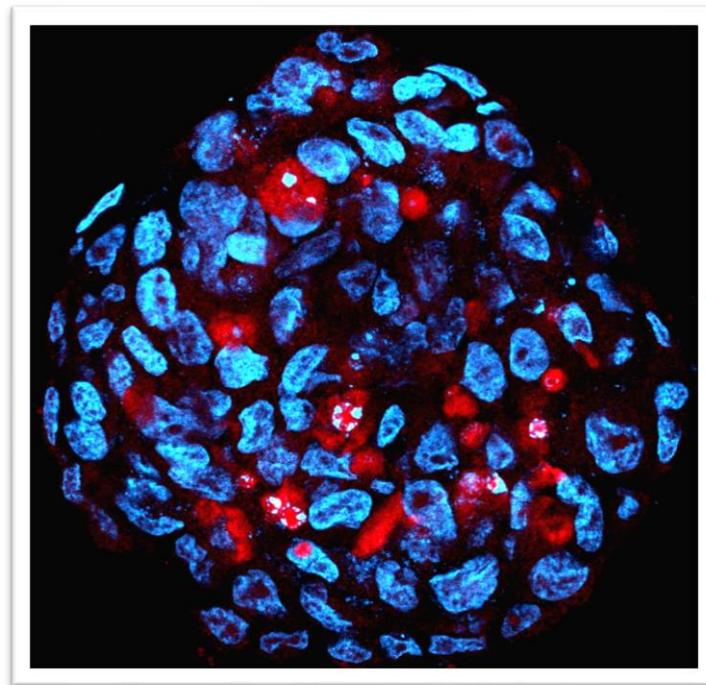


CAROLINI KAID DÁVILA



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

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

São Paulo

2018

CAROLINI KAID DÁVILA

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

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

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

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

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

Kaid, Carolini

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

Número de páginas: 194

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

Programa de Pós-graduação: Biologia (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

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

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

Folha de Avaliação

Nome: KAID, Carolini

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

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

Aprovado em: ___/___/___.

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Isaac, por tornar tudo mais desafiador;

Ao Henrique, por tornar tudo mais fácil;

À Deus, por tornar tudo possível.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ÍNDICE

I-	Dedicatória -----	5
II-	Agradecimentos -----	6
III-	Índice -----	7
IV-	Resumo Geral -----	8
V-	<i>Abstract</i> -----	10
VI-	Lista de Abreviaturas -----	12
VII-	Introdução Geral -----	14
	1. Heterogeneidade Tumoral -----	11
	2. Tumores do Sistema Nervoso Central -----	18
	3. Tumores Embriónários do SNC -----	20
VIII-	Objetivos -----	33
IX-	Capítulo 1: Proteínas e miRNAs presentes em microvesículas tumorais -----	34
X-	Capítulo 2: miR-367 como alvo terapêutico em tumores embrionários do SNC -----	59
XI-	Capítulo 3: Efeito oncolítico do vírus ZIKA-----	85
XII-	Discussão Geral -----	134
XIII-	Conclusões -----	146
XIV-	Apêndices -----	148
	1. Padronização Ensaio de Formação de Neuroesferas -----	148
	2. Padronização Ensaio de Invasão 3D -----	150
	3. Padronização Proliferação em Tempo Real -----	152
	4. Padronização do Ensaio <i>in vivo</i> (injeção intracranial do miR-367 <i>inhibitor</i> em modelo ortotópico) -----	154
	5. Estabelecimento de novas linhagens celulares de tumores pediátricos -----	159
	5.1. Estabelecimento da linhagem USP7-ATRT -----	160
	5.2. Estabelecimento da linhagem USP21-EPE -----	164
	5.3. Sequenciamento de EXOMA do paciente 22 -----	167
	6. Efeito Oncolítico de vírus ZIKV ^{BR} -----	173
	6.1. Efeito Oncolítico do ZIKV ^{BR} em USP21-EPE -----	174
	6.2. Efeito Oncolítico do ZIKV ^{BR} em linhagens celulares de glioblastoma -----	176
XV-	Anexos -----	180
XVI-	Referências Bibliográficas -----	188

RESUMO GERAL

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

1. Heterogeneidade Tumoral

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

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

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

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

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

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

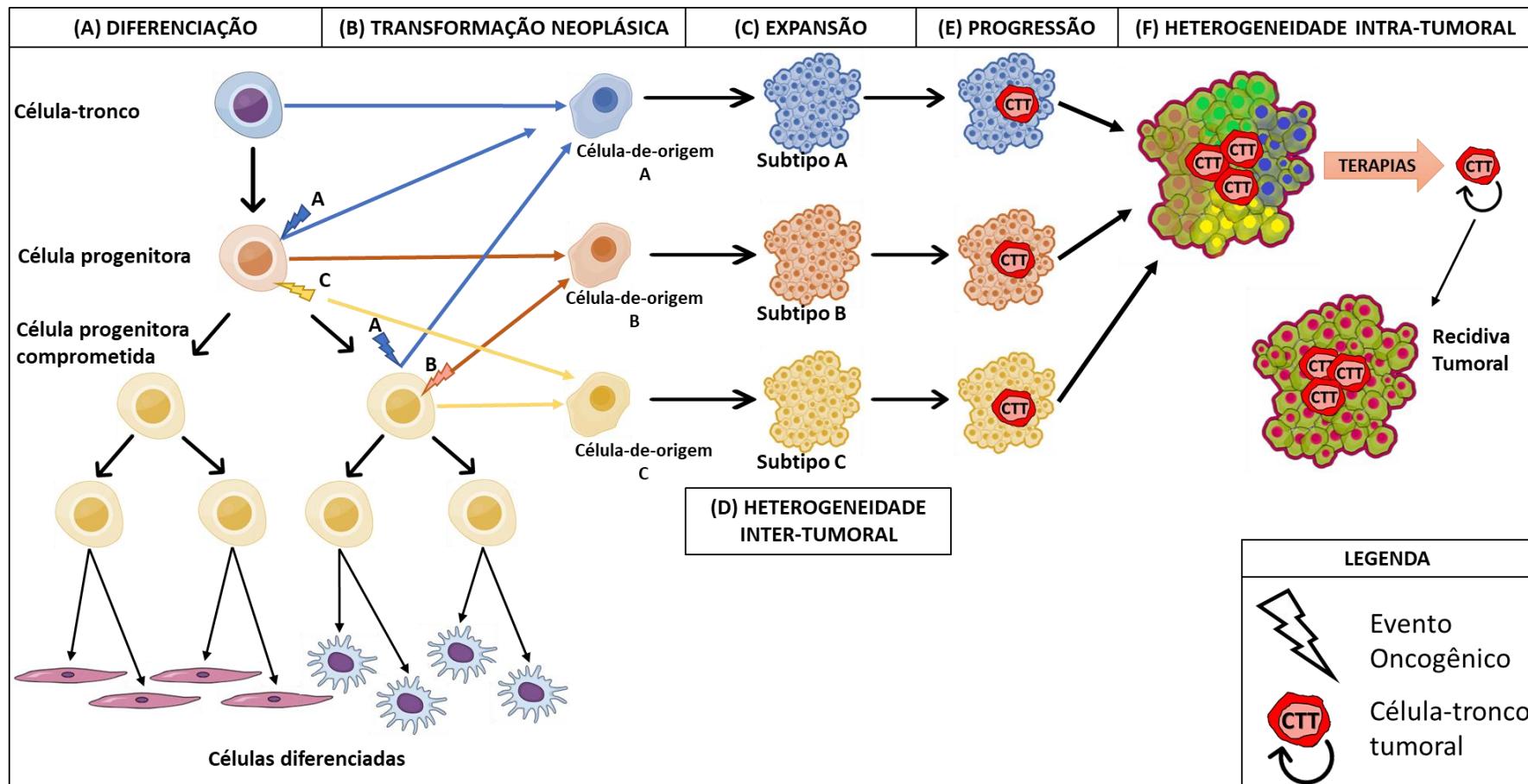


Figura 1: A célula-de-origem do tumor e a evolução da célula-tronco tumoral. (A) A diferenciação normal de uma célula se inicia com a célula-tronco pluripotente (azul) que gera células progenitoras (laranja) e mais comprometidas (amarela) até a produção de células diferenciadas. (B) Células-de-origem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

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

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

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

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

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

2. Tumores do Sistema Nervoso Central

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

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

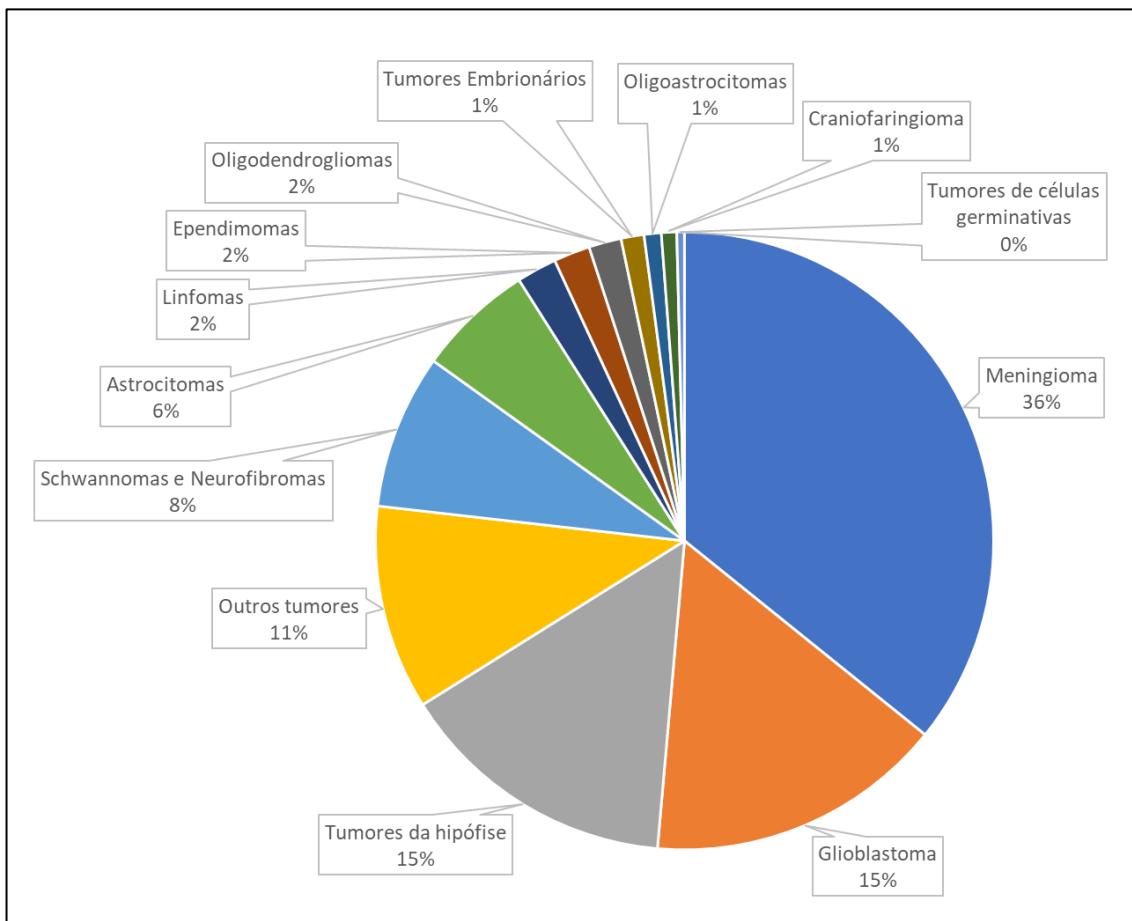


Figura 2: Distribuição dos diferentes tipos de tumores primários do SNC (n: 326,711). Dados de 2006-2010 (CBTRUS Statistical Report: NPCR e SEER). Adaptado de Ostrom et al, 2013. Dentre os tumores apresentados, os gliomas representam 28%. Ao considerar apenas os tumores malignos, os gliomas representam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

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

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

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

2.1. Tumores Embrionários do SNC

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

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

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

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

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

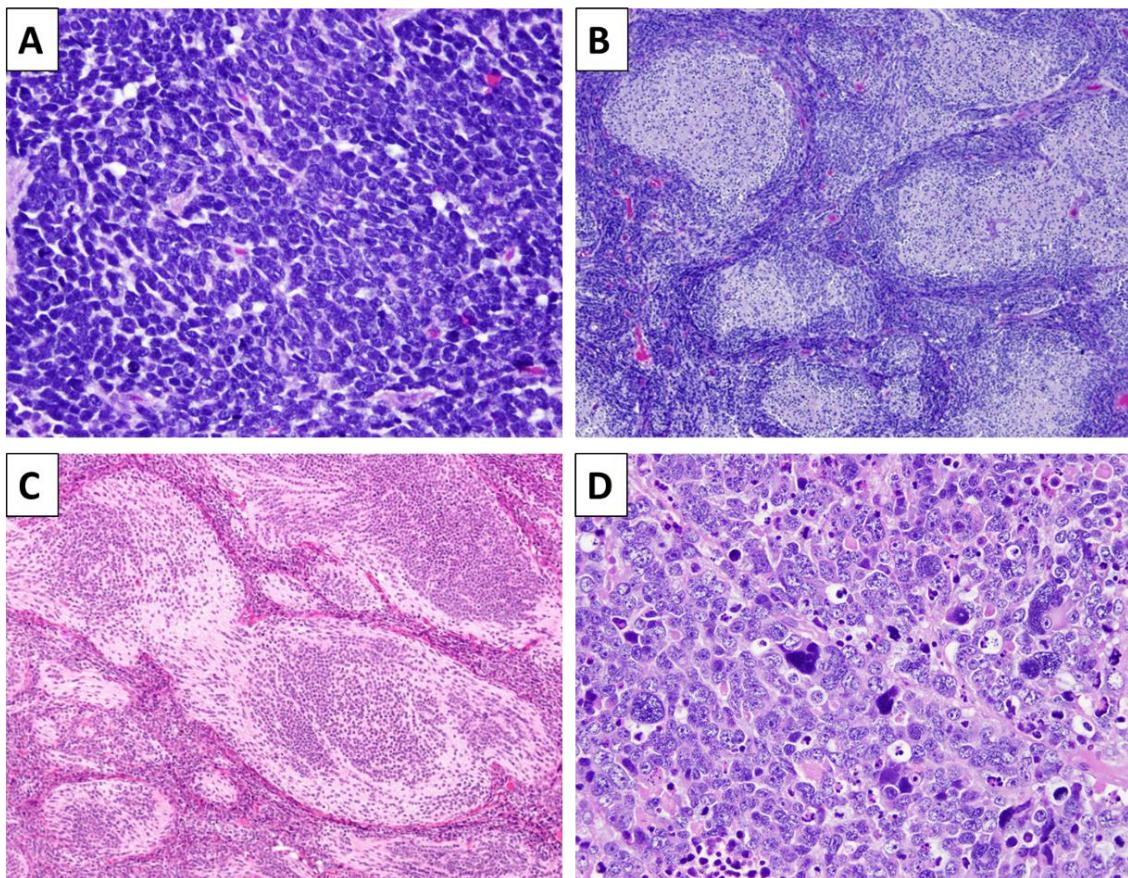


Figura 3: Tipos histopatológicos de meduloblastoma. (A) Clássico. (B) Desmoplásico/Nodular. (C) Nodular extenso. (D) Células-Grande/Anaplásico. Adaptado de <http://neuropathology-web.org>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 1- Mutações no gene supressor tumoral *TP53* são um indicativo específico de alto risco para o grupo SHH, uma vez que são enriquecidos apenas no subgrupo SHH α . Apesar de ser identificado como novo grupo apenas em 2017, pacientes do subgrupo SHH com mutação em *TP53* já eram classificados como pacientes de risco mais elevado (sobrevida de <50 %) e priorizados nos tratamentos com terapias alternativas na Europa e América do Norte (RAMASWAMY et al., 2016);
- 2- A presença de amplificações no gene *MYC* e *MYCN* permitiu identificar pacientes de alto risco nos subgrupos de meduloblastoma mais heterogêneos e carentes de estudo, o Grupo 3 e Grupo 4.

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

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

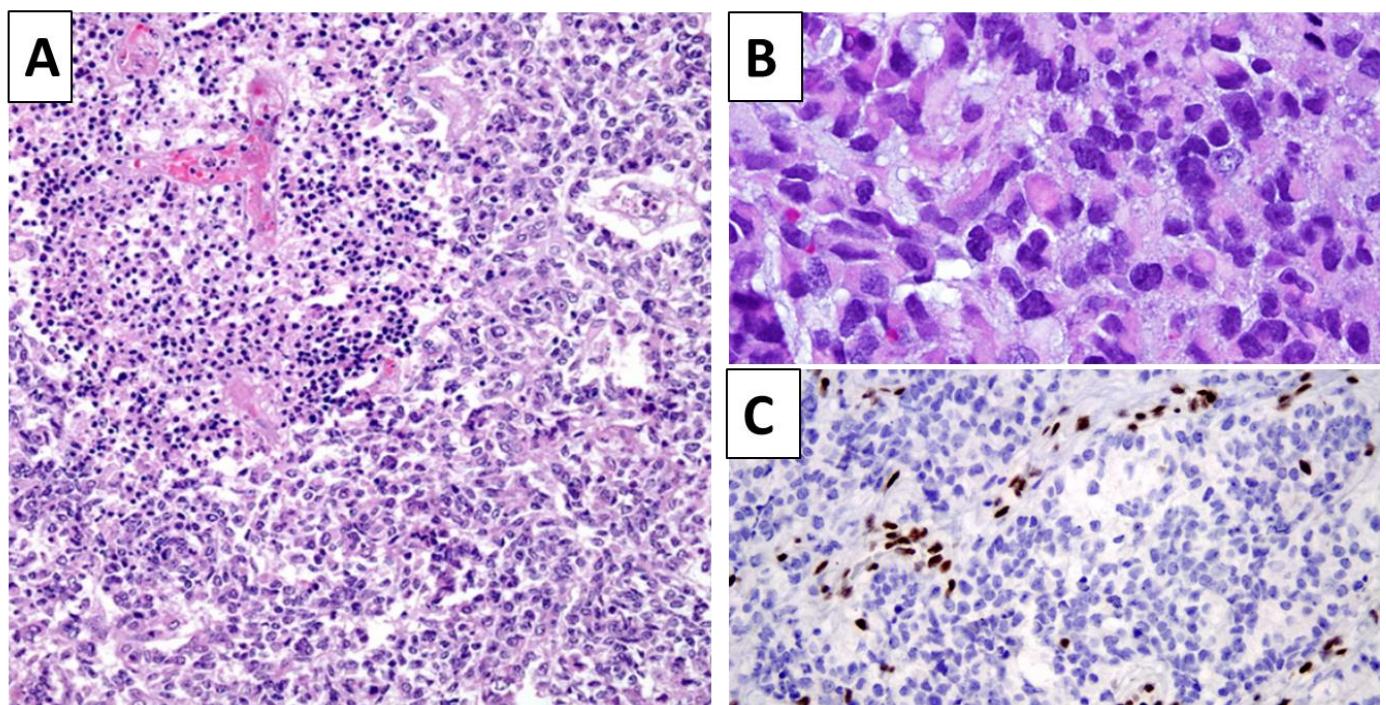


Figura 5: Histopatologia de ATRT. (A) Com perfil semelhante ao teratoma, o ATRT apresenta grande variedade no padrão histológico, composto por células grandes, com ou sem características rabdóides e presença de elementos mesenquimais e epiteliais. (B) Células rabdóides de ATRT. (C) Imunomarcação de SNF5.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

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

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

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

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

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

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

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

Outros genes tipicamente expressos em CTE também foram correlacionados ao pior prognóstico de muitos tumores, como por exemplo a alta expressão de OCT4A (DA SILVA et al., 2017; RODINI et al., 2010), SOX2 (MANSOURI et al., 2016), *c-MYC* (ROUSSEL; ROBINSON, 2013) e *LITD1* (SANTOS et al., 2015) em meduloblastoma, e *LIN28B* tanto em ATRT (CHOI et al., 2016; WEINGART et al., 2015) como também em meduloblastoma (HOVESTADT et al., 2014). Esses fatores de transcrição, além de serem importantes para a manutenção do estado pluripotente de CTEs, também são capazes de realizar a reprogramação de uma célula somática para um estado indiferenciado, gerando as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Portanto, a expressão anormal de fatores de pluripotência em células tumorais pode induzir a dediferenciação e formação da CTT com alta capacidade proliferativa e auto-renovação, atribuindo maior agressividade aos tumores (FRIEDMANN-MORVINSKI; VERMA, 2014).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

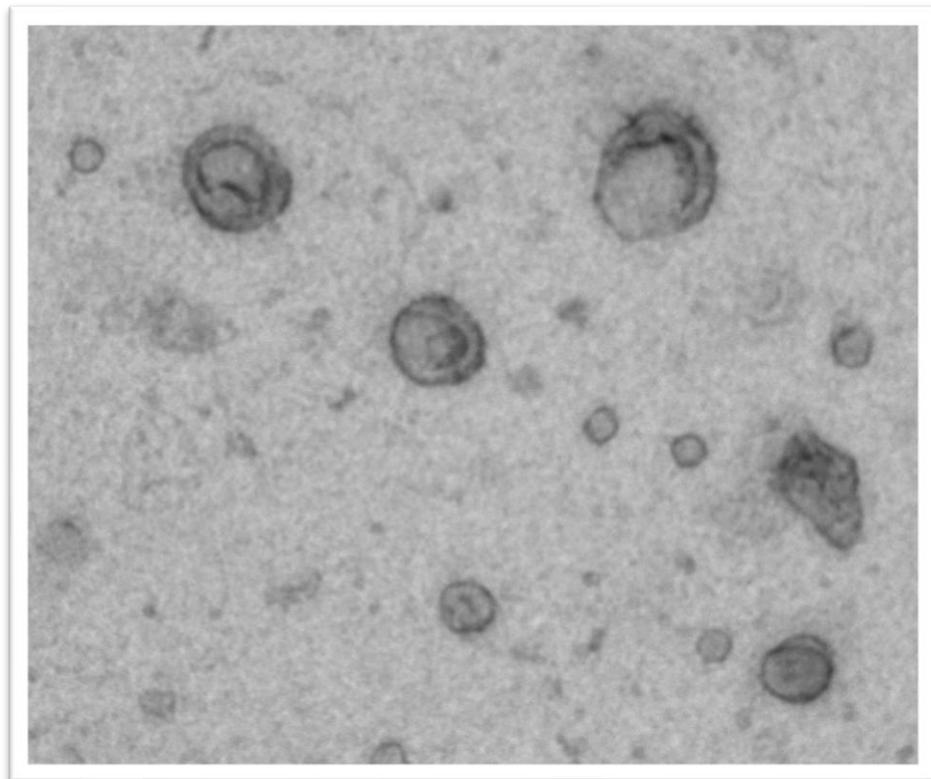
OBJETIVOS

Objetivo Geral:

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

Objetivos Específicos:

- 1- Identificar miRNAs e proteínas expressas em MVs derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma humano, com e sem superexpressão estável de OCT4A, como marcadores de agressividade. (Capítulo 1)
- 2- Avaliar em um modelo pré-clínico o potencial do miR-367 como possível alvo terapêutico em linhagens celulares de tumores embrionários do SNC com expressão alterada de OCT4A. (Capítulo 2)
- 3- Avaliar o possível efeito oncolítico do vírus ZIKA em linhagens celulares de tumores embrionários do SNC. (Capítulo 3)



CAPÍTULO 1: Proteínas e miRNAs presentes em microvesículas tumorais

PROTEOME AND miRNOME PROFILING OF MICROVESICLES DERIVED FROM MEDULLOBLASTOMA STEM-LIKE CELLS REVEALS BIOMARKERS OF POOR PROGNOSIS

Carolini Kaid¹, Amanda Assoni¹, Marina Marçola¹, Patricia Semedo-Kuriki¹, Valdemir Melechco Carvalho², Oswaldo Keith Okamoto^{1*}.

¹Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão 277. CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Phone: (55 11) 3091-7501.

²Fleury Group, São Paulo, Jabaquara, São Paulo, SP, Brazil.

***Corresponding author:** Oswald Keith Okamoto. Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão 277. CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Phone: (55 11) 3091-7501. keith.okamoto@usp.br.

Keywords. MICROVESICLES, MEDULLOBLASTOMA, OCT4A, PROTEOME, miRNA

Scientific article submitted to Scientific Reports (Nature).

ABSTRACT

Primary central nervous system (CNS) tumors are the most common and fatal type of childhood cancer. Several patients with medulloblastoma experience local or metastatic recurrences after standard treatment, a condition associated with very poor prognosis. Current neuroimaging techniques do not accurately detect residual stem-like medulloblastoma cells promoting tumor relapses. In attempt to identify candidate tumor markers that could be circulating in blood or cerebrospinal (CSF) fluid of patients, we evaluated the proteome and miRNome content of extracellular microvesicles (MVs) released by highly-aggressive stem-like medulloblastoma cells overexpressing the pluripotent factor OCT4A. These cells display enhanced tumor initiating capability and resistance to chemotherapeutic agents. A common set of 464 proteins and 10 microRNAs were exclusively detected in MVs of OCT4A-overexpressing cells from four distinct medulloblastoma cell lines, DAOY, CHLA-01-MED, D283-MED, and USP13-MED. The interactome mapping of these exclusive proteins and miRNAs revealed ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGF/EGFR, and stem cell self-renewal as the main oncogenic signaling pathways altered in these aggressive medulloblastoma cells. Of these MV cargos, four proteins (UBE2M, HNRNPCL2, HNRNPCL3, HNRNPCL4) and five miRNAs (miR-4449, miR-500b, miR-3648, miR-1291, miR-3607) have not been previously reported in MVs from normal tissues and in CSF. These proteins and miRNAs carried within MVs might serve as biomarkers of aggressive stem-like medulloblastoma cells to improve clinical benefit by helping refining diagnosis, patient stratification, and early detection of relapsed disease.

INTRODUCTION

Diagnosis of medulloblastoma, one of the most common and lethal types of embryonal central nervous system (CNS) tumors in young children¹, usually occurs after the onset of clinical symptoms. About 40% of medulloblastoma patients already have metastasis at initial diagnosis², and a significant proportion of patients with more aggressive tumors exhibit local or metastatic tumor recurrence after treatment, leading to severe patient morbidity and significant mortality rates³. The high degree of medulloblastoma heterogeneity at the molecular and cellular levels affects the clinical course of the disease, while the lack of consistent liquid biopsy biomarkers for disease monitoring and limited therapeutic options further impairs treatment⁴.

In these tumors, stem-like cells with self-renewal properties are mostly responsible for tumor initiation and recurrence⁵. Medulloblastoma enriched in such cancer stem cells are associated with poor prognosis⁶. These highly tumorigenic cells are thought to be originated by malignant transformation of normal tissue stem cells or by neoplastic cells acquiring stemness properties due to genetic and/or epigenetics alterations⁷⁻⁹. Stemness may also be dynamically induced in cancer cells by interactions with tumor stromal cells or by extracellular factors and microvesicles (MVs) present in the tumor microenvironment^{10,11}.

Stem-like aggressive properties in medulloblastoma cells may be enhanced by aberrant expression of pluripotency factors like OCT4A and miR-367^{12, 13}. Consistently, in these tumor cells, aberrant expression of OCT4A, LIN28B and L1TD1 are correlated with poor clinical outcome of patients^{12, 14, 15}. Kim and colleagues¹⁶ have shown that ectopic expression of OCT4 is sufficient to directly reprogram and induce pluripotency in mouse neural stem cells. Although these stem cells already express SOX2, *c-MYC* and *KLF4*, *in vivo* teratoma induction was observed only after reprogramming, suggesting that pluripotency and tumorigenicity share the same pathways involving OCT4 activation¹⁷.

Thus, characterization of medulloblastoma cells with abnormal OCT4 expression may help understand mechanisms underlying cancer cell stemness and uncover biomarkers of aggressive tumors. In this work, we have explored this model of aggressive medulloblastoma cells

to evaluate whether overexpression of the pluripotency factor OCT4A affects the pattern of MV secretion by these tumor cells, as well as their MV cargo. By analyzing the proteome and miRNome profiles of MVs secreted by OCT4A-overexpressing cells, we reveal MV-associated molecules of possible clinical relevance to medulloblastoma patient care.

RESULTS

Isolation and Characterization of MVs

Given the oncogenic role of aberrant OCT4A expression in aggressive medulloblastoma, the MVs secretion pattern of medulloblastoma cells stably overexpressing OCT4A was assessed. MVs from four different medulloblastoma cell lines (Daoy, CHLA-01-MED, D283-MED, and USP13-MED), with or without stable OCT4A overexpression, could be successfully isolated by ultracentrifugation. Purity and integrity of the MV preparations were confirmed based on ultrastructural morphology analysis by electron microscopy, particle size distribution and concentration with the NanoSight instrument, as well as by expression analysis of MVs surface markers by flow cytometry.

As indicated in Figure 1A, all medulloblastoma-derived MVs were mostly positive for the combined expression of CD81, CD63 and CD9, three typical MVs markers. MVs were also mostly negative for the expression of calnexin, considered a positive marker of endoplasmic reticulum and negative marker for extracellular vesicles extracts. Expression of CD9 in MVs of CHLA-01-MED cells, however, was less frequent compared with the pattern of CD9 expression in MVs derived from the other cell lines tested.

The ultrastructural analysis confirmed presence of typical MVs with diameter higher than 100 nm in all preparations, displaying a cup-shaped morphology and slightly wrinkled surface (Figure 1B). The mean size distribution of extracellular vesicles from all medulloblastoma cell preparations ranged from 102.5 to 168.9 nm, according to the nanoparticle tracking analysis. Very small vesicles (≤ 50 nm in diameter) could also be observed by electron microscopy, particularly

in ultracentrifuge preparations of CHLA-01-MED and D283-MED cells. In the latter two cell lines, overexpression of OCT4A significantly altered the pattern of MV secretion. Compared with cells with basal OCT4A expression, MVs of OCT4A-overexpressing cells were larger, albeit present at a lower concentration in the preparations (Figure 2).

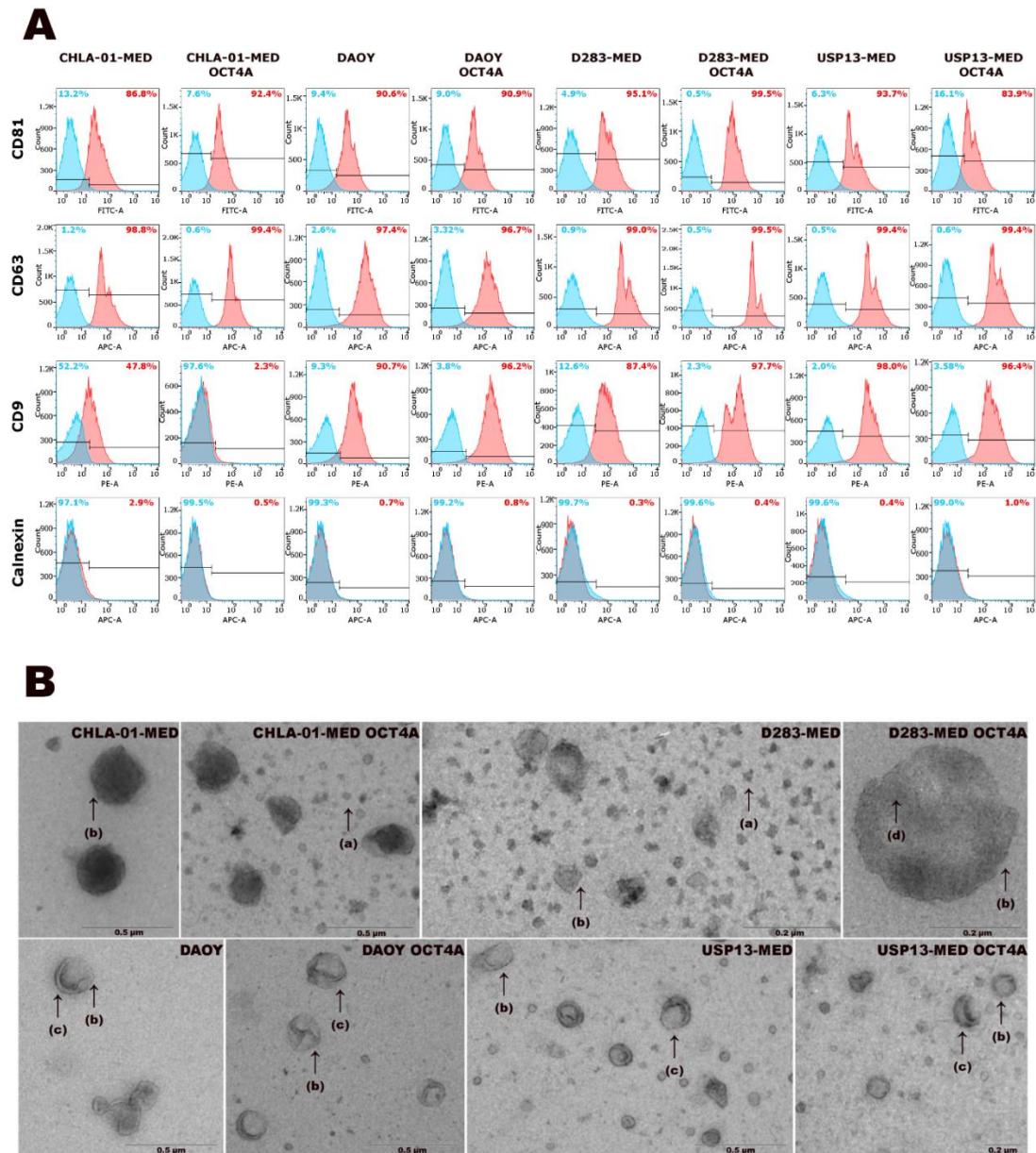


Figure 1: Characterization of microvesicles (MVs) from medulloblastoma cells. (A) Immunophenotyping by flow cytometry. Proportion of CD81+, CD63+, CD9+ and calnexin+ (red plot) MVs reacting with bead-coated antibodies. Negative controls of reactions are also shown (blue plot). (B) Representative TEM images of MVs from medulloblastoma cells, with or without OCT4A overexpression, after purification by ultracentrifugation. Particles with a diameter ≤ 50 nm (a); lipid layer structure (b); cup-shaped morphology (c); slightly wrinkled surface (d). Scale bars: 0.5 μm and 0.2 μm .

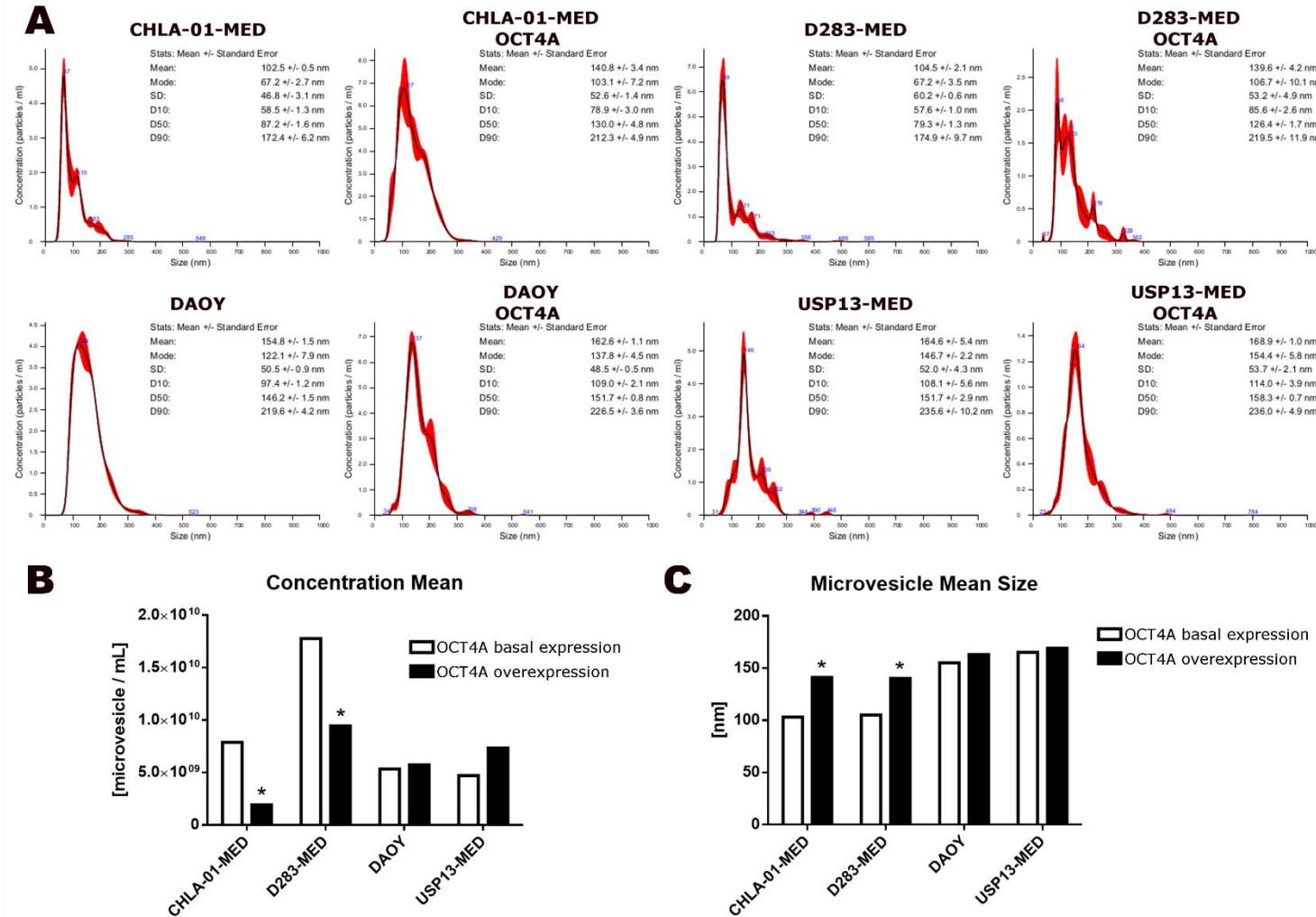


Figure 2: Pattern of extracellular vesicle secretion by medulloblastoma cells with or without OCT4A overexpression. (A) Nanoparticle tracking analysis (NTA) of extracellular vesicles obtained from four medulloblastoma cell lines. Plots show extracellular vesicle size distribution and concentration measurements. Data are represented as mean \pm SD from three acquisitions. (B) Concentration and (C) mean size of extracellular vesicles. Data are normalized by correlated control cells. * $p < 0.05$ compared with the respective control cell.

Proteome Profiling of medulloblastoma microvesicles

The common proteome content of MVs derived from all medulloblastoma cell lines was investigated by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). Through this analytical technique, a total of 413 proteins could be identified in MVs from cells with basal OCT4A expression, mostly involved in cellular growth and proliferation, cell death and survival, gene expression, protein synthesis and cellular development (Figure 3A-B). An even larger proteome comprised by 797 common proteins was detected in MVs secreted by OCT4A-overexpressing medulloblastoma cells (Supplementary Table S1).

Interestingly, proteins with roles in cell-to-cell signaling and interaction, cellular movement, cell assembly and organization were only detected in MVs from cells with basal OCT4A expression, while cell morphology-related proteins were solely detected in MVs from OCT4A-overexpressing cells (Figure 3B). The interactome mapping of these unique MV proteins resulting from OCT4A overexpression is depicted in Figure 3C, highlighting members of the F-box protein family, members of the catenin family and cadherin superfamily, as well as members of the ERK, WNT, PI3K/AKT/mTOR, and EGF/EGFR signaling pathways.

A common set of 333 proteins were further identified in MVs secreted by all medulloblastoma cell lines analyzed, independently of the OCT4A expression level. This subset of shared proteins is a more representative protein cargo of medulloblastoma MVs. By filtering out proteins present in the cerebrospinal fluid (CSF) or present in MVs from normal cells, according to proteomic datasets previously published for healthy tissues and non-cancer cell lines, a smaller subset of 14 candidate MV-related protein markers of medulloblastoma were revealed (Table 1). Five of these 14 proteins had never been reported in MVs from other types of tumor cells.

