al., 2006), which has an analysis of 9 samples and the Versteeg database (ps avgpres ITCCCELLLINE86_U133P2) that has the expression

analysis of 14 MB cell lines. Other databases with large numbers of samples, such as Cavalli with 763 samples of MB (563 samples of pediatric MB) and Pfister with 167 samples of MB (137 samples of pediatric MB) were used to analyze the expression of MST2 in the MB molecular subgroups. In these analyses, data were used only from pediatric patients.

The R2: Genomics Analysis and Visualization platform was also used to evaluate which genes were the most correlated with the expression of MST2. In this analysis, we evaluated which common genes of the two databases, Cavalli with 763 samples and Pfister with 223 Samples of MB, had the expression correlation factor $R \geq 0.4$ and $R \leq -0.4$ with MST2 expression. With these genes was performed the analysis of enrichment of pathways by KEEG pathways, through the online tool DAVID Bioinformatics Resources 6.8.

2.10 Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was performed using the SPSS 20.0 program (Chicago, IL, USA) and the GraphPad Prism® 5 program. For the analysis of gene expression of the samples the Mann-Whitney test was used, and values were considered significantly those with P value ≤ 0.05. Correlation between the values of the gene expression was analyzed using the Spearman Rho coefficient. Those with P value ≤ 0.05 were considered statistically significant values. Analysis of functional assays as cell viability, colony formation, apoptosis and cell cycle were used the Student's t-test, One Way Anova and Bonferroni post-test. Those with P value ≤ 0.05 were considered statistically significant values.

3. RESULTS

3.1 MST2 expression in Medulloblastoma

The gene expression of MST2 was performed in MB tumor samples and cell lines compared to the expression of non-neoplastic cerebellum samples by qRT-PCR and in silico analysis (Fig. 1). After qRT-PCR analysis, it was possible to observe a significant difference in the MST2 expression which is more expressed in the MB tumor samples ($P = 0.0236$) and cell lines ($P = 0.0025$) (Fig. 1a) when compared with the expression of cerebellum samples. In silico analysis also showed higher expression of MST2 in the MB tumor samples and in the cell lines ($P < 0.0001$) when compared with cerebellum (Fig. 1b).

The MST2 expression analysis was performed between the molecular subgroups WNT, SHH, Group 3 and Group 4 by qRT-PCR and in silico analysis. The gene expression of MST2 was higher in the subgroup WNT ($P = 0.0027$) and SHH ($P = 0.0098$) when compared to the expression in the non-neoplastic cerebellum samples in the analysis by qRT-PCR (Fig. 2a). In silico analysis showed that the difference of MST2 expression was significant ($P < 0.0001$) in the comparison of all subgroups between each other and with the cerebellum (Fig. 2b) using Pfister_223 database. In the other databases the expression of MST2 is also higher in the WNT and SHH subgroups compared to subgroups 3 and 4 (Fig. 2c and 2d).

3.2 Effect of pharmacological inhibition of MST2 in Medulloblastoma cells

After treatment with the MST2 inhibitor, XMU-MP-1, there was a decrease in cell viability and colony formation in the four MB cell lines (Fig. 3). All cell lines had a decrease in cell viability of at least 70% after 96 hours of treatment. The drug XMU-MP-1 promoted a decrease in the formation of colonies after 72 hours of

treatment and it is possible to observe that in the dose of 1µM there is no formation of colonies in the four cell lines (Fig. 4).

Cell cycle analysis was performed after 72 hours of treatment at doses 1 and 5µM of XMU-MP-1. The cell lines DAOY (Fig. 5a), ONS-76 (Fig. 5b) and UW228 (Fig. 5c) had a decrease of 20 to 30% in the number of cells in G1 and an increase of 15 to 30% in the G2/M phase after treatment with XMU-MP-1 in comparison with the cells treated only with DMSO. In addition, it was possible to observe an increase of cells in the subG1 phase in the DAOY strain (Fig. 5a). In the UW473 the treatment did not promote changes in the cell cycle (Fig. 5d). There was a decrease in viable cells (annexin and PI negative), but the apoptosis rate, annexin and PI staining, was not significant after treatment (Fig. 6).

3.2 Effect of MST2 inhibition by siRNA in Medulloblastoma cells

qRT-PCR and Western blot were performed to confirm that the transfection with siRNA decreases the expression of MST2 (Fig. 7). After confirmation of MST2 knockdown, the cell viability assay was performed after transfection with siRNA. The silencing of MST2 promoted a decrease in cell viability in all cell lines, with the most significant effect after 72 hours. DAOY (Fig. 8a), ONS-76 (Fig. 8b) and UW228 (Fig. 8c) had a reduction of more than 50% in cell viability. The transfection with siMST2, also promoted a significant reduction in the number of colonies in the 3 cell lines (Fig. 9).

The cell cycle was evaluated after the transfection, all the cell lines had a decrease in the number of cells in the S phase after MST2 inhibition. The ONS-76, in addition to the S phase, had an increase of cells in the G1 phase and a decrease in the G2/M phase while UW228 had an increase in cells in this phase of the cell cycle (Fig. 10).

3.3 In silico analysis with MST2 correlated genes

The R2: Genomics Analysis and Visualization platform was used to evaluate which genes are the most correlated with MST2, for this was used two public databases. The two databases have in common 2079 genes that have high correlation with MST2 expression, which 1116 genes have a positive correlation and 963 have a negative correlation. The analysis of pathway enrichment analysis was performed with the genes in common and it was possible to observe that a large part of these genes are involved with important pathways such as MAPK, ribosome, p53, cell cycle and also with the molecular pathways of development that are relevant to MB biology, such as via Wnt, TGF-β, Hippo and Shh (Fig. 11). With the genes that are correlated with MST2 and participating in these developmental pathways it was possible to elaborate a network of protein interaction through the online tool STRING 11.0 together with the program Cytoscape 3.6.1 (Fig. 11). In this network there are targets that have interaction with many proteins, among them are YAP1 (Hippo pathway), GLI1 and GLI2 (Shh pathway), SMAD3 (TGF-β pathway) and LEF1 (Wnt pathway), all have a high correlation with MST2 expression so they were chosen to verify if the MST2 modulation would alter the expression of these genes in the cell lines of MB.

3.4 MST2 targets validation

The analysis of gene expression by qRT-PCR was performed to verify if the expression of some genes changes after treatment with MTS2 inhibitor (XMU-MP-1). The expression of GLI1 (Fig. 12a) was analyzed and the treatment promoted a reduction of the expression in the four MB cell lines when compared with expression of the control. GLI2 (Fig. 12b) is not expressed in the UW228, but in the other cell lines there was a decrease in the

expression with the treatment. The expression of YAP1 (Fig. 12c) decreased at the highest dose in the line ONS-76 and UW473. SMAD3 (Fig. 12d) and LEF1 (Fig. 12e) had a reduction in gene expression after treatment, except in the UW228.