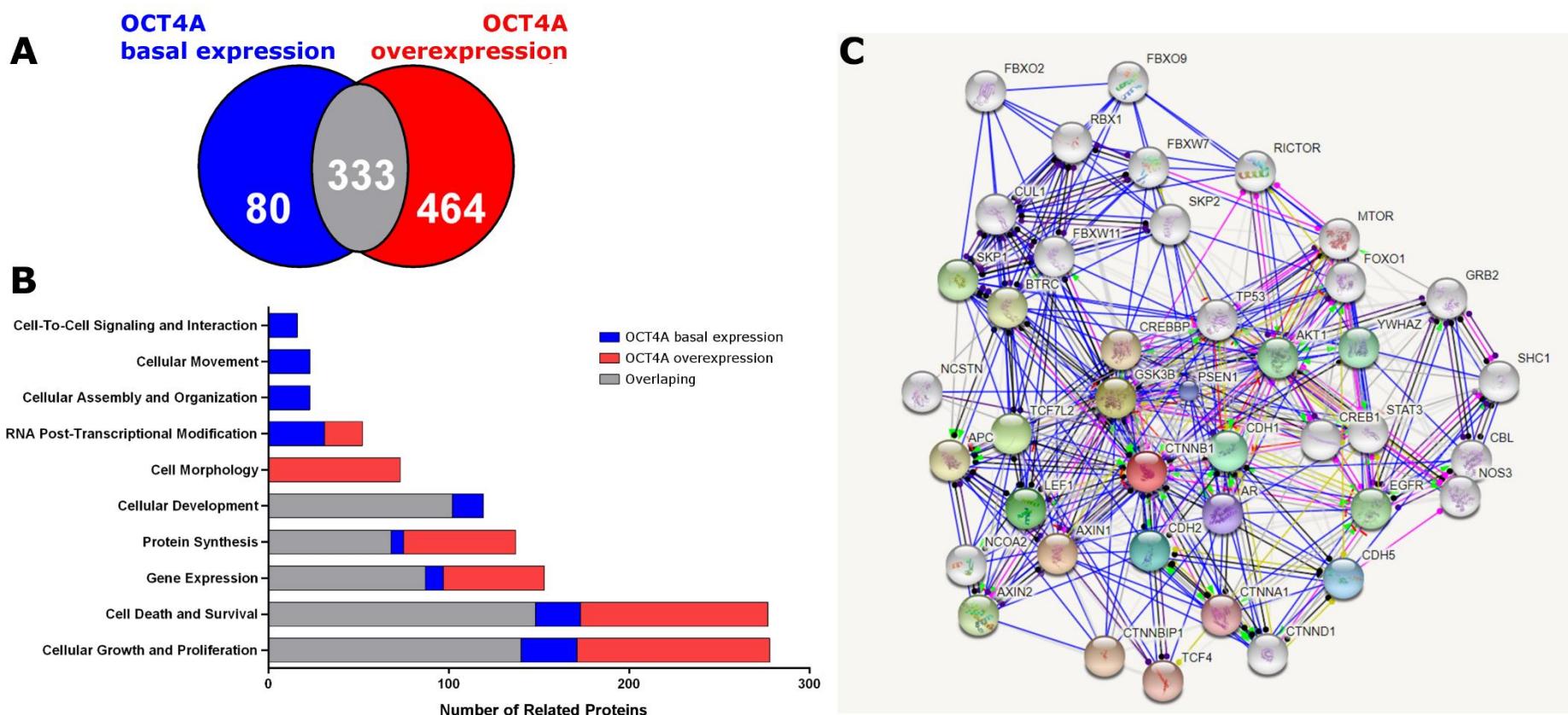


Figure 3: Proteomic profiling of MVs derived from medulloblastoma cells. (A) Venn diagram displaying amount of proteins that were exclusively identified in MVs from all OCT4-overexpressing cell lines (red), MVs from all medulloblastoma cell lines with basal OCT4A expression (blue), and proteins found in both groups (grey). (B) Main molecular and cellular functions of proteins detected in MVs from medulloblastoma cells. (C) Interactome mapping of proteins exclusively detected in MVs from OCT4A-overexpressing medulloblastoma cell lines. Only direct protein-protein interactions were considered in the analysis.

Table 1: Proteins commonly detected in MV samples of all medulloblastoma cell lines that have not been previously reported in MVs from normal cells, according to proteomic datasets previously published for healthy tissues and non-cancer cell lines. Functional information is described for each protein, including detection in diseased tissue.

Protein	Information	Detection in diseased tissue	Reference
KATNAL2	Promotes rapid cellular microtubule reorganization influencing cell division.	Neuroblastoma	[18]
TUBAL3	Alpha-like 3 tubulin. Involved in immune response and microtubule constitution.	Neuroblastoma carcinoma and thymus	[19]
*HNRNPCL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2.	Neural and colorectal cancer	NCBI
*UBE2M	Ubiquitin-like protein. Involved in cell proliferation.	Neuroblastoma colorectal cancer, carcinoma and thymus	[20]
PABPC1L	Chromatin-mediated maintenance of transcription. Overexpressed in early postnatal life.	Neuroblastoma	[21]
SETSIP	Chromatin binding. Upregulated during somatic cell reprogramming.	Neuroblastoma	[22]
RALYL	RNA-binding protein. Correlated with poor prognosis in renal cell carcinoma.	Renal cell carcinoma and neuroblastoma	[23]
*HNRNPCL4	RNA-binding protein.	Neuroblastoma	NCBI
[†] RPL13AP3	mRNA binding and ribosomal structural constituent.	-	NCBI
*HNRNPCL3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 3.	Neuroblastoma	NCBI
[†] RACK1	Scaffolding protein involved in many cellular processes, including apoptosis	-	[24]
[†] PPIAL4D	Accelerate the folding of protein	-	NCBI
[†] LDHC	Involved with sperm mobility and member of cancer-testis antigens family.	-	[25]
[†] H2BFS	Nucleosome component. Central role in DNA repair and chromosomal stability.	-	[26]

*Proteins exclusively detected in MVs from OCT4A-overexpressing medulloblastoma cells.

[†]Proteins detected in the present study, not previously reported in public proteomic databases.

miRNome profiling of medulloblastoma microvesicles

Small RNA sequencing detected many non-coding RNAs in MV samples of medulloblastoma cells, including known primary, precursor and mature miRNAs, as well as their variants (IsomiRs) (Figure 4). The miR-221, miR-342, and miR-3651 were commonly found in MVs from all medulloblastoma cell lines with basal OCT4A expression, but not in MVs from OCT4A-overexpressing cells. Other five miRNAs, let-7a, miR-208, miR-182, miR-1248 and miR-6087, were detected in MVs derived from both OCT4A-basal expression and OCT4A-overexpressing cell lines. On the other hand, 10 miRNAs (miR-1291, miR-181, miR-183, miR-3607, miR-3648, miR-4449, miR-500b, miR-6516, let-7f and miR-501) were found exclusively in MVs from all OCT4A-overexpressing medulloblastoma cell lines (Figure 4A).

As for the proteomic data, microRNAs reported in the Human miRNA Expression Database (miRmine, University of Michigan) to be present in MVs from normal cells or circulating in the plasma, serum or CSF, were filtered out from the group of miRNAs commonly detected in MVs secreted by all four medulloblastoma cell lines. From this analysis, a total of eight miRNAs more representative of medulloblastoma MVs were identified. Expression of these eight microRNAs in diseased tissue samples have been reported (Table 2).

Regarding expression levels, miR-182 and miR-6087 were the miRNAs detected at the highest levels in all MVs, with a total number of 656,660 and 209,436 reads, respectively. Notably, the amount of total reads was higher in RNA samples from MVs derived from medulloblastoma cell lines stably overexpressing OCT4A, compared with MVs from cells with basal OCT4A expression (Figure 4B). Hierarchical analysis based on mature miRNA sequence profiling clustered DAOY, USP13-MED and D283-MED cells overexpressing OCT4A, revealing a higher similarity to each other than with their counterparts with basal OCT4A expression. The same pattern was not observed for CHLA-01-MED cells (Figure 4C).

Interactome network analysis revealed experimentally validated interactions for three of the ten MV miRNAs exclusively detected in OCT4A-overexpressing cells. These miRNAs

interact with mRNAs encoding proteins regulating cell cycle (*CCND1*), vesicle-mediated transport (*NAA30*) and development (E3 ubiquitin-protein ligase/*TRIM71*) (Figure 4D).

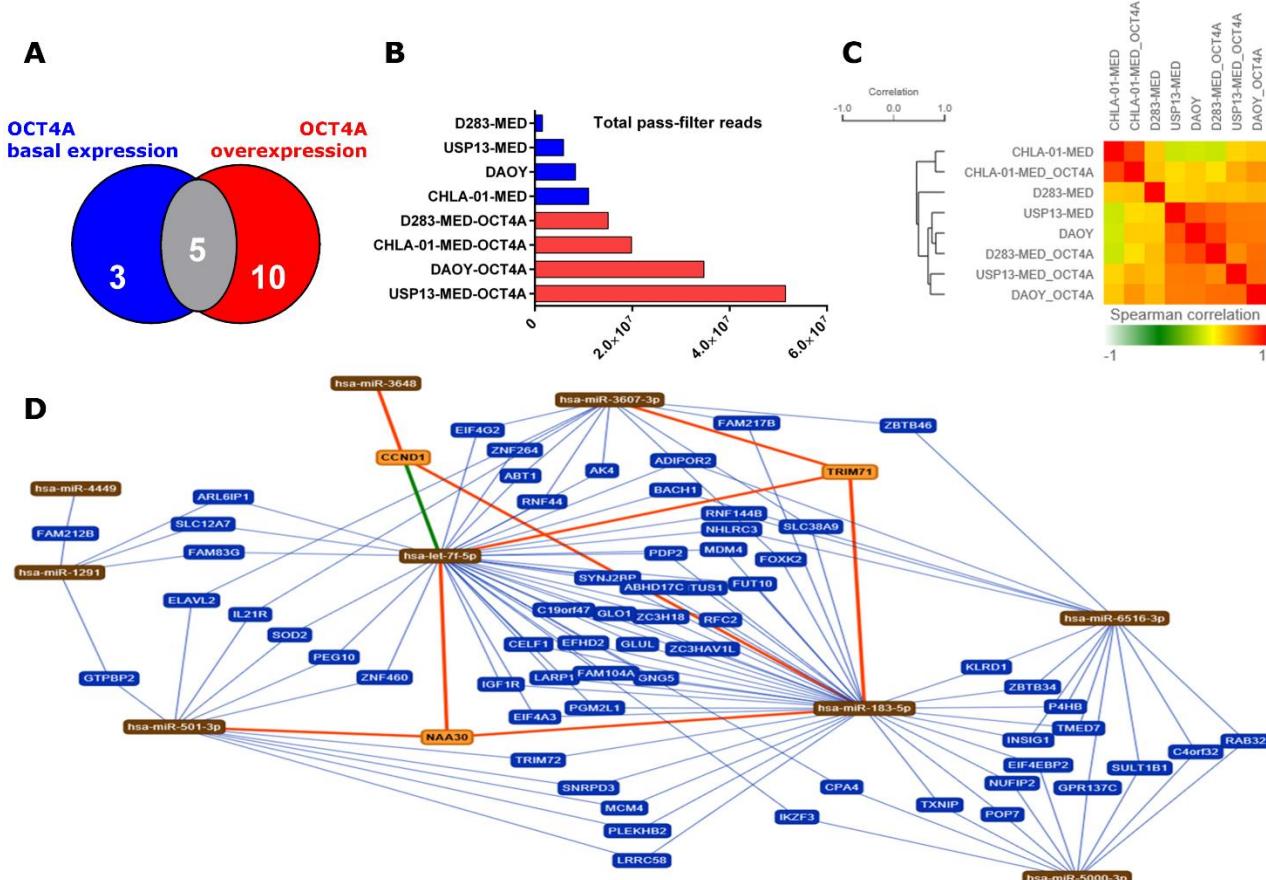


Figure 4: miRNA profiling of MVs derived from medulloblastoma cells. (A) Venn diagram of all miRNAs (primary, precursor and mature) identified in MVs from all OCT4A-overexpressing MVs (red), medulloblastoma cell lines with basal OCT4A expression (blue) and found in both groups (grey). (B) Total pass-filter reads in MVs derived from medulloblastoma cell lines with (red) or without (blue) OCT4A-overexpression. (C) Hierarchical clustering and heat map showing the relative similarity among the medulloblastoma cell lines, according to their mature miRNA expression profiling. The color of each field indicates the Spearman Rho correlation between these replicates. (D) Network of experimentally validated miRNA interactions with either two (blue) or three (orange) distinct mRNAs. Only miRNAs detected in MVs from all OCT4A-overexpressing cells were included in the analysis. Strong interaction is represented by green line.

Table 2: miRNAs commonly detected in MV samples of all medulloblastoma cell lines, with expression not previously reported in normal tissues. miRNAs are ranked by mean read count. Data was analyzed by Human miRNA Expression Database comparison (miRmine, University of Michigan).

miRNA	Biosynthesis stage	Mean Read Count	Tissue (miRmine database)
miR-6087	Precursor and Mature	209436	Brain diseased
miR-1248	Precursor and Mature	776	Brain, breast, liver and nasopharynx diseased
*miR-4449	Primary, Precursor and Mature	766	Brain, plasma and bladder diseased
*miR-500b	Primary	51	Brain and nasopharynx diseased
miR-208	Primary and Precursor	36	Brain and semen diseased
*miR-3648	Primary and Precursor	36	Brain and breast diseased
*miR-1291	Primary and Precursor	34	Brain, bladder and breast diseased
*miR-3607	Primary and Precursor	18	Brain and nasopharynx diseased

*miRNA exclusively detected in MVs derived from OCT4A-overexpressing medulloblastoma cells.

DISCUSSION

Predicting and monitoring medulloblastoma recurrence is critical since most fatalities are due to relapsed tumors refractory to resection, craniospinal irradiation and standard chemotherapy. This scenario is particularly alarming for patients with SHH, Group 3, or Group 4 subtypes of medulloblastoma, which are more likely to experience recurrence. About 70% of SHH and Group 3 patients present recurrences within a year. Furthermore, Group 3 and Group 4 patients have mainly metastatic recurrences that are more difficult to treat²⁷, indicating that existing neuroimaging techniques are failing in detecting residual cells with tumor initiating capability and increased resistance to therapy.

In medulloblastoma, high OCT4A expression is known to enhance tumor-initiating capability, metastatic potential and resistance to chemotherapeutic agents¹², being associated metastatic disease and poor patient survival rates¹⁷. Hence, detection of OCT4A-overexpressing cells may significantly contribute with clinical management of patients with medulloblastoma.

In our experimental model of aggressive medulloblastoma, 464 proteins and 10 microRNAs were predominantly detected in MVs released by OCT4A-overexpressing tumor cells, which could serve as surrogate indicators of the presence of medulloblastoma stem cells in the organism. Microvesicles can be routinely isolated from blood plasma and CSF samples using protocols and equipment accessible to most clinical laboratories²⁸. Liquid biopsies offer a minimally invasive approach to monitor CNS tumors and it has been recently applied to detect primary and metastatic CNS tumors in adult patients²⁹, as well as to monitor disease response to radiotherapy in pediatric patients with gliomas³⁰.

Detection of tumor-derived molecules carried within MVs is advantageous due to their increased *in vivo* stability, since they are more protected from enzymatic degradation³¹. In glioblastoma patients, RNU6-1, miR-320, and miR-574-3p expression could be specifically detected in MVs isolated from patient serum³². This approach also seems well suited for surveillance of medulloblastoma, based on reports that medulloblastoma cells release twice as much MVs than cells from other tumors such as glioblastoma, and four times more MVs than the

amount released by normal cells³³.

Some of the MV cargos identified for the first time in our study might also help differential diagnosis of medulloblastoma, including RPL13AP3, RACK1, PPIAL4D, LDHC and H2BFS proteins. Other proteins such as RALYL, HNRNPCL4, RPL13AP3, HNRNPCL3, RACK1, PPIAL4D, LDHC and H2BFS had never been associated with medulloblastoma. These proteins are involved in cell proliferation and DNA repair, two cellular processes crucial for cancer development^{20,26}. The SETSIP and PABPC1L proteins are of particular interest to stemness, since they have been reported to be upregulated during somatic cell reprogramming and development, respectively^{21,22}.

Similarly, medulloblastoma MVs were found enriched with miR-6087, a microRNA typically overexpressed in human embryonic stem cells³⁴, that had not been previously correlated with cancer. In addition to miR-6087, of the eight miRNAs exclusively expressed in MVs from medulloblastoma cells but not reported in MVs from normal tissues, miR-4449 had not been previously associated with CNS tumors in general. However, miR-4449 was identified as potential blood marker for multiple myeloma³⁵. Although, miR-1291 was extensively studied in other types of cancer, including glioblastoma³⁶ and AT/RT³⁷, its association with medulloblastoma is first reported here. Thus, miR-6087, miR-4449, and miR-1291 are good candidate markers of medulloblastoma to help improve diagnosis. The latter two microRNAs, detected exclusively in MV from aggressive forms of medulloblastoma cells, might also help patient risk stratification.

Other microRNAs may provide ancillary information for tumor cell detection, such as miR-182, miR-221 and miR-183, which have already been detected in medulloblastoma by other studies³⁸⁻⁴⁰. Three other miRNAs (miR-1248, let-7a, and miR-181b) have also been previously associated with glioblastoma, astrocytoma, neuroblastoma and osteosarcoma⁴¹⁻⁴⁵.

Interestingly, the interactome mapping of proteins exclusively found in MVs from OCT4A-overexpressing medulloblastoma cells revealed ERK, PI3K/AKT/mTOR, and EGF/EGFR as signaling pathways altered in these aggressive cells. Function of these pathways

in oncogenic signaling is well known⁴⁶. Likewise, miRNAs silencing expression of TRIM71, a tumor suppressor protein⁴⁷ regulating embryonic stem cell self-renewal⁴⁸, were solely detected in MVs from OCT4A-overexpressing cells. These findings further support the correlation of the aforementioned medulloblastoma MV cargos with aggressive tumor cells.

In conclusion, our study reveals several proteins and miRNAs present in MVs of aggressive metastatic medulloblastoma cells that might serve as tumor biomarkers. Given that tumor MVs can be isolated from blood and CSF of patients, analysis of these MV cargos may help refine diagnosis and stratification of medulloblastoma patients, as well as detection of relapsed disease not detectable by conventional exams, aiming at improved clinical benefit.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Medulloblastoma cell lines Daoy (ATCC HTB-186), D283-MED (ATCC HTB-185), CHLA-01-MED (ATCC CRL-3021) were purchased directly from ATCC (Manassas, VA, USA). USP13-MED medulloblastoma cell line was obtained from HUG-CEL (Human Genome and Stem Cell Center, Universidade de São Paulo)⁴⁹. Daoy and USP13-MED cells were cultivated in DMEM low glucose supplemented with 10% FBS. D283-Med cells were cultivated in MEM supplemented with 10% FBS. CHLA-01-Med cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium - Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) with 20ng/mL human recombinant EGF, 20ng/mL human recombinant basic FGF and B-27 Supplement (Invitrogen) to a final concentration of 2%. All culture media contained 1% of penicillin/streptomycin solution. All medulloblastoma cell lines underwent stable OCT4A overexpression by retroviral transduction as described by da Silva et al¹².

Isolation of MVs

All medulloblastoma cell lines were cultivated in T225 cm² flask. After achieving 80% confluence, cells were kept in 30-40 mL medium without supplement for 24 h at 37°C, 5% CO₂ atmosphere. The culture supernatant was harvested and centrifuged at 3.000 g for 10 min to

remove debris. For MV isolation, cell-free supernatants were centrifuged at 100.000 g (Sorvall Ultra Pro800 ultracentrifuge) for 2 h at 4°C, as described at Greening et al.⁵⁰. MV pellets were resuspended in PBS or in 50 µL of RapGest SF Surfactant (Waters Technologies, Brasil LTDA) for proteomics assays.

Characterization of microvesicles

Microvesicles (MVs) were immunophenotyped by flow cytometry (FACS Aria II; FACS Diva software, BD), using antibodies against CD81 (BioLegend; catalog number: 349501), CD9 (BioLegend; catalog number: 312107) and CD63 (BioLegend; catalog number: 353007). Calnexin antibody (Abcam catalog number: ab22595) was also used as negative control for extracellular vesicles. Medulloblastoma MVs were attached to Aldehyde/Sulfate Latex Beads, 4% w/v, 4 µm (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at room temperature. After 1M glycine incubation for 30 min and washing with PBS, MVs were stained with the cited antibodies⁵¹. Analysis was carried out using FlowJo software (La Jolla, CA, USA). MVs size and concentration were estimated by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) with NanoSight NS300 equipped with a 488nm blue laser (NanoSight Ltd, Minton Park UK), following the manufacturer's instructions. Significant differences were determined by unpaired Student's t test, with Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Transmission electron microscopy

For ultrastructural analysis of MVs, pellet resulting from cell culture supernatant ultracentrifugation was resuspended in PBS and dropped into CU-Rh formvar-coated 200 mesh grids for 20 min. The grid was emerged in 100 µL PBS, placed in parafilm and fixed in 1% glutaraldehyde in 0,1 M phosphate buffer for 5 min. After washing the grids with distilled water, the samples were stained with uranyl acetate and lead citrate. The MVs preparation were examined in a Zeiss EM 109 electron microscopy¹⁴.

Proteomic Analysis

The proteome content of tumor MVs was determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For protein digestion, 10 µg of total protein was

diluted in 50 mM ammonium bicarbonate to a final volume of 60 μ L. Then, protein samples were denatured with 0.2% (wt:vol) RapiGestTM SF Surfactant (Waters) at 80°C for 15 min, reduced with 2.5 μ L of 100 mM dithiothreitol at 60°C for 30 min, alkylated with 2.5 μ L of 300 mM iodoacetamide at room temperature for 30 min, and enzymatically digested at 37°C overnight with trypsin at a 1:50 (wt/wt) enzyme:protein ratio. After hydrolysis of RapiGest with 10uL of 5% trifluoroacetic acid (TFA) at 37°C for 90 min, samples were centrifuged at 16,000 g at 6°C for 30 min. Samples were analyzed by nanoACQUITY system (Waters). Peptides were captured, desalted and concentrated in a Symmetry C18 column (180 μ m \times 20 mm, 5 μ m; Waters) with 0.1% TFA (15 μ L/min for 5 min), separated to HSS C18 analytical column (75 μ m \times 150 mm, 1.7 μ m; Waters) by elution with 2 % DMSO in 0.1% formic acid in water and 5 % DMSO in 0.1% formic acid in acetonitrile. For protein identification and database analysis, the acquisition of 2 technical sample replicates were made. The tandem mass spectrometer Q-Exactive type (Thermo Scientific) was calibrated in the positive mode at the beginning of each analytical sequence. Analytical sequence started after the acquisition of human cell line extract Mino (new mantle cell lymphoma) for quality control of the number of identified proteins (Lai et al., 2002). The acquired data were processed by MaxQuant program specifically designed for high-resolution and quantitative data ⁵². Protein identification was performed by Andromeda search tool using the database of the human proteome UniProtKB (swissprot june 2016) with the following criteria: allowed maximum of two incomplete cleavages by trypsin, fixed modification by carbamidomethylation of cysteines and variable changes by N-terminal portion acetylation and methionine oxidation. Quantification was based on unmarked strategy (Label-free quantification-LFQ).

For statistical analysis, student t-test was performed and p <0.05 were considered significant at Perseus software. Functional analysis systems biology was performed using the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA). The reference database used was the Ingenuity Knowledge Base (Genes) including only direct relations considering molecules and relationships in humans and experimentally observed. Functional protein association networks were performed

by Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) Integration of protein– protein-interaction (version 10.0). The molecular complex detection was performed to screen modules of PPI network with $| \log FC | > 2$ and $P < 0.05$.

Small RNA sequencing

Total miRNA was isolated from medulloblastoma MVs with miRVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies). miRNA concentration and quality were determined on a Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) using the Qubit microRNA Assay Kit (InvitrogenTM). Small RNA sequencing libraries were prepared using the TruSeq® Small RNA Library Prep Kit (Illumina®) following the manufacturer's protocol. Briefly, the first step was to add Illumina adapters to the 3' and 5' ends with unique indexes for each miRNA sample. The cDNA constructs were created by reverse transcript amplification based on the small RNA ligated with 3' and 5' adapters. Then, the libraries with unique indexes were pooled and SDS TBE gel (Thermo) purified together. The size, purity and concentration of the library were performed at Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer v1.03 (#DE13804475; Type G2939A; Agilent Technologies) using the High Sensitivity DNA Assay (Agilent Technologies). Sequencing was done at the Core Facility for Scientific Research–University of São Paulo (CEFAP-USP/GENIAL) using the Illumina NextSeq platform. The running metrics were: Projected yield = 6.17 Gbp; Error Rate = 0.50 %; Q30 average = 94.88 %.

The small RNA sequencing analysis were performed in the BaseSpace® Small RNA v1.0 app (Illumina Technologies). miRNA family, precursor and mature variants sequencing were summarized in Supplementary Table S2. The reads were aligned against 4 reference databases (abundant, mature miRNA, other RNA, and genomic) and output hits to mature miRNAs, isomiRs, and piRNAs using Bowtie v0.12.8⁵³. The DESeq2 variance model was used to detect and exclude outliers based on extreme variation between replicates⁵⁴. Analysis and image of interactome mapping generated by miRTargetLink Human database.

ABBREVIATIONS

CNS: central nervous system; MV: microvesicles; miRNA: microRNA; CSF: cerebrospinal fluid; AT/RT: atypical teratoid rhabdoid tumor.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. Marçola and P. Semedo-Kuriki contributed with MVs isolation and characterization. A.F. Assoni and V.M. Carvalho contributed with proteomic data acquisition and analysis. C. Kaid contributed with miRNA sequencing and analysis. All authors reviewed results and manuscript. C. Kaid and O.K. Okamoto wrote the manuscript. O.K. Okamoto designed and supervised the study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Waldir Caldeira, for his technical assistance, and Prof. Alberto Ribeiro, for his helpful comments regarding transmission electron microscopy. The authors also thanks Suzan Ienne from GENIAL (Genome Investigation and Analysis Laboratory, Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa - CEFAP-USP) for helping with the Small RNA Sequencing assay.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflicts of interest.

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, FAPESP-CEPID (2013/08028-1), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). C. Kaid is a fellow of CAPES (1379594); A.F. Assoni is a fellow of FAPESP (2016/09707-8).

REFERENCES

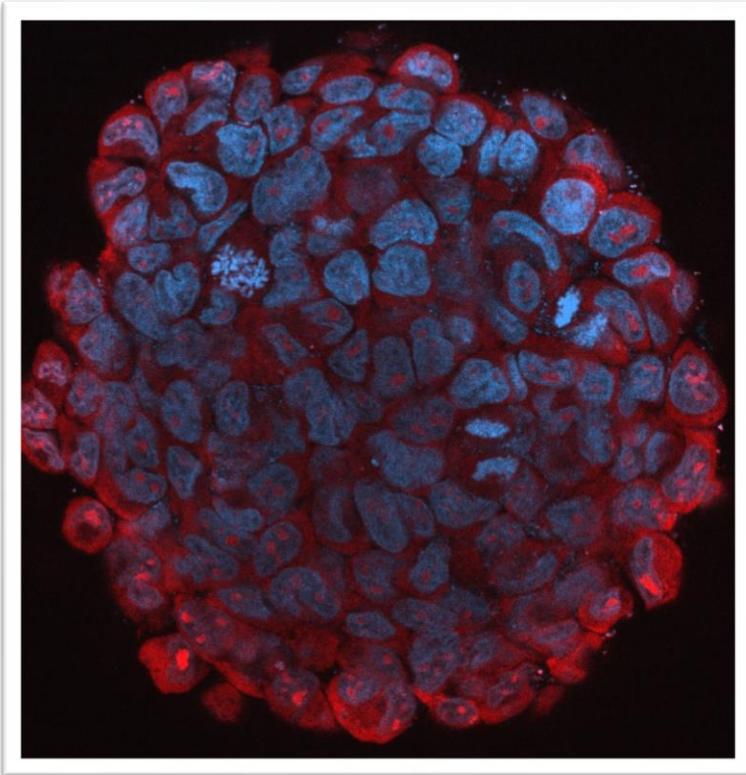
1. Johnston DL, Keene D, Strother D, Taneva M, Lafay-Cousin L, Fryer C, et al. Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 14];1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29432312>
2. Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJH, Witt H, et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature*. 2012;482:529–33.
3. Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2014 [cited 2014 Aug 3];40:356–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389035>
4. Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, et al. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 [cited 2014 Jul 16];29:1400–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=3525837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res* [Internet]. 2003 [cited 2014 Aug 28];63:5821–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/18/5821.full>
6. Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Yong WH, Cloughesy TF, et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2014 Oct 14];55:644–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=4017922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Okamoto OK. Cancer stem cell genomics: the quest for early markers of malignant progression. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2009 [cited 2018 Feb 20];9:545–54. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erm.09.40>
8. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 [cited 2014 Aug 21];120:41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=2798700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Muñoz P, Iliou MS, Esteller M. Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming. *Mol Oncol* [Internet]. 2012 [cited 2014 Jul 16];6:620–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141800>
10. Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells* [Internet]. 2015 [cited 2018 Feb 20];7:27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621103>
11. Lindoso RS, Collino F, Vieyra A. Extracellular vesicles as regulators of tumor fate: crosstalk among cancer stem cells, tumor cells and mesenchymal stem cells. *Stem Cell Investig* [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 20];4:75–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29057247>
12. da Silva PBG, dos Santos MCT, Rodini CO, Kaid C, Pereira MCL, Furukawa G, et al. High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. *Oncotarget*. 2017;8.
13. Kaid C, Silva PBG, Cortez BA, Rodini CO, Semedo-Kuriki P, Okamoto OK. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. *Cancer Sci*. 2015;106.

14. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2018 Jun 7];2:569–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154376>
15. Santos MCT, Silva PBG, Rodini CO, Furukawa G, Marco Antonio DS, Zanotto-Filho A, et al. Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015 [cited 2018 Feb 15];24:2700–8. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0052>
16. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* [Internet]. 2009 [cited 2018 Feb 20];461:649–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718018>
17. Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, De Souza JES, Cavalheiro S, et al. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol* [Internet]. 2012 [cited 2014 Aug 18];106:71–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725800>
18. Cheung K, Senese S, Kuang J, Bui N, Ongpipattanakul C, Ghokar A, et al. Proteomic Analysis of the Mammalian Katanin Family of Microtubule-severing Enzymes Defines Katanin p80 subunit B-like 1 (KATNBL1) as a Regulator of Mammalian Microtubule-severing. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2016 [cited 2018 May 7];15:1658–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26929214>
19. Yang AX, Chong N, Jiang Y, Catalano J, Puri RK, Khleif SN. Molecular Characterization of Antigen-Peptide Pulsed Dendritic Cells: Immature Dendritic Cells Develop a Distinct Molecular Profile when Pulsed with Antigen Peptide. Bansal GP, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2018 May 7];9:e86306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24475103>
20. Huang DT, Miller DW, Mathew R, Cassell R, Holton JM, Roussel MF, et al. A unique E1-E2 interaction required for optimal conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. NIH Public Access; 2004 [cited 2018 May 7];11:927–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361859>
21. Ozturk S, Guzeloglu-Kayisli O, Demir N, Sozen B, Ilbay O, Lalioti MD, et al. Epab and Pabpc1 Are Differentially Expressed During Male Germ Cell Development. *Reprod Sci* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 7];19:911–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814100>
22. Margariti A, Winkler B, Karamariti E, Zampetaki A, Tsai T -n., Baban D, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 7];109:13793–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869753>
23. Cui Z-W, Xia Y, Ye Y-W, Jiang Z-M, Wang Y-D, Wu J-T, et al. RALY RNA binding protein-like reduced expression is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 7];13:3403–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994768>
24. Law J, Kwek I, Svystun O, Lim J, Tan CT, Luong L, et al. RACK1/TRAF2 regulation of modulator of apoptosis-1 (MOAP-1). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2018 [cited 2018 May 7];1865:684–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29470995>
25. Hua Y, Liang C, Zhu J, Miao C, Yu Y, Xu A, et al. Expression of lactate dehydrogenase C correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 7];39:101042831769596. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28351304>
26. Huo L-R, Liang J-T, Zou J-H, Wang L-Y, Li Q, Wang X-M. Possible novel roles of poly(rC)-binding protein 1 in SH-SY5Y neurocytes: an analysis using a dynamic Bayesian network. *Neurosci Bull* [Internet].

- 2012 [cited 2018 May 7];28:282–90. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12264-012-1242-6>
27. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2016 [cited 2018 May 29];131:821–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040285>
28. Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2017 [cited 2018 Jun 7];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28085080>
29. Ballester LY, Lu G, Zorofchian S, Vantaku V, Putluri V, Yan Y, et al. Analysis of cerebrospinal fluid metabolites in patients with primary or metastatic central nervous system tumors. *Acta Neuropathologica Communications*; 2018;2:11.
30. Panditharatna E, Kilburn LB, Aboian MS, Kambhampati M, Gordish-Dressman H, Magge SN, et al. Clinically Relevant and Minimally Invasive Tumor Surveillance of Pediatric Diffuse Midline Gliomas Using Patient-Derived Liquid Biopsy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30322880>
31. Lin Z, McClure MJ, Zhao J, Ramey AN, Asmussen N, Hyzy SL, et al. MicroRNA Contents in Matrix Vesicles Produced by Growth Plate Chondrocytes are Cell Maturation Dependent. *Sci Rep* [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 22];8:3609. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29483516>
32. Manterola L, Guruceaga E, Pérez-Larraya JG, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, et al. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jun 7];16:520–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24435880>
33. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* [Internet]. NIH Public Access; 2011 [cited 2018 Oct 22];2:180. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21285958>
34. Yoo JK, Kim J, Choi S, Noh HM, Kwon Y Do, Yoo H, et al. Discovery and Characterization of Novel MicroRNAs During Endothelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 3];21:2049–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142236>
35. Shen X, Ye Y, Qi J, Shi W, Wu X, Ni H, et al. Identification of a novel microRNA, miR-4449, as a potential blood based marker in multiple myeloma. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 3];55:748–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27155004>
36. DONG L, LI Y, HAN C, WANG X, SHE L, ZHANG H. miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Int J Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jun 7];45:746–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858071>
37. Choi SA, Kim S-K, Lee JY, Wang K-C, Lee C, Phi JH. LIN28B is highly expressed in atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) and suppressed through the restoration of SMARCB1. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2016 [cited 2018 May 29];16:32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27095948>
38. Kunder R, Jalali R, Sridhar E, Moiyadi A, Goel N, Goel A, et al. Real-time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. *Neuro Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2018 May 3];15:1644–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203893>

39. Hsieh T-H, Chien C-L, Lee Y-H, Lin C-I, Hsieh J-Y, Chao M-E, et al. Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced malignancy in central nervous system embryonal tumors. *Carcinogenesis* [Internet]. 2014 [cited 2018 May 3];35:2164–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832085>
40. Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, et al. Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 3];123:539–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402744>
41. Zhao Y, Xu K, Liu P. Post-Transcriptional Control of Angiotensin II Type 1 Receptor Regulates Osteosarcoma Cell Death. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018 [cited 2018 May 3];45:1581–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29482191>
42. de Mooij T, McCutcheon BA, Leontovich AA, Parney IF. 336 Small RNA Sequencing of Glioblastoma Multiforme Extracellular Vesicles. *Neurosurgery* [Internet]. 2016 [cited 2018 May 3];63:198. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27399534>
43. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2012 [cited 2014 Sep 4];30:411–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374783>
44. Luo G, Luo W, Sun X, Lin J, Wang M, Zhang Y, et al. MicroRNA-21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and β-catenin signaling. *Mol Med Rep* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 3];15:187–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909726>
45. Delsin LEA, Roberto GM, Fedatto PF, Engel EE, Scrideli CA, Tone LG, et al. Downregulated Adhesion-Associated microRNAs as Prognostic Predictors in Childhood Osteosarcoma. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 3]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28944406>
46. Song W, Li Q, Wang L, Huang W, Wang L. FoxO1-negative cells are cancer stem-like cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 7];5:10081. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068418>
47. Nguyen DTT, Richter D, Michel G, Mitschka S, Kolanus W, Cuevas E, et al. The ubiquitin ligase LIN41/TRIM71 targets p53 to antagonize cell death and differentiation pathways during stem cell differentiation. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 8];24:1063–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28430184>
48. Melton C, Blelloch R. MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2010;695:105–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21222202>
49. Silva PBG, Rodini CO, Kaid C, Nakahata AM, Pereira MCL, Matushita H, et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology*. 2016;68.
50. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 30]. p. 179–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25820723>
51. Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* [Internet]. The Federation of American Societies for Experimental Biology; 2009 [cited 2018 Jun 7];23:1541–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109410>

52. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2018 Jun 7];11:2301–19. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2016.136>
53. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* [Internet]. 2009 [cited 2018 Jun 7];10:R25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261174>
54. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jun 7];15:550. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281>



CAPÍTULO 2: miR-367 como alvo terapêutico em tumores embrionários do SNC

**miR-367 AS A THERAPEUTIC TARGET IN STEM-LIKE CELLS
FROM EMBRYONAL CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS**

Carolini Kaid¹, Dione Jordan¹, Heloisa Maria de Siqueira Bueno¹, Bruno Henrique Silva Araujo², Amanda Assoni¹, Oswaldo Keith Okamoto^{1*}.

¹Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão 277. CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Phone: (55 11) 3091-7501.

²Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Oswald Keith Okamoto. Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão 277. CEP: 05508-090. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. Phone: (55 11) 3091-7501. keith.okamoto@usp.br.

Running title: miR-367 as a therapeutic target in CNS tumors

The authors declare that they have no competing interests.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, FAPESP-CEPID (2013/08028-1), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). C. Kaid was a fellow of CAPES (1379594), D. Jordan and A. Assoni and H. S. Araujo were recipients of FAPESP fellowships (2013/02983-1; 2016/09707-8; 2014/08049-1).

Scientific article submitted to Oncogene journal (Nature).

Manuscript # ONC-2018-02472

ABSTRACT

Aberrant expression of the pluripotency factor OCT4A in embryonal tumors of the Central Nervous System (CNS) is a key factor that contributes to tumor aggressiveness and correlates with poor patient survival. OCT4A overexpression has been shown to up regulate miR-367, a microRNA (miRNA) that regulates pluripotency in embryonic stem cells and stem-like aggressive traits in cancer cells. Here, we show that miR-367 is carried in microvesicles derived from embryonal CNS tumor cells expressing OCT4A and that inhibition of miR-367 in these cells attenuates their aggressive traits. miR-367 silencing in OCT4A-overexpressing tumor cells significantly reduced their proliferative and invasive behavior, clonogenic activity, and tumorsphere generation capability. *In vivo* miR-367 targeting through direct injections of a specific inhibitor in the cerebrospinal fluid of Balb/C Nude mice bearing OCT4A-overexpressing tumor xenografts inhibited tumor development and improved overall survival. miR-367 was also shown to target SUZ12, one of the core components of the PRC2 complex known to be involved in epigenetic silencing of pluripotency-related genes, including *POU5F1* encoding OCT4A. Our findings reveal possible clinical applications of a cancer stemness pathway highlighting miR-367 as a putative liquid biopsy biomarker that could be further explored to improve early diagnosis, prognosis prediction and a therapeutic target in aggressive embryonal CNS tumors.

Key words: Embryonal CNS tumor, miR-367, cancer stem cell, oncogenic biomarker.

INTRODUCTION

Embryonal tumors of the Central Nervous System (CNS) are highly heterogeneous at the molecular level and associated with different clinical outcomes. Some of these tumors, such as Medulloblastoma (MB) and Atypical Teratoid/Rhabdoid tumors (AT/RT), occur most commonly in young children¹. Despite combined treatment efforts that include surgery, chemotherapy, and radiotherapy, the overall prognosis of patients with MB and AT/RT remains poor^{2,3}. In addition, treatment-related neurological sequelae significantly impact their quality of life⁴.

Although many studies in the last few years have contributed with large sets of genetic and molecular data characterizing these embryonal CNS tumors^{5,6}, functional validation of putative therapeutic targets in preclinical studies are still scarce. Targeting proteins and signaling pathways responsible for maintaining a stem-like phenotype in tumor cells is a promising strategy, since the so-called cancer stem cells play key roles in tumor relapse and metastasis⁷ and are associated with poor survival of pediatric patients with embryonal SNC tumors⁸.

An increasing number of studies have been reporting a correlation between poor clinical outcome and expression of pluripotency-related genes such as *OCT4*⁹, *LIN28B*, *SOX2*¹⁰, *LITD1*¹¹, and *LIN28A*¹² in these tumors. A previous functional study also demonstrated the role of OCT4A in acquisition of stemness and aggressive traits in embryonal CNS tumor cells. This oncogenic activity of OCT4A involves modulation of expression of many novel non-coding RNAs¹³.

One such OCT4A-regulated non-coding RNA is the miR-367, a micro-RNA (miRNA) capable of inducing pluripotency in normal somatic cells¹⁴ and stem-like traits in medulloblastoma cells¹⁵. Up-regulation of this miRNA was also reported in other types of cancer including pancreatic ductal adenocarcinoma¹⁶, Wilm's tumor¹⁷, ependymoma¹⁸, non-small cell lung cancer¹⁹, and malignant germ-cell tumors. In the latter case, miR-367 could be detected in the cerebrospinal fluid of pediatric patients²⁰.

Given that cancer-associated miRNAs stably circulate in the organism and can be targeted in tumor cells by specific inhibitors, we investigated whether miR-367 could be used as a biomarker of OCT4A-expressing embryonal tumors of the CNS and if its therapeutic targeting could inhibit tumor aggressiveness.

RESULTS

miR-367 is carried by microvesicles derived from embryonal CNS tumor cells

In order to evaluate whether miR-367 could be explored as a tumor biomarker in liquid biopsies, microvesicles (MVs) secreted by embryonal CNS tumor cells were first isolated by ultracentrifugation. MVs purification and integrity were confirmed by electron microscopy. All tumor cell lines produced vesicles displaying a cup-shaped morphology, slightly wrinkled surface and diameter greater than 100 nm, typical of MVs. Smaller electron-dense vesicles consistent with exosomes could also be visualized (Figure 1a). qRT-PCR confirmed miR-367 expression in all tested tumor-derived MV samples (Figure 1b). Increased miR-367 levels in MVs correlated with OCT4A overexpression in medulloblastoma cell lines but not in the AT/RT cell line.