As can be seen in Fig. 13, the activity/phosphorylation of MST2 decreases as the dose of the inhibitor increases. The phosphorylation level of YAP increases in the highest doses and occurs the opposite to the expression of the total protein of YAP in the DAOY, but in ONS-76 decreases both expression of phosphorylated and total protein of YAP. SMAD3 phosphorylated, SMAD2/3 Total and p21 increases expression with XMU-MP-1. And the expression of GLI1 decreases with treatment.

Protein expression analysis was also performed after MST2 knockdown. The phosphorylation level of YAP and SMAD3 and the expression of the total protein decreases after MST2 inhibition. The knockdown promoted an increase in the expression of p21. The expression of GLI1 could only be detected in ONS-76 and had its expression reduced when compared with the control (Fig. 14).

4 DISCUSSION

A considerable portion of the patients with MB evolves to death due to treatment resistance, recurrence or tumor progression, representing an important cause of morbidity and mortality in the pediatric age group. Additionally, most survivors suffer severe long-term side effects. Therefore, advances for a better understanding of MB biology, using in vitro pre-clinical assay models, have been very useful in testing the efficacy of new therapeutic molecules, in the expectation of significant improvements in the regression of tumor growth and decreased toxic effect caused by current treatments. Studies aimed at understanding tumor biology and discovering new therapeutic approaches are necessary.

MST2 kinase are involved in several fundamental mechanisms for the homeostasis of the organism, such as proliferation, apoptosis and cell cycle, and participate and regulate important molecular pathways. Alterations in these mechanisms and pathways can lead to defects in the development of tissues and even the promotion and progression of the tumor. In MB we found high expression of MST2 in the MB samples and cell lines compared with the expression of non-neoplastic cerebellum samples, this high expression was found in the analysis by qRT-PCR and in the analysis in silico. Among the main activities of MST2, the most described in the literature is its participation in via Hippo as a tumor suppressor [12]. Thus, a lower expression was expected in the tumor samples of MB in relation to the non-neoplastic cerebellum as seen in other tumors [13, 21-25]. However, most studies investigate MST1 and not MST2 and despite the contrary data expected, there are some studies show the relationship between the increased activity of MST2 favoring cell growth [26-30].

A higher expression of MST2 was observed in the molecular subgroups WNT and SHH. Some studies show the correlation between the MSTs kinases and the developmental pathways which would explain the greater expression in these subgroups [31-34]. Since there was a higher gene expression of MST2 in the SHH subgroup, the cell lines chosen for the assays belong to this subgroup. The SHH subgroup is a very heterogeneous group and depending on the clinical and molecular characteristics may present a poor prognosis similar to subgroup 3, it is therefore interesting to investigate new therapeutic strategies for this group.

In this study, we performed the inhibition of the MST2 activity with the XMU-MP-1 drug to evaluate whether the kinases are involved with cellular mechanisms in the cell lines of MB. The treatment promoted a decrease in cell viability and colony formation and caused cell cycle arrest in the G2/M phase. The XMU-MP-1 drug blocks the

activation site, not allowing the MST2 kinases to be phosphorylate. Study has shown that this drug can cross the blood brain barrier and reduce damage caused by intracerebral hemorrhage [35].

The antitumor effect of this drug in MB could be explained by the relationship of MST2 in the control of the DNA repair process. In response to DNA damage, the MST2 kinase phosphoryl histone H2B in the nucleolar chromatin and causes a transient stop of transcription, necessary for genomic integrity maintenance. The MST2 inhibition promote a loss of this transcriptional control, the DNA repair process becomes disturbed and causes an increase in cellular lethality [29].

Although we observed a reduction in cell viability, there was no change in the rate of apoptosis after treatment, which could explain this result would be that the drug would be promoting a stop in the cell cycle leading to the cell senescence. The work of Sang et al. associates the inhibition of MST2 with decreased proliferation and increased cellular senescence [30].

To confirm if the effects of the drug occurs by inhibition of MST2, we perform assays after transfection with siRNA. It was possible to observe that the MST2 knockdown promoted a reduction in the viability, in the formation of colonies and altered the cell cycle in the three lines of MB. The study by Camgoz et al. (2018) showed that gene silencing and pharmacological inhibition of MST2 caused a decrease in cell proliferation and an increase in the rate of apoptosis in the acute myeloid leukemia cell lines [28].

To better understand the role of MST2 in the biology of MB was performed in silico analysis of the genes correlated with the its expression in the MB samples, and with these genes was performed the pathway analysis enrichment. In addition to the Wnt, Hippo, TGF-β and Shh developmental pathways, genes participate in other important pathways such as MAPK, ribosome, p53, cell cycle and others.

In MB, the MAPK pathway is involved with the development of the cerebellum and tumor formation, mechanisms as proliferation and apoptosis, chemoresistance and components of this pathway are prognostic markers [36-39]. It was observed that MST2 inhibition is related to decreased MAPK pathway activation leading to a lower proliferation and increased senescence [26, 30].

In the pathway analysis enrichment several genes correlated with MST2 are involved with the developmental signaling pathways Wnt, Hippo, TGF-β and Shh that are directly related in the development of the cerebellum and in the formation and growth of MB. In other tumors, this relationship between MST2 and these pathways also occurs, as in the case of hepatocellular cancer. In this tumor, the deletion of the MST2 kinase promotes tumor progression by activating the molecular pathways Wnt, Hippo and Notch [33, 34]. The expression validation of pathways targets was performed after MST2 inhibition (drug XMU-MP-1 and siRNA), and most had their expression altered after MST2 modulation. This demonstrates that it is possible that the MST2 activity is related to direct or indirect regulation of the investigated molecular pathways.

The pharmacological inhibition of MST2 promoted a decrease in the gene expression of Shh targets GLI1 and GLI2 and a decrease in the protein expression of GLI1. MST2 knockdown also promoted a reduction in the protein expression of GLI1 in ONS-76. Studies show that less activity or expression of GLI transcription factors is related to less proliferation and cell survival, corresponding to the results found in the present study. However, there are no data from the direct relationship between the MST2 kinase and the GLI transcription factors, but there are studies that report the link between the Hippo/MST pathway and the Shh/Gli pathway in MB [40-42].

The connection between Hippo and Shh pathway occurs mainly between YAP and GLI, because one of the described targets of YAP is GLI1 and GLI2 [43, 44]. In this study we found that the inhibition of MST2 promoted

a reduction in the protein expression of total YAP, which could also explain the lower expression of GLI transcription factors. YAP together with TAZ regulates expression of genes associated with different cellular processes such as proliferation, survival, cell cycle and migration [12].

Following target studied was SMAD3 of the TGF-β pathway, that when phosphorylated goes to the nucleus and regulates the expression of important genes that are involved with several cellular mechanisms relevant to cell homeostasis [45]. In the MB cells, the pharmacological inhibition of MST2 promoted a decrease in the gene expression of SMAD3, but there was an increase in the expression of phosphorylated protein and total protein. Another intriguing finding is that the inhibition of MST2 through transfection with siRNA decreases the protein expression of SMAD3, different from the result found after drug treatment. What could explain this data would be that the drug besides inhibit MST2 is also inhibiting the activity of MST1, and this would be promoting increased expression of SMAD3. Studies show that MST1 hyperexpression decreases TGF-β/Smad pathway activity in prostate cancer cell lines and hepatic cells [46, 47], which would corroborate the data found.

The last target evaluated was LEF-1, that belongs to Wnt pathway, when activated forms the complex between β-Catenin, TCF and LEF that regulates the expression of targets such as cyclin D1, p21, c-Myc, VEGF and others [48]. Treatment with the XMU-MP-1 drug decreased the gene expression of LEF1 in three MB cell lines, but there are no data on the direct relationship between LEF-1 and MST kinases. In MB, Wnt inhibition promotes a decrease in tumor propagation and growth in subgroup SHH [49].

Another interesting result was that p21 which is a tumor suppressor protein had its high expression after treatment and after the gene silencing of MST2. p21 causes stopping in the cell cycle by inhibiting some CCDK (Cyclin-Dependent Kinase) proteins that are essential for the cell cycle transitions from G1 to S and from G2 to mitosis [50]. Thus, its high expression after MST2 inhibition would explain the alterations observed in the cell cycle in the MB cell lines. Studies show that MST2 is involved with mechanisms of control of cell division [26, 51, 52], in addition, cell cycle is one of the pathways that are enriched in the analysis in silico. As p21 regulates the cell cycle, some studies associate its expression with increased senescence [53]. Sang et al. observed that MST2 inhibition promoted an increase in the expression of p21 and p27 correlated with decreased cell viability and increased senescence [30].

With all these data it can be observed that MST2 regulates important mechanisms for tumor progression, such as cell viability, colony formation and cell cycle and is involved with relevant pathways in MB, being a potential therapeutic target for this tumor.

5 REFERENCES

1. Gajjar AJ, Robinson GW (2014) Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. Nat Rev Clin Oncol 11: 714-722 doi:10.1038/nrclinonc.2014.181

2. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, Rutkowski S, Ellison DW, Malkin D, Taylor MD, Gajjar A, Pfister SM (2019) Medulloblastoma. Nat Rev Dis Primers 5: 11 doi:10.1038/s41572-019-0063-6

3. Kieffer V, Chevignard MP, Dellatolas G, Puget S, Dhermain F, Grill J, Valteau-Couanet D, Dufour C (2019) Intellectual, educational, and situation-based social outcome in adult survivors of childhood medulloblastoma. Dev Neurorehabil 22: 19-26 doi:10.1080/17518423.2018.1424262

4. King AA, Seidel K, Di C, Leisenring WM, Perkins SM, Krull KR, Sklar CA, Green DM, Armstrong GT, Zeltzer LK, Wells E, Stovall M, Ullrich NJ, Oeffinger KC, Robison LL, Packer RJ (2017) Long-term neurologic

health and psychosocial function of adult survivors of childhood medulloblastoma/PNET: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. Neuro Oncol 19: 689-698 doi:10.1093/neuonc/now242

5. Massimino M, Biassoni V, Gandola L, Garrè ML, Gatta G, Giangaspero F, Poggi G, Rutkowski S (2016) Childhood medulloblastoma. Crit Rev Oncol Hematol 105: 35-51 doi:10.1016/j.critrevonc.2016.05.012

6. Habrand JL, De Crevoisier R (2001) Radiation therapy in the management of childhood brain tumors. Childs Nerv Syst 17: 121-133 doi:10.1007/s003810000365

7. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. J Clin Oncol 29: 1408-1414 doi:10.1200/JCO.2009.27.4324

8. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathol 123: 465-472 doi:10.1007/s00401-011-0922-z

9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 131: 803-820 doi:10.1007/s00401-016-1545-1

10. Roussel MF, Hatten ME (2011) Cerebellum development and medulloblastoma. Curr Top Dev Biol 94: 235-282 doi:10.1016/B978-0-12-380916-2.00008-5

11. Creasy CL, Chernoff J (1995) Cloning and characterization of a member of the MST subfamily of Ste20-like kinases. Gene 167: 303-306 doi:10.1016/0378-1119(95)00653-2

12. Zheng Y, Pan D (2019) The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. Dev Cell 50: 264-282 doi:10.1016/j.devcel.2019.06.003

13. Zhu D, Sun C, Qian X (2019) MST1 suppresses viability and promotes apoptosis of glioma cells via upregulating SIRT6 expression. J Integr Neurosci 18: 117-126 doi:10.31083/j.jin.2019.02.122

14. Maejima Y, Kyoi S, Zhai P, Liu T, Li H, Ivessa A, Sciarretta S, Del Re DP, Zablocki DK, Hsu CP, Lim DS, Isobe M, Sadoshima J (2013) Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. Nat Med 19: 1478-1488 doi:10.1038/nm.3322

15. Won GW, Park SH, Park J, Lee Y, Lee YH (2019) Mammalian Hippo kinase pathway is downregulated by BCL-2 via protein degradation. Biochem Biophys Res Commun 512: 87-92 doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.015

16. Oh HJ, Kim MJ, Song SJ, Kim T, Lee D, Kwon SH, Choi EJ, Lim DS (2010) MST1 limits the kinase activity of aurora B to promote stable kinetochore-microtubule attachment. Curr Biol 20: 416-422 doi:10.1016/j.cub.2009.12.054

17. Lee YP, Wong CH, Chan KS, Lai SK, Koh CG, Li HY (2012) In vivo FRET imaging revealed a regulatory role of RanGTP in kinetochore-microtubule attachments via Aurora B kinase. PLoS One 7: e45836 doi:10.1371/journal.pone.0045836

18. Hergovich A, Kohler RS, Schmitz D, Vichalkovski A, Cornils H, Hemmings BA (2009) The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. Curr Biol 19: 1692-1702 doi:10.1016/j.cub.2009.09.020

19. Chiba S, Ikeda M, Katsunuma K, Ohashi K, Mizuno K (2009) MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. Curr Biol 19: 675-681 doi:10.1016/j.cub.2009.02.054

20. Cruzeiro GAV, Salomão KB, de Biagi CAO, Baumgartner M, Sturm D, Lira RCP, de Almeida Magalhães T, Baroni Milan M, da Silva Silveira V, Saggioro FP, de Oliveira RS, Dos Santos Klinger PH, Seidinger AL, Yunes JA, de Paula Queiroz RG, Oba-Shinjo SM, Scrideli CA, Nagahashi SMK, Tone LG, Valera ET (2019) A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma subgrouping. Acta Neuropathol Commun 7: 33 doi:10.1186/s40478-019-0681-y

21. Liu Y, Fan Y, Wang X, Huang Z, Shi K, Zhou B (2018) Musashi-2 is a prognostic marker for the survival of patients with cervical cancer. Oncol Lett 15: 5425-5432 doi:10.3892/ol.2018.8077

22. Chang Y, Fu XR, Cui M, Li WM, Zhang L, Li X, Li L, Sun ZC, Zhang XD, Li ZM, You XY, Nan FF, Wu JJ, Wang XH, Zhang MZ (2019) Activated hippo signal pathway inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in NK/T cell lymphoma cells. Cancer Med 8: 3892-3904 doi:10.1002/cam4.2174