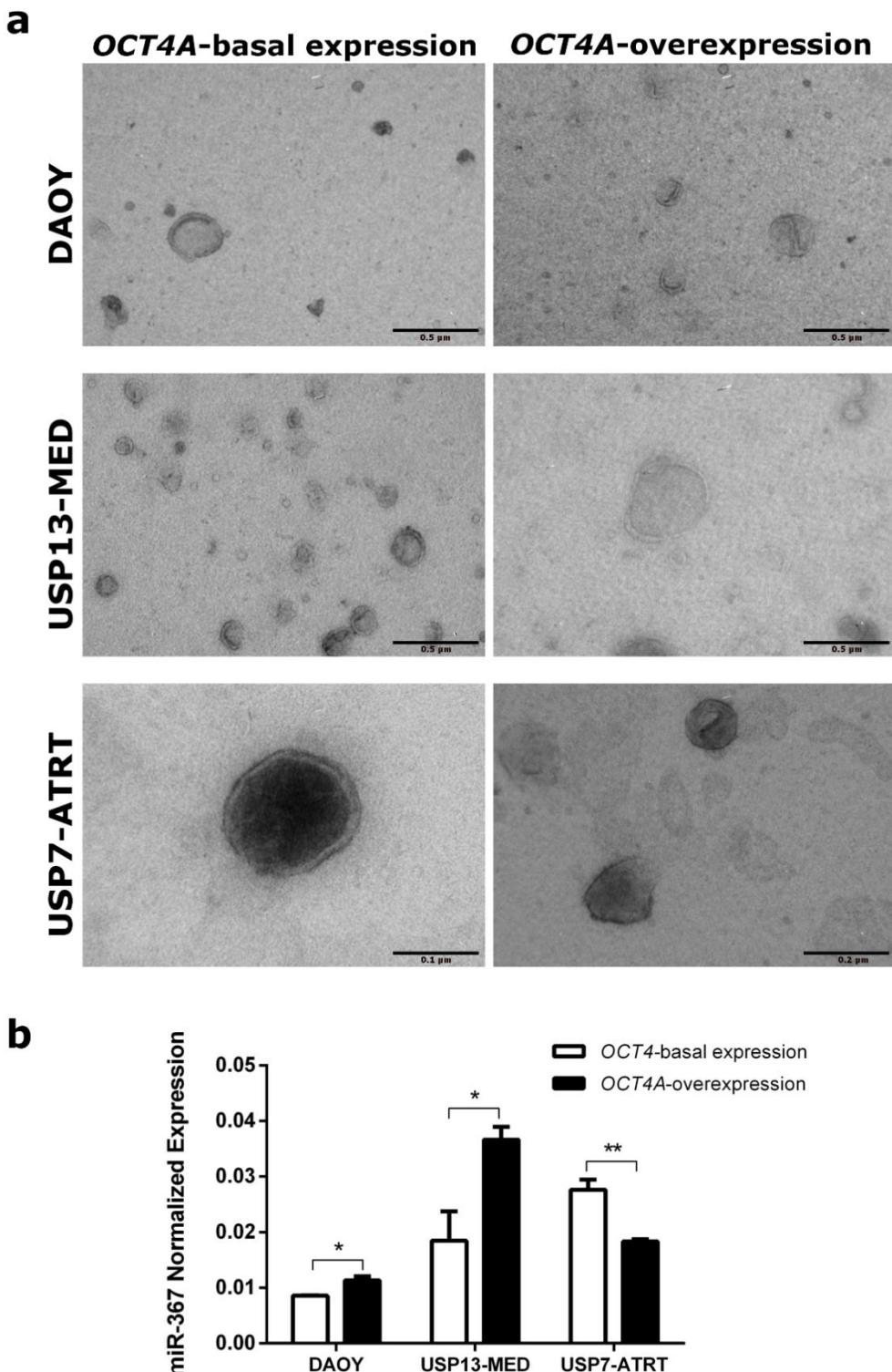


Figure 1: miR-367 levels in microvesicles (MVs) from embryonal CNS tumor cell lines. (a) Representative electron microscopy images of MVs isolated from medulloblastoma and AT/RT cells, with or without OCT4A stable overexpression. Scale Bars=0.5 μ m, 0.2 μ m and 0.1 μ m. (b) Expression profile of miR-367 in MVs isolated from embryonal tumor cell lines, with and without OCT4A stable overexpression by real-time qPCR, using RNU58A as endogenous control. Results are expressed as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; n = 3 per sample).

Inhibition of miR-367 attenuates aggressive traits of OCT4+ embryonal CNS tumor cells

Overexpression of OCT4A is known to exacerbate stemness traits and up regulate miR-367 expression in medulloblastoma cells^{13, 15}. Thus, we evaluated whether miR-367 would be a possible druggable target in aggressive embryonal CNS tumors. Transient miR-367 inhibition was performed in tumor cells with basal or enhanced OCT4A expression. The efficiency of miR-367 *inhibition* was confirmed by up regulation of its targets *RAB23* and *ITGAV*, at the transcript and protein levels (Supplementary Figure 1).

Silencing of miR-367 significantly inhibited the kinetics of *in vitro* tumor cell growth in cultures of cells with either basal OCT4A expression or OCT4A overexpression (Supplementary Figure 2). Overexpression of OCT4A enhanced tumor cell growth in all cell lines tested and this OCT4A-induced effect was partly reversed by miR-367 inhibition in OCT4A-overexpressing cells (Figure 2a). When evaluating cell proliferation rates based on EdU incorporation, miR-367 inhibition completely reversed the OCT4A-induced effects on DAOY cell proliferation, reducing the percentage of OCT4A-overexpressing cells in S phase. In USP13-MED and USP7-ATRT cells, miR-367 silencing significantly inhibited proliferation of cells displaying either basal or enhanced OCT4A expression (Figure 2b-c).

Similar results were obtained with tumor spheroids grown in distinct 3D culture systems mimicking tumor development. Inhibition of miR-367 significantly decreased anchorage-independent tumor cell growth and overall size of tumor colonies (Figure 3a). Reduced amount of tumor colonies after miR-367 inhibition occurred in all cell lines, independently of the OCT4A expression level (Figure 3b). Similarly, generation of tumorspheres enriched in stem-like cells was significantly inhibited after miR-367 silencing in all conditions tested (Figure 3c-e). Finally, miR-367 silencing also significantly inhibited 3D cell invasion in tumor spheroids of both USP13-MED and USP7-ATRT cells (Figure 4). Under the same experimental conditions, no tumor spheroids with spindle-like protrusions resulting from invading cells were obtained with the Daoy cell line (Supplementary Figure 3).

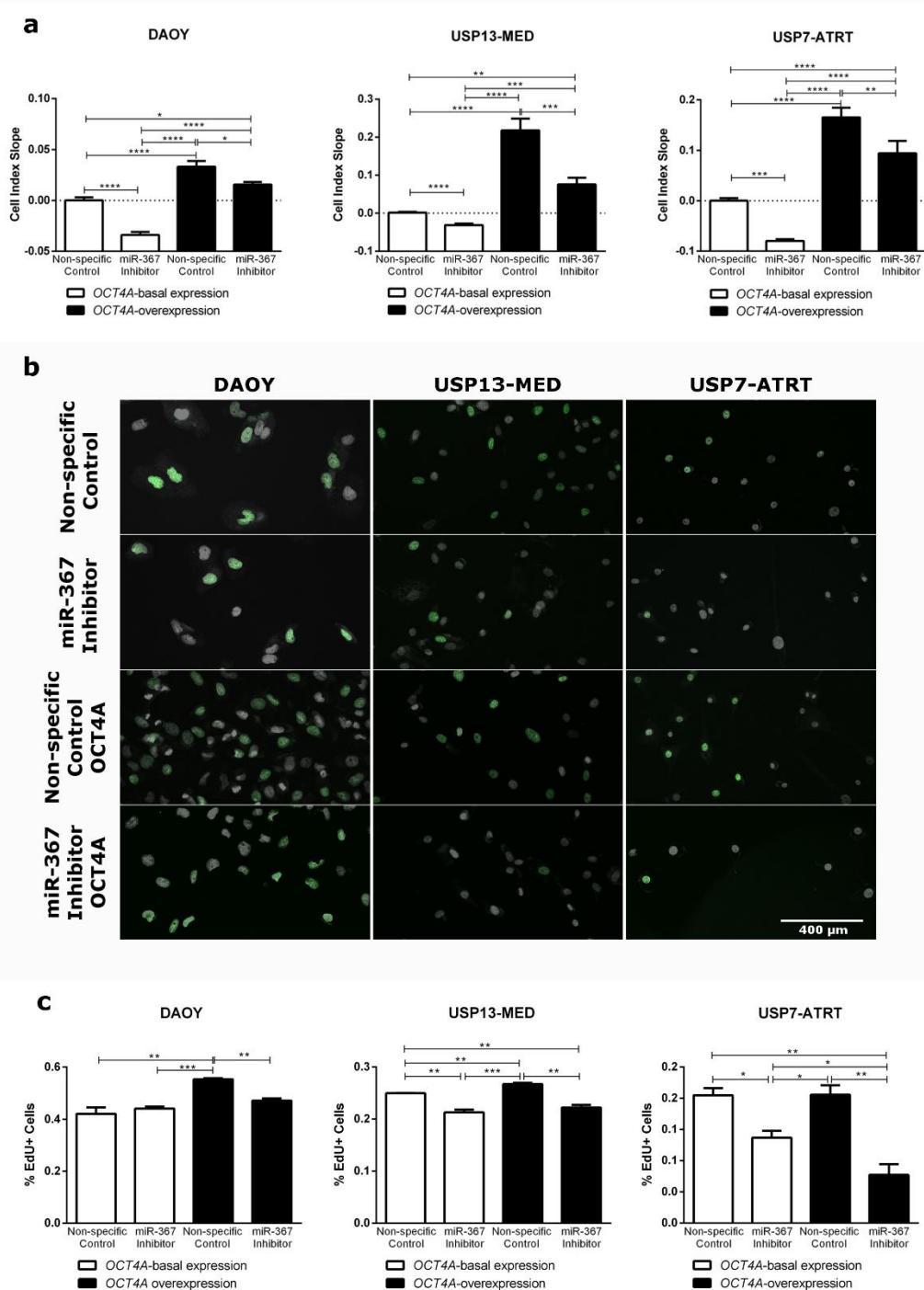


Figure 2: miR-367 silencing inhibits embryonal CNS tumor cell proliferation. (a) Tumor cell growth index along seven days post-miR-367 silencing. Data are expressed as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; n = 9 per sample). See also Supplementary Figure S2. (b) Representative immunofluorescence images of tumor cells after EdU incorporation (green) and DAPI staining (gray). Scale Bar = 400 μ m. (c) Tumor cell proliferation based on positive EdU incorporation, 48 hours post-miR-367 silencing. Results are expressed as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; n = 4 per sample). Cells with either basal or permanently enhanced OCT4A expression were included in the experiments. Cells transfected with non-specific oligonucleotides, under the same conditions, were used as controls.

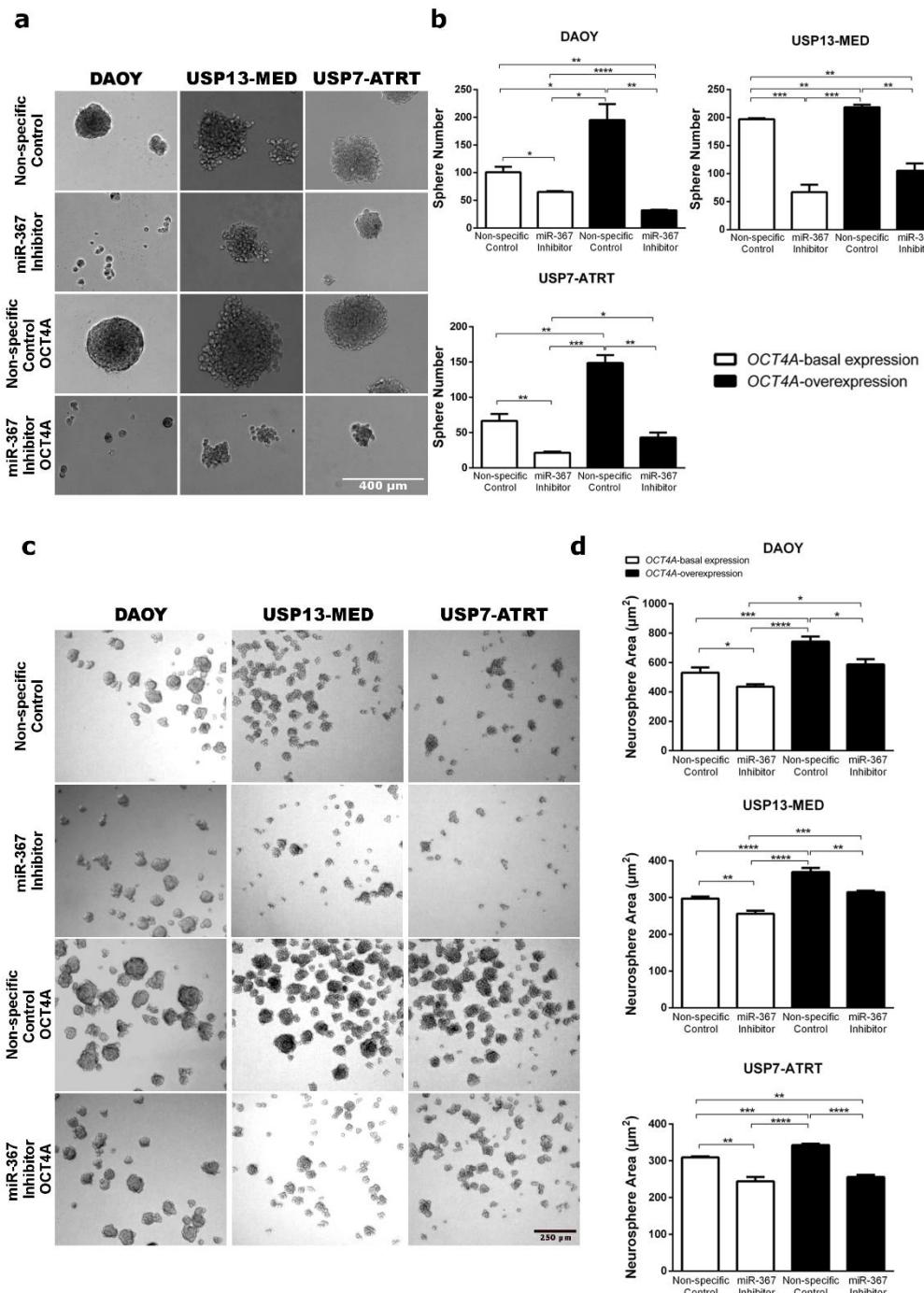


Figure 3: miR-367 silencing decreases clonogenic potential and neurosphere generation capability of embryonal CNS tumor cells. (a) Representative images of tumor colonies formed by Daoy, USP13-MED and USP7-ATRT cells. Cells were transfected with miR-367 inhibitor or non-specific control oligonucleotide and maintained in anchorage-independent culture conditions until colonies became visible (5 days for Daoy; 12 days for USP13-MED and USP7-ATRT). Scale Bar = 400 μm . (b) Respective amount of tumor cell colonies generated in each experimental condition. Only colonies larger than 50 μm were counted. (c) Representative images of tumorspheres generated by Daoy, USP13-MED and USP7-ATRT cells transfected with miR-367 inhibitor or non-specific control oligonucleotide and kept for 5 days in neurosphere culture medium. Scale bar = 250 μm . (d) Respective amount of tumorspheres generated in each experimental condition. Cells with either basal or permanently enhanced OCT4A expression were included in the experiments. Data are expressed as mean \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; $n = 6$ per sample).

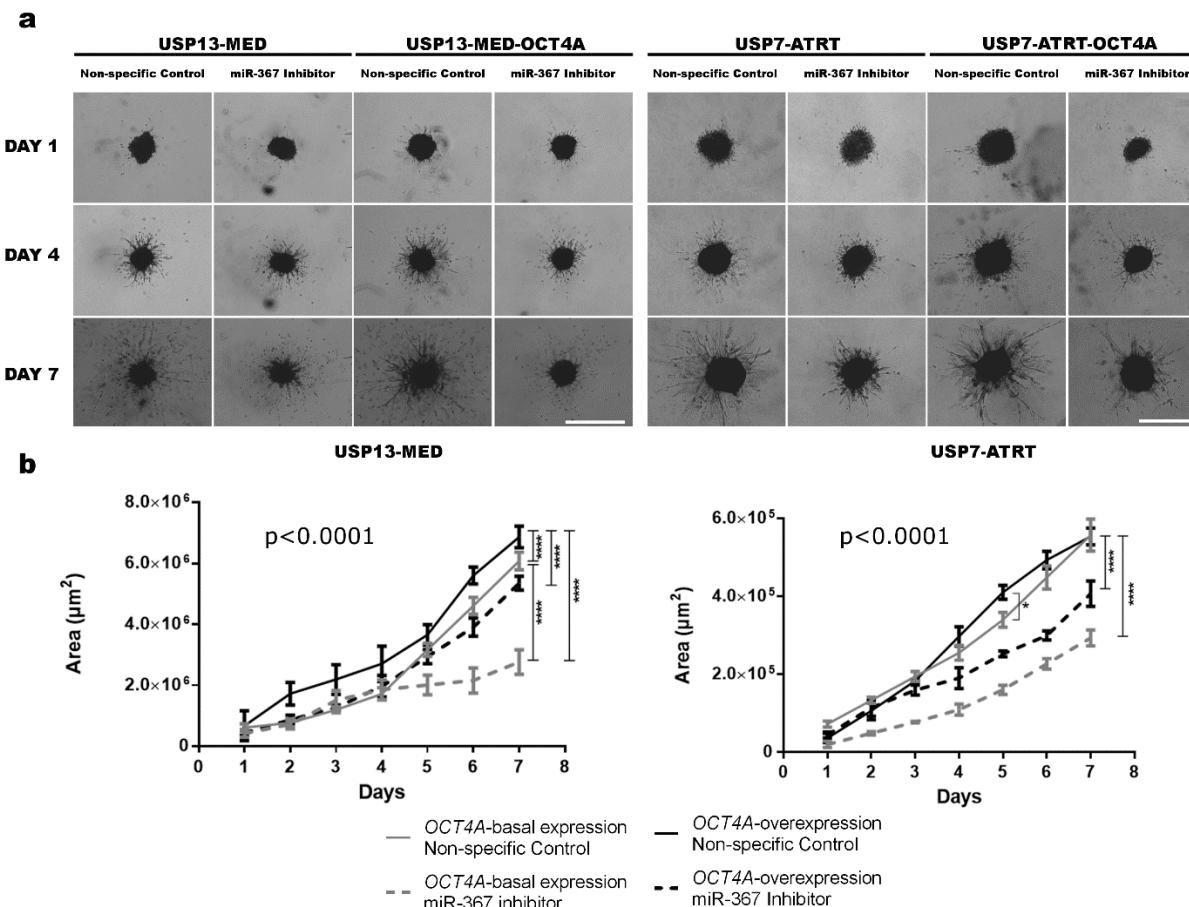


Figure 4: miR-367 silencing inhibits embryonal CNS tumor spheroid cell invasion. Tumor cells were transfected with miR-367 inhibitor or non-specific control oligonucleotide and embedded in a hydrogel matrix. (a) Representative images of USP13-MED and USP7-ATRT spheroids displaying arboreal protrusions formed by invading cells after 1, 4 and 7 days of 3D invasion culture. Scale bar: 400 μ m. (b) Kinetics of 3D cell invasion in tumor spheroids of USP13-MED and USP7-ATRT cells. Cells with either basal or permanently enhanced OCT4A expression were included in the experiments. (* $p<0.05$, *** $p<0.0001$; two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, non-linear fit curve test; $n = 8$ per group).

In vivo miR-367 targeting reduces tumor development and improves survival

The therapeutic potential of miR-367 was further confirmed *in vivo*, in an orthotopic xenograft model of aggressive embryonal CNS tumors initiated by OCT4A-overexpressing cells (Daoy, USP13-MED or USP7-ATRT) in Balb/C Nude mice. Tumor bearing mice were subjected to weekly injections of either miR-367 inhibitor or non-specific control, in the right lateral ventricle, at days 0, 7 and 14 (Figure 5a). Animals treated with miR-367 inhibitor displayed a significant reduction in tumor growth, 35 days post-injection of *OCT4A*-overexpressing tumor cells, as compared with control animals. Notably, treatment with miR-367 inhibitor prevented metastasis in animals harboring medulloblastoma xenografts (Figure 5b and c). The overall survival rate of animals harboring Daoy, USP13-MED or USP7-ATRT initiated tumors was also significantly improved by treatment with miR-367 inhibitor (Figure 5d).

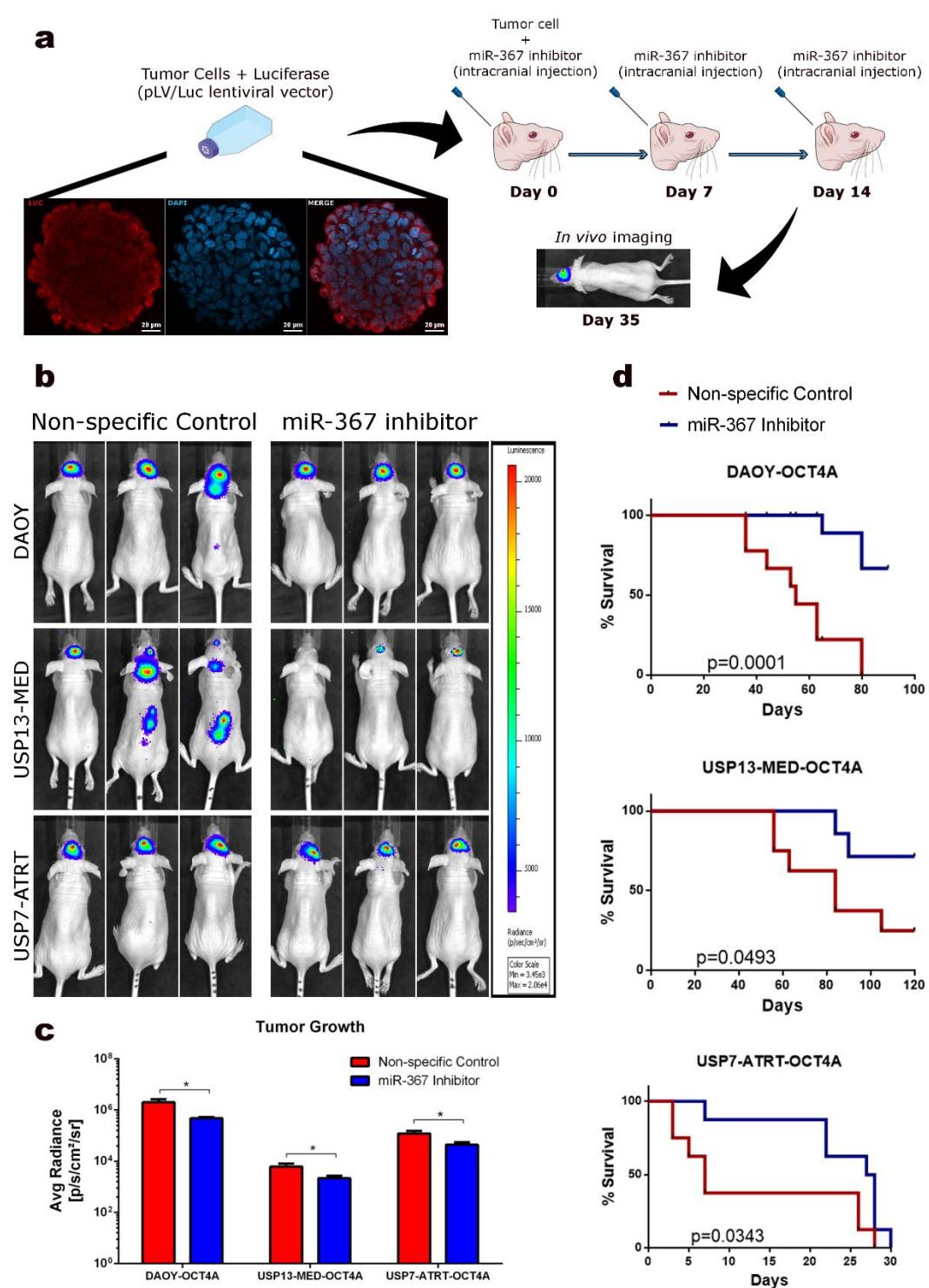


Figure 5: Therapeutic targeting of miR-367 in mice bearing orthotopic *OCT4A*-overexpressing embryonal CNS tumor xenografts. (a) Schematic overview of the *in vivo* experimental layout. Representative immunofluorescence images of Daoy tumorsphere incubated with antibody against firefly luciferase (red) and DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m. (b) Representative bioluminescence-based images of *OCT4A*-overexpressing tumors in mice, 35 days post-intracerebroventricular cell injection. (c) Bioluminescence intensity analysis of USP7-ATRT, USP13-MED, and DAOY tumors at day 35. (* $p<0.05$, *t* test compared with respective control condition; $n = 8$ per group). (d) Overall survival rates of mice bearing *OCT4A*-overexpressing embryonal CNS tumors (* $p<0.05$, log-rank Mantel-Cox test; $n = 8$ per group).

The epigenetic modifier SUZ12 is a target of miR-367

An *in silico* analysis for predicted miR-367 targets involved with maintenance of stemness identified SUZ12, a component of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) which catalyzes the H3K27 methylation during stem cell differentiation (OBIER et al., 2015). To confirm this hypothesis, we first analyzed SUZ12 protein expression after miR-367 silencing (Figure 6a-b). Transfection of miR-367 inhibitor increased SUZ12 expression in all types of CNS tumor cells, with or without *OCT4A* overexpression.

A luciferase report system confirmed specific binding between miR-367 and SUZ12 3'UTR (Figure 6c). Transfection of miR-367 mimic significantly decreased relative luciferase activity in cells containing reporter plasmid carrying wild-type SUZ12 3'UTR sequence (pSUZ12/3'UTR-Wt), but not in cells containing reporter plasmid carrying SUZ12 3'UTR sequence mutated at the miR-367-binding site (SUZ12/3'UTR-Mut). Similar changes in luciferase activity were not detected in cells transfected with non-specific control (Figure 6d).

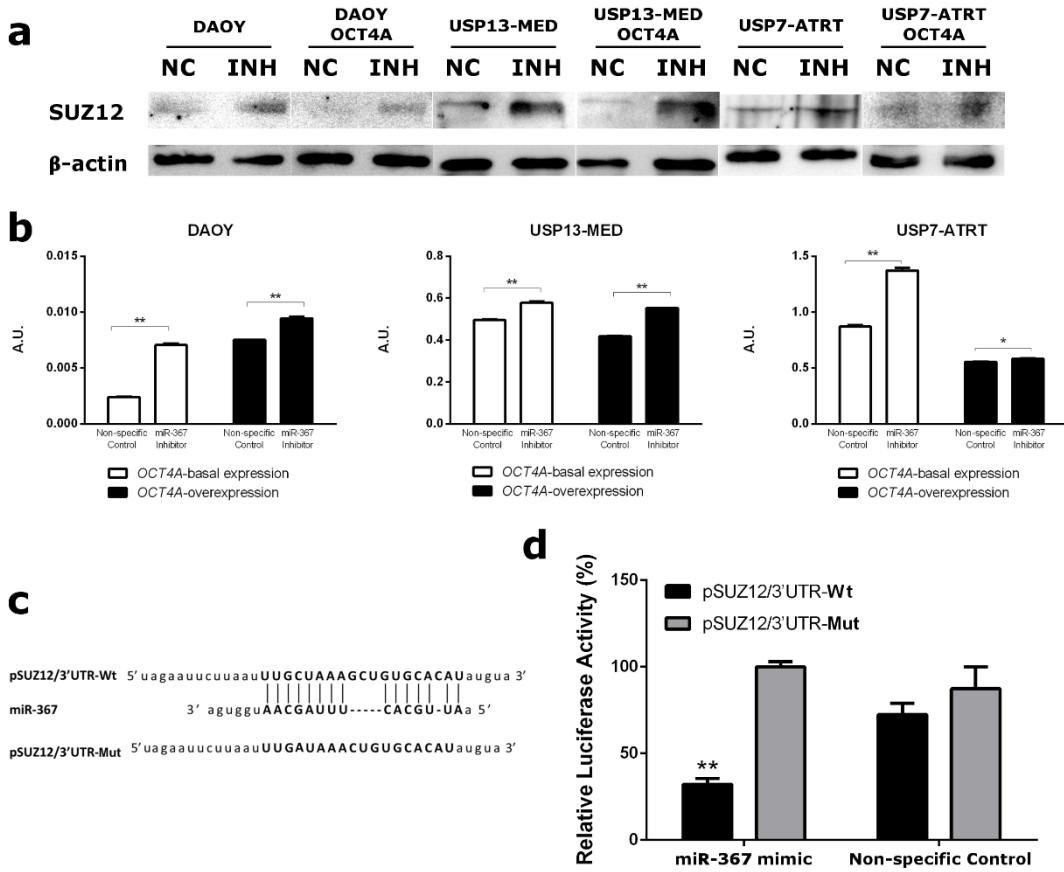


Figure 6: SUZ12 is a direct target of miR-367. (a) SUZ12 levels in embryonal CNS cells by western blotting, 48 hours post-miR-367 silencing. (b) Corresponding densitometry of SUZ12 protein bands. Data are expressed as mean \pm SEM (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *t* test analysis, $n = 3$ per sample). (c) Reporter sequences of SUZ12 3'UTR carrying wild type (Wt) or mutated (Mut) miR-367 binding sites. (d) Luciferase reporter assay. HEK293 cells were co-transfected with miR-367 *mimic* or negative control, and plasmid pSUZ12/3'UTR-Wt or pSUZ12/3'UTR-Mut. Relative luciferase activities were measured 48 hours after transfection. Results are expressed as percentage (mean \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *t* test; $n = 3$ per group).

DISCUSSION

Involvement of miR-367 in cancer stem cell-like traits was first reported in medulloblastoma¹⁵, in agreement with earlier correlation of miR-367 expression with poor prognosis in other types of pediatric tumors, including nephroblastoma and ependymoma^{17, 18}. This miRNA was later detected in serum and cerebrospinal fluid of pediatric patients with intracranial malignant germ-cell tumors²⁰.

Here, miR-367 was found in MVs produced by different embryonal CNS tumor cells expressing OCT4A. The latter pluripotency factor has been previously associated with poor prognosis of patients with medulloblastoma, directly enhancing tumor aggressiveness and metastatic spread^{13, 25}. Given that miR-367 is up regulated by OCT4A in these tumors¹⁵, detection of circulating miR-367 could be proposed as a biomarker of aggressive embryonal CNS tumors. In this scenario, the fact that miR-367 is a MV cargo is advantageous for liquid biopsies, since MVs protect RNAs from degradation²⁶, increasing their *in vivo* stability. In particular, medulloblastoma cells were shown to release about 10.000 MVs per cell on a daily basis, twice as much as Glioblastoma or Melanoma cells and four times more MVs than the amount released by normal fibroblasts. In addition, the amount of RNA in MVs from medulloblastoma cells was estimated 120- to 310-fold higher than in MVs from normal fibroblasts²⁷. Such abundance of RNAs carried by MVs would favor detection of early stage tumors and relapsed disease not detectable by conventional exams.

Active production of MVs by tumor cells may modify the behavior of nearby cells and affect tumor development. Transfer of microRNAs through MVs was shown to induce stemness in breast cancer cells, increasing tumorsphere generation capacity, cell invasion, and anchorage-independent cell growth²⁸. Our current findings support similar oncogenic properties of miR-367 in embryonal CNS tumors, which could be abrogated by transient inhibition of miR-367 in respective tumor cells. More importantly, *in vivo* miR-367 targeting through serial injections of a

specific miR-367 inhibitor in the cerebrospinal fluid of mice bearing orthotopic xenograft tumors significantly inhibited tumor development and improved overall survival.

These *in vivo* findings highlight miR-367 as a candidate therapeutic target for treating aggressive embryonal CNS tumors since, in this experimental model, tumors were initiated by OCT4A-overexpressing cells, which have been previously shown to generate highly aggressive and infiltrative tumors associated with early onset of clinical manifestations and short survival rates¹³. Similar therapeutic approaches could be applicable for other types of cancer in which miR-367 expression has also been implicated in tumor cell proliferation and invasion, such as melanoma²⁹, osteosarcoma³⁰, as well as endometrial³¹, renal cell³², and hepatocellular³³ carcinomas.

Interestingly, we demonstrated that SUZ12, a core subunit of the PRC2 complex component, is a direct target of miR-367. The PRC2 complex catalysis the trimethylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me3) leading to epigenetic silencing of the pluripotency gene network during differentiation³⁴. It has been shown that depletion of any of the PRC2 core components, EZH2, EED or SUZ12, may result in its inactivation³⁵. Indeed, depletion of SUZ12 allows OCT4A motif binding together with SOX2 and NANOG at promoter regions of genes that are PRC2-dependently silenced²⁴. Consistently, SUZ12 knockout in embryonic stem cells has been shown to impair cell differentiation³⁶. Thus, through its effect on SUZ12, one may speculate that miR-367 in cancer cells might help sustain expression of pluripotency genes known to enhance tumor cell stemness and aggressiveness. In this scenario, control of highly tumorigenic cells could be attempted by inhibiting miR-367 expression in those cells. If confirmed by further independent studies, such a mechanism allowing aberrant expression of pluripotency factors would be of particular practical interest to pediatric cancers where epigenetic changes play an important oncogenic role³⁷, while relatively few driver mutations are present³⁸.

Altogether, miR-367 up-regulation and release in MVs of aggressive OCT4A-overexpressing cells, inhibition of tumor stemness traits by miR-367 silencing *in vitro*, and

inhibition of tumor development and improved survival rates by *in vivo* miR-367 targeting reveal a novel oncogenic mechanism that could be further explored to improve early diagnosis, prognosis prediction, and treatment of pediatric patients with aggressive embryonal tumors of the CNS.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Cell Lines HEK293 (ATCC CRL-1573) cells as well as human embryonal CNS tumor cells Daoy (ATCC HTB-186), USP13-MED²¹ and USP7-ATRT²² were cultured in low DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin solution, and maintained at 37°C with 5% CO₂. The cell lines Daoy and HEK293 were purchased directly from ATCC. USP13-MED (medulloblastoma) and USP7-ATRT (AT/RT) cell lines were obtained from the HUG-CELL (Human Genome and Stem Cell Center, Universidade de São Paulo) cell repository. All embryonal CNS cell lines were subjected to stable OCT4A overexpression by retroviral transduction as previously described¹³.

Isolation of Tumor-derived Microvesicles

Microvesicle (MV) isolation was performed by ultracentrifugation as previously described²³. Briefly, embryonal CNS tumor culture supernatants were first centrifuged at 3 000 g for 10 min to remove debris and then centrifuged at 100 000 g (Sorvall Ultra Pro800 ultracentrifuge) for 2 h at 4°C. MVs pellets were suspended in PBS for downstream procedures. Ultrastructural characterization of MVs was performed in a Zeiss EM 109 electron microscopy.

Modulation of miR-367

For miR-367 transient silencing or overexpression, cells at 50% confluence were transfected with either mir-VANA miRNA 367 inhibitor (5'-AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA-3') or miR-367 mimic (5'-AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA-3') (Life Technologies, Carlsbad, CA), respectively.

Control cells were transfected with a universal non-specific negative control duplex (DS-NC1) that does not target any sequence in the human transcriptome (Scrambled Negative Control DsiRNA; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Transfection was performed with Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, using a final oligonucleotide concentration of 200 nM. Medium was replaced 24 h after transfection. Transient miR-367 silencing efficiency was confirmed by analyzing the cellular levels of specific targets, as previously described¹⁵.

Plasmid Vector Constructs and Luciferase Activity Assay

Synthetic oligonucleotides containing the wild-type (Wt) 3'-UTR sequence of SUZ12 (pSUZ12/3'UTR-Wt; sense: 5' TAGAATTCTTAATTGCTAAAGCTGTGCACATATGTA 3'; antisense: 5' TACATATGTGCACAGCTTAGCAAATTAAGAATTCTA 3') or mutated (Mut) 3'-UTR sequences of SUZ12 (pSUZ12-3'UTR-Mut; 5' TAGAATTCTTAATTGATAAACTGTGCACATATGTA 3': antisense: 5' TACATATGTGCACAGTTATCAAATTAAGAATTCTA 3') were cloned into pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and co-transfected with either miR-367 mimic or universal non-specific ncRNA control into HEK293 cells, using Lipofectamine RNAiMAX. As a control, the empty pmirGLO plasmid was also co-transfected with miR-367 mimic or universal non-specific ncRNA. After 48 hours, luciferase activity assay was performed using Dual-Luciferase Reporter (DLR) Assay System (Promega Corporation), according to the manufacturer's protocol.

Cell Population Growth Assay

Growth curves of embryonal CNS tumor cells were determined by the impedance-based xCeLLigence real-time cell analysis (RTCA) system (ACEA Biosciences, San Diego, CA). Briefly, 50 µL of cell culture media were added to each 96 well of the E-Plate 96 PET (ACEA Biosciences, San Diego, CA) for background reading. Subsequently, 50 µL of cell suspension containing 2 000 cells were added to each well and the plate was placed on xCeLLigence station inside the incubator. Twenty-four hours later, cells were subjected to miR-367 silencing and

impedance reflecting cell adhesion and proliferation changes was measured every 15 min for 7 days. Data is expressed as changes of impedance (“Cell Index”) over time, according to the manufacturer’s instruction.

Cell Proliferation Assay

Tumor cells previously transfected with miR-367 inhibitor or non-specific control were incubated with 10 µM EdU (5-ethynyl-20-deoxyuridine; Click-It EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Life Technologies) for 30 min. Cell nuclei were stained with DAPI at a concentration of 5 µg/mL for 5 min. All images were acquired in IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare) at Core Facility for Scientific Research – University of São Paulo (CEFAP-USP/INCELL) and analyzed using the IN Cell Investigator Software (GE Healthcare).

3D Tumor Spheroid Assays

In soft agar colony formation, five hundred cells, 24 h-post miR-367 silencing or non-specific RNA control treatment, were seeded over a 0.6% agarose solution and covered with a 0.3% agarose solution in a well of a six-well plate and maintained as previously described ¹³. Colonies over 50 µm were counted. For tumorsphere formation, cells treated with miR-367 inhibitor or non-specific control treatment were seeded onto a 96-well ultra-low attachment plate in DMEM/F12 supplemented with B-27, N-2, 20 ng/mL EGF and 20 ng/mL bFGF (Invitrogen), at an initial density of 1 250 cells/mL. After four days of incubation at 37°C with 5% CO₂ humidified atmosphere, spheres over 50 µm in diameter were counted by ImageJ software. Tumorsphere CD133-expressing cells were detected by flow cytometry with FACS Aria II (BD Biosciences) using FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo v10 softwares.

Cell invasion capacity was evaluated using Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay (Trevigen, MD) following the manufacturer’s recommendation. Tumor cells, 24 h-post miR-367 or non-specific negative control treatment, were suspended in Spheroid Formation ECM at initial density of 8x10⁴ and Spheroids were allowed to form for 24 hours. Invasion measurements were performed after two and four days, using ImageJ software. Daoy cell line was not included in the

results since these cells fail to form spheroids under such experimental conditions (Supplementary Figure S3).

Immunofluorescence

Cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 30 min. After fixation, cells were treated with PBS-T (0.1% Triton X-100, 1% BSA) for 30 min. and then incubated overnight at room temperature with GTX27358 Firefly Luciferase antibody [Luci 21 1-107] (1:200 dilution, Genetex). After washing with PBS three times, cell nuclei were stained with 1 μ g/mL DAPI for 2 min and mounted on slides with VectaShield. Images were acquired in confocal microscope (Zeiss LSM 800).

Therapeutic Targeting of miR-367 in Orthotopic Metastatic Xenograft Model

The orthotopic model of embryonal CNS tumors was performed with luciferase-expressing DAOY, USP13-MED, and USP7-ATRT cells, as previously described¹³. Tumor cell suspension (10⁶ cells in 5 μ L of DMEM) was injected in the right lateral ventricle of Balb/C Nude mice at a ratio of 1 μ L/min with a high-precision microsyringe (701RN; Hamilton Company, Reno, NV, USA), by stereotaxic surgery. The mir-VANA miRNA 367 inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA) or non-specific negative control duplex (DS-NC1) (Scrambled Negative Control DsiRNA; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) were formulated with in vivo jetPEI transfection reagent (Polyplus) containing 2 μ g of oligonucleotides diluted in 2 μ L of DEPC water and injected in the right ventriculum at days 0, 7 and 14 (Figure 4A). Tumor development was assessed by in vivo imaging with the IVIS Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) at Core Facility for Scientific Research – University of São Paulo (CEFAP-USP/FLUIR). Bioluminescence images were taken at day 35, following intraperitoneal injection of 1.5 mg D-luciferin (Promega, Madison, WI, USA) diluted in PBS. Tumor burden was calculated by the Living Image 3.1.0 software (PerkinElmer). All efforts were made to minimize animal suffering as proposed by the International Ethical Guideline for Biomedical Research (CIOMS/OMS, 1985).

Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and three independent experiments were carried out. Data were analyzed by t test or ANOVA followed by the Bonferroni or Tukey post hoc tests. Significance was established at the $p \leq 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM. Survival was analyzed by Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 6 (version 6.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Clarissa Rocha and Matheus Molina for helping with the luciferase cell line generation. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, FAPESP-CEPID (2013/08028-1), CNPq (309206/2011-1; 444722/2014-9), INCT-CETGEN (573633/2008-8), and FINEP-CTC (0108057900). C. Kaid was a fellow of CAPES (1379594), D. Jordan and A. Assoni and H. S. Araujo were recipients of FAPESP fellowships (2013/02983-1; 2016/09707-8; 2014/08049-1).