23. Turunen SP, von Nandelstadh P, Öhman T, Gucciardo E, Seashore-Ludlow B, Martins B, Rantanen V, Li H, Höpfner K, Östling P, Varjosalo M, Lehti K (2019) FGFR4 phosphorylates MST1 to confer breast cancer cells resistance to MST1/2-dependent apoptosis. Cell Death Differ doi:10.1038/s41418-019-0321-x

24. Yao S, Yan W (2018) Overexpression of Mst1 reduces gastric cancer cell viability by repressing the AMPK-Sirt3 pathway and activating mitochondrial fission. Onco Targets Ther 11: 8465-8479 doi:10.2147/OTT.S180851

25. Zhang W, Liu K, Pei Y, Ma J, Tan J, Zhao J (2018) Mst1 regulates non-small cell lung cancer A549 cell apoptosis by inducing mitochondrial damage via ROCK1/F-actin pathways. Int J Oncol 53: 2409-2422 doi:10.3892/ijo.2018.4586

26. Kilili GK, Kyriakis JM (2010) Mammalian Ste20-like kinase (Mst2) indirectly supports Raf-1/ERK pathway activity via maintenance of protein phosphatase-2A catalytic subunit levels and consequent suppression of inhibitory Raf-1 phosphorylation. J Biol Chem 285: 15076-15087 doi:10.1074/jbc.M109.078915

27. Varghese RT, Liang Y, Guan T, Franck CT, Kelly DF, Sheng Z (2016) Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma. Oncotarget 7: 20140-20151 doi:10.18632/oncotarget.7917

28. Camgoz A, Paszkowski-Rogacz M, Satpathy S, Wermke M, Hamann MV, von Bonin M, Choudhary C, Knapp S, Buchholz F (2018) STK3 is a therapeutic target for a subset of acute myeloid leukemias. Oncotarget 9: 25458-25473 doi:10.18632/oncotarget.25238

29. Pefani DE, Tognoli ML, Pirincci Ercan D, Gorgoulis V, O'Neill E (2018) MST2 kinase suppresses rDNA transcription in response to DNA damage by phosphorylating nucleolar histone H2B. EMBO J 37 doi:10.15252/embj.201798760

30. Sang B, Zhang YY, Guo ST, Kong LF, Cheng Q, Liu GZ, Thorne RF, Zhang XD, Jin L, Wu M (2018) Dual functions for OVAAL in initiation of RAF/MEK/ERK prosurvival signals and evasion of p27-mediated cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A 115: E11661-E11670 doi:10.1073/pnas.1805950115

31. Basu D, Lettan R, Damodaran K, Strellec S, Reyes-Mugica M, Rebbaa A (2014) Identification, mechanism of action, and antitumor activity of a small molecule inhibitor of hippo, TGF-β, and Wnt signaling pathways. Mol Cancer Ther 13: 1457-1467 doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0918

32. Xu F, Wang YL, Chang JJ, Du SC, Diao L, Jiang N, Wang HJ, Ma D, Zhang J (2014) Mammalian sterile 20-like kinase 1/2 inhibits the Wnt/β-catenin signalling pathway by directly binding casein kinase 1ε. Biochem J 458: 159-169 doi:10.1042/BJ20130986

33. Kim W, Khan SK, Gvozdenovic-Jeremic J, Kim Y, Dahlman J, Kim H, Park O, Ishitani T, Jho EH, Gao B, Yang Y (2017) Hippo signaling interactions with Wnt/β-catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. J Clin Invest 127: 137-152 doi:10.1172/JCI88486

34. Kim W, Khan SK, Yang Y (2017) Interacting network of Hippo, Wnt/β-catenin and Notch signaling represses liver tumor formation. BMB Rep 50: 1-2 doi:10.5483/bmbrep.2017.50.1.196

35. Zhang P, Wang T, Zhang D, Zhang Z, Yuan S, Zhang J, Cao J, Li H, Li X, Shen H, Chen G (2019) Exploration of MST1-Mediated Secondary Brain Injury Induced by Intracerebral Hemorrhage in Rats via Hippo Signaling Pathway. Transl Stroke Res doi:10.1007/s12975-019-00702-1

36. Anne SL, Govek EE, Ayrault O, Kim JH, Zhu X, Murphy DA, Van Aelst L, Roussel MF, Hatten ME (2013) WNT3 inhibits cerebellar granule neuron progenitor proliferation and medulloblastoma formation via MAPK activation. PLoS One 8: e81769 doi:10.1371/journal.pone.0081769

37. Zhao X, Ponomaryov T, Ornell KJ, Zhou P, Dabral SK, Pak E, Li W, Atwood SX, Whitson RJ, Chang AL, Li J, Oro AE, Chan JA, Kelleher JF, Segal RA (2015) RAS/MAPK Activation Drives Resistance to Smo Inhibition, Metastasis, and Tumor Evolution in Shh Pathway-Dependent Tumors. Cancer Res 75: 3623-3635 doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2999-T

38. Antonucci L, Di Magno L, D'Amico D, Manni S, Serrao SM, Di Pastena F, Bordone R, Yurtsever ZN, Caimano M, Petroni M, Giorgi A, Schininà ME, Yates Iii JR, Di Marcotullio L, De Smaele E, Checquolo S, Capalbo C, Agostinelli E, Maroder M, Coni S, Canettieri G (2019) Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 inhibits hedgehog signaling and medulloblastoma growth through GLI1 phosphorylation. Int J Oncol 54: 505-514 doi:10.3892/ijo.2018.4638

39. Park AK, Lee JY, Cheong H, Ramaswamy V, Park SH, Kool M, Phi JH, Choi SA, Cavalli F, Taylor MD, Kim SK (2019) Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. BMC Cancer 19: 571 doi:10.1186/s12885-019-5742-x

40. Fernandez-L A, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, Taylor MD, Kenney AM (2009) YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. Genes Dev 23: 2729-2741 doi:10.1101/gad.1824509

41. Fernandez-L A, Squatrito M, Northcott P, Awan A, Holland EC, Taylor MD, Nahlé Z, Kenney AM (2012) Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation. Oncogene 31: 1923-1937 doi:10.1038/onc.2011.379

42. Zhang Y, Wang T, Wang S, Xiong Y, Zhang R, Zhang X, Zhao J, Yang AG, Wang L, Jia L (2018) Nkx2-2as Suppression Contributes to the Pathogenesis of Sonic Hedgehog Medulloblastoma. Cancer Res 78: 962-973 doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1631

43. Lin YT, Ding JY, Li MY, Yeh TS, Wang TW, Yu JY (2012) YAP regulates neuronal differentiation through Sonic hedgehog signaling pathway. Exp Cell Res 318: 1877-1888 doi:10.1016/j.yexcr.2012.05.005

44. Swiderska-Syn M, Xie G, Michelotti GA, Jewell ML, Premont RT, Syn WK, Diehl AM (2016) Hedgehog regulates yes-associated protein 1 in regenerating mouse liver. Hepatology 64: 232-244 doi:10.1002/hep.28542