The authors disclose no potential conflicts of interest.

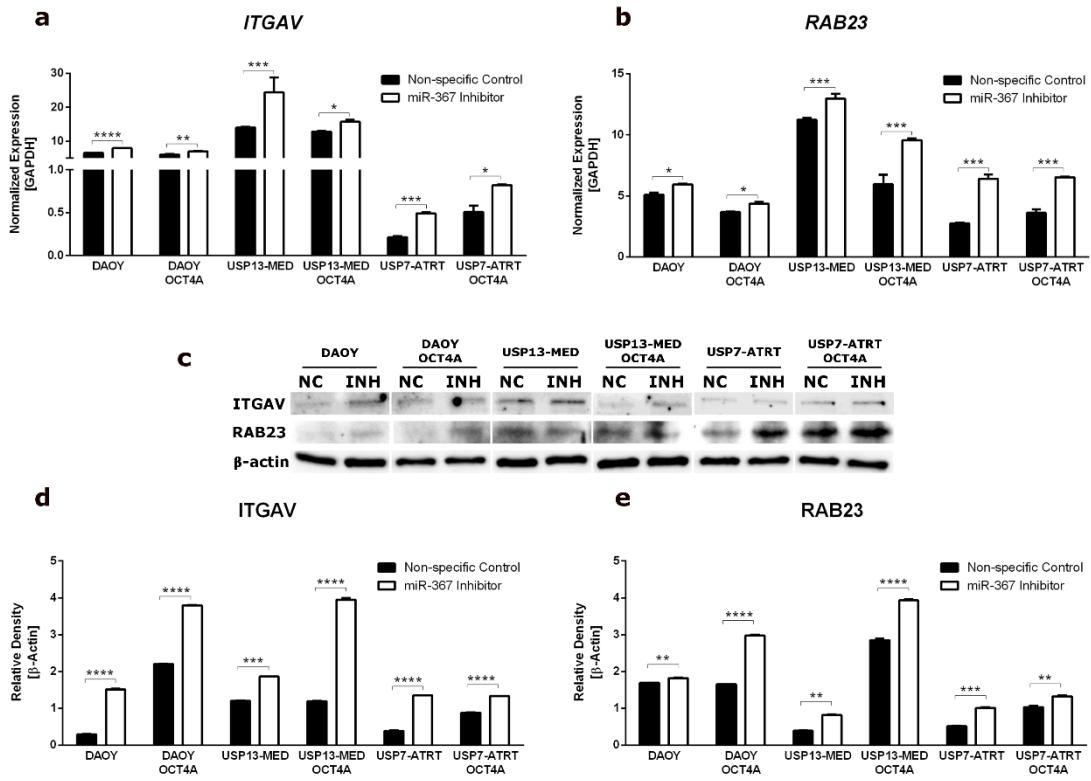
REFERENCES

1. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrissey EE (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8:376–88. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.001
2. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2:180. doi: 10.1038/ncomms1180
3. Cai W, Jiang H, Yu Y, Xu Y, Zuo W, Wang S, Su Z (2017) mi R -367 regulation of DOC-2/DAB2 interactive protein promotes proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Biomed Pharmacother* 95:120–128. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.158
4. Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Diaz T, Tejero R, Gimferrer JM, Molins L, Cabanas ML, Ramirez J, Monzo M, Marrades R (2013) Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 41:1172–8. doi: 10.1183/09031936.00048712
5. Cao R, Zhang Y (2004) SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol Cell* 15:57–67. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2004.06.020
6. Costa FF, Bischof JM, Vanin EF, Lulla RR, Wang M, Sredni ST, Rajaram V, Bonaldo MDF, Wang D, Goldman S, Tomita T, Soares MB (2011) Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma. *PLoS One* 6:e25114. doi: 10.1371/journal.pone.0025114
7. Ding D, Zhang Y, Wen L, Fu J, Bai X, Fan Y, Lin Y, Dai H, Li Q, Zhang Y, An R (2017) MiR-367 regulates cell proliferation and metastasis by targeting metastasis-associated protein 3 (MTA3) in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 8:63084–63095. doi: 10.18632/oncotarget.18647
8. Donnarumma E, Fiore D, Nappa M, Roscigno G, Adamo A, Iaboni M, Russo V, Affinito A, Puoti I, Quintavalle C, Rienzo A, Piscuoglio S, Thomas R, Condorelli G (2017) Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* 8:19592–19608. doi: 10.18632/oncotarget.14752
9. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ (2015) A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 179–209
10. Guerreiro Stucklin AS, Ramaswamy V, Daniels C, Taylor MD (2018) Review of molecular classification and treatment implications of pediatric brain tumors. *Curr Opin Pediatr* 30:3–9. doi: 10.1097/MOP.0000000000000562
11. Han Y-P, Ma C-K, Wang S-Q, Enomoto A, Zhao Y, Takahashi M, Ma J (2014) Evaluation of osteopontin as a potential biomarker for central nervous system embryonal tumors. *J Neurooncol* 119:343–351. doi: 10.1007/s11060-014-1484-4
12. Johnston DL, Keene D, Strother D, Taneva M, Lafay-Cousin L, Fryer C, Scheinemann K, Carret A-S, Fleming A, Afzal S, Wilson B, Bowes L, Zelcer S, Mpofu C, Silva M, Larouche V, Brossard J, Bouffet E (2018) Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1. doi: 10.1097/MPH.0000000000001095
13. Kaid C, Goulart E, Caires-Júnior LC, Araujo BHS, Soares-Schanoski A, Siqueira Bueno HM, Silva KAT, Astray RM, Assoni AF, Ribeiro Júnior AF, Ventini DC, Puglia ALP, Gomes RP, Zatz M, Okamoto OK (2018) Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS

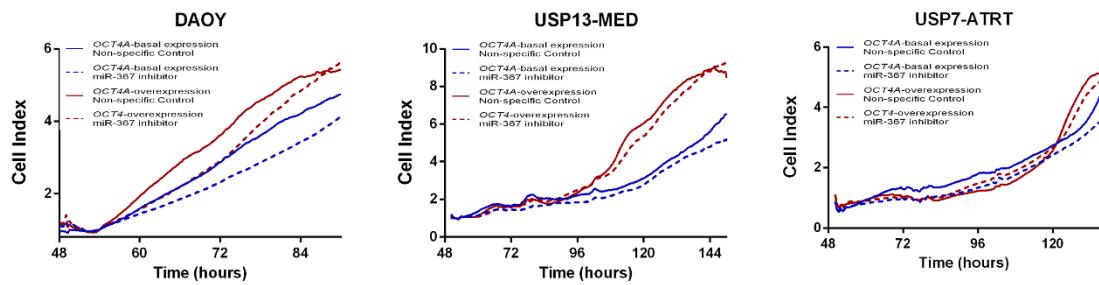
- tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res canres.*3201.2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3201
14. Kaid C, Silva PBG, Cortez BA, Rodini CO, Semedo-Kuriki P, Okamoto OK (2015) miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. *Cancer Sci.* doi: 10.1111/cas.12733
 15. Lin Z, McClure MJ, Zhao J, Ramey AN, Asmussen N, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD (2018) MicroRNA Contents in Matrix Vesicles Produced by Growth Plate Chondrocytes are Cell Maturation Dependent. *Sci Rep* 8:3609. doi: 10.1038/s41598-018-21517-4
 16. Long J, Luo J, Yin X (2018) miR-367 enhances the proliferation and invasion of cutaneous malignant melanoma by regulating phosphatase and tensin homolog expression. *Mol Med Rep* 17:6526–6532. doi: 10.3892/mmr.2018.8663
 17. 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
 18. Ma J, Li D, Kong F-F, Yang D, Yang H, Ma X-X (2018) miR-302a-5p/367-3p-HMGA2 axis regulates malignant processes during endometrial cancer development. *J Exp Clin Cancer Res* 37:19. doi: 10.1186/s13046-018-0686-6
 19. Margueron R, Reinberg D (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469:343–349. doi: 10.1038/nature09784
 20. Meng X, Lu P, Fan Q (2016) miR-367 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by negatively regulating PTEN. *Biochem Biophys Res Commun* 470:187–191. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.025
 21. Murray MJ, Bell E, Raby KL, Rijlaarsdam MA, Gillis AJM, Looijenga LHJ, Brown H, Destenaves B, Nicholson JC, Coleman N (2016) A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. *Br J Cancer* 114:151–162. doi: 10.1038/bjc.2015.429
 22. Obier N, Lin Q, Cauchy P, Hornich V, Zenke M, Becker M, Müller AM (2015) Polycomb Protein EED is Required for Silencing of Pluripotency Genes upon ESC Differentiation. *Stem Cell Rev Reports* 11:50–61. doi: 10.1007/s12015-014-9550-z
 23. Okamoto OK (2009) Cancer stem cell genomics: the quest for early markers of malignant progression. *Expert Rev Mol Diagn* 9:545–54. doi: 10.1586/erm.09.40
 24. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 15 Suppl 2:ii1-56. doi: 10.1093/neuonc/not151
 25. Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Yong WH, Cloughesy TF, Lazareff JA, Mischel PS, Moore TB, Kornblum HI (2010) Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 55:644–51. doi: 10.1002/pbc.22627
 26. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JYH, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR (2002) Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415:436–442. doi: 10.1038/415436a

27. Rao S, Rajeswarie RT, Chickabasaviah Yasha T, Nandeesh BN, Arivazhagan A, Santosh V (2017) LIN28A, a sensitive immunohistochemical marker for Embryonal Tumor with Multilayered Rosettes (ETMR), is also positive in a subset of Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor (AT/RT). *Child's Nerv Syst* 33:1953–1959. doi: 10.1007/s00381-017-3551-6
28. Rodini CO, Suzuki DE, Nakahata AM, Pereira MCL, Janjoppi L, Toledo SRC, Okamoto OK (2010) Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. *Arq Neuropsiquiatr* 68:947–52
29. Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, De Souza JES, Cavalheiro S, Toledo SRC, Okamoto OK (2012) Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol* 106:71–79. doi: 10.1007/s11060-011-0647-9
30. Roussel MF, Stripay JL (2018) Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. *The Cerebellum* 17:28–36. doi: 10.1007/s12311-017-0899-9
31. Santos MCT, Silva PBG, Rodini CO, Furukawa G, Marco Antonio DS, Zanotto-Filho A, Moreira JCF, Okamoto OK (2015) Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. *Stem Cells Dev* 24:2700–8. doi: 10.1089/scd.2015.0052
32. da Silva PBG, dos Santos MCT, Rodini CO, Kaid C, Pereira MCL, Furukawa G, da Cruz DSG, Goldfeder MB, Rocha CRR, Rosenberg C, Okamoto OK (2017) High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. *Oncotarget* 8. doi: 10.18632/oncotarget.15163
33. Silva PBG, Rodini CO, Kaid C, Nakahata AM, Pereira MCL, Matushita H, Costa SS, Okamoto OK (2016) Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology* 68. doi: 10.1007/s10616-015-9914-5
34. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, Kushida M, Head R, Morrissey S, Zhu X, Aviv T, Voisin V, Clarke ID, Li Y, Mungall AJ, Moore RA, Ma Y, Jones SJM, Marra MA, Malkin D, Northcott PA, Kool M, Pfister SM, Bader G, Hochdlinger K, Korshunov A, Taylor MD, Dirks PB (2014) Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell* 26:33–47. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.005
35. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339:1546–58. doi: 10.1126/science.1235122
36. Walker E, Manias JL, Chang WY, Stanford WL (2011) PCL2 modulates gene regulatory networks controlling self-renewal and commitment in embryonic stem cells. *Cell Cycle* 10:45–51. doi: 10.4161/cc.10.1.14389
37. Watson J a, Bryan K, Williams R, Popov S, Vujanic G, Coulomb A, Boccon-Gibod L, Graf N, Pritchard-Jones K, O'Sullivan M (2013) miRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PLoS One* 8:e53417. doi: 10.1371/journal.pone.0053417
38. Zhu Z, Xu Y, Zhao J, Liu Q, Feng W, Fan J, Wang P (2015) miR-367 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by targeting the Smad7-TGF- β signalling pathway. *Br J Cancer* 112:1367–1375. doi: 10.1038/bjc.2015.102

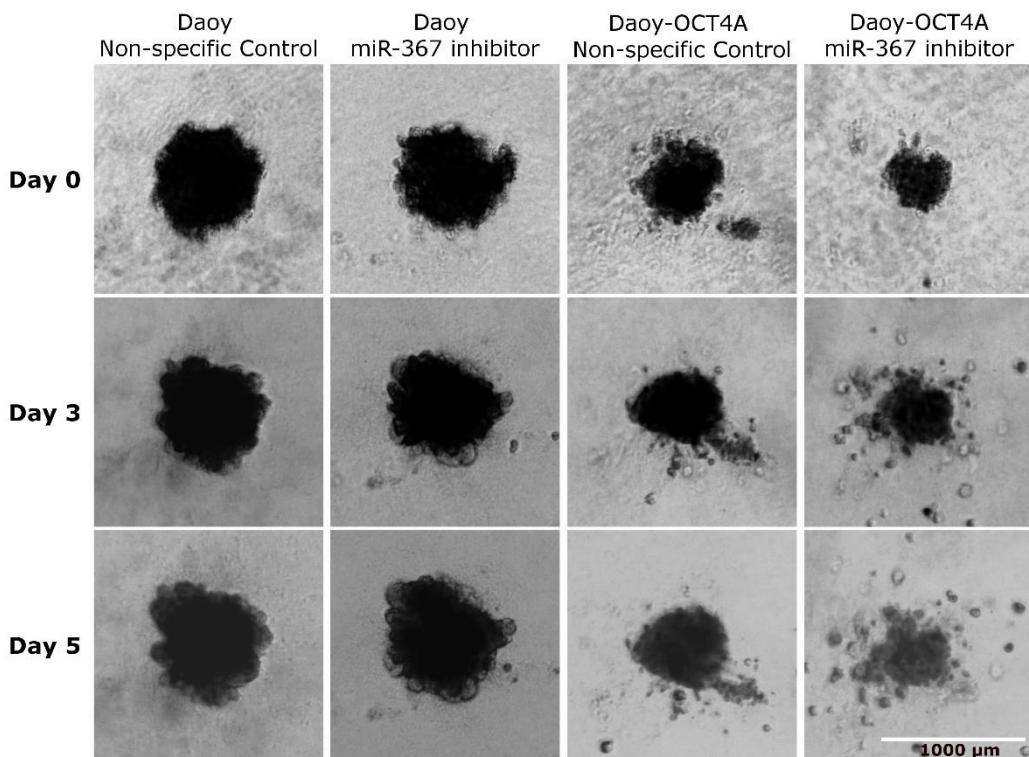
SUPPLEMENTARY MATERIAL



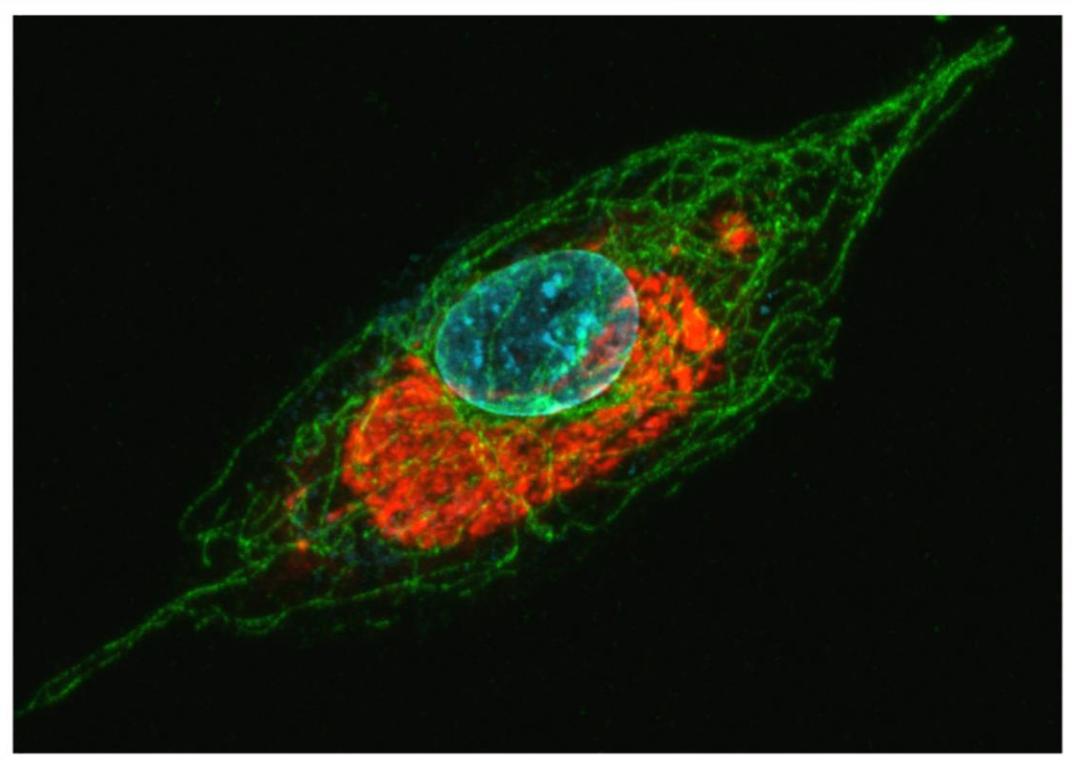
Supplementary Figure 1: Downregulation of miR-367 targets in OCT4A-basal expressing and OCT4A-overexpressing embryonal CNS cells 48 hours after miR-367 inhibitor [200 nM] or non-specific control transient transfection. (a) Itgav and Rab23 transcript levels in embryonal CNS cells, assessed by real time PCR. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, *t* test compared with respective control condition) (n=3 per each group). (c) ITGAV and RAB23 protein levels in embryonal CNS cells, assessed by western blotting. (d-e) Respective westing blot quantification is presented as a bar graph and normalized by β-Actin expression (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, *t* test compared with respective control condition) (n=3 per each group).



Supplementary Figure 2: Real-time cell analyzer curves generated OCT4A-basal expressing (blue line) and OCT4A-overexpressing (red line) embryonal CNS cells after miR-367 *inhibitor* (dotted line) or non-specific control (continuous line) transient transfections.



Supplementary Figure 3: Representative images of Daoy and Daoy-OCT4A spheroids after 3D invasion culture. The spheres were not able to invade the matrix after lipofectamine RNAiMax transfection. Scale bar: 1000 μ m.



CAPÍTULO 3: Efeito oncolítico do vírus ZIKA



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



Carolini Kaid¹, Ernesto Goulart¹, Luiz C. Caires-Júnior¹, Bruno H.S. Araujo^{2,3}, Alessandra Soares-Schanoski⁴, Heloisa M.S. Bueno¹, Kayque A.T. Silva¹, Renato M. Astray⁴, Amanda F. Assoni¹, Antônio F.R. Júnior¹, Daniella C. Ventini⁴, Ana L.P. Puglia⁴, Roselane P. Gomes⁴, Mayana Zatz¹, and Oswaldo K. Okamoto¹

Author Manuscript Published OnlineFirst on April 26, 2018;

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3201

Impact Factor: 9.122

Cancer Research Cover June 15th

Affiliations

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

²Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil.

³Neuroscience laboratory, Department of Neurology and Neurosurgery, Federal University of São Paulo - UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil.

The authors declare no potential conflicts of interest.

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

The recent outbreak of Zika virus (ZIKV), especially throughout South and Central Americas, revealed an unprecedented impact of gestational infection on neurodevelopment, resulting in severe Central Nervous System (CNS) development effects in neonates, such as microcephaly and other associated abnormalities (1). Recent studies showed that ZIKV prominently infects neural stem and progenitor cells (NPCs) and disrupts key cellular processes, e.g. survival, proliferation and differentiation (2, 3) leading to massive cell death and growth reduction.

Notably, aggressive CNS embryonal tumors with high incidence in infants are originated from NPC aberrations, affecting key cell signaling pathways that regulates neurogenesis, such as the mTOR/Wnt pathway (4). These tumors are comprised by cells with neural stem-like features, also known as cancer stem cells (CSC), which are highly tumorigenic and resistant to classical cancer therapies (5). CNS tumors enriched in stem-like cancer cells are very difficult to treat and usually associated with poor prognosis (6). Available therapies have a low efficiency and severe adverse effects that include endocrine, motor and cognitive deficits.

Oncolytic viral therapy has emerged as an alternative approach to treat aggressive, fast-growing forms of cancer. Oncolytic viruses are defined as native or genetically modified viruses that are able to directly infect and lyse tumor cells (7). Since ZIKV infects preferentially NPC, we hypothesized whether ZIKV^{BR} could act as an oncolytic agent in particular against aggressive and metastatic human CNS embryonal tumors.

MATERIALS AND METHODS

Human and animal samples

The study followed the International Ethical Guideline for Biomedical Research (CIOMS/OMS, 1985) and was approved by the Institutional Animal Experimentation Ethics Committee (CEUA-USP 290/2017; CEUA-Instituto Butantan 3473210817). A total of 66 animals were included in the present study. Animals with 30% weight loss and/or visible tumor and/or ataxia and/or freezing, were subjected to euthanasia and all efforts were made to minimize suffering. Human samples (peripheral blood and tumors) were obtained after written informed consent of the patients, according to protocol approved by the Internal Review Board (CEP-IB No. 121/2011).

Cell lines and cultures

Three embryonal CNS tumor cell lines: DAOY (medulloblastoma - ATCC® HTB-186TM), USP13-MED (medulloblastoma - in-house established) (8) and USP7-ATRT (atypical teratoid/rhabdoid tumor, in-house established); three non-CNS tumor cell lines: MCF-7 (breast cancer, ATCC® HTB-22TM), HCT-8 (colorectal cancer, ATCC® CCL-244TM) and DU-145 (prostate cancer, derived from brain metastasis, ATCC® HTB-81TM); one control human induced pluripotent stem cell (hiPSC - C2535 - in-house reprogrammed) derived NPCs and neurons were analyzed. Detailed information regarding the generation and characterization of hiPSCs, NPCs and neurons is provided in Supplementary Fig. S2. All commercial tumor cell lines were grown according to ATCC recommendations and cell authentication was performed by high-resolution karyotype analysis. USP13-MED and USP7-ATRT were isolated and characterized as previously reported (8). After thawing, all cell lines were cultured under standard conditions (5% CO_{2(g)} at 37° C) up to 4 weeks (passages 1-4), and tested for mycoplasma contamination by PCR (Cat. MP002, Sigma-Aldrich, USA), before use in the described experiments.

Zika virus strain

ZIKV^{BR} was donated by Dr. Pedro Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, Brazil. Viral stock was established in VERO cells, cultured in serum-free medium (VP SFM, Thermo scientific) after two serial passages, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 and harvesting supernatants after 72h. Virus stocks were titrated by Plaque Forming Units assay (PFU) on VERO cells.

In vitro 2D and 3D infection with ZIKV^{BR}

Cells (4.2×10^3 cells/cm²) in 2D were exposed to ZIKV^{BR} (MOI: 0.01, 0.1, 1 and 2) or Mock for 1h at 37°C, washed with culture medium, and maintained up to 72h. Tumorspheres (3D), generated and characterized as previously reported (8), were infected with MOI 1, 2 or Mock, with viral exposure for 2h to ensure complete sphere infection. ZIKV^{BR} PFU and copy numbers were analyzed from supernatant media every 24h. Total viable cells and spheres area were daily evaluated with ImageJ software.

Functional ZIKV^{BR} yielding analysis

Tumor cells were infected with ZIKV^{BR} (MOI 1), based on prior PFU results of all tested cell lines. Seventy-two hours later, culture supernatants were harvested and used to infect human NPC (8.4×10^4 cells/cm² infected with 1.26×10^6 ZIKV^{BR} viral copies). After another 72h, NPCs culture supernatants were harvested for PFU analysis in order to verify the efficiency of functional ZIKV^{BR} yielding by each tumor cell line (see Fig. 6G). The volumes used to infect NPC were calculated based on RT-qPCR results (see Fig. 1H, I and J, and Supplementary Fig. S1B, C and D).

Immunofluorescence

Brain sections and fixed tumor cells (3.7% formaldehyde for 10 min) were treated for 30 min with 0.1% Triton X-100 in 1 X PBS, prior to 2 h incubation in 5% bovine serum albumin in 1 X PBS, and then incubated overnight with the primary antibody (Table S1) at 4°C. Brain sections and cells were then washed three times in 1 X PBS, incubated with the secondary

antibody for 2 h (Table S1) and washed again three times in 1 X PBS. Cell nuclei were stained with 1 μ g/mL DAPI for 2 min. Tissue sections and tumor cells were mounted on glass slides and covers lipped with VectaShield®. All images were taken in confocal microscope (Zeiss LSM 800).

Cell death analysis

Staining for Caspase 3/7 (CellEvent, Thermo Fisher) and propidium iodide were performed in 1x10⁵ tumor cells, 72h post-infection with ZIKV^{BR}, following the manufacturers' protocol. Flow cytometry analysis was performed using FACS Aria II (BD) collecting 10,000 events per run. Analysis was carried using FlowJo software.

Wnt- β -catenin pathway modulation

Cell lines (USP7-ATRT, USP13-MED and DAOY) were cultured as previously described, with addition of CHIR99021 (Wnt pathway inductor; 5 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM or 1000 nM), IWP-2 (Wnt pathway inhibitor; 20 nM, 100 nM, 200 nM, 100 nM or 2000 nM) or DMSO (dilution reagent for CHIR99021 and IWP-2), together with ZIKV^{BR} (MOI 0.1). Seventy-two hours after viral infection, β -catenin expression (See Supplementary Material Table S1), cell death and virus titration were evaluated.

Orthotopic metastatic xenograft model/ZIKV^{BR} in vivo injection assay

Tumor cells expressing firefly luciferase were generated with pLV/Luc lentiviral vector, as previously described (9). The orthotopic metastatic model was performed as previously described in detail (10). After tumor establishment, according to cell line-dependent growth kinetics (Ti = 1 week for USP7-ATRT and 2 weeks for USP13-MED and DAOY), 2 x 10³ ZIKV^{BR} particles / 2 μ L were injected in the right lateral ventricle. Sham group were injected with DMEM, instead of tumor cells (see Figure 4A). The initial amount of animals per experimental group was $n = 10$. Few animals died during the surgery procedure and therefore could not be included in the experiment. Tumor development was assessed *in vivo* with IVIS Imaging System (PerkinElmer,

Waltham, MA, USA) as previously described (8). Metastasis classification followed M-Stage proposed by Chang's system (11). Tumor detection was confirmed by histological and immunofluorescence analyses. Tumor remission in each experimental animal was evaluated by time course analysis of normalized bioluminescence levels (photon counts) and considered if respective bioluminescence levels in T1, T2, or T3 / Ti < 1. Animal activity was monitored as described in Supplementary Material.

Molecular analysis

Gene expression profiling was determined with Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST whole-transcript arrays (GEO accession number: GSE103935.). Identification and interactome analysis of differentially expressed genes were performed with Transcriptome Analysis Console (Affymetrix) and IPA Software (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen), respectively. Whole exome sequencing was performed using Illumina's TrueSeq kits and the Illumina HiSeq sequencer. Candidate pathogenic mutations were determined by allele frequency < 0.05 in NIH 1000 Genomes Project and by SIFT and FATHMM algorithms. aCGH was performed using 60K whole-genome platform (Agilent Technologies, CA) following the manufacturer's recommendation. Detailed description is provided in Supplementary Experimental Procedures.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and three independent experiments were carried out. Data were analyzed by one-way and two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. *t* test with two-tailed unpaired test was used for pairwise comparison. Clinical and pathological parameters were analyzed by Fisher's exact test. Graphpad Prism software was used to perform all statistical analysis (version 6.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Quantification of data are represented as mean ± SEM and p-value threshold was * 0.05, ** 0.01, *** 0.001, **** 0.0001.

RESULTS

Oncolytic in vitro effects of ZIKV^{BR}

In order to evaluate ZIKV^{BR} oncolytic properties in different tumors, six human tumor cell lines were tested against various MOIs: 0.01, 0.1, 1 and 2. Three non-CNS cell lines: MCF-7, HCT-8 and DU-145 and three CNS embryonal tumor cell lines: USP13-MED (7), DAOY, and USP7-ATRT were infected in monolayer cultures (Fig. 1). Fig. 1B-1G and Supplementary Fig. S1A show that 72 hours post-infection (hpi), ZIKV^{BR} induced significant cell death and/or growth reduction in DAOY, USP13-MED and more pronounced death in USP7-ATRT, starting at MOI 0.1. At least 50% of the USP7-ATRT and USP13-MED cell populations were already infected starting at MOI 0.1 at 48 hpi. Under the same conditions, infection of DAOY cells was less effective, reaching a maximum of about 40% of infected cells at MOI 1 and 2 (Fig. 1A and K). Confocal microscopy analysis confirmed presence of ZIKV^{BR} particles within the cytoplasm (Fig. 2C). Complementary flow cytometry analysis (Fig. 2A and B) showed that ZIKV^{BR} infection significantly increased the population of propidium iodide-positive cells while caspase 3/7-positive cells remained low in all CNS tumor cell lines. On the other hand, exposure to ZIKV^{BR} had little or no effect on non-CNS tumor cell lines (Fig. 1E-G). These results indicate that ZIKV^{BR} induces death involving rupture of the plasma membrane of CNS embryonal tumor cells.

Interestingly, viral titer quantification (Fig. 1H-1J) showed that all CNS embryonal tumor cells produced high amounts of infectious viral particles starting at 24 hpi but, after 72 hpi, these cells started producing defective viral particles, indicative of host cell dysfunction (Supplementary Fig. S1B-S1D). MCF-7 and HCT-8 cells did not produce significant amounts of ZIKV^{BR} (Supplementary Fig. S1E). Of note, DU-145 cells showed high viral titers during all the infection kinetics experiment, which supports ZIKV^{BR} clinical findings of prolonged viral titers found in human semen samples (13).

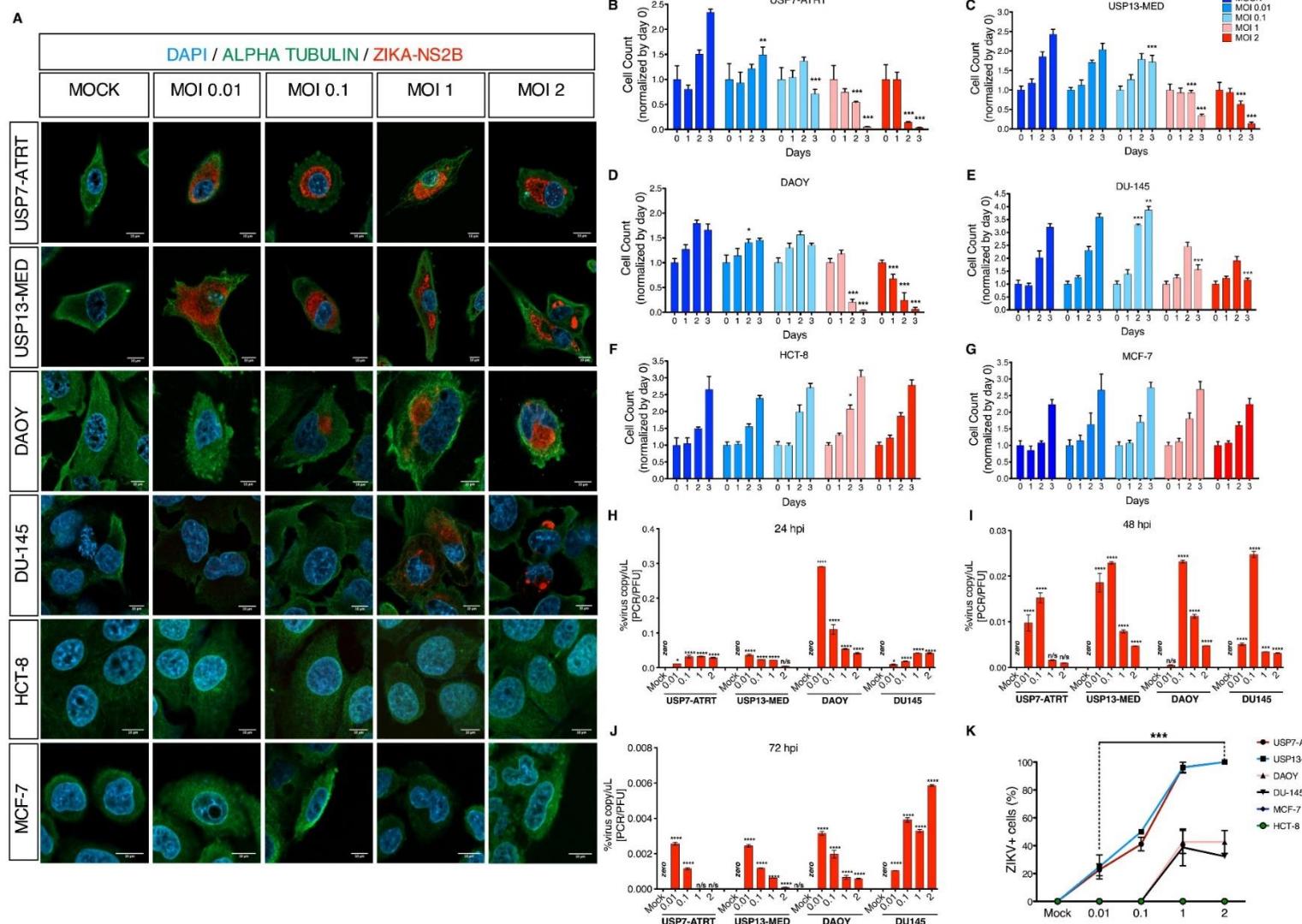
Figure 1

Fig. 1. Oncolytic effects of ZIKV^{BR} against CNS and non-CNS tumor cells *in vitro*. A) Immunofluorescence staining of ZIKV^{BR} in all conditions and cell lines at 48 hpi. Scale bar, 10µm. B-G) Total cell number of CNS and non-CNS tumor cell lines infected by ZIKV^{BR} at different MOI conditions at 24, 48 and 72 hpi. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, two-way ANOVA compared with respective day mock condition, n = 5 replicates per cell line). H-J) Percentage of PFU relative to total viral RNA copies on culture supernatants at 24, 48 and 72 hpi, respectively (****p<0.0001, two-way ANOVA always compared with respective day mock condition, n = 3 replicates per cell line). K) Percentage of ZIKV^{BR} positive stained cells of all tumor lines and conditions at 48 hpi (**p<0.001, two-way ANOVA) (n = 3 replicate per cell line). See also Supplementary Fig. S1.

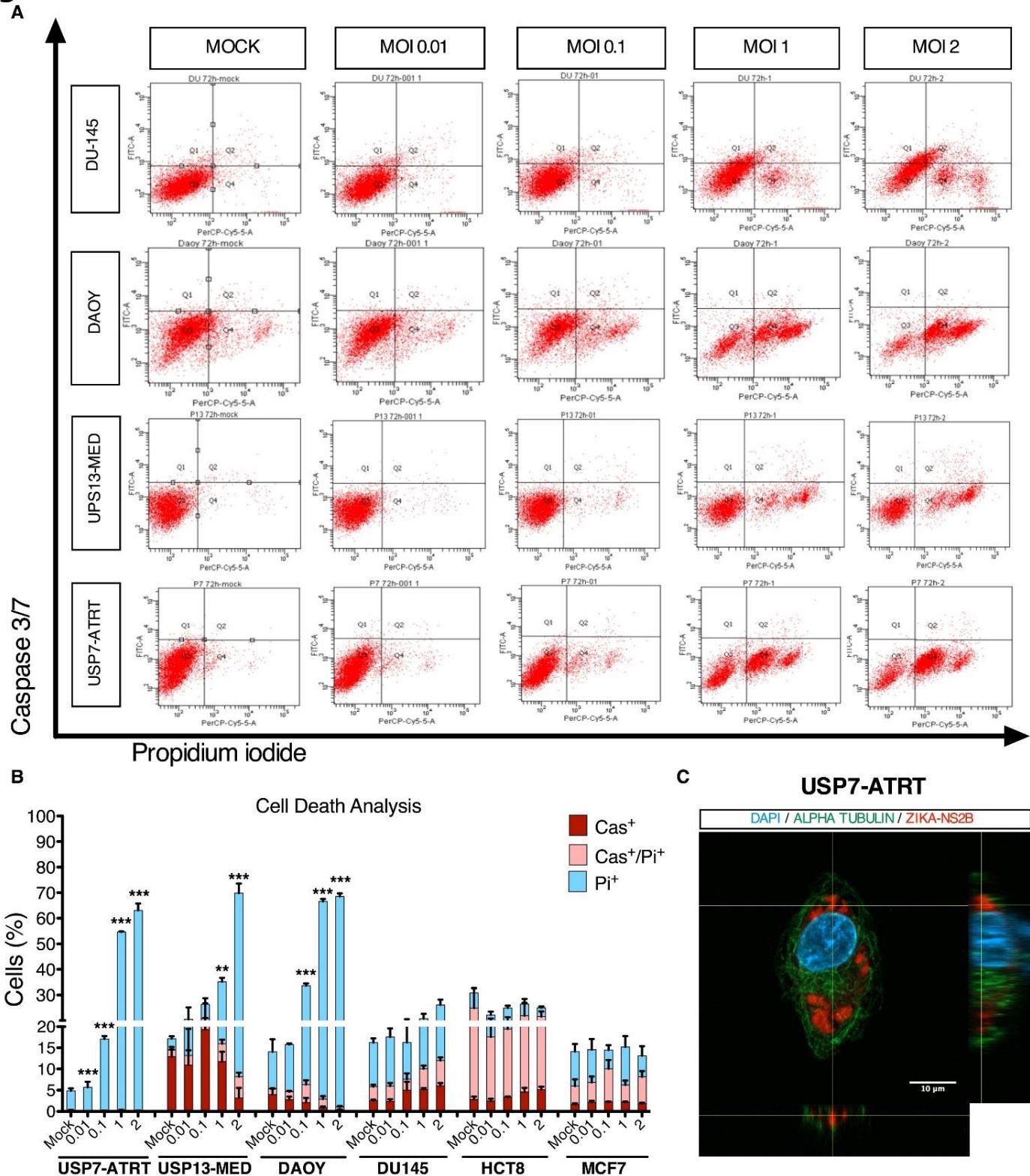
Figure 2

Fig. 2. ZIKV^{BR} induces cell death *in vitro* involving rupture of the plasma membrane. A) Flow cytometry gating and acquired events in USP7-ATRT, USP13-MED, DAOY and DU-145 cells stained for PI and Caspase at 72 hpi ($n = 3$ replicate per cell line). B) Flow cytometry staining analysis of propidium iodide (PI) and Caspase 3/7 (Cas) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA always compared with respective mock condition, $n = 3$ replicates per cell line). C) Orthogonal view of USP7-ATRT ZIKV staining.

ZIKV^{BR} oncolytic effects in tumorspheres and normal neurospheres

All tumor cell lines susceptible to ZIKV^{BR} infection were then cultured in a CSC-tumorsphere promoting system and tested in parallel with normal hiPSC-derived NPC (Fig 3 and Supplementary Fig. S2). Fig. 3A-F shows that ZIKV^{BR} significantly disrupted CNS tumorspheres and produced high viral titers, particularly in USP7-ATRT cultures. Conversely, despite infected by ZIKV^{BR}, DU-145 tumorspheres were not disrupted, reinforcing a selective oncolytic effect towards the CNS tumor cells. Compared with the cell cultures in monolayer, the 3D culture system showed a greater impact of ZIKV^{BR} on cellular viability. Interestingly, normal NPC neurospheres were less affected by ZIKV^{BR} as compared to CNS embryonal tumorspheres. Neurons derived from these normal NPC, however, were not infected by ZIKV^{BR} (Fig. 3G). Of note, single cells from dissociated CNS embryonal tumorspheres were not capable of forming new tumorspheres after ZIKV infection (Supplementary Fig. S1F and G). Together, these results suggest that proliferative tumor cells from CNS origin are more permissive to ZIKV^{BR} infection and virus mediated death than normal nervous system cells and tumors from other primary origins such as breast, colorectal and prostate.

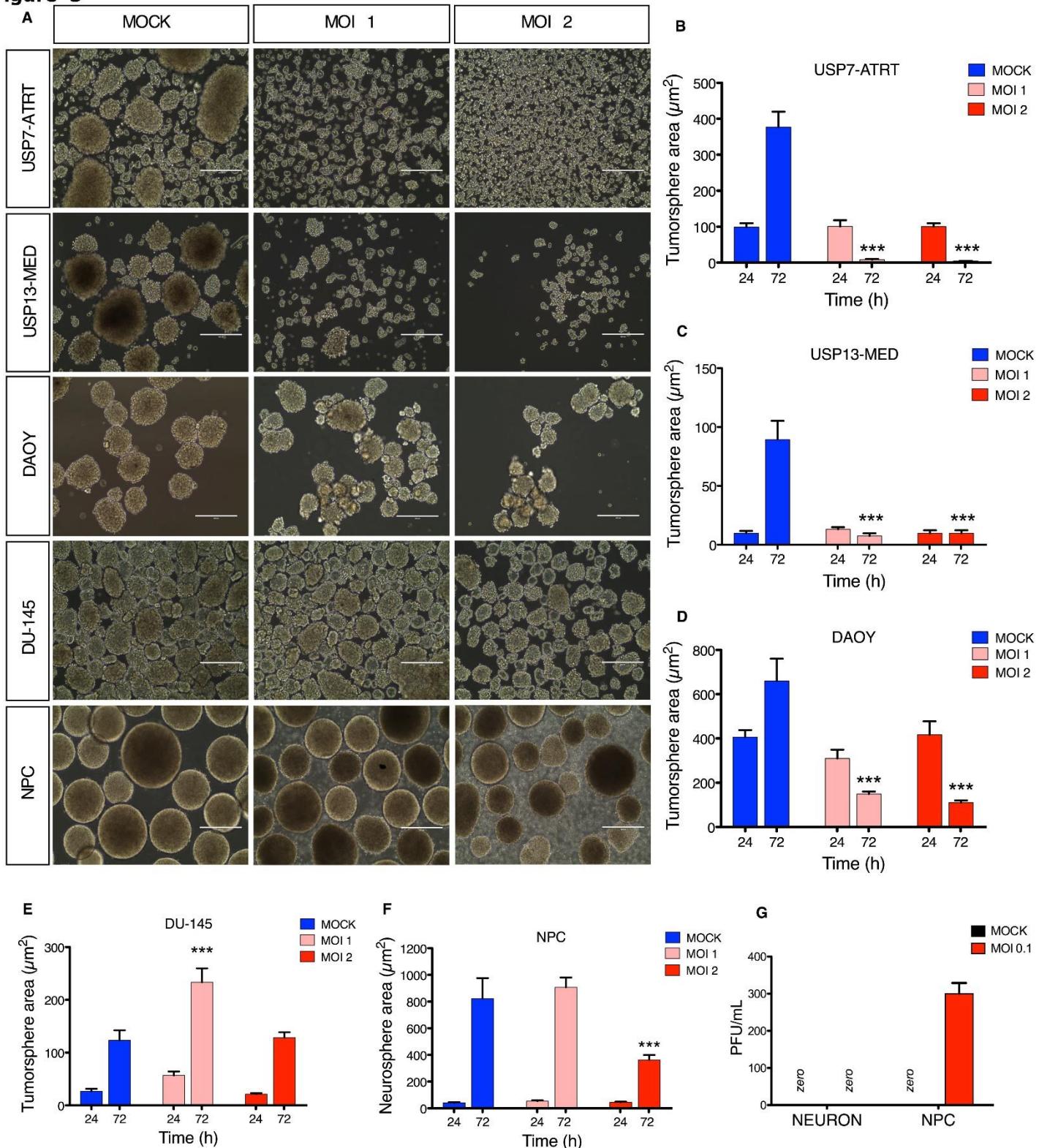
Figure 3

Fig. 3. Oncolytic effects of ZIKV^{BR} in tumorspheres and normal neurospheres. A) Representative phase contrast images of tumorspheres and neurospheres at 72 hpi. Scale bar, 400 μ m. B-F) Area quantification of USP7-ATRT, USP13-MED, DAOY, DU-145 tumorspheres and normal hiPSC-derived NPC neurospheres, after 24h and 72h of ZIKV^{BR} infection (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, two-way ANOVA always compared with respective mock condition, n = 30 tumorsphere per cell line). Scale bar, 400 μ m. G) PFU on culture supernatant 48 hours after normal hiPSC-derived NPC and Neuron ZIKV^{BR} infection (MOCK and MOI 0.1).

ZIKV^{BR} effects in tumor development and metastasis

Next, we tested ZIKV^{BR} oncolytic properties in an orthotopic xenograft animal model in BALB/c nude mice with DAOY, USP13-MED and USP7-ATRT cell lines. A single dose of 2×10^3 infectious viral particles was injected in the right ventriculum after respective tumor engraftment period of DAOY, USP13-MED and USP7-ATRT cell lines (Fig. 4A).

After few weeks of viral particles administration, striking results were observed. ZIKV^{BR} induced tumor remission in 20 out of 29 animals (USP7-ATRT: 8/10; USP13-MED: 8/9; DAOY: 4/10) (Supplementary Fig. S3A-C), seven of which achieving complete remission (two USP7-ATRT and six USP13-MED). Of note, an additional USP7-ATRT bearing mice had complete remission three weeks after ZIKV^{BR} injection, but it was not included in our analysis due to lack of imaging acquisition at the time of injection (Ti). Overall survival of USP7-ATRT tumor bearing mice was significantly improved ($p = 0.0046$) by ZIKV^{BR} treatment (Fig. 4B). Three cases of tumor relapse after complete remission were observed in ZIKV^{BR} treated animals with USP13-MED tumors. Fig. 4C, E and G show a marked reduction of USP7-ATRT and USP13-MED tumor growth ratio. A poor response of DAOY tumors to ZIKV^{BR} was detected *in vivo* (Fig. 4D), which is consistent with the relative lower rates of cell infection observed for this cell line (Fig. 1K).

Additionally, in ZIKV^{BR} treated animals, 60% (3 out of 5) of USP7-ATRT tumor bearing mice had complete metastatic remission and none of the USP13-MED tumor bearing mice developed M3 metastasis (Table 1). USP7-ATRT and USP13-MED cell lines were the only capable of generating M3 stage metastasis (tumors in the spinal cord), which occurred in 66% (6 out of 9) and 33% (3 out of 9) of animals from the mock group, respectively (Table 1).

USP7-ATRT cells formed the most aggressive tumors in our experimental model, being the only tumor cell line causing 100% of death rate in the mock control group within 30 days of experimental follow-up. The same poor survival was observed in mice orthotopically injected in low density of cell (2×10^5 per animal) (Supplementary Fig. S4C-G). The ATRT cell line was able

to generate M2 and M3 metastatic tumors after one week (Supplementary Fig. S4A and B, Supplementary Fig. S5A).

Histological analysis confirmed necrotic tumor foci and ZIKV^{BR} positive tumor cells in brain tissue of USP7-ATRT and USP13-MED tumor bearing mice (Fig 4F and Supplementary Fig. S5A), but significant improvement in overall survival was detected only for animals bearing USP7-ATRT tumors (Supplementary Fig. S5B and C). In tumor bearing mice, viral titer in brain, spinal cord, peripheral blood and spleen indicated that ZIKV^{BR} infection was more consistently persistent and restricted to host CNS at the time of euthanasia (Supplementary Fig. S5E). Interestingly, sham animals (without tumor cell injection) that were only infected with ZIKV^{BR} had persistent virus in peripheral blood, brain, spinal cord and spleen and decreased survival rate as compared to those bearing tumors (Supplementary Fig. S5D, S5F and S5G). These results are in agreement with the observation of high non-infectious viral particles production by host tumor cells, especially USP7-ATRT (Fig. 1H-J). The ZIKV^{BR}-mediated cell lysis in USP7-ATRT is so intense that it rapidly destroys tumor sites hampering viral infection amplification.

To address this question, USP7-ATRT, USP13-MED, and DAOY cells were first infected with MOI 1 ZIKV^{BR} and, 72h post tumor cell infection, respective supernatants of these cell cultures containing the same amount of ZIKV^{BR} copies were used to infect normal NPC at 72 hpi. In this cross-infection experiment, NPC infection with USP7-ATRT and USP13-MED supernatants did not produce functional ZIKV^{BR} particles, while infection with DAOY supernatant produced relatively few functional ZIKV^{BR} particles (Fig. 6G).

Figure 4

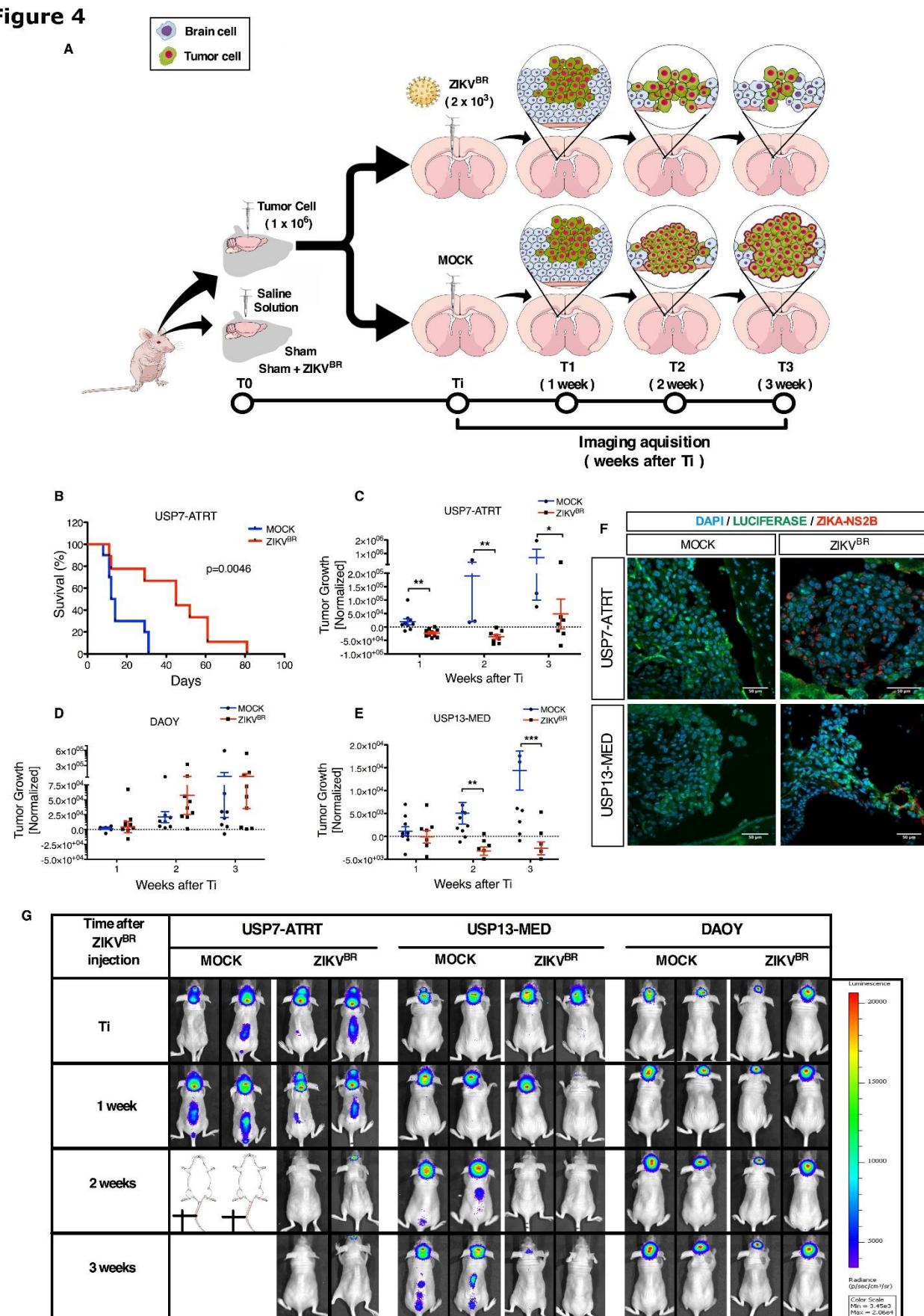


Fig. 4. Oncolytic effects of single intracerebroventricular ZIKV^{BR} administration in mice bearing orthotopic CNS embryonal tumor xenografts. A) Visual representation of the in vivo experimental layout. B) Overall survival rates of USP7-ATRT tumor bearing mice (*p<0.05, log-rank Mantel-Cox test) (n = 10 per ZIKV^{BR} group and n = 9 per MOCK group). C-E) Bioluminescence-based analysis of USP7-ATRT, USP13-MED and DAOY tumor development (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, two-way ANOVA always compared with respective mock condition); n = 10 per ZIKV^{BR} group (red) and n = 9 per MOCK group (blue). F) Representative images of brain tissue immunofluorescent staining for firefly luciferase-positive tumor cells and ZIKV^{BR} from tumor bearing mice. See also Supplementary Fig. S5. G) Representative bioluminescence-based images of tumor development in control (mock) and ZIKV^{BR}-treated mice (n = 10 per ZIKV^{BR} group and n = 9 per MOCK group). Scale bar, 50μm.

NPC-like tumor cells are more prone to ZIKV^{BR}-mediated oncolysis

Among the tumor cell lines tested, USP7-ATRT and USP13-MED displayed the highest levels of viral infection, USP7-ATRT being the most sensitive to ZIKV^{BR} mediated oncolysis. USP7-ATRT cells are highly invasive and proliferative, with a population doubling time (PDT) of 24.16 h (Supplementary Fig. S6A-C). However, the higher USP7-ATRT sensitivity to ZIKV^{BR} is unlikely related to cell proliferation rates since its population doubling time is equivalent of those from USP13-MED (24.5 h) and DAOY (29.8 h) cells (8). Also, both USP7-ATRT and USP13-MED (8) cell lines are enriched in highly tumorigenic CSC with increased resistance to chemotherapeutic agents and capability of generating tumorspheres (Supplementary Fig. S6D-H).

A more detailed analysis, integrating whole exome sequencing, chromosomal copy number aberrations, and global gene expression profiling, revealed TP53, CDKN1A, CTNNB1 and CCND1 as hotspots of an interactome map of affected proteins in USP7-ATRT cells (Fig. 5). Interestingly, the molecular profile of USP7-ATRT is consistent with SMARCB1/INI1-positive type of ATRT (Supplementary Fig. S6), known to be closely related to normal neural stem cells (14). In fact, USP7-ATRT cells express typical neural stem cell markers (Fig. 5A, 5B), and a comparative global gene expression profiling revealed a stronger similarity of USP7-ATRT cells with normal NPC than with other CNS embryonal tumors (Fig. 5C, 5E, 5F). In addition, USP7-ATRT cells and NPC are highly similar regarding the pattern of expression of TAM receptor genes and other genes associated with ZIKV^{BR} cellular entry (15, 16, 17) (Fig. 5D). Such neural stem cell molecular fingerprint is correlated with a higher sensitivity of USP7-ATRT cells to ZIKV^{BR}-mediated oncolysis, as compared with the other tumor cell lines.

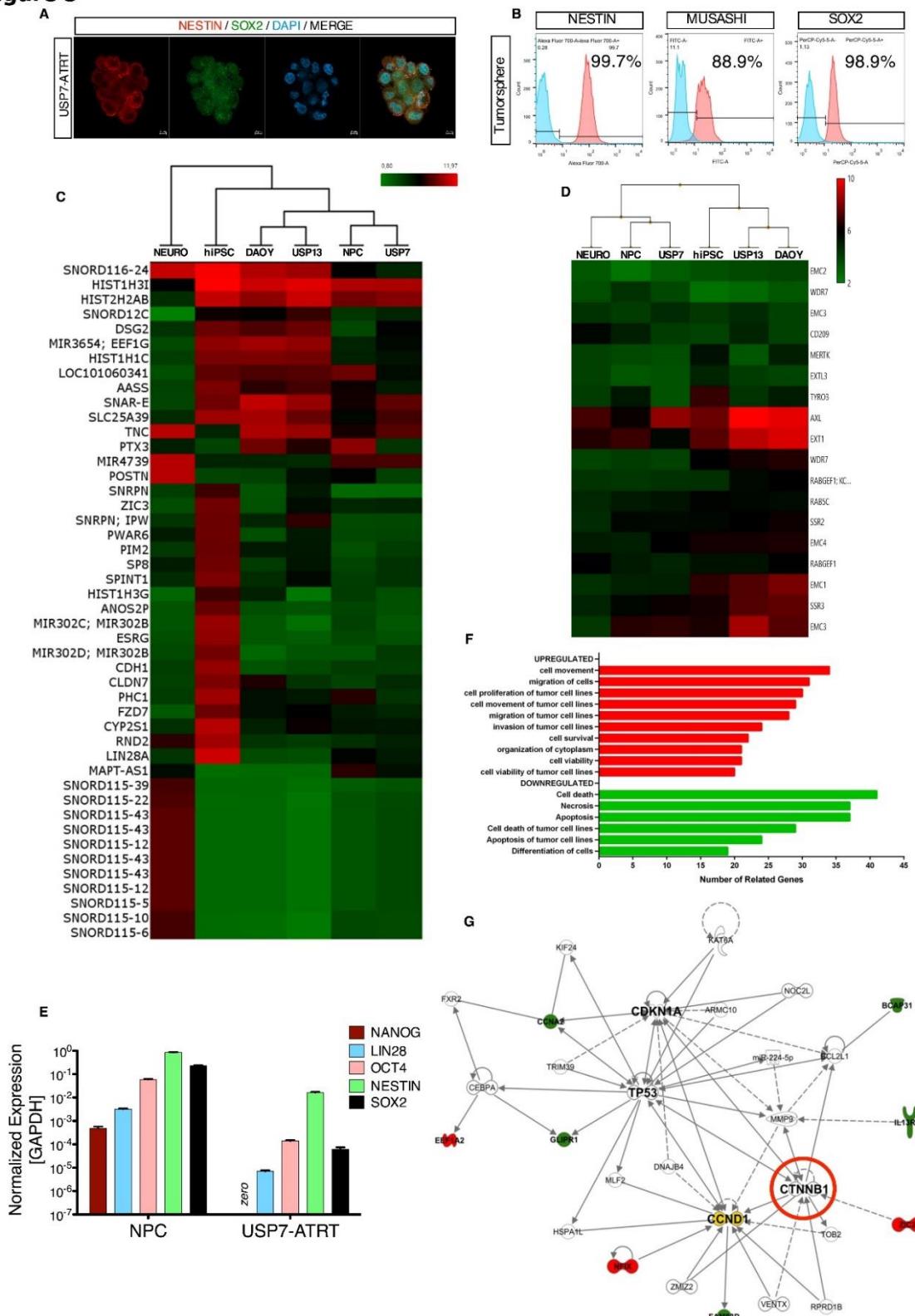
Figure 5

Fig. 5. USP7-ATRT gene profiling is more similar with NPC than with other CNS embryonal tumors. A and B) Nestin and SOX2 immunofluorescence staining and Nestin, SOX2 and Musashi-1 flow cytometry analysis of USP7-ATRT tumorspheres ($n = 3$ replicates). Scale bar, 5 μ m. C and D) Cluster analysis of commonly differentiated expressed genes in all tumor cell lines prior to ZIKV^{BR} infection (C) and ZIKV^{BR} predict targets among non-infected embryonic CNS tumor cell lines and hiPSC and hiPSC derived NPCs and neurons (D). Data are presented as average normalized signal in Log2 ($n = 2$ replicates per cell line). E) Expression profile of stem cell and neural stem cell markers in USP7-ATRT and hiPSC derived NPCs by real-time PCR. F) Main functional categories and signaling pathways associated with upregulated or downregulated genes in USP7-ATRT cells relative to normal cerebellum. Genes were functionally classified according to Ensembl definition. G) Interactome mapping of proteins affected in USP7-ATRT cells, as indicated by an integrated analysis of global gene expression profiling prior to ZIKV^{BR}, chromosome copy number aberration by aCGH, and whole exome sequencing data. See also Supplementary Fig. S2 and S6.

Wnt/β-catenin activity modulates ZIKV^{BR}-induced oncolysis and efficient viral replication in tumor cells

USP7-ATRT was the most sensitive cell line to the oncolytic properties of ZIKV^{BR} and the comparative molecular analysis suggested that the Wnt pathway is hyperactive in this specific tumor cell line (Fig. 5G). Given the involvement of the Wnt pathway in normal neural development and tumorigenesis, we further investigated a possible role of Wnt/β-catenin signaling in ZIKV^{BR} susceptibility.

All CNS embryonal tumor cell lines were treated with CHIR99021 or IWP-2, an activator and an inhibitor of Wnt/β-catenin signaling, respectively. Both small molecules were not cytotoxic in mock infected cells at the concentrations used in this study for all cell lines tested (Supplementary Fig.S7A-B). The CHIR99021 treatment significantly increased ZIKV^{BR}-mediated oncolysis of USP7-ATRT and USP13-MED cells, while IWP-2 treatment significantly attenuated such virus effect in USP7-ATRT (Fig. 6A-B and Supplementary Fig. S7C-F). Although unlikely, a possible cytotoxicity due to a synergistic effect of ZIKV^{BR} and CHIR99021 cannot be ruled out. ZIKV^{BR}-induced oncolysis was not affected by both treatments in DAOY cell line (Fig. 6C and Supplementary Fig. S7G-H). Western Blotting analysis showed that CHIR99021 treatment efficiently modulated β-catenin expression in USP7-ATRT and USP13-MED, but not in DAOY (Fig. 6D and E). β-catenin expression was altered by IWP-2 only in USP7-ATRT cell line (Fig. 6E). Basal β-catenin levels were significantly higher in USP7-ATRT (Fig. 6E) compared with the other cell lines, confirming the previous global gene expression findings (Fig. 5G). CHIR99021 treatment also reduced efficient viral replication in USP7-ATRT cells (Fig. 6F).

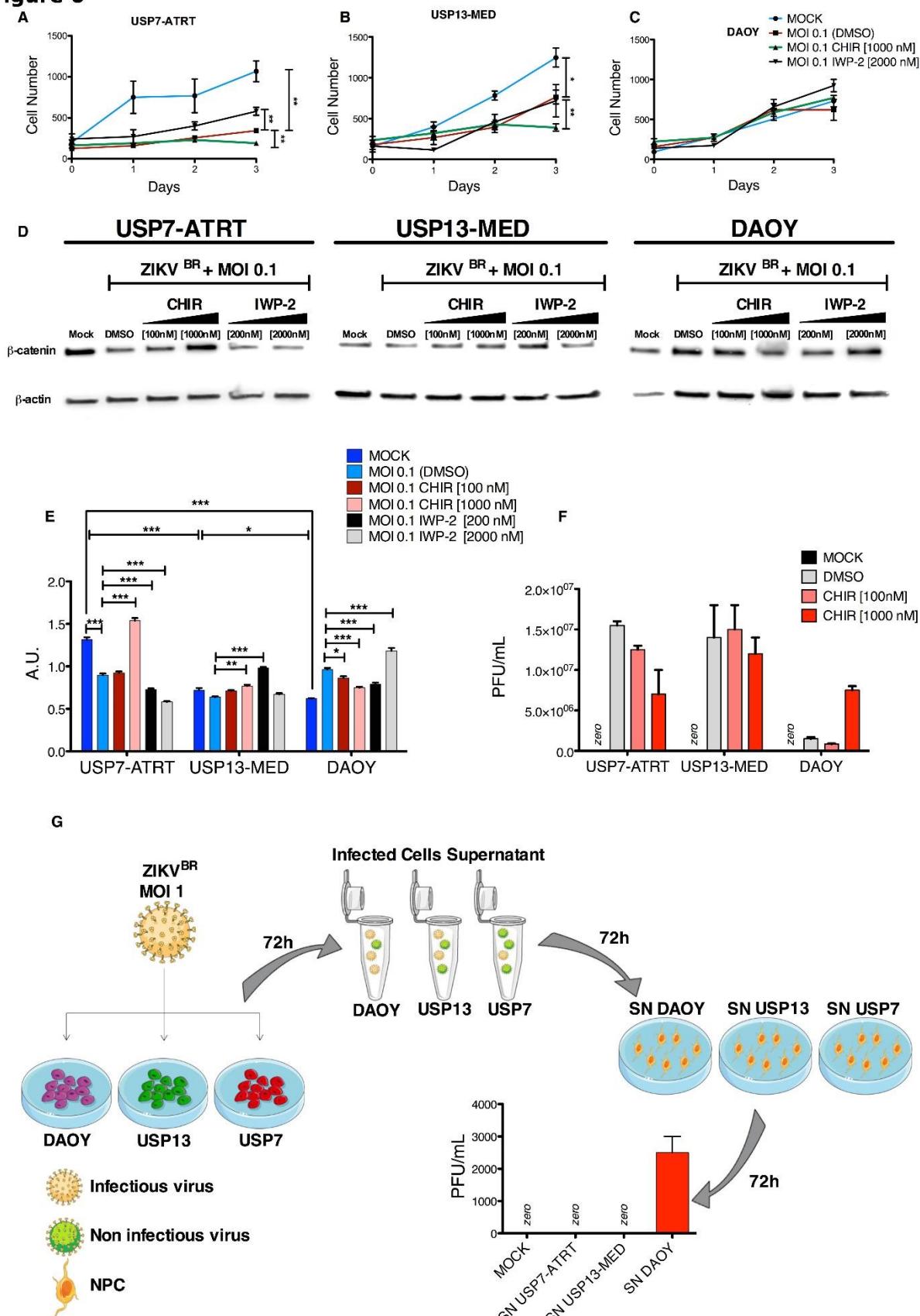
Figure 6

Fig. 6. ZIKV^{BR} oncolysis in response to Wnt/β-catenin activity modulation. A-C) Cell counting of ZIKV^{BR}-infected tumor cells (MOI 0.1) treated with CHIR99021 or IWP-2 for 72 hours (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, non-linear fit curve test) (n = 4 per group). D) Western blotting of β-catenin of all tumor cell lines after 72 hpi and treated with CHIR99021 or IWP-2. E) β-catenin western blotting analysis (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test) (n = 3 per group). F) PFU/mL of culture supernatant at 72 hpi and treated with CHIR99021 (n = 2, technical replicates). G) Schematic representation of tumor cell lines and NPC cross-infection experiment and result (n = 2, technical replicates).

DISCUSSION

Here we compared six cell lines from five different human tumors (breast, prostate, colon rectal, and two different CNS embryonal tumors: ATRT and Medulloblastoma), normal human NPC and neurons. We show that ZIKV^{BR} oncolytic effects are not generalized to all kinds of cancer, but more specific to CNS tumors. Interestingly, we observed that ZIKV^{BR} kills CNS tumor cells more efficiently than normal NPC and that distinct CNS tumors may have differential sensitivity to ZIKV^{BR}, indicating a selective oncolytic property. Notably, ZIKV^{BR} injection improved overall survival, induced tumor remission and effectively inhibited metastatic spread of human CNS tumor xenografts in athymic nude mice.

To our knowledge, this is the first study demonstrating oncolytic effects of ZIKV^{BR} against human tumor cells *in vivo*. A very recent study by Zhu et al (18) reported that ZIKV can also infect and inhibit mouse glioblastoma in syngeneic mice, improving survival. However, it is known that animal models not always recapitulate human pathologies. Furthermore, these authors also showed that ZIKV can destroy human glioblastoma cells *in vitro*, but at a relatively high MOI of 5, for much longer periods of time (2-4 weeks), as compared with the lower 0.01-2 MOI range tested in our study up to 72 hours.

The demonstration of selective oncolytic effects at low infection rates is highly relevant regarding safety in possible clinical trials. Some studies reported prolonged viral shed in human CNS (19) but very few cases were reported in the literature as lethal ZIKV associated infection (20). Postnatal, infant and adult infection rarely results in clinically relevant findings (e.g. conjunctivitis (21), Gillan-Barré syndrome (22) and encephalitis (20)). Nonetheless, most ZIKV infected individuals remain asymptomatic (23) and, in general, prognosis of ZIKV infection is largely uneventful with few or no intervention required.

In our pre-clinical study, conjunctivitis, ataxia, inflammation and behavior abnormalities were not detected in any of the experimental animal subjects. Interestingly, upon ZIKV^{BR} infection, overall survival of tumor-bearing mice was higher than that of sham animals. This

higher mortality of control immunosuppressed mice raises an important safety issue and alert for possible adverse effects that can not be ignored in future clinical development steps. Cross-infection experiments suggest that this effect may involve low production of functional viral particles by the infected tumor cells. The *in vitro* dose escalation study at different time points also showed that infection with increasing virus MOI correlate with increasing tumor cell death and lower virus replication. This pattern was observed for the CNS tumor cell lines, with USP7-ATRT being the most affected cells. However, in this scenario, establishing optimal ZIKV dosing scheme required for efficient treatment of CNS tumors is paramount.

This lower virus replication in tumor cells can be explained by the fact that virus use the host cell machinery to complete their replication. Thus, virus replication requires alive and fully functional host cells. In fact, death of host cells is a well-known defense mechanism that limits virus replication in infected cells and some viruses encode cell death inhibitors to circumvent this defense and facilitate their own replication (24).

Among the CNS embryonal tumor cells lines, USP7-ATRT displayed the highest sensitivity to ZIKV^{BR}, which may be partly explained by the fact that ATRT is originated from early neural stem cells and neuroprogenitors (25), while medulloblastoma is thought to originate from more mature granular neurons and their progenitors (26). A closer molecular similarity of USP7-ATRT with NPC than with the other tumor cell lines was indeed confirmed by an integrated molecular study, which also highlighted CTNNB1 as a key affected protein in USP7-ATRT cells.

Unbalanced regulation of Wnt signaling effectors, like CTNNB1, are common in ATRT (27). The relevance of Wnt signaling pathway to normal neural development is also well established (28). Our functional study revealed that activation of Wnt signaling in USP7-ATRT increased ZIKV^{BR}-induced tumor cell death, whereas inhibition of Wnt signaling decreased ZIKV^{BR}-induced cell death. Future alternative complementary genetic approaches should also be considered to corroborate these findings obtained with small molecules. Interestingly, an independent study using human NPC obtained from discordant dizygotic twins for congenital

Zika syndrome found a similar involvement of the Wnt signaling pathway regarding differential sensitivity of NPC to ZIKV^{BR} infection (29). Translating these results to the clinical setting, patients with aggressive ATRT and Medulloblastoma should be good candidates for a future oncolytic therapy with ZIKV^{BR}, since Wnt pathway activation plays an important role in the biology of both tumor types (27, 30), contributing to stemness and therapeutic resistance (31, 32). Importantly, observed metastasis remission also suggests that a possible treatment exploring ZIKV^{BR} oncolytic effects could benefit patients with advanced and disseminated disease. Pursue of attenuated forms of ZIKV and genetic modifications to avoid adverse effects and neutralization by the host immune system should facilitate a safe transition to clinical trials. Oncolytic viral therapy using modified Herpes simplex virus type I for melanoma has been approved by the FDA and one clinical trial using H1-parvovirus therapy for glioblastoma is currently on phase I (33).

In conclusion, ZIKV^{BR} has strong and specific oncolytic property against human CNS embryonal tumor cells, as demonstrated by both *in vitro* and *in vivo* assays. Our results show that ZIKV^{BR} induces massive death of highly proliferative tumor cells at a MOI as low as 0.1. Selective infection of tumor cells results in low production of functional viral particles. Significant CNS tumor remission and spinal cord metastasis inhibition was also achieved after a single ZIKV^{BR} infection in tumor bearing mice with relatively low amount of virus particles. These effects were more prominent in tumors generated by neural stem-like cancer cells with high Wnt/β-catenin basal activity. It is reasonable to speculate that other signaling pathways might contribute to tumor cell-dependent susceptibility to ZIKA-induced oncolysis, which should be further investigated. Our findings provide novel mechanistic insights and open new perspectives for future investigations using ZIKV^{BR} strains or engineered mimicking derivative approaches to treat patients affected by highly aggressive and metastatic CNS tumors lacking effective treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Patricia Semedo-Kuriki and Dr. Vivek Kumar for helping with cytometry assay and neuron differentiation, respectively. This study was supported by grants from FAPESP (CEPID number 2013/08028-1 and INCT to M. Zatz and O.K.Okamoto); C. Kaid is a fellow of CAPES (1379594); E. Goulart, A. F. Assoni, B. H. S. Araujo and L.C. Caires Júnior are fellows of FAPESP (2015/14821-1; 2016/09707-8; 2014/08049-1; 2017/16283-2).

Data and materials availability: Original data are curated and stored in the server of the Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CELL). Requests for data can be sent to mayazatz@usp.br and keith.okamoto@usp.br.

Author contributions: C.K; E.G; L.C.C.J; B.H.S.A; A.S.S; H.M.S.B; K.A.T.S; R.M.A; D.C.V; A.A; A.L.P.P; P.S.K; M.Z and O.K.O; designed the experiments, analyzed and discussed data. C.K; E.G; L.C.C.J; B.H.S.A; A.S.S; H.M.S.B; K.A.T.S; R.M.A; D.C.V; A.A.; R.P.G. and A.L.P.P. performed the experiments. C.K; E.G; L.C.C.J; B.H.S.A; A.S.S; M.Z. and O.K.O. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

REFERENCES

- 1- Brasil, P., Pereira, J.P., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.A., Salles, T.S. et al. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 375, 2321–2334.
- 2- Gabriel, E., Ramani, A., Karow, U., Gottardo, M., Natarajan, K., Gooi, L.M., Goranci-Buzhala, G., Krut, O., Peters, F., Nikolic, M. et al. (2017). Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* 20, 397–406.e5.
- 3- Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Regla-Nava, J.A., Chai, G., Sheets, N., Tang, W., Terskikh, A.V., Shresta, S., and Gleeson, J.G. (2016). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598.
- 4- Xie, Z. (2009). Brain tumor stem cells. *Neurochem Res* 34, 2055–2066.
- 5- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283–296.
- 6- Panosyan, E.H., Laks, D.R., Masterman-Smith, M., Mottahedeh, J., Yong, W.H., Cloughesy, T.F., Lazareff, J.A., Mischel, P.S., Moore, T.B., and Kornblum, H.I. (2010). Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 55, 644–651.
- 7- Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., Zloza, A., (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Sep;14(9):642-62.
- 8- Silva, P.B., Rodini, C.O., Kaid, C., Nakahata, A.M., Pereira, M.C., Matushita, H., Costa, S.S., and Okamoto, O.K. (2016). Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. *Cytotechnology* 68, 1545–1560.
- 9- Rocha, C.R., Garcia, C.C., Vieira, D.B., Quinet, A., de Andrade-Lima, L.C., Munford, V., Belizário, J.E., and Menck, C.F. (2014). Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 5, e1505.
- 10- Studebaker, A.W., Hutzen, B., Pierson, C.R., Russell, S.J., Galanis, E., and Raffel, C. (2012). Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. *Neuro Oncol* 14, 459–470.
- 11- Zeltzer, P.M., Boyett, J.M., Finlay, J.L., Albright, A.L., Rorke, L.B., Milstein, J.M., Allen, J.C., Stevens, K.R., Stanley, P., Li, H. et al. (1999). Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 17, 832–845.
- 12- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (2009). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. Blackwell Publishing, Vol. 57, No. 1, pp. 289-300.
- 13- Mansuy, J.M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., Izopet, J., and Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen. *Lancet Infect Dis* 16, 405.
- 14- Ho, D.M., Shih, C.C., Liang, M.L., Tsai, C.Y., Hsieh, T.H., Tsai, C.H., Lin, S.C., Chang, T.Y., Chao, M.E., Wang, H.W. et al. (2015). Integrated genomics has identified a new ATRT-like yet INI1-positive brain tumor subtype among primary pediatric embryonal tumors. *BMC Med Genomics* 8, 32.
- 15- Savidis, G., McDougall, W.M., Meraner, P., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Trincucci, G., John, S.P., Aker, A.M., Renzette, N., Robbins, D.R., Guo, Z., Green, S., Kowalik, T.F., Brass, A.L. (2016). Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics. *Cell Rep.* 16, 232–246.

- 16- Marceau, C., Puschnik, A.S., Majzoub, K., Ooi, Y.S., Brewer, S.M., Fuchs, G., Swaminathan, K., Mata, M.A., Elias, J.E., Sarnow, P., Carette, J.E. (2016). Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*, vol: 535 (7610) pp: 159-163
- 17- Zhang, R., Miner, J.J., Gorman, M.J., Rausch, K., Ramage, H., White, J.P., Zuiani, A., Zhang, P., Fernandez, E., Zhang, Q., Dowd, K.A., Pierson, T.C., Cherry, S., Diamond, M.S. (2016). A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature*, Jul 7;535(7610):164-8.
- 18- Zhu, Z., Gorman, M.J., McKenzie, L.D., Chai, J.N., Hubert, C.G., Prager, B.C., Fernandez, E., Richner, J.M., Zhang, R., Shan, C. et al. (2017). Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med*
- 19- Bhatnagar, J., Rabeneck, D.B., Martines, R.B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L.B., Suzuki, T., Ritter, J., Keating, M.K., Hale, G. et al. (2017). Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis* 23, 405-414.
- 20- Soares, C.N., Brasil, P., Carrera, R.M., Sequeira, P., de Filippis, A.B., Borges, V.A., Theophilo, F., Ellul, M.A., and Solomon, T. (2016). Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. *J Clin Virol* 83, 63-65.
- 21- Peterson, L.R., Jamieson, D.J., Honein, M.A. (2016). Zika Virus. *N Engl J Med*, Jul 21;375(3):294-5
- 22- Cao-Lormeau, V., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. *Lancet* (London, England), 387(10027), 1531-1539.
- 23- Moghadas, S.M., Shoukat, A., Espindola, A.L., Pereira, R.S., Abdirizak, F., Laskowski, M., Viboud, C., and Chowell, G. (2017). Asymptomatic Transmission and the Dynamics of Zika Infection. *Sci Rep* 7, 5829.
- 24- Upton, J., and Chan, F. (2014). Staying alive: cell death in antiviral immunity. *Mol Cell*, Apr 24;54(2):273-80
- 25- Han, Z., Richer, W., Fréneaux, P., Chauvin, C., Lucchesi, C., et al. (2016). The occurrence of intracranial rhabdoid tumours in mice depends on temporal control of Smarcb1 inactivation. *Nat Commun*. Jan 28;7:10421.
- 26- Moreno, N., Schmidt, C., Ahlfeld, J., Poschl, J., Dittmar, S. et al. (2014). Loss of Smarc Proteins Impairs Cerebellar Development. *Journal of Neuroscience*, vol: 34 (40) pp: 13486-13491.
- 27- Chakravadhanula, M., Hampton, C.N., Chodavadia, P., Ozols, V., Zhou, L., Catchpoole, D., Xu, J., Erdreich-Epstein, A., Bhardwaj, R.D. (2014). Wnt pathway in atypical teratoid rhabdoid tumors. *Neuro-Oncology*, Vol 17, 4:526-535.
- 28- Pfister, S.M., Korshunov, A., Kool, M., Hasselblatt, M., Eberhart, C., and Taylor, M.D. (2010). Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol* 120, 553-566.
- 29- Caires-Júnior, L.C., Goulart, E., Melo, U.S., Araujo, B.H.S, Alvizi, L., et al. (2018). Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Comm*. doi 10.1038/s41467-017-02790-9.
- 30- Northcott, P., Buchhalter, I., Morrissey, A., Hovestadt, V., Weischenfeldt, J. et al. (2017). The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*, Jul 19;547(7663):311-317.
- 31- McCord, M., Mukouyama, Y., Gilbert, M.R., Jackson, S. (2017). Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Oct 13;11:318
- 32- Cho, Y.J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., et al., (2011). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol*. Apr 10;29(11):1424-30.
- 33- Lawler, S.E., Speranza, M.C., Cho, C.F., Chiocca, E.A. (2017). Oncolytic Viruses in Cancer Treatment. *JAMA Oncology*, Vol 3, 6:841.

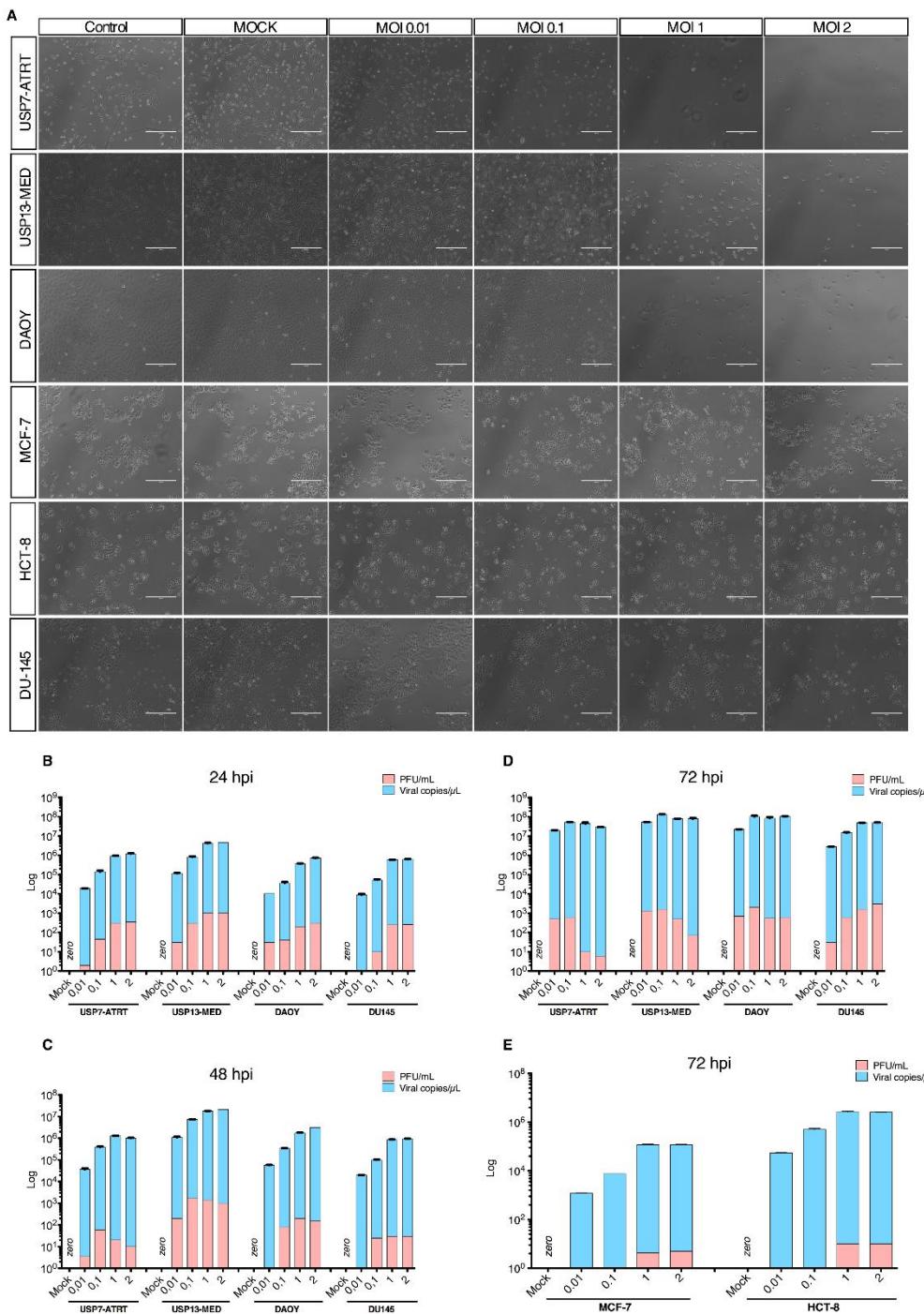
TABLES

Table 1. Clinical and pathological parameters of BALB/c nude mice bearing orthotopic human embryonal CNS tumor cells and subjected to ZIKV^{BR} infection. Events expressed in ratios of number of animals/group/time of injection (Ti). Weight gain and weight loss correspond to 10-30% alteration based on the initial animal body weight along time. M3 corresponds to advanced stage of tumor metastasis in the neural axis, according to Chang's staging system (Zeltzer et al., 1999). Statistical analysis following Fisher's exact test (*p<0.05; ***p<0.001).