45. Yu Y, Feng XH (2019) TGF-β signaling in cell fate control and cancer. Curr Opin Cell Biol 61: 56-63 doi:10.1016/j.ceb.2019.07.007

46. Perumal N, Perumal M, Halagowder D, Sivasithamparam N (2017) Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/Yap and TGF-β1/Smad signaling. Biochimie 140: 10-19 doi:10.1016/j.biochi.2017.05.017

47. Ready D, Yagiz K, Amin P, Yildiz Y, Funari V, Bozdag S, Cinar B (2017) Mapping the STK4/Hippo signaling network in prostate cancer cell. PLoS One 12: e0184590 doi:10.1371/journal.pone.0184590

48. Vlad A, Röhrs S, Klein-Hitpass L, Müller O (2008) The first five years of the Wnt targetome. Cell Signal 20: 795-802 doi:10.1016/j.cellsig.2007.10.031

49. Rodriguez-Blanco J, Pednekar L, Penas C, Li B, Martin V, Long J, Lee E, Weiss WA, Rodriguez C, Mehrdad N, Nguyen DM, Ayad NG, Rai P, Capobianco AJ, Robbins DJ (2017) Inhibition of WNT signaling attenuates self-renewal of SHH-subgroup medulloblastoma. Oncogene 36: 6306-6314 doi:10.1038/onc.2017.232

50. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B (2016) Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. DNA Repair (Amst) 42: 63-71 doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008

51. Ram RR, Mendiratta S, Bodemann BO, Torres MJ, Eskiocak U, White MA (2014) RASSF1A inactivation unleashes a tumor suppressor/oncogene cascade with context-dependent consequences on cell cycle progression. Mol Cell Biol 34: 2350-2358 doi:10.1128/MCB.01506-13

52. Chen X, Chen Y, Dong J (2016) MST2 phosphorylation at serine 385 in mitosis inhibits its tumor suppressing activity. Cell Signal 28: 1826-1832 doi:10.1016/j.cellsig.2016.08.013

53. Shtutman M, Chang BD, Schools GP, Broude EV (2017) Cellular Model of p21-Induced Senescence. Methods Mol Biol 1534: 31-39 doi:10.1007/978-1-4939-6670-7_3

FIGURE LEGENDS

Figure 1. MST2 expression in non-neoplastic cerebellum (CB), medulloblastoma (MB) and cell lines of MB (LIN) by qRT-PCR analysis (A) and by in silico analysis (B).

Figure 2. MST2 expression in the four molecular subgroups of MB by qRT-PCR (A) analysis and in the different databases Pfister_190 (B), Pfister_137 (C) and Cavalli_563 (D). CB-Non-neoplastic cerebellum.

Figure 3. Relative cellular viability after treatment with the drug XMU-MP-1 at doses of 0.25-10µM in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B), UW228 (C) and UW473 (D).

Figure 4. Number of colonies formed after 72 hours of treatment with the XMU-MP-1 drug at doses of 0.25-10µM in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B), UW228 (C) and UW473 (D) and below the graphic representative photo of the colonies of each dose of the drug in the respective cell line.

Figure 5. Analysis of the percentage of cells in each phase of the cell cycle after 72 hours of treatment with the XMU-MP-1 drug at doses of 1 and 5µM in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B), UW228 (C) and UW473 (D).

Figure 6. Apoptotic analysis through the percentage of positive cells for annexin and/or PI after 72 hours of treatment with the XMU-MP-1 drug at doses of 1 and 5µM in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B), UW228 (C) and UW473 (D).

Figure 7. Gene (A) and protein (B) expression of MST2 after 48 hours of transfection with siRNA (siMST2 and siContr) in the cell lines DAOY, ONS-76 and UW228.

Figure 8. Cell viability after transfection with siRNA (siMST2 and siContr) in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B) and UW228 (C).

Figure 9. Number of colonies formed after 48 hours of transfection with siRNA (siMST2 and siContr) in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B) and UW228 (C) and below the graphic representative photo of the colonies in the respective cell line.

Figure 10. Cell cycle analysis after 48 hours of transfection with siRNA (siMST2 and siCcontr) in the cell lines DAOY (A), ONS-76 (B) and UW228 (C).

Figure 11. Pathway enrichment analysis with the genes correlated with MST2 expression. The development pathways associated with MB are highlighted. The numerical value inside the bars corresponds to the number of genes correlated with MST2 that participate in each pathway. Network of protein interaction of the molecular pathways Wnt (red), TGF-β (green), Hippo (blue), Shh (purple) that has a high correlation with MST2 in MB. The dimension of the rectangle of each component is according to the amount of connections to other proteins. Network performed by the program Cytoscape 3.6.1.

Figure 12. Gene expression of GLI1 (A), GLI2 (B), YAP1 (C), SMAD3 (D) and LEF1 (E) in the MB cell lines after 12h of XMU-MP-1 treatment at doses of 1 and 5µM. Expression related to control treated only with DMSO.

Figure 13. Protein expression of DAOY (A) and ONS-76 (B) after 48 hours of XMU-MP-1 treatment. In the figure are the values of the quantification of the protein expression relative to the DMSO, the expression of GAPDH was used for normalization.

Figure 14. Protein expression of DAOY (A) and ONS-76 (B) after 48 hours of siRNA transfection. In the figure are the values of the quantification of protein expression relative to the negative control siRNA, the expression of GAPDH was used for normalization.