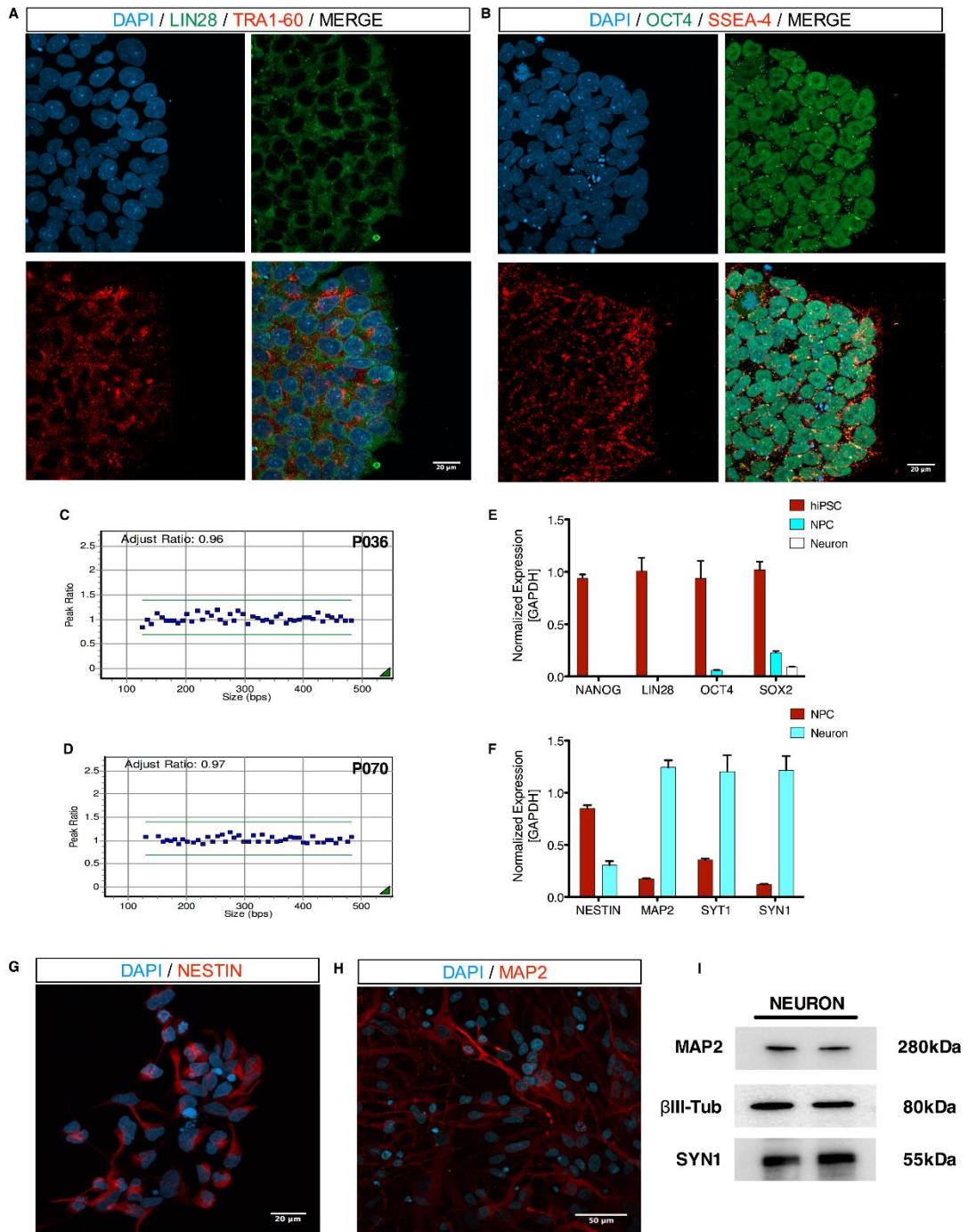
Tumor	USP7-ATRT		USP13-MED		DAOY	
	Ti	Mock	ZIKV^{BR}	Mock	ZIKV^{BR}	Mock
Activity Gain	0/4	2/4	1/4	0/4	3/4	3/4
Weight Gain	1/9	7/10*	4/9	5/9	5/9	6/10
Weight Loss	8/9*	4/10	6/9	4/9	2/9	7/10
Event M3	6/9	5/10	3/9	0/9	0/9	2/10
Tumor Remission	0/9	8/10***	0/9	8/9***	0/9	4/10
Tumor Relapse	-	2/8	-	4/9	-	4/4
M3 Remission	0/7	3/5	0/3	-	-	-
M3 Recover	-	0/3	-	-	-	-

SUPPLEMENTARY INFORMATION

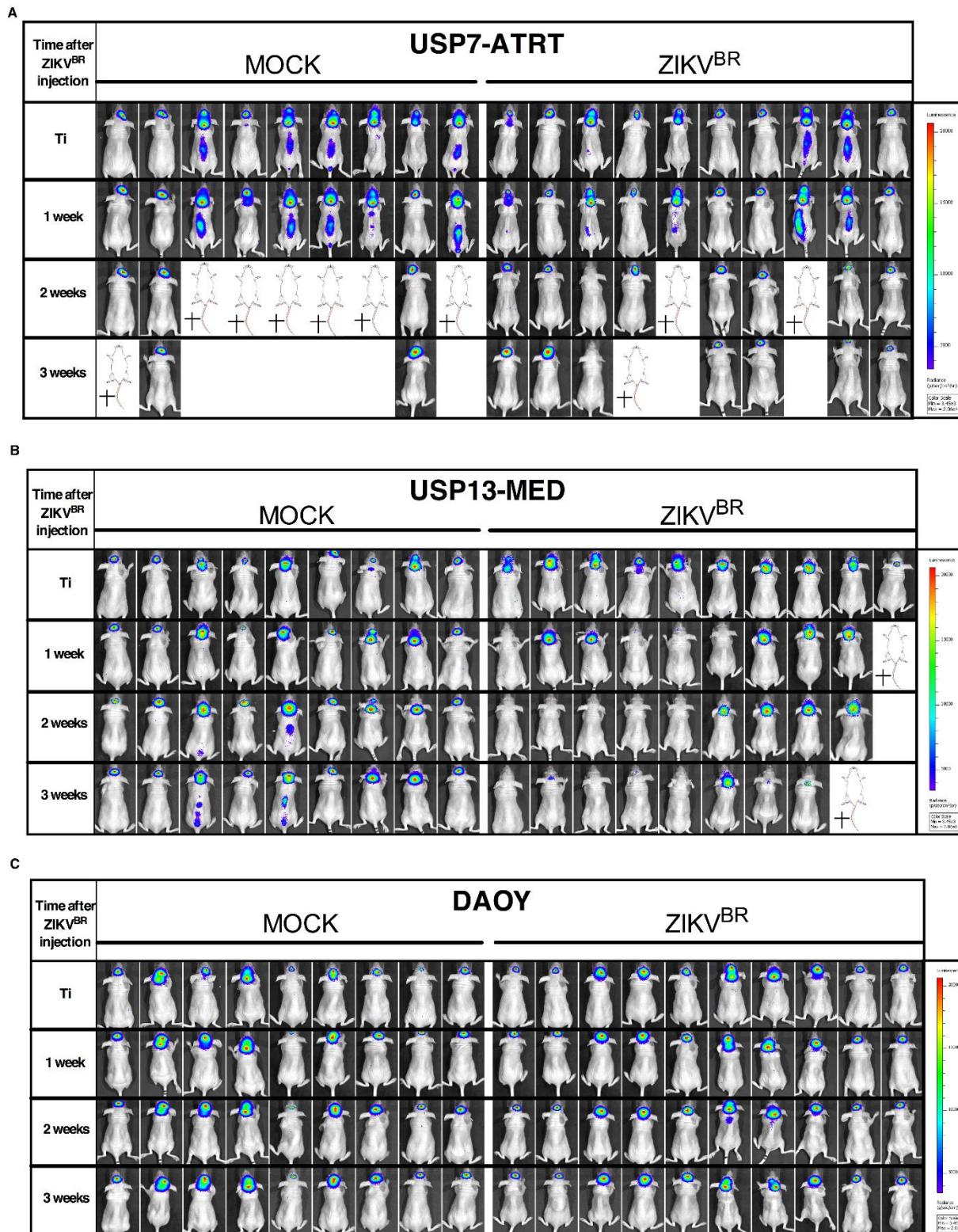
Supplementary Figures and Tables



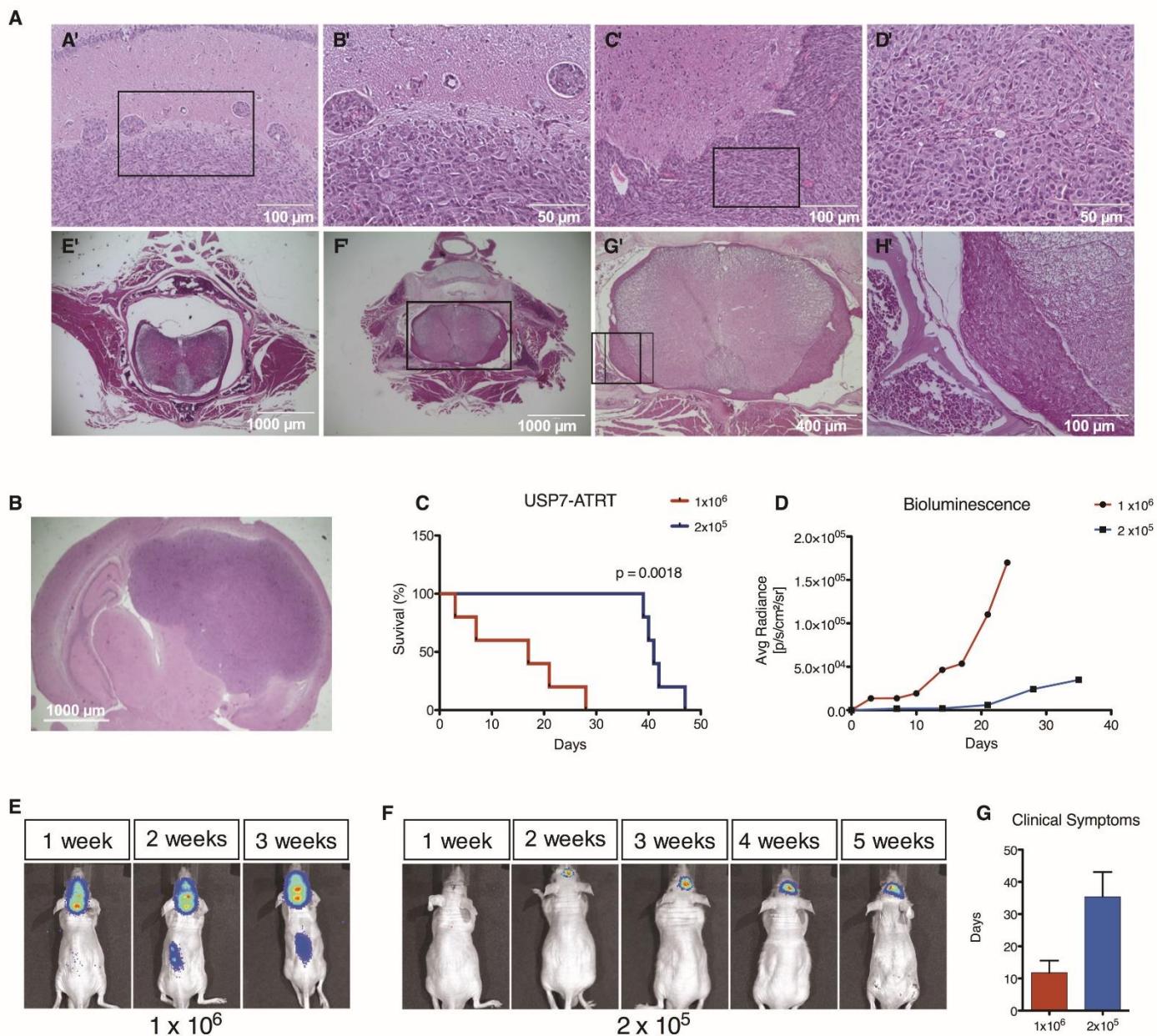
Supplementary Fig. S1. ZIKV^{BR} *in vitro* infection. A) Representative phase contrast images of all cell lines and condition at 72 hpi. Scale bar, 400 μ m. B-D) Total of ZIKV RNA copies and PFU on culture supernatants at 24, 48 and 72 hpi, respectively ($n = 3$ replicate per cell line). E) Total of ZIKV^{BR} RNA copies and PFU of MCF-7 and HCT-8 infected cells at 72 hpi ($n = 3$ replicate per cell line).



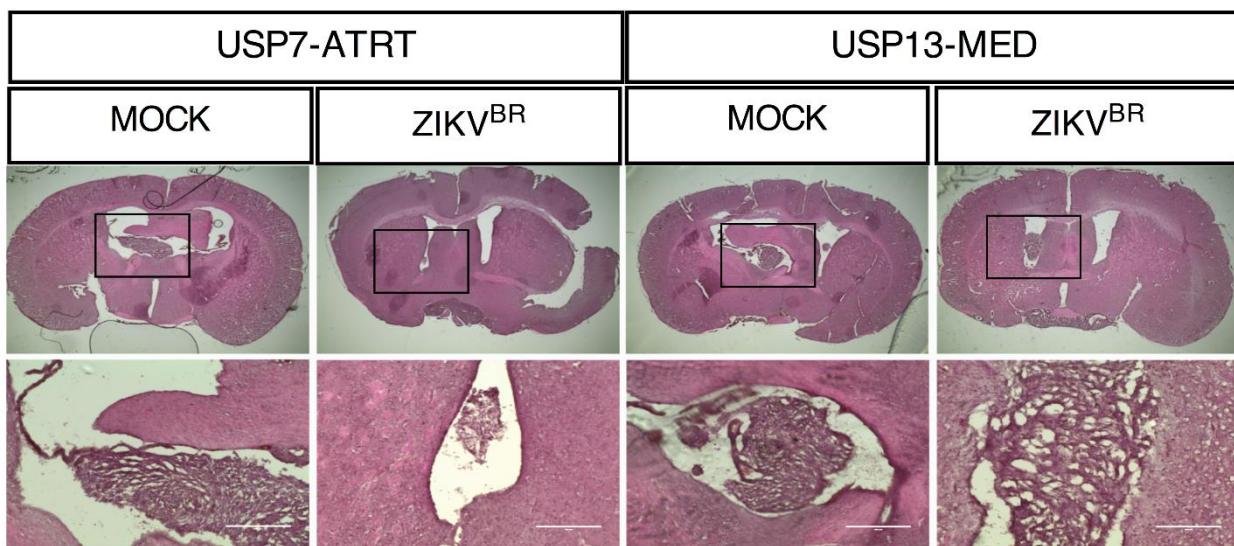
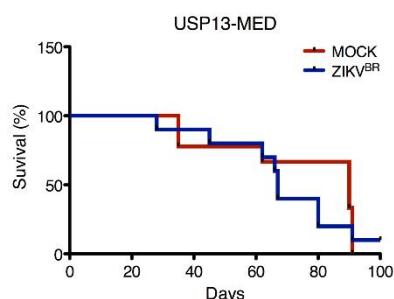
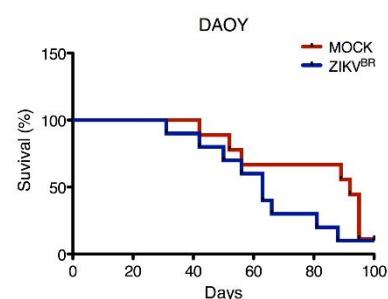
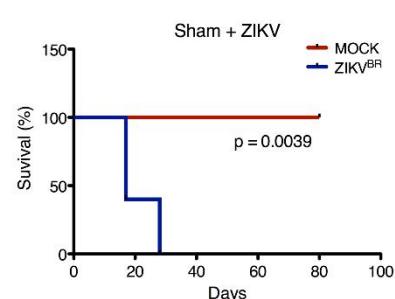
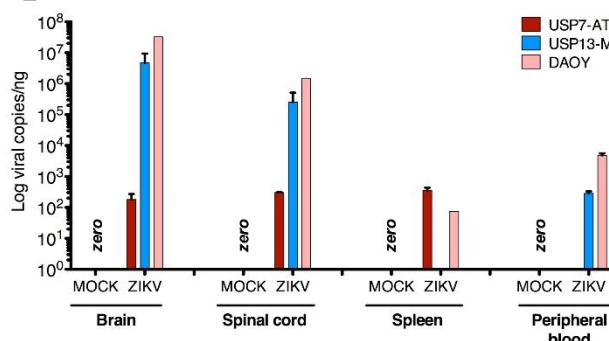
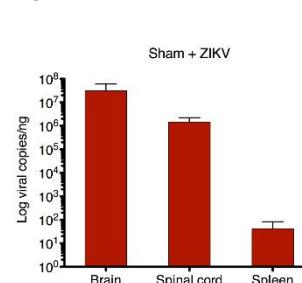
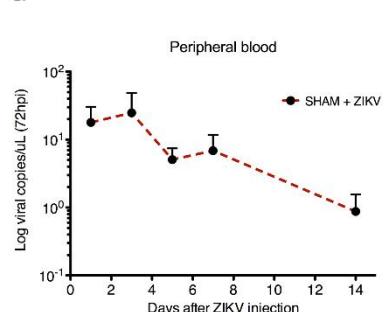
Supplementary Fig. S2. hiPSC, NPC and neuron characterization. A and B) Immunofluorescence for LIN28, TRA1-60, OCT4 and SSEA4 in hiPSCs. Scale bar, 20 μ m. C and D) MLPA analysis of cultured hiPSC samples using P070 and P036 MLPA kits. E) RT-qPCR analysis of hiPSCs and hiPSC derived NPC and neurons for *NANOG*, *LIN28*, *OCT4* and *SOX2*. F) RT-qPCR analysis of hiPSC derived NPC and neurons for *NESTIN*, *MAP2*, *SYT1* and *SYN1*. G and H) Immunofluorescence for Nestin and MAP2 in hiPSC derived NPC and neurons. Scale bar, 20 μ m and 50 μ m. I) Western blotting protein expression of MAP2, β III-Tubulin and synapsin-1 in hiPSC derived neurons ($n = 2$).



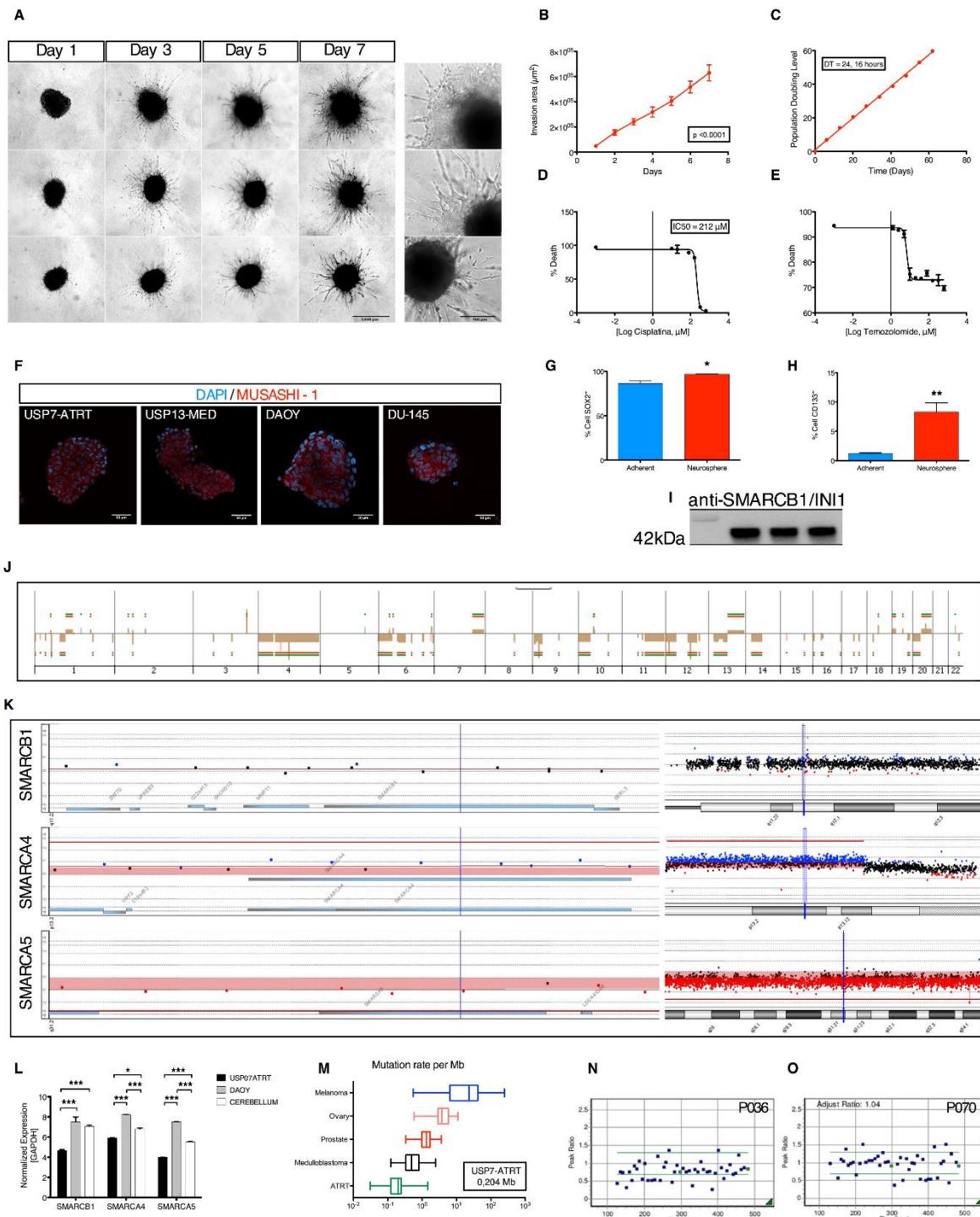
Supplementary Fig. S3. In vivo oncolytic assessment of ZIKV^{BR} in orthotopic tumor bearing mice. A-C)
Representation of all animals used for bioluminescence-based data acquisition for tumor kinetics analyses upon ZIKV^{BR} treatment for USP7-ATRT, USP13-MED and DAOY cell lines, respectively.



Supplementary Fig. S4. USP7-ATRT *in vivo* tumorigenesis. A) Histological images of the brain tissue and spinal cord showing USP7-ATRT M2 and M3 metastatic event. B' and D' are the same images of the inset in A' and C' (black box) respectively, showing scattered necrotic areas intercalated by high cell density micrometastatic vascular zones on the brain tissue. E'-H' are the same images of the inset in F and G (black box) respectively, showing M3 metastatic event in spinal cord of BALB/c nude mice. B) Representative image of hematoxylin and eosin stained xenograft tumor. C) Overall survival rates of USP7-ATRT injected mice with 2×10^5 and 1×10^6 cells ($n = 5$ per group). D) Bioluminescence-based analysis of USP7-ATRT tumor development ($n = 5$ per group). E, F) Bioluminescence images after injection of 1×10^6 and 2×10^5 USP7-ATRT cells, respectively. G) Clinical symptoms appearance after USP7-ATRT injection ($n = 5$ per group).

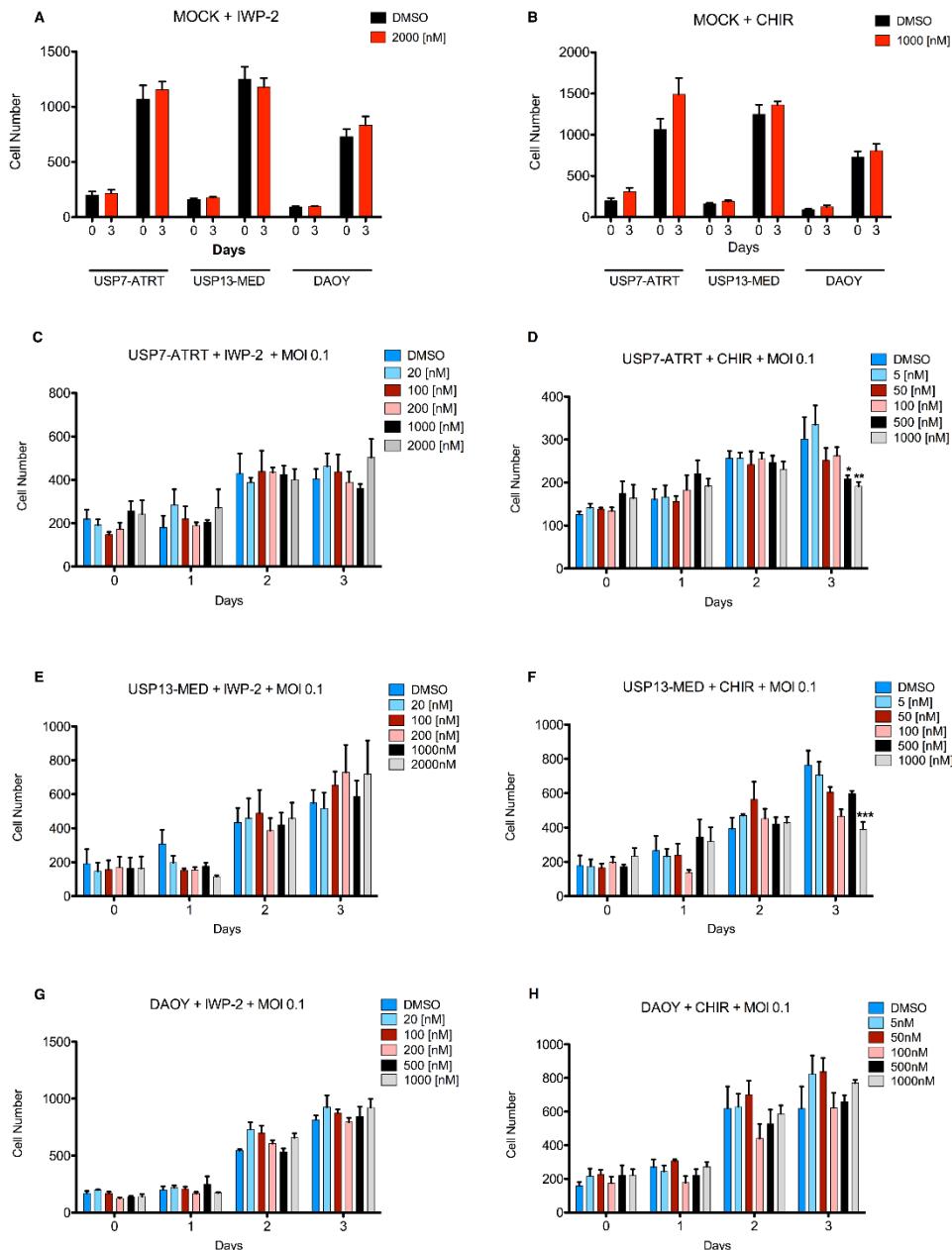
A**B****C****D****E****F****G**

Supplementary Fig. S5. ZIKV^{BR} infected animals shows a marked reduction of USP7-ATRT and USP13-MED tumor growth. A) Hematoxylin and eosin stained brain sections of mice bearing orthotopic human USP7-ATRT and USP13-MED tumor after ventricular injection with mock and ZIKV^{BR}. The same image of the inset in (black box) is displayed at higher magnification. Scale bar, 400 μ m. B and C) USP13-MED ($n = 10$ ZIKV^{BR} group and $n = 9$ MOCK group) and DAOY ($n = 9$ per group) tumor bearing mice survival curve. D) Sham group survival curve after ZIKV^{BR} ventricular brain injection (Sham + ZIKV) ($n = 5$ per group). E) Viral titer in brain, spinal cord and spleen in USP7-ATRT, USP13-MED and DAOY tumor bearing mice at euthanasia ($n = 5$ per group). F) Viral titer in brain, spinal cord and spleen in Sham + ZIKV^{BR} at euthanasia ($n = 5$ per group). G) Peripheral blood viremia of Sham + ZIKV^{BR} group over time ($n = 5$).



Supplementary Fig. S6. Characterization of USP7-ATRT cell line. A) Phase contrast image of spheroid invasion of USP7-ATRT tumor cell. Scale bar, 1000 μm and 400 μm. B) Invasion area ($p < 0.0001$) ($n = 9$ replicates). C) Population doubling level. D and E) USP7-ATRT cells death percentage after treatment with Cisplatin and Temozolomide, respectively ($n = 3$ replicates). F) Immunofluorescence staining for Musashi-1 in CNS and non-CNS tumor cell line. Scale bar, 50 μm. G) Percentage of SOX2+ adherent and neurosphere USP7-ATRT cells ($*p < 0.05$). ($n = 3$ for each condition). Scale bar, 50 μm. H) Percentage of CD133+ adherent and neurosphere USP7-ATRT cells ($**p < 0.01$). ($n = 3$ replicates for each condition). I) USP7-ATRT positive staining for INI1 (SMARCB1 protein) by western blotting. J) CGH-array of all chromosomes. K) Chromosomal copy number aberration detail of chr22 (22q11.23), chr19 (19p13.2) and chr4 (4q31.21) harboring SMARCB1, SMARCA4 and SMARCA5, respectively. L) RT-qPCR analysis of SMARCB1, SMARCA4 and SMARCA5 expression by USP7-ATRT, DAOY and cerebellum cell lines ($*p < 0.05$, ***p < 0.001). M) Box plot of mutation rate per Mb. N and O) Scatter plot of Peak Ratio vs Size (bps) for P036 and P070.

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) ($n = 3$ replicates per cell line). M) Whole exome-sequencing of USP7-ATRT generated 9.06×10^7 paired reads. We considered targeted regions above 20 reads, resulting in 58.6 Mb. USP7-ATRT cells presented six somatic damaging mutations in *SMARCA5*, *KCNA5*, *MYH6*, *PRKAR2A*, *PIGG*, and *RYR1*, indicating a low mutation rate (0.204 per Mb) compared with other common tumors (COSMIC) ($n = 2$ replicates). N and O) MLPA analysis showing extensive chromosomal aberration in USP7-ATRT cell line.



Supplementary Fig. S7. CHIR99021 and IWP-2 treatment in tumor cell lines. A and B) Cell counting in non-infected tumor cell lines treated with high concentration of IWP-2 and CHIR99021, respectively. C-H) Cell counting of ZIKV-infected tumor cell lines (MOI 0.1) treated with escalating doses of CHIR99021 and IWP2 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test, always compared with respective day and DMSO condition) ($n = 4$ per group).

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES:**Key Resources Table.**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-TRA-1-60	Millipore	MAB4360 RRID:AB_2119183
Anti-OCT4	Abcam	Ab18976 RRID: AB_444714
Anti-Nestin	Millipore	MAB5326 RRID:AB_2251134
Anti-Musashi-1	Abcam	Ab21628 RRID:AB_2144988
Anti-β-Catenin	Cell Signaling Technology	7074S RRID:AB_2099233
Anti-firefly Luciferase	GeneTex	GTX27358 RRID:AB_384150
Alexa Fluor 647 Anti-Nestin	BD Bioscience	560341 RRID:AB_1645181
Anti-Alpha-tubulin	Novus Biologicals	NB100-690 RRID:AB_521686
Anti-Zika virus NS2B	GeneTex	GTX133308 RRID:AB_ 2715494
Anti-SSEA4 [MC813]	Abcam	Ab16287 RRID:AB_778073
Anti-LIN28A (D1A1A)	Cell Signaling Technology	8641S RRID:AB_10997528
Anti-SOX2	Abcam	Ab97959 RRID:AB_2341193
Anti-MAP2, clone AP20	Millipore	MAB3418 RRID:AB_11212326
Anti-Tubulin, beta III isoform	Millipore	MAB1637 RRID:AB_2210524
Anti-Synapsin-1	Synaptic Systems	106103 RRID:AB_110422000
PE Anti-Human CD133/1 (AC133)	MiltenyiBiotec	130-080-801 RRID:AB_244342
Anti-SNF5 [EPR12014-77]	Abcam	Ab192864 RRID:AB_ 2715495
PerCP-Cy 5.5 Anti-SOX2	BD Biosciences	561506 RRID:AB_10646039
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	A11037 RRID:AB_2534095
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	A11005 RRID:AB_2534073
Goat anti-rabbit IgG Cy3	Thermo Fisher Scientific	A10520 RRID:AB_10563288
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11070 RRID:AB_2534114

Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11001 RRID:AB_2534069
Anti-mouse IgG HRP-Linked	Cell Signaling Technology	7076 RRID:AB_330924
Anti-mouse β-Actin HRP-Linked	Abcam	Ab49900 RRID: AB_867494
Anti-rabbit IgG HRP-Linked	Cell Signaling Technology	7074 RRID:AB_2099233
Bacterial and Virus Strains		
ZIKV ^{BR}	Faria et al., 2016	Instituto Evandro Chagas
Biological Samples		
hiPSC-derived NPCs cell line	In-house reprogrammed hiPSC	Derived from donor C2535
DAOY cell line	ATCC	Number: HTB-186™
USP13-MED	Silva et al., 2016	Institute of Biosciences - University of São Paulo
USP7-ATRT	This paper	Institute of Biosciences - University of São Paulo
MCF-7	ATCC	Number: HTB-22™
DU-145	ATCC	Number: HTB-81™
Vero cell line	ATCC	Number: CCL-81™
Cerebellum RNA	Agilent	540007
EmbryoMax® Primary Mouse Embryo Fibroblasts, Strain CF1, Mytomycin C treated, passage 3	Merck Millipore	PMEF-CF
BALB/c nude mice	FMUSP - Bioterium	Faculdade de Medicina – University of São Paulo
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
hESC qualified Matrigel	Corning	354277
Essential 8 Medium	Thermo Fisher Scientific	A1517001
DMEM:F12	Thermo Fisher Scientific	11320-082
DMEM	Thermo Fisher Scientific	31600091
Neurobasal Medium	Thermo Fisher Scientific	21103049

MEM	Thermo Fisher Scientific	11900024
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific	11875
Methyl cellulose	Sigma-Aldrich	9004-67-5
Naphthol blue-black	Sigma-Aldrich	N3393
Sodium acetate	Sigma-Aldrich	S5636
Glacial acetic acid	Sigma-Aldrich	1005706
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific	16000044
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher Scientific	15240096
Pen/Strep (100X)	Thermo Fisher Scientific	15140-122
B27 supplement w/o Vitamin A	Thermo Fisher Scientific	12587-010
Non-essential Amino Acids (100X)	Thermo Fisher Scientific	11140050
N2 Supplement	Thermo Fisher Scientific	17502-048
Accutase	Thermo Fisher Scientific	A11105-01
Glutamax (100X)	Thermo Fisher Scientific	35050061
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	Promega	P1041
RNAlater Stabilization Solution	Thermo Fisher Scientific	AM7021
VectaShield® Mouting Media	Biocompare	H-1000
cis-Diammineplatinum(II) dichloride	Sigma-Aldrich	Y0001019
Temozolomide	Sigma-Aldrich	T2577
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific	15140122
Laminin	Thermo Fisher Scientific	23017015
B-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific	21985-023

Knockout Serum Replacement (KSR)	Thermo Fisher Scientific	10828-028
VP-SFM (1X)	Thermo Fisher Scientific	11681020
Poly-L-ornithine hydrobromide	Sigma-Aldrich	P3655
StemSpan Medium	StemCell	9650
Recombinant Human FGF2	Peprotech	100-18B
Recombinant Human EGF	Peprotech	AF-100-15
Y-27632 dihydrochloride	Tocris	1254
PD0325901	Tocris	4192
Valproic acid	Tocris	2815
Dorsomorphin	Tocris	3093
Sodium butyrate	Tocris	3850
Thiazovivin	Tocris	3845
SB431542	Tocris	1614
Dexamethasone	Tocris	1126
Interleukin 3	R&D	203-IL-010
Human erythropoietin	R&D	287-TC-500
Recombinant human stem cell factor	R&D	250-SC-010/CF
CHIR99021	Tocris	4423
IWP-2	Sigma-Aldrich	I0536
Critical Commercial Assays		
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen	52904
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32851
SALSA MLPA P036 Subtelomeres	MRC-Holland	P036-025R
SALSA MLPA P070 Subtelomeres	MRC-Holland	P070-025R
Tumor Dissociation Kit	MiltenyiBiotec	130-095-929
SuperScript II Reverse Transcriptase Kit	Thermo Fisher Scientific	18064014

SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	4364346
CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	C10427
Guava Nexin® Annexin V Assay kit	Millipore	4500-0450
Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay	Trevigen	3500-096-K
Amaxa human CD34+ cells Nucleofection kit	Lonza	VPA-1003
AffymetrixGeneChip® Human Gene 2.0 ST whole-transcript arrays	Thermo Fisher Scientific	902113
Illumina's TrueSeq kits	Illumina	RS-122-2001
Deposited Data		
Global gene expression analysis	This paper	GEO: GSE103935
Oligonucleotides		
RT-qPCR primers (Table S1)		
Recombinant DNA		
pCXLE-hOCT3/4-shP53-F	Addgene	27077
pCXLE-hSK	Addgene	27078
pCXLE-hUL	Addgene	27080
Software and Algorithms		
PRISM v.6 graphing and statistical software	GraphPad Software	http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
ImageJ	National Institutes of Health (NIH)	https://imagej.nih.gov/ij/
DIVA software	BD Biosciences	http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112/overview
Living Image 3.1.0 software	PerkinElmer	http://www.perkinelmer.com/product/li-software-for-spectrum-1-seat-add-on-128113
AQCAD software	AVS Projects	http://www.avsproyectos.com.br/produtos/categoria/47
FlowJo v.10	Flowjo,LCCSoftware	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads

GuavaSoft 2.1 software	Merck Millipore	https://www.merckmillipore.com/BR/pt/life-science-research/cell-analysis/guava-easycyte-flow-cytometers/downloads/A2.b.qB.iHwAAAFBQQY7FnTl,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.br%2F&bd=1
Feature Extraction Software	Agilent Technologies	http://www.genomics.agilent.com/en/Microarray-Scanner-Processing-Hardware/Feature-Extraction-Software/?cid=AG-PT-144&tabId=AG-PR-1050
Affymetrix® Expression Console Software	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarray-analysis/microarray-analysis-instruments-software-services/microarray-analysis-software/affymetrix-expression-console-software.html
Transcriptome Analysis Console Software	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarray-analysis/microarray-analysis-instruments-software-services/microarray-analysis-software/affymetrix-transcriptome-analysis-console-software.html
Ingenuity Pathway Analysis Software	Qiagen	https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/

USP7-ATRT - Cell line establishment

The USP7-ATRT cell line was established from an ATRT left temporal supratentorial specimen derived from a three year-old boy, and characterized by the Medical School Hospital of the University of São Paulo. The procedure was approved by the Internal Review Board (CEP-IB No.121/2011), and informed consent was obtained from the patient's parents.

Anchorage-independent growth of tumor cells

The soft agar colony formation assay, a proper *in vitro* assay for detecting transformed cells, were developed in USP7-ATRT in order to estimate anchorage-independent growth of tumor cells. Five hundred cells were seeded over a 0.6% agarose solution and covered with a 0.3% agarose solution in a well of a six-well plate. Both solutions contained supplemented media at normal concentrations (10% FBS and 1% Antibiotic-Antimycotic). Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Media was replaced every three days.

Population Doubling Time

Population doubling level (PDL) assay was performed to evaluate the proliferative profile of USP7-ATRT cells, as recommended by WHO (1) and described by Schaeffer, 1990 (2). The cumulative PDL over 60 cells generations *in vitro* was calculated by the formula: $PDL = \log_{10} (N/No) \times 3.33$ where: N = number of harvested cells after a period of growth and No = number of cells seeded at every new passage. The PDT (population doubling time) was calculated each passage using the following formula $DT = t \times \ln 2 / \ln (N/No)$, where t is the incubation time.

Cisplatin and Temozolomide sensitive

USP7-ATRT culture were serum deprived for 24 hrs for synchronization. A total of 8×10^4 cells/mL were then seeded in a well of a 6-well microplate and allowed to attach overnight in the surface of the culture plate, prior to a 48 hr-treatment with increasing doses of cisplatin (Sigma-Aldrich) and temozolomide (Sigma-Aldrich). Apoptotic cells were estimated by the Guava Annexin® V Assay kit (Millipore). Staining was performed according to the manufacturer's instructions, and samples were analyzed in the Guava EasyCyte 5HTTM Flow Cytometer (Millipore – Guava technologies), using GuavaSoft 2.1 software. Concentrations lethal to 50% of cells (LC50) were calculated from dose-response curves.

3-dimensional (3D) spheroid cell invasion assay

USP7-ATRT cell invasion capacity were evaluated *in vitro* using Cultrex® 3D Spheroid Cell Invasion Assay (Trevigen, MD) following the manufacturer's recommendation. Cells were resuspended in spheroid formation ECM at density of 8×10^4 cells, and added to a 96-well round bottom ultra-low attachment microplate (Corning, NY). Spheroids were allowed to form for 24 hrs before invasion matrix and medium with 10% FBS were added. Invasion measurements were performed after two and four days, using ImageJ software.

Generation of human iPSCs, NPCs and Neurons

Human pluripotent induced stem-cells (hiPSCs) were generated from CD71+-cells which were isolated from peripheral blood sample. The reprogramming protocol was performed with episomal vectors system (pCXLE-hOCT3/4-shP53-F, addgene plasmid 27077; pCXLE-hSK, addgene plasmid 27078; pCXLE-hUL, addgene plasmid 27080) (3), and using the Amaxa human

CD34+ cells nucleofection kit (Lonza), following the manufacturer's recommendations. Three days after nucleoporation, cells were seeded on irradiated murine embryonic fibroblasts (Millipore) in embryonic stem cell medium (DMEM/F12 supplemented with 2mM GlutaMAX-I, 0.1mM non-essential amino acids, 100uM 2-mercaptoethanol, 20% of knockout serum replacement (all provided by Life Technologies), 10ng/mL of bFGF, 0.25mM NaB, 0.5mM VPA, 2uM thiazovivin, 0.5uM PD 0325901 and 2uM SB 431542 (all provided by Tocris Bioscience). The typical hiPSC colonies were transferred to hESC-Qualified matrigel (Corning) - coated 60 mm petri dishes (Corning) and cultured in Essential 8 medium (Gibco). hiPSC was differentiated through NPCs and neuron using our established protocol for neuronal differentiation (4).

Animal Activity Monitoring

In order to assess eventual influence of the experimental procedures on the passive (natural) activity of the animals, a 24h/day real time activity acquisition system integrated to AQCAD software was used (AVS Projetos, São Carlos, Brazil). Briefly, a high sensitive infrared sensor was coupled to the back-side top of a regular mice micro-isolator cage. Centesimal variations of temperature emanated from the animal (near/far movements) were captured as direct current level signals followed by a derivation plot to determine the exact instant of each movement. Data were recorded as animal movements/hour. Mock and ZIKV^{BR} treated animals were simultaneously kept in monitoring cages (1 animal/cage, 4 animals/group; total n = 24) for 48h activity assessment during 5 experimental weeks. Activity monitoring run on the 2nd to 4th day after Mock and ZIKV times of injection (Ti) and on corresponding days in the subsequent weeks. Data extracted from the 12hr/dark periods was considered, when animals were not anyway disturbed.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Assays

The USP7-ATRT and hiPSCs' DNA were extracted from culture cells using the NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), following supplier's instructions. MLPA analysis was performed with subtelomeric kits (P036 and P070; MRC-Holland) in order to detect chromosomal imbalances, as previously described (5).

Whole Exome Sequencing

For whole-exome library preparation, exon capture and sequencing we used our standard protocols at Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CELL), belonging to the Institute of Biosciences of the University of São Paulo (USP). Briefly, exome capture was performed using Illumina's TrueSeq kits and the Illumina HiSeq sequencer for paired-end reads of approximately 100×100 bp. An average on-target coverage of 60× was achieved. In silico analysis, the alignment of the sequenced reads to the reference genome (hg19) was performed with the Burrows-Wheeler Aligner. Subsequently, the Picard and Genome Analysis Tool Kit (GATK) were used for local realignment of reads and to get coverage of consensus coding (6). Variant annotation was performed on the basis of BWA alignments and were then annotated with ANNOVAR (7). Candidate pathogenic mutations were subjected to several filtering steps: allele frequency <0.05 in 1000 Genomes Project National Institutes of Health to filter for an allele frequency of <0.5% and damaging variants were analyzed by SIFT and FATHMM algorithms (open access).

Chromosomal Copy Number Aberrations

DNA from USP7-ATRT was extracted using standard chloroform / phenol protocol. aCGH was performed using 60K whole-genome platform (Agilent Technologies, CA). All procedures were carried out following the manufacturer's recommendation. Microarray scanned images were processed using the Feature Extraction Software (Agilent Technologies, CA). Copy number aberrations (CNAs) were called using the statistical algorithm ADM-2 in Genomic Workbench 6.9 Software. Chromosome deletions and duplications were considered when log₂ ratio of Cy3/Cy5 intensities were detected <-0.3 and >0.3, respectively. Hybridization was gender matched.

Viral burden measurement

Cell culture supernatants were harvested at specified time points and used for ZIKV titration by both, plaque assay and absolute RT-qPCR. For plaque assay, 8 × 10⁴ VERO cells/well were seeded in 24-well plates, 24h before the assay. Samples were serially diluted in DMEM

medium from 10^{-1} to 10^6 , applied in duplicates of 100 μL to each well and incubated for 60 min at 37°C. After virus adsorption, wells were overlaid with culture medium containing methyl cellulose (1%) and incubated at 37°C. After four days, plates were drained, washed with PBS and stained with 0.1% naphthol blue-black, 1.6% sodium acetate in 6% glacial acid acetic for 30 min. Plaque formation units were visually determined in the most appropriate viral dilution and expressed as PFU/mL.

ZIKV RNA obtained from culture supernatants was extracted by using Viral RNA Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol and viral RNA copies were quantified by RT-qPCR. In the *in vivo* experiments, blood was collected and organs were recovered, at specified time points before and after ZIKV infection. Organs were weighed and homogenized in QIAzol solution (Qiagen) with endotoxin free stainless steel beads in a Precellys Dual homogenizer instrument for 30 seconds. The sera were prepared after coagulation at 37°C/30min and 2000 RPM/8°C/10min centrifugation. Total RNA from tissues and serum samples were extracted with RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and Viral RNA Mini Kit (Qiagen), respectively.

For absolute RT-qPCR titration, a standard curve was generated with a double-strand DNA fragment with sequence corresponding to a region of Zika E protein. The fragment was quantified by fluorometry (QuBit, Thermo Fisher) and the concentration required for a specific number of target sequences was calculated. Six dilutions were performed in TE + EGTA 1 mM buffer, generating the standard dilutions containing 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 or 6×10^2 and 60 copies at each 3 μL .

For *in vitro* samples, cDNA were obtained using SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher) and Zika RNA primers (Table S2). Samples were amplified along with standard curve dilutions, in three replicates each on a Stepone Real Time PCR System and Sybr® Green PCR Mastermix (Thermo). Mean Cts were applied to standard curve equation to determine cDNA copy numbers in each sample. The total Zika RNA copy number was calculated by multiplication of the cDNA copy number by a conversion factor, which considered all dilutions made during the RNA extraction to qPCR protocol.

ZIKV RNA levels from samples obtained in the *in vivo* experiments were determined by TaqMan one-step quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) on an ABI 7500 Fast Instrument using standard cycling conditions. Viral burden is expressed on a log10 scale as viral RNA equivalents per milliliter of total RNA. RNA copy numbers in tissues were normalized per mg of total RNA. A comparison with a standard curve run in parallel as described above for RT-qPCR of *in vitro* assays, was used. For primers sequence please see Table S2.

References:

- 1- WHO (2010). Recommendations for evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf. Accessed 16 Jul 2017
- 2- Schaffer, W.I. (1990). Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *Vitr Cell Dev Biol* 26:97–101.
- 3- Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N. and Yamanaka, S. (2013). An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *STEM CELLS*, 31: 458–466.
- 4- Araujo, B.H.S., Kaid, C., De Souza, J.S., da Silva, S.G., Goulart, E., Caires, L.C.J., Musso, C.M., Torres, L.B., Ferrasa, A., Herai, R., Zats, M., Okamoto, O.K., Cavalheiro, E.A. (2017). Down Syndrome iPSC-Derived Astrocytes Impair Neuronal Synaptogenesis and the mTOR Pathway In Vitro. *Mol Neurobiol*, Nov/11: 1-14.
- 5- Jehee, F.S., Takamori, J.T., Vasconcelos Medeiros, P.F., Pordeus, A.C.B., Latini, F.R.M. (2011). Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, 54, 4: e425-e432
- 6- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20, 9: 1297-1303.

7- Wang, K., Li, M., Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nuclei Acids Research, 38, 16: e164-e164

Supplementary Table S1. Antibodies concentrations and primers sequences

Target	Primary Antibody	Host	Assay	Dilution
ZIKV	NS2B	Rabbit	IF	1:100
Tumor	Firefly Luciferase	Mouse	IF	1:100
	Alpha-tubulin	Mouse	IF	1:100
	β -Catenin	Rabbit	WB	1:2000
	β -Actin-HRP	Rabbit	WB	1:30000
hiPSC	SSEA4	Mouse	IF	1:100
	OCT4	Rabbit	IF	1:200
	LIN28A	Rabbit	IF	1:400
	TRA1-60	Mouse	IF	1:200
NPC	Nestin	Mouse	IF	1:100
	Musashi-1	Rabbit	IF/FC	1:200
	SOX2	Rabbit	IF	1:200
Neuron	MAP2	Mouse	WB/IF	1:1000
	Beta III	Mouse	WB	1:10000
	Tubulin	Rabbit	WB	1:4000
	Synapsin-1			
CSC	CD133-PE	Mouse	FC	1:200

SMARCB1 1/INI1	Rabbit	IF/WB	1:200 and 1:1000
Alexa 647- Nestin	Mouse	FC	1:200
PerCP-Cy 5.5 SOX2	Mouse	FC	1:200

Secondary Antibody	Host specie	Assay	Dilution
Goat-Alexa 488	Mouse	IF	1:1000
Goat-Alexa 488	Rabbit	IF	1:1000
Goat-Cy3	Rabbit	IF	1:1000
Goat- Alexa 594	Rabbit	IF	1:1000
Goat-Alexa 594	Mouse	IF	1:1000
IgG-HRP	Rabbit	WB	1:3000
IgG-HRP	Mouse	WB	1:3000

Gene	Sequence 5'-3'	
<i>OCT4</i>	Foward	CCT GAA GCA GAA GAG GAT CAC C
	Reverse	AAA GCG GCA GAT GGT CGT TTG G
<i>NANOG</i>	Foward	CCT GAA GAA AAC TAT CCA TCC
	Reverse	CCT TGT CTT CCT TTT TTG CGA
<i>LIN 28</i>	Foward	CCA GTG GAT GTC TTT GTG CAC C
	Reverse	GTG ACA CGG ATG GAT TCC AGA C
<i>SOX2</i>	Foward	GCT ACA GCA TGA TGC AGG ACC A
	Reverse	TCT GCG AGC TGG TCA TGG AGT T
<i>SMARCB1</i>	Foward	AAC GCC AGC GCC TGC GCA
	Reverse	TGG TGG GAG CTG TTG GGC AG
<i>SMARCA4</i>	Foward	AGAAGAAGAGGAAGAGGGAGGAG
	Reverse	TGAGGACACCATTGACCATAAG

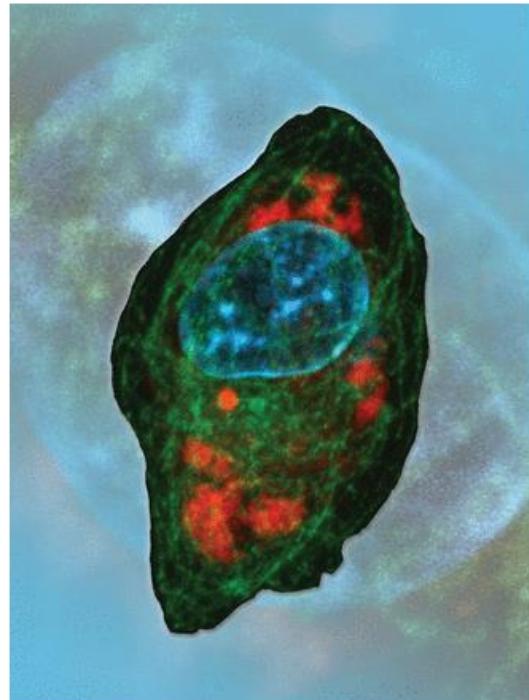
<i>SMARCA5</i>	Foward	GGAGACCCTAAAGCAGGAATAC
	Reverse	GACAGGGAAGTGACAGGTTAAA
<i>NESTIN</i>	Foward	GGC GCA CCT CAA GAT GTC C
	Reverse	CTT GGG GTC CTG AAA GCT
<i>MAP2</i>	Foward	CTC CTT CTC CAC CCC CAT CA
	Reverse	TGG AAC TCC ATC TTC GAG GC
<i>SYNAPTOTAGMIN-1</i>	Foward	GCT GCT GGT AGG GAT CAT TCA
	Reverse	GTT TTT CGG TGG ACT TTT GTC TC
<i>SYNAPSIN-1</i>	Foward	AGT TCT TCG GAA TGG GGT GAA
	Reverse	CAA ACT GCG GTA GTC TCC GTT
<i>GAPDH</i>	Foward	ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G
	Reverse	GCC ATC ACG CCA CAG TTT C
<i>ZIKV 1086</i>	Foward	CCG CTG CCC AAC ACA AG
<i>ZIKV 1162</i>	Reverse	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT
<i>ZIKV 1007 probe</i>		5'FAM AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA3' BHQ1

IF = Immunofluorescence; WB = Western blotting; FC = Flow cytometry.

Cancer Research

[Home](#)[About](#)[Articles](#)[For Authors](#)[Alerts](#)[News](#)

About the Cover



ZIKV^{BR} displays strong and specific oncolytic property against human central nervous system (CNS) embryonal tumors. Tumor cells infected with the virus (red) are readily destroyed and are ineffective in producing new functional viral particles. In tumor-bearing mice, ZIKV^{BR} induces significant CNS tumor remission and spinal cord metastasis inhibition. Neural stem-like cancer cells with high Wnt/β-catenin basal activity are more susceptible to the oncolytic effects of ZIKV^{BR}. For details, see article by Kaid and colleagues on page 3363.

DISCUSSÃO GERAL

Os tumores embrionários do SNC compreendem a neoplasias biologicamente heterogêneas, porém compartilham a capacidade de disseminação pelo sistema nervoso através do líquido cefalorraquidiano (LOUIS et al., 2007). O meduloblastoma, tumor maligno mais incidente em crianças, e o ATRT, tipo tumoral altamente maligno e com a mais baixa taxa de sobrevida entre os pacientes pediátricos, apesar de apresentarem grande heterogeneidade entre os seus subgrupos, têm em comum a alta taxa de mortalidade geralmente associada a presença de metástases (SINGH et al., 2014). Essa heterogeneidade se mostrou evidente entre as linhagens celulares de tumores embrionários do SNC utilizadas no presente estudo.

A linhagem comercial DAOY, obtida a partir da ATCC (ATCC® HTB-186™) corresponde ao subgrupo molecular SHH de meduloblastoma e subtipo histopatológico desmoplásico. A linhagem de meduloblastoma USP13-MED, estabelecida no nosso laboratório, se mostrou mais agressiva que a linhagem DAOY e foi caracterizada molecularmente como Grupo 4 (SILVA et al., 2016). Derivado do ATRT, a linhagem USP7-ATRT é a mais tumorigênica *in vitro* e, devido às superexpressão de marcadores melanossomal (*MCAM*) e desregulação da via de *CCND1*, pôde ser classificada como subgrupo ATRT-TYR (JOHANN et al., 2016; KAID et al., 2018).

As linhagens celulares de meduloblastoma CHA-01-MED e D283-MED, estudadas no Capítulo 1, não apresentaram a capacidade de estabelecer e crescer em ambiente *in vivo* no modelo animal aplicado (camundongo Balb/C Nude) (DA SILVA et al., 2017). Diferentemente de Daoy, USP13-MED e USP7-ATRT, as linhagens celulares CHLA-01-MED e D283-MED apresentam crescimento *in vitro* de cultivo em suspensão e semi-adherente, respectivamente, e forem molecularmente caracterizadas como subgrupo 4 de meduloblastoma (SNUDERL et al., 2013; XU et al., 2015).

Ao considerar em conjunto a sobrevida dos camundongos Balb/C Nudes após injeção das linhagens celulares DAOY, USP13-MED e USP7-ATRT no ventrículo direito, foi possível constatar que no período de 100 dias após a cirurgia intracranial, 100% dos animais com tumor derivado da linhagem DAOY permanecem vivos. No caso da linhagem USP13-MED, após 80 dias da cirurgia todos os animais foram eutanasiados devido à presença de sintomas clínicos como perda de 30% do peso, ataxia e crescimento tumoral visível a olho nu. Já a linhagem USP7-ATRT apresentou a pior sobrevida em comparação com as outras linhagens celulares. Após duas semanas da cirurgia, 50% dos animais foram eutanasiados e, no período de 30 dias, todos os animais chegaram à óbito (Capítulo 2, figura 5D). As taxas de sobrevida no ensaio *in vivo* foram correspondentes aos dados clínicos descritos na literatura, em que a sobrevida livre da doença dos pacientes classificados como subgrupo meduloblastoma-SHH, meduloblastoma-grupo 4 e ATRT-TYR são de 70%, 50% e 9-17 meses, respectivamente (RAMASWAMY et al., 2016; SCHREY et al., 2016).

Assim como a maioria dos pacientes com meduloblastoma do subgrupo SHH, a linhagem DAOY não gerou metástase na coluna dos camundongos Balb/C Nude. A linhagem USP13-MED e USP7-ATRT, por sua vez, foram capazes de gerar metástases na coluna após 21 e 17 dias da injeção das células tumorais, respectivamente. E, assim como é observado na progressão clínica dos pacientes com tumores pediátricos (SUKI et al., 2014), a presença de metástase levou a alta perda de peso e debilitação do animal, encaminhados, portanto à eutanásia. Estes resultados confirmam a utilização dessas linhagens celulares como importante modelo experimental para o estudo da origem e progressão dos tumores embrionários do SNC, facilitando a translação dos dados gerados para uma possível aplicação clínica.

Apesar da heterogeneidade e das diferentes progressões *in vivo* observadas nas linhagens celulares utilizadas no estudo, o envolvimento de vias importantes para o desenvolvimento neural, como por exemplo a via Wnt, foram comumente observadas durante todo o trabalho. O perfil de expressão global de USP13-MED constatou modificações de expressão em diversos genes

importantes para a regulação da neurogênese (SILVA et al., 2016). Já em USP7-ATRT, as alterações moleculares presentes na linhagem culminam na ativação anormal da via Wnt e maior expressão de β -CATENINA (*CTNNB1*) (KAID et al., 2018). A mesma alteração em *CTNNB1* foi observada no paciente 22 com astrocitoma pilocístico da região do cerebelo, portador da síndrome de Mowat-Wilson, após análise de interações de vias do sequenciamento de exoma (Anexos e Apêndices, item 5.3.).

Alterações na via Wnt foram primeiramente associadas à origem de tumores embrionários do SNC em pacientes com meduloblastoma e portadores da síndrome de Turcot, devido a presença de mutações germinativas no gene que codifica a proteína APC, responsável pela manutenção e controle da via Wnt (HAMILTON et al., 1995). Subsequentemente, mutações de ponto ativadoras em *CTNNB1*, gene que codifica a β -catenina, efetor da via Wnt, estavam presentes em 4-10% dos casos esporádicos de meduloblastoma (PFISTER et al., 2010). Essas mutações que levam a ativação de *CTNNB1* impedem a fosforilação e degradação de β -CATENINA que, consequentemente, é transportada para o núcleo ativando a sinalização canônica da via Wnt (CORDEIRO et al., 2014). Este processo é observado durante os estágios iniciais do desenvolvimento neural e deveria ser desativado a medida que as células se comprometem com a diferenciação celular, porém não ocorre durante a transformação neoplásica. Em alguns casos de meduloblastoma, a ativação anormal da via Wnt ocorre via silenciamento epigenético da família SFRP, formada basicamente por inibidores da via Wnt (KONGKHAM et al., 2010).

A ativação anormal de *CTNNB1* e sua localização no núcleo também é observado em meningiomas agressivos (PFISTER et al., 2010). Em ATRT, o sequenciamento de transcriptoma em tecidos tumorais de pacientes identificou um aumento significativo na expressão do gene *WNT5B*, ativador da via não-canônica de Wnt, quando comparados com amostras de tecidos cerebrais normais (CHAKRAVADHANULA et al., 2015). Acredita-se que em ATRT, tumor com baixa taxa de mutações somáticas, a ativação da via canônica de Wnt possa ocorrer através de

desregulações epigenéticas. O marcador negativo clínico-histopatológico de ATRT, a proteína SNF5, faz parte do complexo remodelador de cromatina SWI-SNF, e já foi demonstrado que a perda de SNF5 leva a ativação de alvos da β -CATENINA/TCF, aumentando a expressão de efetores da via Wnt (CURTIS; GRIFFIN, 2012; GRIFFIN et al., 2011). Em outro estudo foi visto que a subunidade de *SMARCA4*, gene codificador de proteínas do complexo SWI-SNF e comumente deletado em ATRT, interage com *CTNNB1*, inibindo a via Wnt (CURTIS; GRIFFIN, 2012; GRIFFIN et al., 2011; MORA-BLANCO et al., 2014).

Em análise proteomica de MVs derivadas de linhagens celulares de meduloblastoma submetidas à superexpressão estável de OCT4A, componentes da via Wnt estavam alterados (*CTNNB1*, *CTNNA1*, *CTNND1*, *CTNNB1P1*, *APC*), indicando ativação anormal quando comparados com as amostras menos agressivas, com expressão basal de OCT4A (Capítulo 1, Figura 3C). Os resultados gerados neste trabalho somados aos dados da literatura demonstram que componentes da via Wnt desempenham papel central na origem e biologia dos tumores embrionários do SNC e podem constituir potenciais alvos terapêuticos.

A abordagem terapêutica apresentada no Capítulo 3 levou em consideração às características heterogênicas da doença atribuídas pela célula-de-origem, ou seja, tumores de origem progenitora, com alterações em vias ativas durante o desenvolvimento neural, como a via Wnt. Os resultados demonstraram que o ZIKV^{BR} infecta seletivamente tumores com perfil de células progenitoras neurais (NPC) assim como é capaz de infectar células-tronco neural normais de fetos causando microcefalia (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). O aumento da infecção e morte celular após ativação da via Wnt demonstrou que o vírus se utiliza de vias importantes para o desenvolvimento neural e ativas em estágio iniciais da embriogênese para entrar e replicar na célula (Capítulo 3, Figura 6).

O mesmo foi observado em linhagens celulares de glioblastoma e ependimoma, porém com menor eficiência (Anexos e Apêndices, item 6). Apesar dos ependimomas e glioblastomas serem de origem glial, a infecção e morte de USP21-EPE por ZIKV^{BR} pode ser devido a expressão

positiva de marcadores típicos de células-tronco neurais (NESTIN, CD133, SOX2) (Anexos e Apêndices, Tabela 2). Já no caso das linhagens celulares de glioblastoma, a ativação anormal da via Wnt encontrada em diversas células iniciadoras de gliomas pode ter contribuído para o efeito oncolítico do ZIKV^{BR}, porém mais estudos devem ser realizados para esclarecimento dos mecanismo de infecção e morte da célula (XIA et al., 2013).

Logo, podemos concluir que os efeitos oncolíticos do ZIKV^{BR} se mostraram uma promissora abordagem terapêutica para o tratamento mais efetivo de pacientes com tumores do SNC originados de células progenitoras, com perfil molecular semelhante às células-tronco neurais. Entender como o vírus entra nas células progenitoras e aumenta a sua infecção e morte celular através da via Wnt é crucial para expandir essa abordagem para outros tipos de tumores como também para a translação clínica desse possível tratamento para pacientes pediátricos e adultos.

Além da origem progenitora das células de tumores embrionários do SNC, outro objetivo do presente estudo foi investigar a progressão tumoral e a aquisição do fenótipo de célula-tronco em tumores metastáticos e com pior prognóstico. Inúmeros trabalhos atribuem a presença da subpopulação de CTT ao aumento da tumorigênese e metástases pois possuem a capacidade de resistir às drogas terapêuticas e toxinas através de uma série de mecanismos como quiescência e reparo de DNA (CHAFFER et al., 2011; DEAN; FOJO; BATES, 2005). Não obstante, a associação das CTT e os eventos de metástase parece ser mais complexo pois envolve diversos processos como a transição epitelio-mesenquimal (TEM) e outras vias de sinalização importante para a manutenção da população de CTT (LEE et al., 2015).

A via canônica de Wnt, geralmente ativada nos tumores embrionários do SNC como discutido anteriormente, é uma das vias de sinalização importantes na fase do desenvolvimento neural que participam do processo de TEM, assim como as vias de NOTCH e de SHH (TAKEBE et al., 2011). A translocação de β-CATENINA para o núcleo leva a transcrição de diversos fatores que dão início ao processo de TEM (CLEVERS, 2006). Estudos com células-tronco

mesenquimais demonstraram que a via Wnt está particularmente envolvida no controle de migração e invasão de células normal e tumorais, inclusive na indução da invasão celular de CTT (NETH et al., 2007). Além de aumentar a expressão de genes envolvidos com a TEM, a estabilização de β -CATENINA no núcleo também pode aumentar os níveis de genes responsáveis pela aquisição e manutenção do perfil de célula-tronco, como por exemplo os genes *MYC*, *SOX2* e *POU5F1* (OCT4A) (LEE et al., 2015).

Visto que a presença de metástases e de CTT está clinicamente associada ao pior prognóstico de pacientes com tumores do SNC, identificar fatores cruciais para a manutenção do fenótipo de células-tronco em tumores embrionários do SNC contribuirá no estudo de novos marcadores de pior prognóstico e potenciais alvos terapêuticos. Recentemente, os genes *MYC* e *MYCN* forma incluídos na lista de marcadores de pior prognóstico na estratificação de pacientes com meduloblastoma (RAMASWAMY et al., 2016). O presença de amplificações no gene *MYC* está presente em pacientes de baixa sobrevida e altas taxas de metástase nos subgrupos 3, 4 e SHH de meduloblastoma (CAVALLI et al., 2017). Em ATRT, a superexpressão do gene *MYC* caracteriza o subgrupo agressivo ATRT-MYC (JOHANN et al., 2016). Dentre as linhagens celulares estudadas no presente trabalho foi observado alteração no gene *MYC* apenas no paciente 22 com astrocitoma pilocístico (Anexos e Apêndices, Figura 18). Juntamente com outras alterações germinativas observadas no paciente 22, que incluem *CTNNB1*, a expressão alta do gene *MYC* pode ter contribuído para a transformação neoplásica e surgimento do tumor.

Apesar da inclusão clínica do gene de pluripotência *MYC* como marcador de pior prognóstico, e dos extensos estudos moleculares desenvolvidos nos últimos anos, ainda existe um grupo de pacientes que apresentam falhas durante a sua estratificação clínica e, portanto, não recebem o tratamento adequado. Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi possível associar a expressão de OCT4A ao prognóstico desfavorável de pacientes com meduloblastoma (RODINI et al., 2012). Neste mesmo trabalho, a expressão de OCT4A foi significativamente maior nos tumores de pacientes classificados clinicamente como médio risco e submetidos às

doses brandas de quimioterapia e radioterapia, porém com evolução clínica semelhante aos pacientes de alto risco. Posteriormente, ensaios funcionais confirmaram a capacidade da superexpressão OCT4A em atribuir maior tumorigênese *in vitro* e *in vivo* em linhagens celulares de meduloblastoma (DA SILVA et al., 2017). Portanto, a identificação de expressão positiva de OCT4A em pacientes com tumores embrionários do SNC poderia facilitar o diagnóstico precoce de pacientes de alto risco e aumentar a eficácia do tratamento da doença.

Atualmente, o diagnóstico de tumores do SNC é realizado a partir de sintomas clínicos, características histopatológicas e anormalidades em neuro-imagens evidentes nos estágios avançados da doença (SHALABY et al., 2014b). Não obstante, as células-de-origem do tumor respondem molecularmente às alterações genéticas e ao microambiente tumoral durante as fases iniciais da progressão tumoral. Deste modo, detectar precocemente essas alterações através de marcadores biológicos é uma estratégia promissora para aumentar a sobrevida dos pacientes. No presente estudo foi possível identificar diversos fatores proteícos e miRNAs presentes em MVs derivadas de células tumorais que poderiam ser utilizadas como marcadores no diagnóstico e estratificação de pacientes através de exames de sangue ou do líquido cefalorraquidiano, sem a necessidade de realizar uma biópsia intracranial (Capítulo 1).

O conteúdo de MVs derivadas das células carregam fatores oriundos de suas células parentais com a habilidade de interferir em diversos processos celulares e na comunicação intercelular (CHULPANOVA et al., 2018). A superexpressão de OCT4A nas linhagens celulares de meduloblastoma foi capaz de aumentar a quantidade de proteínas e RNAs nas MVs, como também alterou o seu conteúdo de modo que 464 proteínas, com enriquecimento de vias do desenvolvimento neural (via Wnt e mTOR), proliferação e morte celular, e 10 miRNAs foram predominantemente encontrados expressos neste modelo de meduloblastoma agressivo (Capítulo 1, Figuras 3A e 4A).

Em especial, as proteínas SETSIP e PABPC1L e o miR-6087, presentes em todas as MVs derivadas das linhagens de meduloblastoma, poderiam ser explorados como biomarcadores pois

não apresentam expressão em tecidos normais como plasma, soro sanguíneo ou líquido cefalorraquidiano e constituem fatores tipicamente expressos em células embrionárias humanas, durante a reprogramação somática celular e podem participar da manutenção do fenótipo tronco das células tumorais (MARGARITI et al., 2012; OZTURK et al., 2012; YOO et al., 2012).

Dentre os fatores moleculares encontrados no interior das MVs, os miRNAs constituem alvos interessantes porque além de estarem intimamente envolvidos em diversos mecanismos regulatórios das células, o seu perfil de expressão pode ser facilmente detectado em estágios pré-sintomáticos das doença (RAO; BENITO; FISCHER, 2013). Atualmente, a maioria dos biomarcadores detectados em pacientes com câncer são proteínas, como por exemplo SNF5 utilizado no diagnóstico clínico de ATRT (Anexos e Apêndices, item 5, Figura 13). Não obstante, ensaios experimentais com proteínas nem sempre são fáceis de aplicar no diagnóstico clínico e muitas vezes são trabalhosos. Além disso, a composição complexa de proteínas, as modificações pós-transducionais, a desnaturação e proteólise, e a sua baixa abundância nas amostras tornam o uso de proteínas como biomarcadores um grande desafio (ETHERIDGE et al., 2011). Como resultado, poucos biomarcadores proteicos foram recentemente aprovados para serem utilizados no diagnóstico clínico de tumores. Considerando as limitações dos biomarcadores de câncer atuais, o uso de miRNAs como biomarcadores no diagnóstico clínico tem despertado o interesse de diversos pesquisadores (CHAKRABORTY et al., 2017).

Os miRNAs são pequenas sequências de 20-30 oligonucleotídeos encontrados no citoplasma de diversas células, livres e circulantes no soro humano e no líquido cefalorraquidiano, e como constatado no presente estudo, dentro de MVs derivadas de células tumorais (RAO; BENITO; FISCHER, 2013). O perfil de expressão dos miRNAs derivados dessas diferentes fontes periféricas do corpo podem ser utilizadas para indicar o panorama molecular dos tumores intracraniais. Diversos estudos pré-clínicos baseados no perfil de expressão de tumores primários e diferentes linhagens celulares têm identificado diferentes miRNAs importantes para o

desenvolvimento, progressão e metástase dos tumores embrionários do SNC (BRAOUDAKI et al., 2014; KUNDER et al., 2013; SHALABY et al., 2014b).

Dentre os diversos miRNAs identificados na literatura como promotores (OncomiRs) e supressores de meduloblastoma e ATRT, dois deles foram encontrados diferencialmente expressos nas MVs derivadas das linhagens celulares de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A (miR-221 e miR-183) (HSIEH et al., 2014; PAVLAKIS et al., 2017; SREDNI et al., 2010). O oncomiR-181 presente exclusivamente nas amostras com superexpressão de OCT4A já foi encontrado expresso em astrocitoma e osteosarcoma (DELSIN et al., 2017; ZHI et al., 2015). Outros três miRNAs encontrados em todas as amostras de MVs, com e sem superexpressão de OCT4A, o miR-182, miR-1248 e let-7a já foram descritos diferencialmente expressos em meduloblastoma (KUNDER et al., 2013), osteosarcoma (ZHAO; XU; LIU, 2018) e Neuroblastoma (HENNCHEN et al., 2015), respectivamente, e poderiam ser utilizados como biomarcadores na clínica dos pacientes.

Em especial, três miRNAs comumente detectados em MVs derivadas de células com superexpressão de OCT4A (let-7f, miR-3607 e miR-183) apresentam como alvo comum o supressor tumoral TRIM71, proteína reguladora da auto-renovação de células-tronco embrionárias (MELTON; BLELLOCH, 2010; NGUYEN et al., 2017). Não obstante, apesar da importante relação entre fatores de pluripotência, como o OCT4A, e os tumores embrionários do SNC, há poucos dados na literatura sobre miRNAs relacionados com a auto renovação e diferencialmente expressos nesses tumores.

Em trabalho recente, o miR-367 foi encontrado circulante em amostras de soro e no líquido cefalorraquidiano de paciente pediátricos com tumores intracraniais de células germinativas (MURRAY et al., 2016). Neste mesmo estudo foi possível identificar a expressão aumentada de miR-367 no líquido cefalorraquidiano dos pacientes com tumores malignos em comparação com os tumores não-malignos, indicando esse miRNA como possível marcador de pior prognóstico (MURRAY; HUDDART; COLEMAN, 2016). Estudos prévios realizados no

nosso laboratório encontraram regulação direta entre o miR-367 e o fator de transcrição OCT4A (Kaid et al. 2015). Posteriormente, pela primeira vez na literatura, os resultados apresentados no Capítulo 2 demostram que a inibição do miR-367 diminui a tumorigênese *in vitro* de linhagens celulares de tumores embrionárias do SNC com agressividade basal e aumentada através da superexpressão de OCT4A. Foi encontrado também expressão positiva do miR-367 em MVs liberadas pelas linhagens DAOY, USP13-MED e USP7-ATRT. Após análise de expressão por PCR em tempo real, foi observado um aumento de miR-367 nas MVs derivadas das linhagens celulares de meduloblastoma com superexpressão de OCT4A (DAOY e USP13-MED).

Esses dados foram confirmados após sequenciamento dos miRNAs presente nas MVs (Capítulo 2). O miR-367 foi encontrado expresso em todas as MVs isoladas a partir das linhagens de meduloblastoma com exceção da D283-MED. A linhagem comercial D283-MED, diferencialmente das outras linhagens celulares avaliadas no estudo, foi derivada a partir de sítio metastático localizado no peritônio e geralmente apresenta comportamento celular diferenciado quando comparado com CHLA-01-MED, DAOY e USP13-MED (DA SILVA et al., 2017; SANTOS et al., 2015). Uma vez que a análise dos dados descritos no Capítulo 1 preferenciaram os miRNAs expressos em todas as linhagens celulares, de modo a excluir resultados linhagem dependente, o miR-367 não foi incluído na discussão do estudo.

A biossíntese dos miRNAs se iniciam através da transcrição do miRNA primário que contém a sequência de todos os componentes da sua família, e posteriormente esse transcrito é transportado para o citoplasma onde será processado para realizar a sua função regulatório, portanto, a quantificação do miR-367 maturo no citoplasma celular, através do PCR em tempo real, seria a melhor técnica para analisarmos qualquer evento regulatório (BÜSSING; SLACK; GROSSHANS, 2008; SHALABY et al., 2014b). Deste modo, a presença do miR-367 tanto no citoplasma de linhagens celulares de tumores de alta agressividade (KAID et al., 2015b), como também circulante em MVs derivadas de células tumorais (Capítulo 2), amostras de soro e líquido

cefalorraquidiano de pacientes com tumores do SNC (MURRAY et al., 2016), confirma o seu potencial clínico como alvo terapêutico e biomarcador de agressividade.

Além do promissor potencial clínico do uso de miRNAs como marcadores biológicos para classificação dos tumores em relação ao prognóstico e resposta ao tratamento terapêutico, os miRNAs podem ser utilizados como alvos terapêuticos devido à sua capacidade de interferir diretamente nos processos biológicos (BUDHU; JI; WANG, 2010). Os resultados *in vitro* e *in vivo* apresentados no Capítulo 2 confirmam a inibição de miR-367 como possível agente terapêutico para tumores embrionários do SNC. As diversas vantagens em considerar os miRNAs como uma nova classe de drogas terapêuticas incluem o seu tamanho pequeno, sua sequência conservada e bem conhecida de nucleotídeos, sua atuação no citoplasma sem a necessidade de ocorrer integração no genoma e, principalmente, seu amplo potencial de ação, em que um único miRNA pode alterar a expressão de até dois mil alvos ao mesmo tempo (SHALABY et al., 2014b). Portanto, a administração de um único anti-miRNA (miRNA antagonista ou miRNA *inhibitor*) ou um miRNA *mimic* (miRNAs sintéticos) no microambiente tumoral implica em um efeito combinatório de mudanças na expressão gênica que, em conjunto, podem regredir o crescimento tumoral e metástases (VAN ROOIJ; PURCELL; LEVIN, 2012).

O efeito inibitório no crescimento tumoral após administração intratumoral do miR-367 *inhibitor* em modelo *in vivo* foi observado apenas nas linhagens celulares mais agressivas, com superexpressão de OCT4A. Não foi observado inibição do crescimento tumoral e aumento de sobrevida nos animais injetados com as linhagens celulares de tumores embrionários com expressão basal do OCT4A (Anexos e Apêndices, Figura 11 e 12). Esses dados evidenciam a atuação do miR-367 via OCT4A, confirmando o seu uso terapêutico para os pacientes com pior prognóstico e que não respondem às terapias convencionais. Adicionalmente, o uso do miR-367 *inhibitor* poderia ser aplicado de forma conjunta aos tratamentos clínicos convencionais como quimioterapia e radioterapia. Extensos estudos têm associado a expressão de miRNAs e a sensibilidade do tumor à quimio- e radioterapia *in vitro* e/ou *in vivo*, sendo capazes de alterar à

resposta do tumor aos tratamentos convencionais (GONG et al., 2011; NASSER et al., 2008). Deste modo, o miR-367 *inhibitor* poderia inibir à resistência às terapias derivada da presença da subpopulação de CTT, como também a sua expressão no soro e no líquido cefalorraquidiano poderiam ser utilizado para prever a sensibilidade do paciente ao tratamento (NANA-SINKAM; CROCE, 2013).

Diante do exposto, o presente estudo apresenta alternativas para a solução de importantes problemas que rodeiam os tumores embrionários do SNC: (1) identificação de biomarcadores, proteínas e miRNAs, para a estratificação dos pacientes com pior prognóstico e (2) identificação de novos alvos terapêuticos para os tumores embrionários que carecem de tratamento efetivo. As novas abordagens terapêuticas aqui apresentadas que visaram tanto à origem progenitora do tumor (efeito oncolítico do ZIKV^{BR}) como também a presença de CTT (miR-367 *inhibitor*) poderiam ser aplicadas conjuntamente e/ou posteriormente a administração da quimio- e radioterapia. O perfil de expressão dos miRNAs e proteínas encontrados nas MVs derivadas das linhagens celulares de tumores embrionários do SNC podem ser utilizadas para guiar as decisões sobre as doses da quimio- e radioterapia, como já foi sugerido por outros autores (SHALABY et al., 2014b). Deste modo, os pacientes pediátricos poderiam ser diagnosticados mais previamente bem como receber um tratamento multifatorial, englobando aspectos moleculares e convencionais, porém necessariamente menos tóxicas e mais efetivas.

CONCLUSÕES

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

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

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

APÊNDICES

1. Padronização do Ensaio de Formação de Neuroesferas.

O projeto de doutorado foi inicialmente planejado com o objetivo de utilizar quatro linhagens celulares de meduloblastoma humano: CHLA-01-MED, D283-MED, DAOY e USP13-MED. Diferentemente das culturas aderentes de DAOY e USP13-MED, as linhagens comerciais CHLA-01-MED e D283-MED são cultivadas em suspensão e semi-adherente, respectivamente. A padronização dos ensaios de formação de neuroesfera e invasão 3D foram inicialmente realizados com essas quatro linhagens celulares. Porém, as linhagens de crescimento em suspensão, CHLA-01-Med e D283-Med, não se mostraram um modelo celular ideal para a realização dos ensaios de invasão 3D e análise de proliferação em tempo real. Sendo assim, CHLA-01-MED e D283-MED foram excluídas do estudo funcional de inibição do miR-367 como alvo terapêutico em células tumorais com superexpressão estável de OCT4A. Não obstante, para aumentar a reproduzibilidade e confiabilidade dos resultados, foi incluído nos experimentos a linhagem celular de tumor teratóide rabidóide atípico (ATRT) USP7-ATRT.