Figure 1

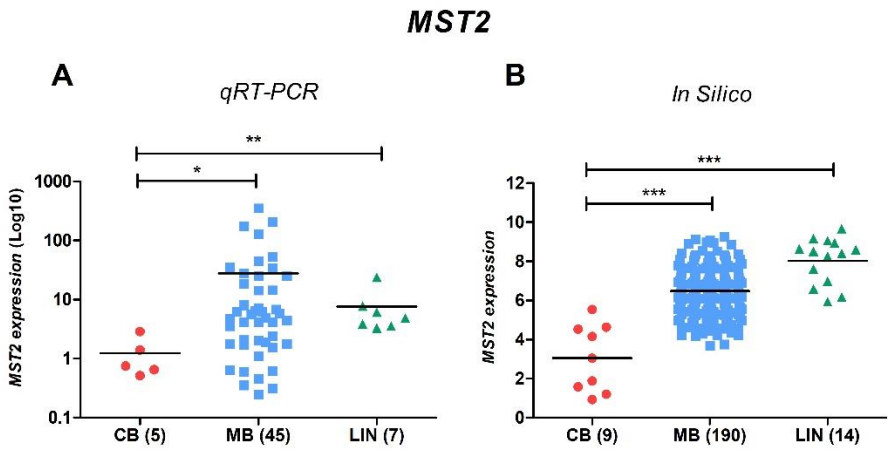


Figure 2

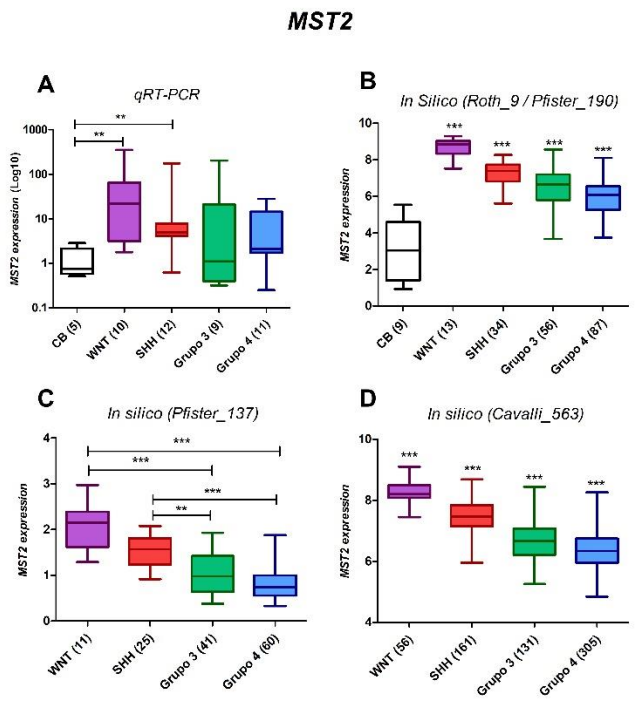


Figure 3

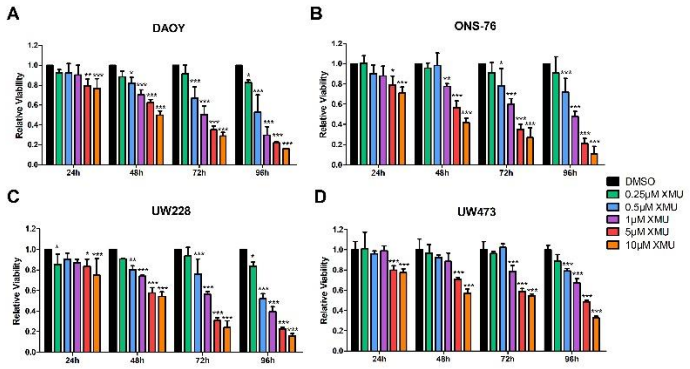


Figure 4

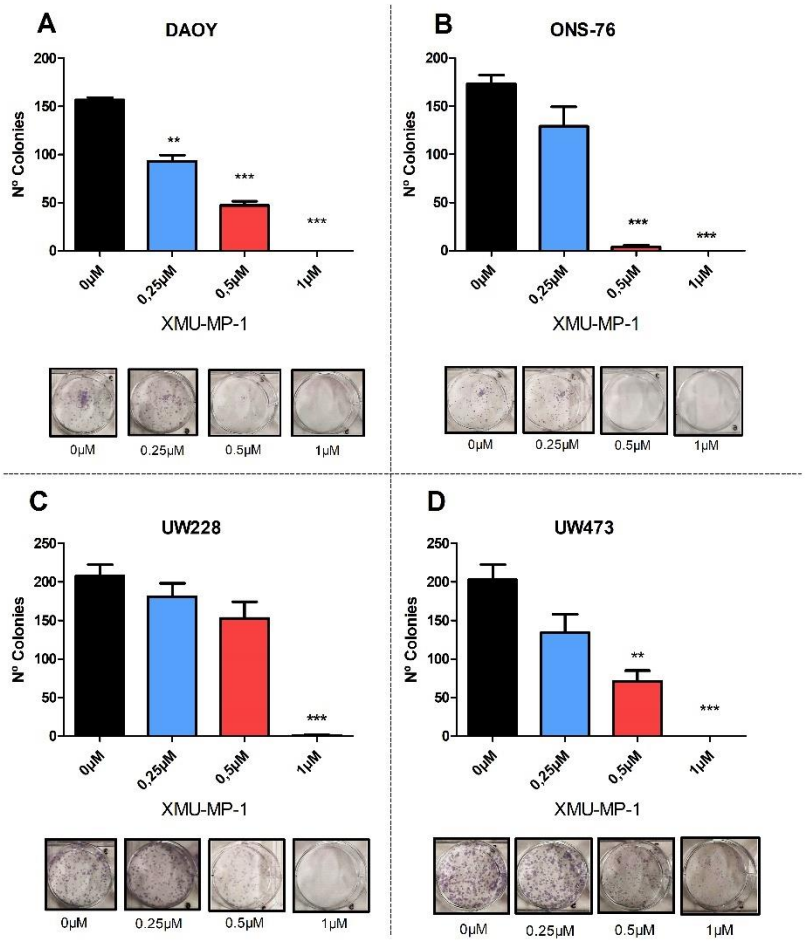


Figure 5

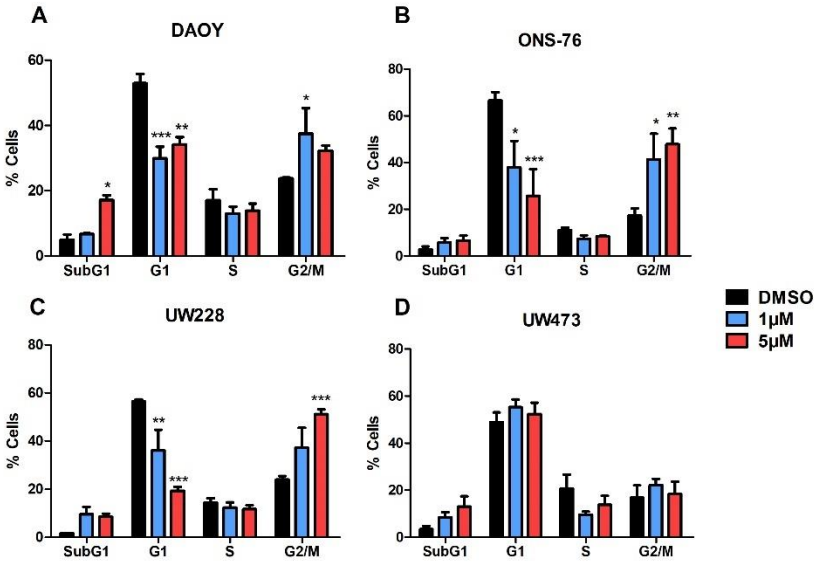


Figure 6

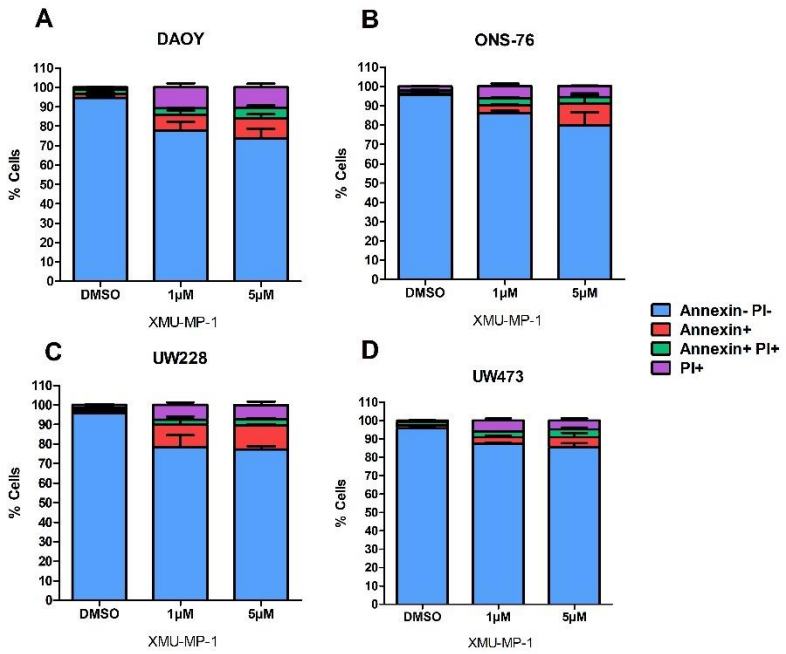


Figure 7

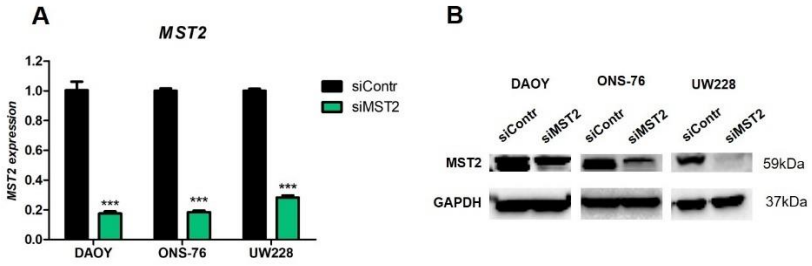


Figure 8

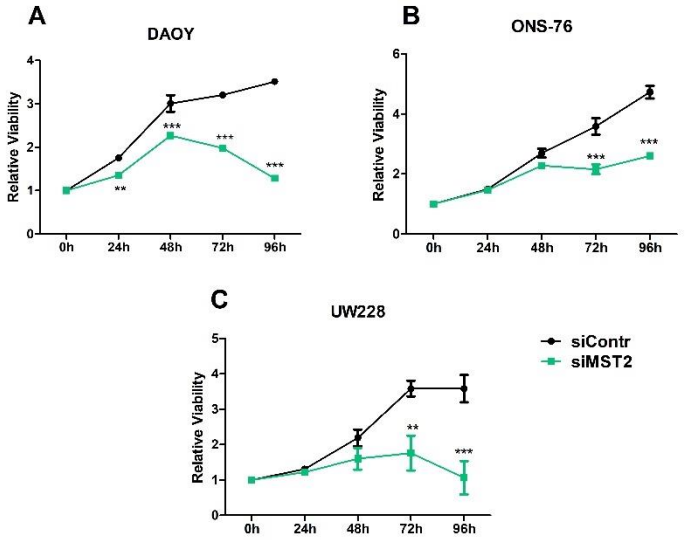


Figure 9

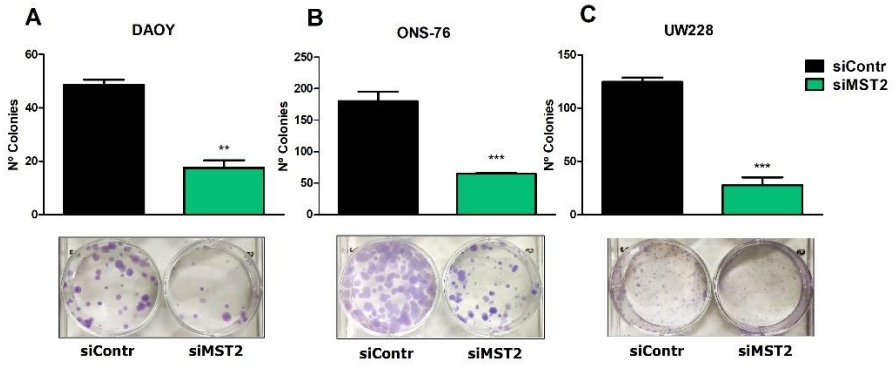


Figure 10

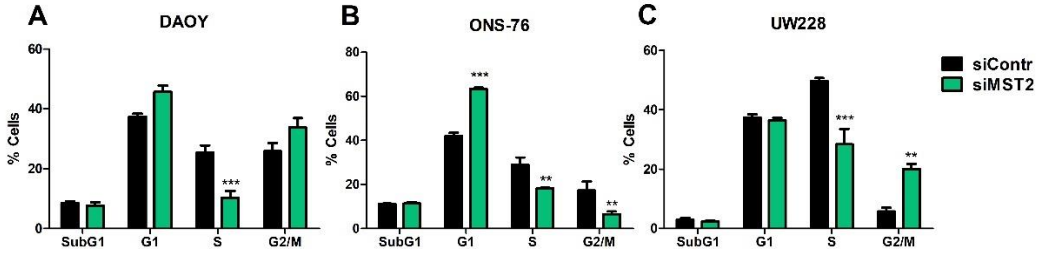


Figure 11

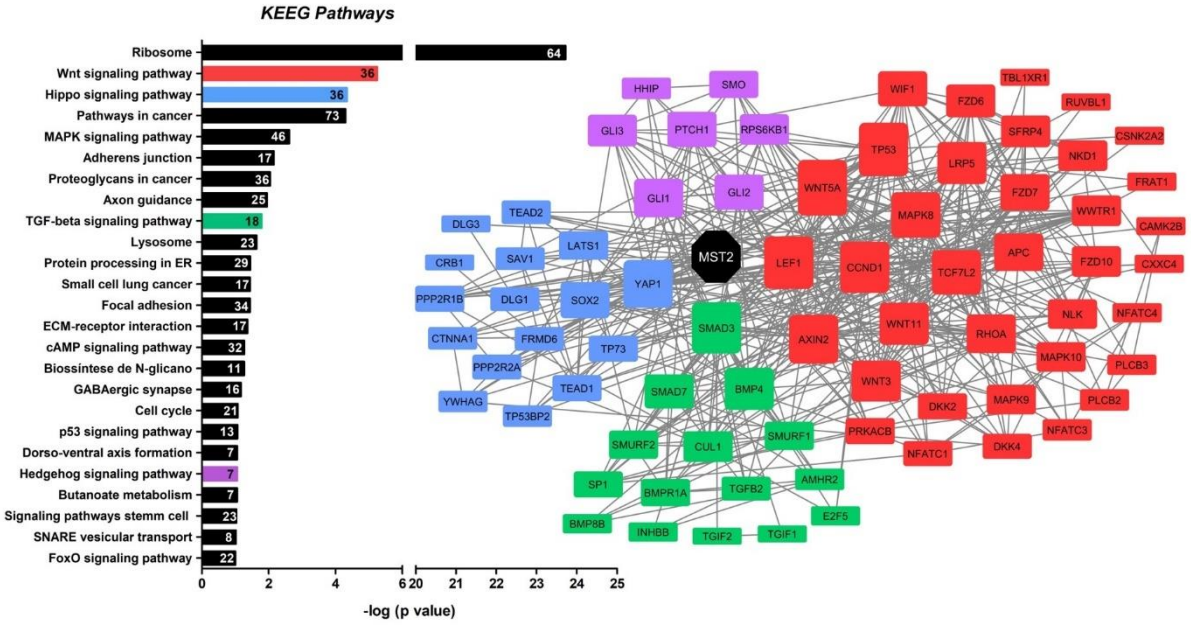


Figure 12

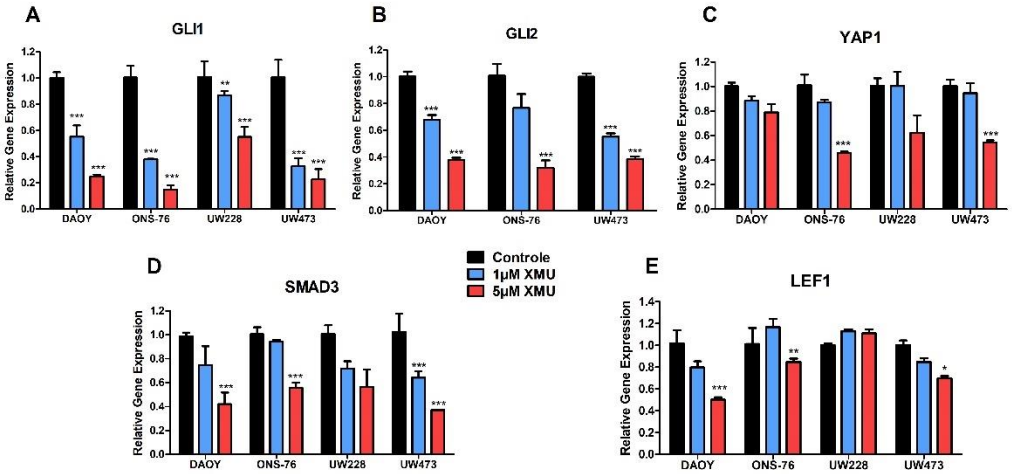


Figure 13

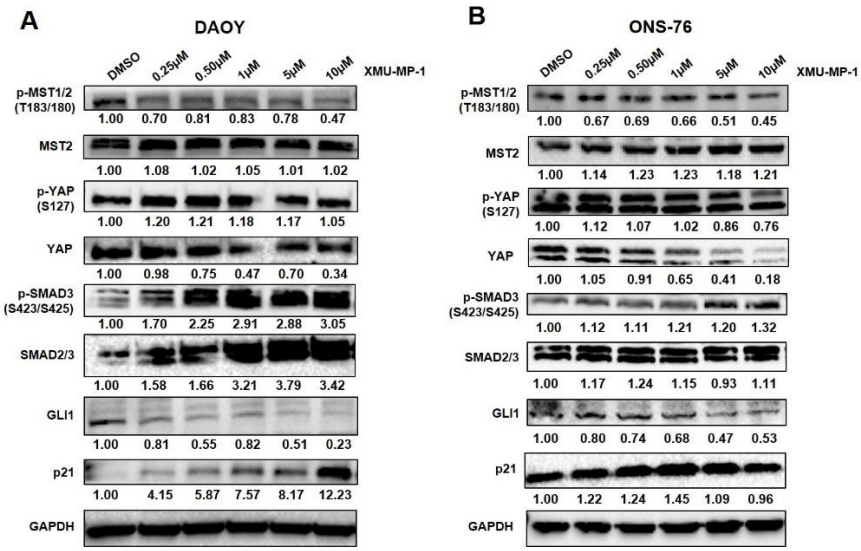
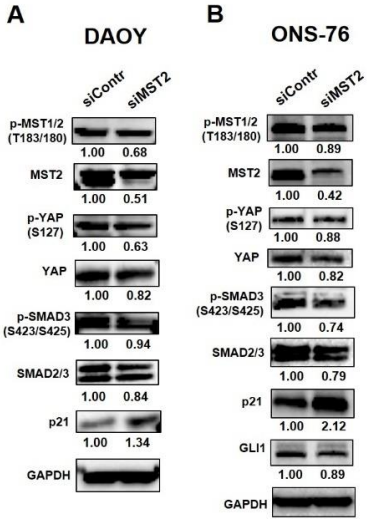


Figure 14



Targeted Oncology

MST2 inhibition reduces cell growth through developmental signaling pathways modulation in medulloblastoma cells.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TARG-D-19-00352
Full Title:	MST2 inhibition reduces cell growth through developmental signaling pathways modulation in medulloblastoma cells.
Article Type:	Original Research Article
Funding Information:	FAPESP (2014/20341-0) — Prof Dr Luiz Gonzaga Tone CNPq (142250/2015-5) — MSc Mirella Baroni
Abstract:	Background Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumor of the central nervous system in childhood. Despite the advances, about one third of patients die due to tumor recurrence and most survivors suffer long-term side effects. Biology of MB is associated with the dysregulation of signaling pathways that control embryonic development. Some studies point to MST2 kinase as key proteins in the regulation of these molecular pathways in different tumors.Objective The aim of the present study was to analyze the involvement of MST2 kinases in MB and to evaluate their role in the regulation of associated molecular pathways.Methods First, we analyzed MST2 expression in MB samples and molecular subgroups. Subsequently, in vitro assays were performed after pharmacological and siRNA MST2 inhibition in MB cell lines. Pathway enrichment analysis was performed with genes correlated with MST2 expression and some of these genes were validated.Results MST2 has a higher expression in MB samples when compared with expression in the cerebellum, and MST2 expression is higher in the WNT and SHH molecular subgroups. Pharmacological inhibition and gene silencing of MST2 promoted a decrease in cell viability and colony formation and caused changes in the cell cycle in SHH MB cell lines. In silico analysis showed that the genes most correlated with MST2 participate in important signaling pathways, and inhibition of MST2 promoted expression modification of important targets.Conclusion With these data it can be observed that MST2 regulates important mechanisms for tumor progression and is involved with relevant pathways in MB, being a promising therapeutic target for this tumor.
Corresponding Author:	Mirella Baroni, MSc Ribeirao Preto Medical School BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Ribeirao Preto Medical School
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mirella Baroni, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mirella Baroni, MSc

TARG-D-19-00352 - Submission Confirmation Inbox x

Targeted Oncology (TARG) <em@editorialmanager.com> Wed, Oct 9, 4:08 PM (20 hours ago)
to me

Dear MSc Baroni,

Thank you for submitting your manuscript,
"MST2 inhibition reduces cell growth through developmental signaling pathways modulation in medulloblastoma cells.", to Targeted Oncology

The submission id is: TARG-D-19-00352
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:

https://www.editorialmanager.com/targ/

Your username is: mibaroni
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

Springer offers authors the option of making their articles available with open access via our OPEN CHOICE program. We advise you to familiarise yourself with the details of Springer Open Choice in advance, to be able to decide quickly should your paper be accepted for publication. Further information can be found at www.springer.com/openchoice.

With kind regards,

Journals Editorial Office TARG
Springer

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.
Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at https://www.springernature.com/production-privacy-policy. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: https://www.editorialmanager.com/targ/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.