Após o estabelecimento e caracterização da linhagem USP7-ATRT (Item 5.1), foi iniciado o procedimento de padronização do ensaio de formação de neuroesfera seguindo o protocolo padrão do laboratório (DA SILVA et al., 2017; KAID et al., 2015b). A linhagem USP7-ATRT foi submetida ao tratamento em meio específico (DMEM-F12 suplementado 20 ng/ml de cada um dos fatores EGF e FGF, 1X B-27 e 1X N2) em placas de 96 poços de baixa adesão (*Ultra-Low Attachment Surface - Corning*) (volume de 100 µL de meio formador de neuroesferas) com densidade celular inicial de 1200 células/poço e mantidas em estufa a 37°C e pCO₂ 5%. USP7-ATRT foi capaz de gerar neuroesferas após 4 e 7 dias de cultivo (Figura 1-A e B, respectivamente).

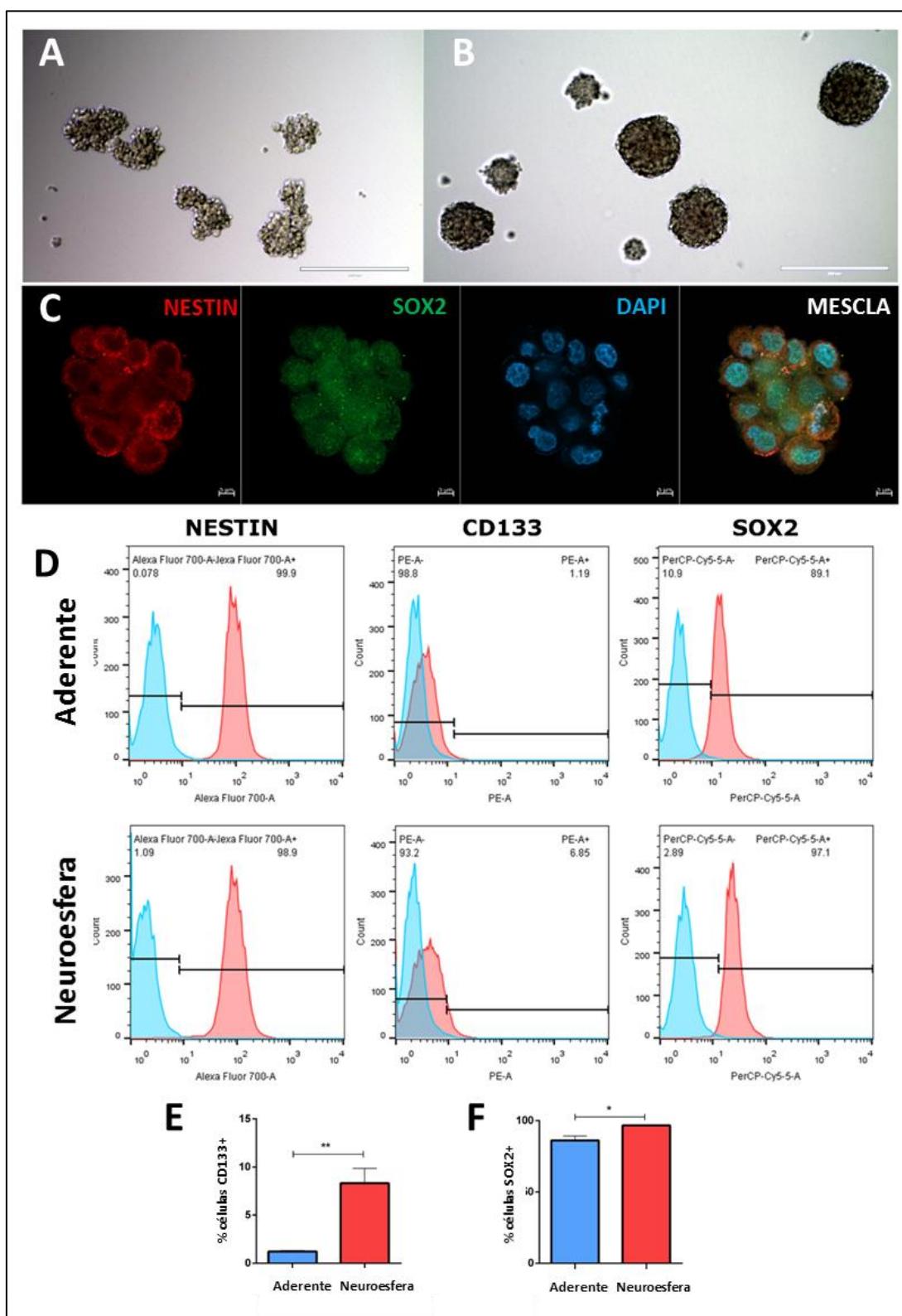


Figura 1 – Imagens de neuroesferas formadas após tratamento de 4 dias (A) e 7 dias (B) da linhagem celular USP7-ATRT. Barra de escala de 200 µm. (C) Imunofluorescência de neuroesferas formadas após 7 dias de tratamento marcadas com anti-NESTIN, anti-SOX2 e DAPI. Barra de escala de 5 µm. (D) Porcentagem de células positivas para NESTIN, CD133 e SOX2 por citometria de fluxo (FACs) de células aderentes e neuroesferas de USP7-ATRT. Curva do controle negativo em azul e curva das células marcadas em vermelho. Análise estatísticas dos dados de citometria com marcação de CD133 (E) e SOX2 (F). *p<0,05; **p<0,01.

As neuroesferas formadas se mostraram positivas para os marcadores de células progenitoras neurais, NESTIN e SOX2, demonstrado em ensaio de imunofluorescência (Figura 1-C). De forma semelhante, foi observado um aumento significativo de células CD133 e SOX2 positivas, quantificado por citometria de fluxo, após cultivo em meio de formação de neuroesferas, quando comparado com células em cultivo aderente normal, demonstrando o enriquecimento de células progenitoras após cultivo em neuroesfera (Figura 1 D-F). A partir do ensaio de citometria de fluxo, foi possível constatar marcação 100% positiva para NESTIN na linhagem celular USP7-ATRT, o mesmo marcador utilizado para caracterização de NPCs (Figura 1-D).

2. Padronização Ensaio de Invasão 3D.

A capacidade de invadir tecidos também é uma habilidade presente em células-tronco normais e em células-tronco tumorais. Portanto, foi incluído no estudo a análise funcional da capacidade invasiva das linhagens de tumores embrionários do SNC. Deste modo, as células foram submetidas ao ensaio de invasão celular 3D *in vitro* (*Cultrex® 96 Well 3D Spheroid BME Cell Invasion Assay - Amsbio™*) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, as células foram cultivadas em placa de 96 (96-well low-attachment round plate, Corning) em meio especializado para a formação de esferas (*Spheroid Formation ECM*) mimetizando um ambiente *in vivo*. Após a formação de esferas, as células foram embebidas em matriz de invasão composta por proteínas de membranas que formam uma rede favorecendo a invasão celular.

As linhagens CHLA-01-Med e D283-MED não foram capazes de formar uma esfera tumoral inicial nas condições experimentais sugeridas pelo fabricante, portanto foram excluídas da análise (Figura 2). A linhagem celular DAOY gerou esferas tumorais iniciais, porém nenhuma atividade invasiva foi observada nas células transfectadas com o controle inespecífico, miR-367 *mimic* e o miR-367 *inhibitor*, após 4 dias de cultivo em matriz invasiva (Figura 3).

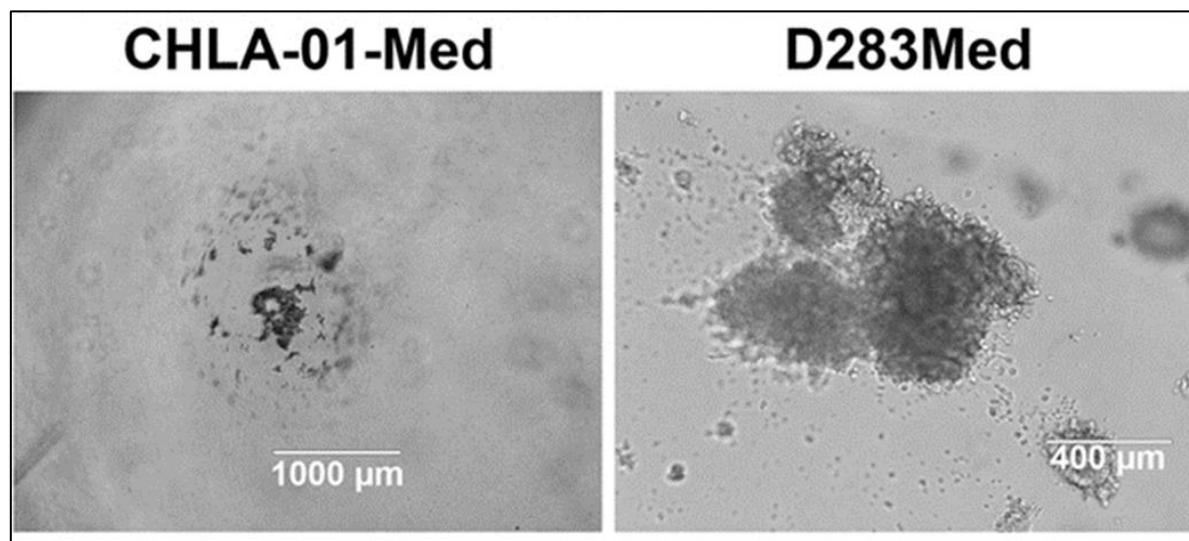


Figura 2 – Imagens representativas do ensaio de Invasão 3D nas linhagens de meduloblastoma CHLA-01-Med e D283-Med 72 horas após cultivo em matriz formadora de esferas tumorais.

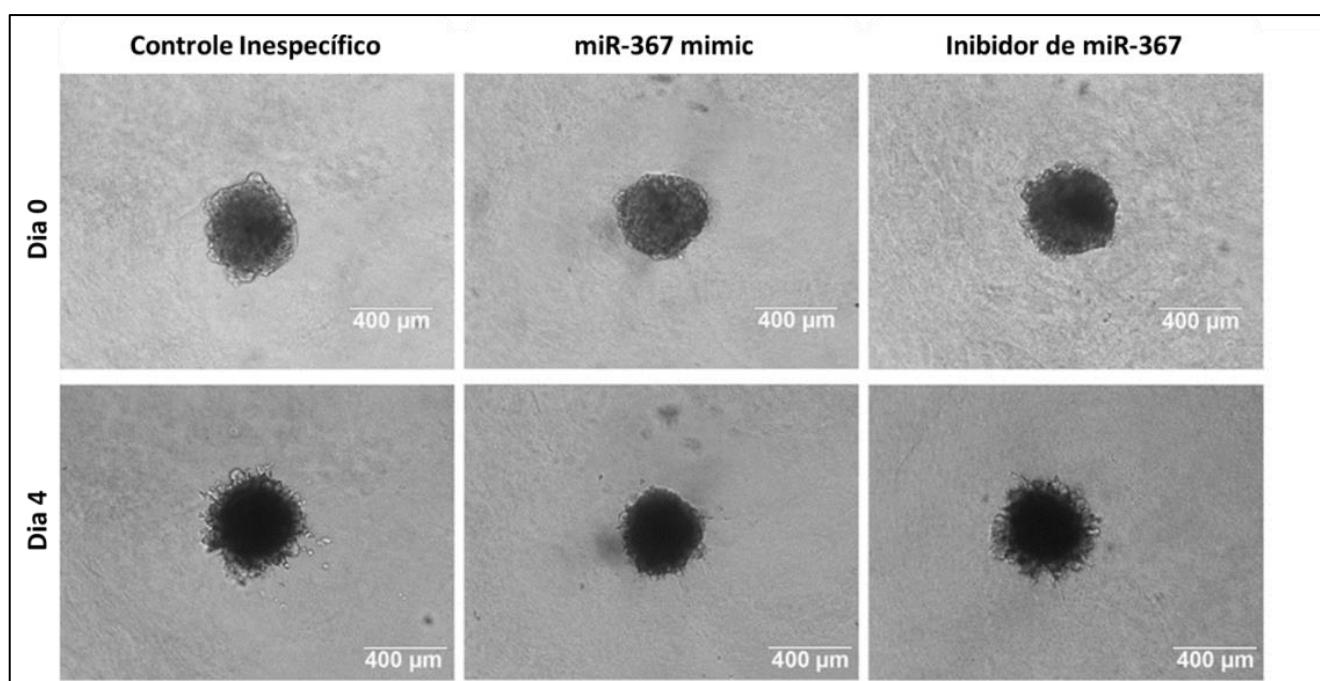


Figura 3 - Imagens representativas do ensaio de Invasão 3D nas linhagens de meduloblastoma DAOY nos dias zero e quatro após cultivo em matriz formadora de esferas tumorais e adição do meio indutor de invasão.

Entretanto, as linhagens de pacientes estabelecidas no nosso laboratório, USP13-MED e USP7-ATRT, foram capazes de gerar esferas e invadir a matriz nas condições experimentais apontadas pelo fabricante. As células invasivas formaram longos prolongamentos na matriz de invasão, sendo incluídas no estudo sobre a contribuição do miR-367 na agressividade dos tumores embrionários do SNC apresentados no Capítulo 2.

3. Padronização Proliferação em Tempo Real

Para analisar o crescimento das células tumorais, foi realizado o ensaio de proliferação do sistema xCeLLigence (ACEA, Bioscience, Inc.) que quantifica o número de células viáveis aderidas à placa a cada 15 minutos por um período contínuo, através do aparelho RTCA-SP inserido dentro da estufa de cultura celular. Deste modo foi possível obter uma curva de crescimento celular contínuo, sem interferência mecânica na cultura celular.

Devido a abordagem do ensaio de proliferação aplicado, foi possível trabalhar apenas com as linhagens que crescem aderidas à placa. Deste modo, as linhagens celulares cultivadas em suspensão e semi-adherentes, CHLA-01-Med e D283-Med, respectivamente, foram excluídas do projeto por não serem modelos experimentais apropriados para os ensaios de invasão 3D e proliferação em tempo real aplicados no presente estudo.

Primeiramente foi realizado uma padronização para determinar a quantidade ideal de células inicial no poço da placa E-Plate (96 poços) de modo a obter uma curva de crescimento exponencial seguida de um platô, referente à saturação da área do poço. Podemos ver na figura 6 imagens de células plaqueadas na *E-Plate* sobre as *bits* eletrônicas que quantificam a quantidade de células aderidas sobre as *bits* (círculos pretos) através da diferença de potencial entre os *chips* atribuindo um valor chamado de *Cell Index*. Portanto, as linhagens celulares de tumor embrionários com e sem superexpressão de OCT4A foram plaqueadas em uma única placa em 4 concentrações iniciais diferentes: 500, 100, 1500 e 2000 células (Figura 7).

I

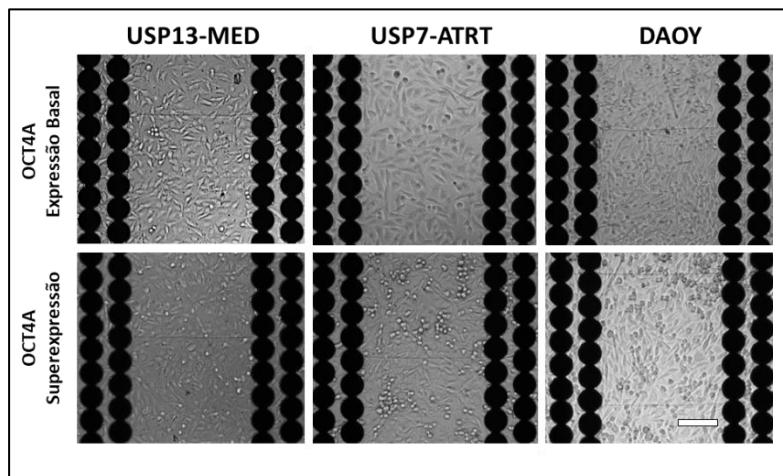


Figura 6 – Imagens representativas das linhagens celulares USP13-Med e USP7-ATRT com e sem superexpressão de OCT4A, 5 dias após o cultivo em placa com eletrodos de ouro (círculos pretos) do sistema xCELLingence. Barra de escala de 200 μ m.

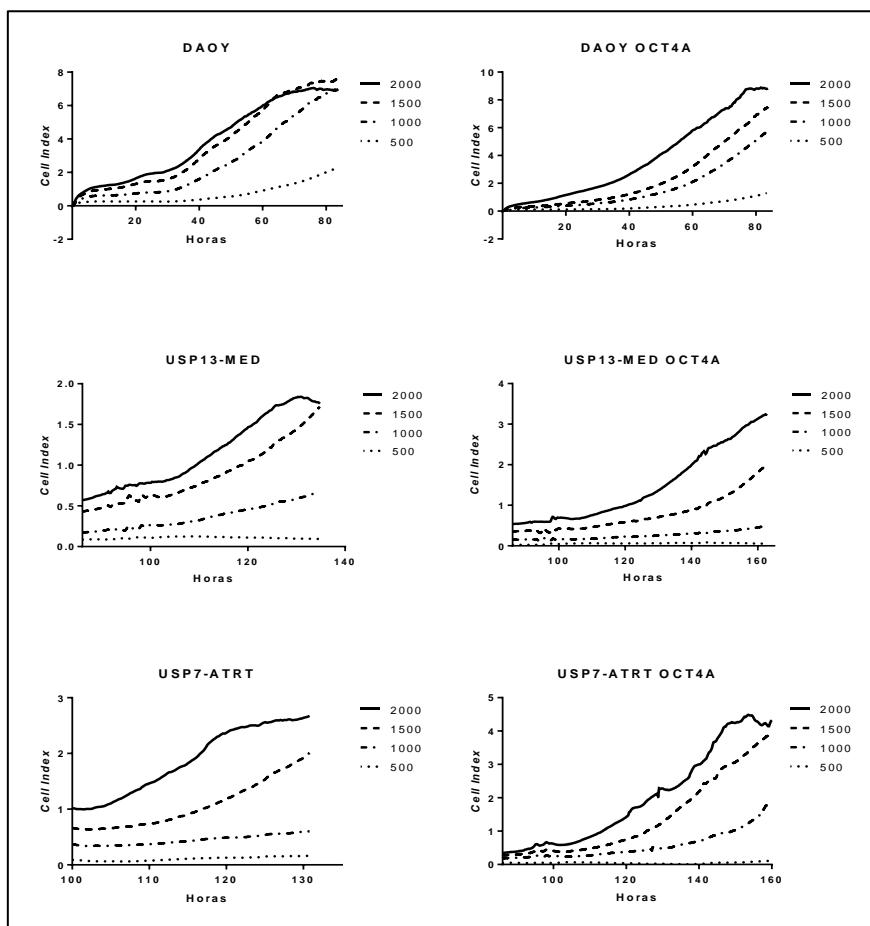


Figura 7: Curva de crescimento das linhagens celulares DAOY, USP13-MED e USP7-ATRT, com e sem superexpressão de OCT4A, em quatro densidades celulares iniciais diferentes por poço em E-Placa de 96 poços (xCelligenceTM).

O teste inicial das curvas de crescimento das linhagens celulares representadas nos gráficos da figura 7 mostram que apenas a concentração inicial de 2000 células foi capaz de formar um crescimento exponencial seguido de platô devido à saturação do poço nas três linhagens. Após análise das curvas de crescimento, foi possível obter o tempo de dobra das linhagens celulares (Figura 8). A superexpressão de OCT4A diminuiu o tempo de dobra em todas as linhagens celulares de tumores embrionários do SNC, corroborando com os dados publicados por da Silva et al, 2017. A USP7-ATRT apresentou o menor tempo de dobra em comparação com as linhagens de meduloblastoma, e a superexpressão do OCT4A levou a diminuição deste tempo de dobra para apenas 17,51 horas.

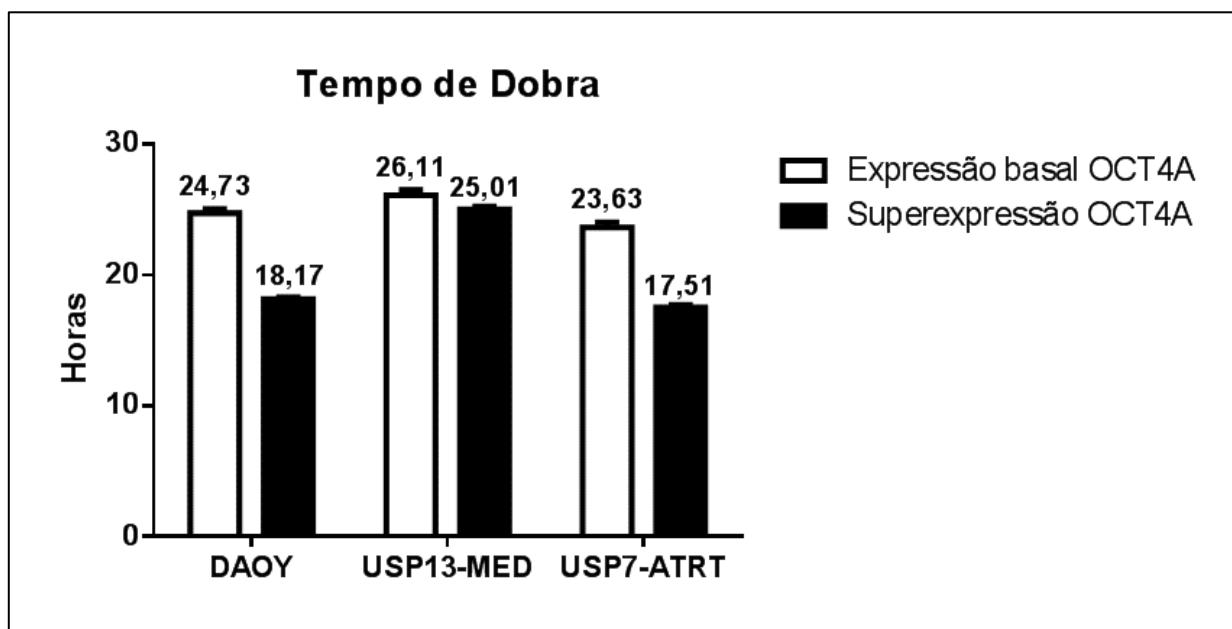


Figura 8: Análise do Tempo de Dobra das linhagens celulares DAOY, USP13-MED e USP7-ATRT, com e sem superexpressão de OCT4A. Dados gerados pelo programa xCELLigence.

4. Padronização do Ensaio *in vivo* (injeção intracranial do miR-367 inhibitor em modelo ortotópico)

Para avaliar o potencial do miR-367 como alvo terapêutico, se fez necessário a realização de experimento *in vivo*. O modelo animal mais utilizado para o estudo de tumores é o camundongo

Balb/C Nude que apresenta o sistema imunológico suprimido (mutação na resposta imunológica via CD4) permitindo assim o crescimento de células tumorais humanas em seu organismo. Portanto foi elaborado uma proposta de projeto para uso desses camundongos e submetido à Comissão de ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências (CEUA-IB). A proposta foi aprovada e registrada com o nº 291/2017.

Como o objetivo do projeto é avaliar o miR-367 como possível alvo terapêutico no tratamento de tumores embrionários de alta agressividade, o modelo experimental escolhido foi o metastático que mimetiza um quadro clínico de M1 (presença de células metastáticas no ventrículo do SNC), muito comum em pacientes pediátricos do SNC, classificando-os como pacientes de Alto Risco.

A administração do tratamento poderia ser realizada de três maneiras: 1- sistêmica; 2- local osmótica contínua; 3- intracranial. Como os miRNAs são oligonucleotídeos de cadeia pequena e baixa estabilidade, com um tempo de vida no organismo de apenas 48 horas, uma entrega sistêmica não seria vantajosa pois não haveria a garantia de que o miRNA teria a capacidade de atravessar todo o sistema circulatório, chegar ao SNC através da passagem pela barreira hemato-encefálica e alcançar as células tumorais com integridade suficiente para desempenhar sua função na regulação gênica.

A segunda alternativa de tratamento, o local osmótico continuo, por sua vez se baseia no uso de um pequeno equipamento acoplado ao cérebro de forma definitiva para liberação continua de pequenas doses (*osmotic fusion pumps*). Para utilização desta metodologia o miRNA permaneceria dentro do equipamento durante todo o tratamento, a uma temperatura de 37°C (temperatura do animal), o que levaria a degradação do material, uma vez que o tratamento duraria mais que 48 horas.

Diante do exposto, a via de administração que garante a integridade do miR-367 seriam injeções intracraniais periódicas no ventrículo, cavidade banhada pelo líquido-cefalorraquidiano, através da cirurgia esteriotáxica intracranial.

A maioria dos pacientes pediátricos de tumores embrionários do SNC apresentam um quadro avançado com M1 no momento do diagnóstico. Portanto eles são direcionados à cirurgia e total retirada do tumor. Porém muitas vezes a ressecção total do tumor não é possível devido à dificuldade de manter a integridade das regiões cerebrais. Na tentativa de mimetizar essa realidade, o protocolo de tratamento foi desenhado de modo que a primeira injeção do miR-367 *inhibitor* seria no líquido-cefalorraquidiano, durante a primeira cirurgia em que haveria uma ressecção parcial do tumor.

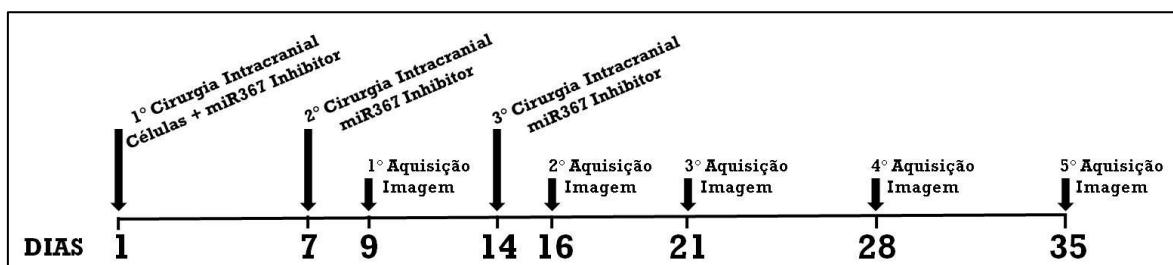


Figura 9: Cronograma representativo do protocolo de experimentação in vivo de tratamento de camundongos Balb/C Nude com miR-367 inhibitor.

Deste modo o protocolo de tratamento experimental detalhado na figura 9, consistiu em realizar uma cirurgia intracranial ortotópica com injeção de células tumorais no ventrículo do camundongo, e juntamente com as células, foi injetado 2 μ g de miR-367 *inhibitor* ou controle inespecífico como primeiro tratamento (maior quantidade de miRNA possível no volume máximo de 2 μ L). Após 7 e 14 dias foi realizado uma segunda/terceira cirurgia, respectivamente, para administração do mesmo tratamento direto no microambiente tumoral (2 μ g de miR-367 *inhibitor* em 2 μ L). O crescimento do tumor foi inicialmente acompanhado semanalmente através de aquisição de imagens de bioluminescência para quantificação do número de fôtons emitidos pelas linhagens celulares com expressão constitutiva de Luciferase após transdução do plasmídeo lentiviral pLV/Luc, 15 minutos após injeção intraperitoneal de 1,5 mg de D-luciferina (Promega, Madison, WI, USA) diluída em 100 μ L de PBS nos animais (DA SILVA et al., 2017; ROCHA et al., 2014).

Como descrito em diversos trabalhos científicos, o agente transsector PEI (In vivo-jetPEI, Polyplus-Transfection®) foi utilizado para garantir a integridade do miR-367 durante a sua entrega no animal (TEPLYUK et al., 2016). O processamento do miRNA com o PEI está detalhado na Figura 10.

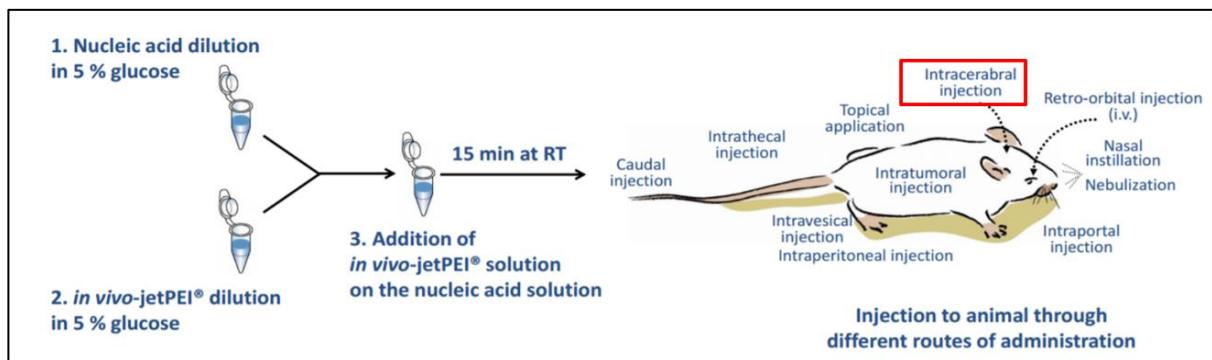


Figura 10: Esquema do processamento do miR-367 *inhibitor* com o agente transsector PEI presente no protocolo do fabricante (in vivo-jetPEI®, Polyplus Tranfection)

Um teste inicial foi realizado em animal piloto para confirmar a viabilidade de três cirurgias ortotópicas intracraniais seguidas com intervalo de 7 dias para a recuperação do camundongo. Após confirmar que 5 dias eram suficiente para a recuperação total do animal, seguiu-se para a realização do ensaio inicialmente com a linhagem DAOY com um *n* experimental de 8 para cada grupo (DAOY/Controle Inespecífico; DAOY/miR-367 *inhibitor*; DAOY-OCT4A/Controle Inespecífico; DAOY-OCT4A /miR-367 *inhibitor*) totalizando 32 camundongos.

O acompanhamento do crescimento tumoral deste primeiro grupo foi mais frequente, com 5 aquisições de imagem e análise de quantidade de fotões emitidos pelo tumor (software IVIS). Como o miRNA apresenta seu maior pico de ação 48 horas após a transfecção, a primeira aquisição de imagem foi realizada 2 dias após a segunda cirurgia, esperando-se encontrar alguma diferença estatística entre o tamanho dos tumores (Figura 9). As aquisições de imagens seguintes foram realizadas em um intervalo de 7 dias. Animais tratados com o oligonucleotídeo controle inespecífico e miR-367 *inhibitor* foram mantidos no microisolador para evitar variáveis externas diferentes.

Com as 5 aquisições de imagens foi possível realizar uma curva de crescimento da massa tumoral no período de 35 dias após a injeção do tumor e obter o Tempo de Dobra da massa tumoral (DT). Podemos observar na figura 11 que o DT do tumor nos animais com injeção intracranial da linhagem DAOY foi de 6,613 dias. O tratamento desse tumor com miR-367 *inhibitor* aumentou levemente DT para 7,616 dias, porém não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 11, esquerda). Os animais submetidos a cirurgia com a linhagem DAOY-OCT4A apresentaram um crescimento elevado quando comparado com as células com expressão basal de OCT4A, com um DT de apenas 4,287 dias. O tratamento desse tumor mais agressivo com o miRNA desacelerou significativamente o crescimento tumoral, de modo que o seu DT aumentasse para 9,614 dias, sendo maior que o DT da linhagem DAOY com expressão basal de OCT4A (Figura 11, direita).

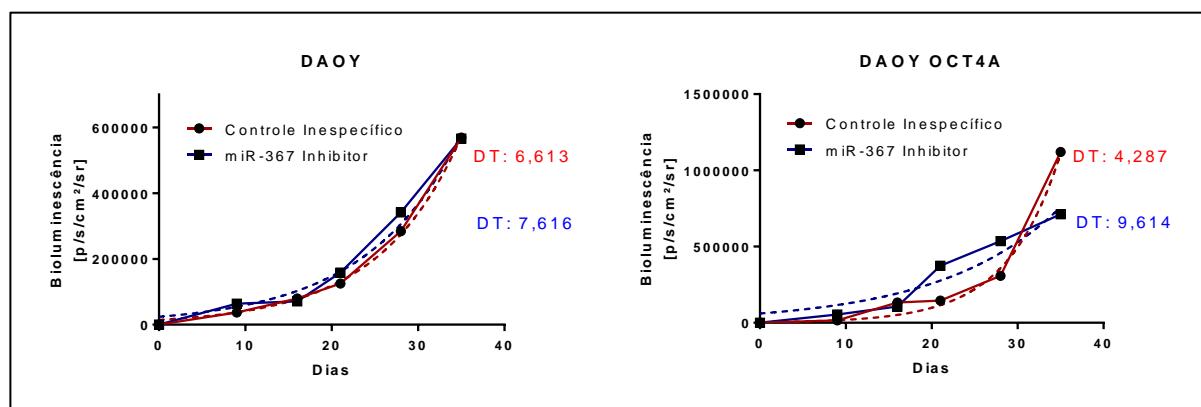


Figura 11: Curva de crescimento da massa tumoral em camundongos submetidos a cirurgia intracranial com injeção de células DAOY com e sem superepressão de OCT4A e tratados com miR-367 *inhibitor* ou controle inespecífico, por quantificação da bioluminescência emitida pelas células tumorais com expressão de luciferase. DT = Tempo de Dobra.

O efeito da diminuição do crescimento tumoral após tratamento com miR-367 *inhibitor* refletiu em um aumento da sobrevida apenas nos camundongos do grupo DAOY-OCT4A (Capítulo 2). Os animais foram acompanhados por 90 dias após a primeira cirurgia. Não houve diferença estatística na sobrevida do grupo dos animais injetados com DAOY com expressão basal de OCT4A (Figura 12).

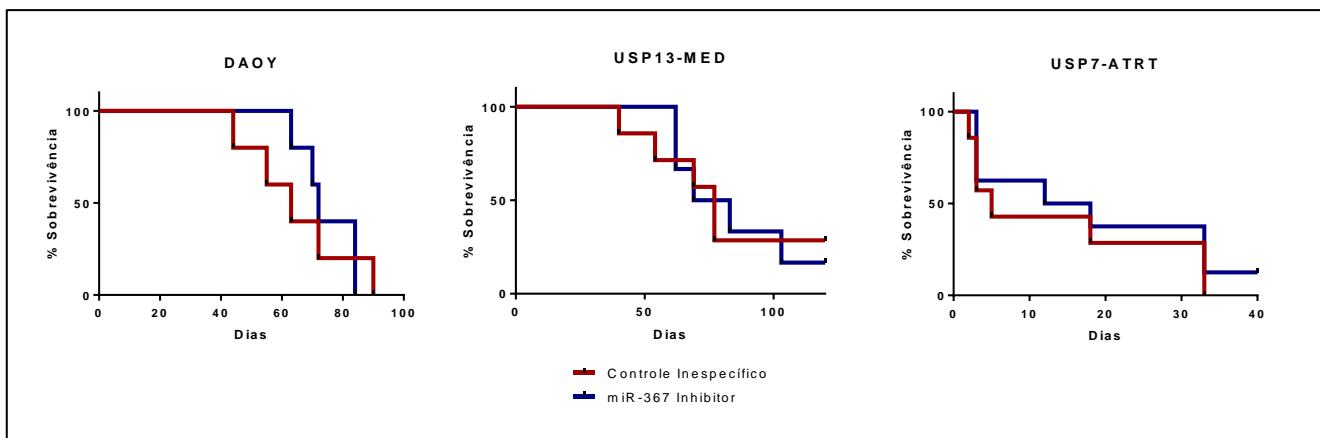


Figura 12: Curva de sobrevida Kaplan-Meyer para os camundongos Balb/C Nude após inoculação ortotópica de células DAOY, USP13-MED E USP7-ATRT com expressão basal de OCT4A, submetidos ao tratamento com miR-367 inhibitor ou controle inespecífico. Os animais foram eutanasiados após o surgimento de sintomas clínicos ou perda excessiva de peso.

Foi possível observar diferença estatística entre os grupos tratados, em relação ao tamanho da massa tumoral e sua localização no camundongo no tempo de 35 dias após a primeira cirurgia. Portanto, o protocolo experimental foi repetido para a linhagem USP13-MED, porém com apenas uma aquisição de imagem no tempo de 35 dias para evitar qualquer tipo de estresse aos animais. As aquisições de imagem dos animais injetados com a linhagem USP7-ATRT foram obtidas no tempo de 21 dias após a primeira cirurgia devido à alta mortalidade desse tipo tumoral no camundongo. Como descrito no material suplementar do Capítulo 3, os camundongos injetados com USP7-ATRT apresentam sobrevida média de apenas 3 semanas. A superexpressão de OCT4A na linhagem de ATRT levou a morte da maioria dos camundongos em apenas 7 dias. Portanto foi decidido antecipar em 14 dias a aquisição de imagem em comparação com as outras linhagens de meduloblastoma (Capítulo 2).

5. Estabelecimento de novas linhagens celulares de tumores pediátricos

Durante o doutorado, foi constituído um procedimento de rotina em colaboração com o Dr. Hamilton Matushita, médico do Departamento de Cirurgia Neurológica do Hospital das

Clínicas da Universidade de São Paulo, para estabelecimento de novas linhagens celulares de tumores pediátricos. Durante o período de 4 meses, a doutoranda participou de neurocirurgias, realizadas toda segunda-feira, para ressecção parcial ou total de tumores pediátricos humanos. O material biológico doado pelo paciente, sob autorização dos pais, era armazenado em meio DMEM sem soro e encaminhado para o laboratório. O fragmento tumoral era dissociado com utilização do kit *Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec)* e cultivado em DMEM high suplementado com 10% soro fetal bovino. Durante o período de doutorado foram coletados 6 fragmentos tumorais e 4 amostras de sangue, dos quais 3 obtiveram o diagnóstico confirmado de meduloblastoma e um de ependimoma. Durante esse período, duas linhagens foram estudadas: USP7-ATRT (tumor teratóide rabidóide atípico - ATRT) e USP21-EPE (ependimoma). Adicionalmente foi realizado uma análise de sequenciamento de exoma de amostras tumorais (fragmento tumoral) e normais (saliva) do paciente número 22 diagnosticado com astrocitomas pilocístico e portador da Síndrome de Mowat-Wilson. Todo o procedimento de estabelecimento e caracterização de linhagens foi realizado com auxílio da especialista Dr. Patrícia Semedo-Kuriki.

5.1. Estabelecimento da linhagem USP7-ATRT

A linhagem celular de ATRT, derivada de tumor localizado no lobo temporal esquerdo de um paciente pediátrico do sexo masculino e idade de 39 meses, foi retirado em cirurgia realizada no dia 19.01.2011 sob supervisão do Dr. Hamilton Matushita. As células tumorais dissociadas do tumor foram cultivadas em agarose, no ensaio de crescimento independente de ancoragem em que apenas as células com maior agressividade são capazes de crescer. A linhagem USP7-ATRT foi isolada a partir de um clone capaz de crescer nesse meio inóspito e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A imortalidade da célula foi confirmada em ensaio de PDL (*Population Doubling Level*) em que seu tempo de dobra foi de 24,16 horas (KAID et al., 2018).

Clinicamente, o diagnóstico de USP7-ATRT foi realizado pela equipe médica responsável pelo paciente através de análise histopatológica do fragmento do tumor. Morfologicamente, foi observado a presença de células tumorais rhabdoides (formato redondo-oval com grande quantidade citoplasmática e núcleo não centralizado) com tamanho médio aumentado. Os marcadores utilizados na clínica para identificação de ATRT incluem antígeno da membrana epitelial (EMA), proteína glial (GFAP), vimentina (VIM) e actina de músculo (α SMA). No caso de meduloblastoma, as células devem ser negativas para EMA e α SMA, e positiva para sinapsina (SYN). As células tumorais de USP7-ATRT se mostraram positivas para CITOQUERATINA AE1/AE3, EMA, GFAP e VIM, e apresentaram marcação negativa para α SMA e Desmina.

Outro marcador amplamente utilizado para diagnóstico de ATRT é a mutação do gene *SMARCB1*, que codifica a proteína SNF5, membro do complexo de remodelamento de cromatina ATP-dependente SWI/SNF, presente em 98% dos ATRTs (Johann et al, 2016). Como não havia sido realizado o estudo de expressão de SNF5 na linhagem USP7-ATRT, a busca da mutação no gene *SMARCB1* tornou-se necessária. Deste modo, o presente estudo realizou o sequenciamento de todo o EXOMA (*Agilent Exome v4 51 Mb Capture Technology*; sequenciamento em *Illumina HiSeq200*) da linhagem celular de ATRT (Tabela 1), como também análise de expressão de SNF5 por Western-Blotting (resultado presente no material suplementar do Capítulo 3) e Imunofluorescência (Figura 13).

O alinhamento da sequência, processamento dos dados, e análise das variantes foi realizado através do *Burrows-Wheeler Aligner*, *Picard*, pacote de *Genome Analysis Toolkit* e ANNOVAR, respectivamente. Após análise bioinformática dos dados, e aplicação dos filtros *1000genome* (genes com mutações inferior a 0,5% na população), o *sift* e *fathmm* (*ANNOVAR BIOINFORMATIC ANALYSIS*), foram constatadas apenas 6 mutações deletérias (Tabela 1), sendo 2 dos genes mutados envolvidos na patologia do câncer (Análise realizada no software *Ingenuity Pathway Analysis* – QIAGEN). Não foi encontrada mutação no gene *SMARCB1*. Esses dados foram confirmados após análise de SNF5 (Anti-SNF5 - Ab19286, ABCAM) através das

imagens de imunofluorescência mostrando a expressão e localização da proteína no núcleo da linhagem celular USP7-ATRT (Figura 13).

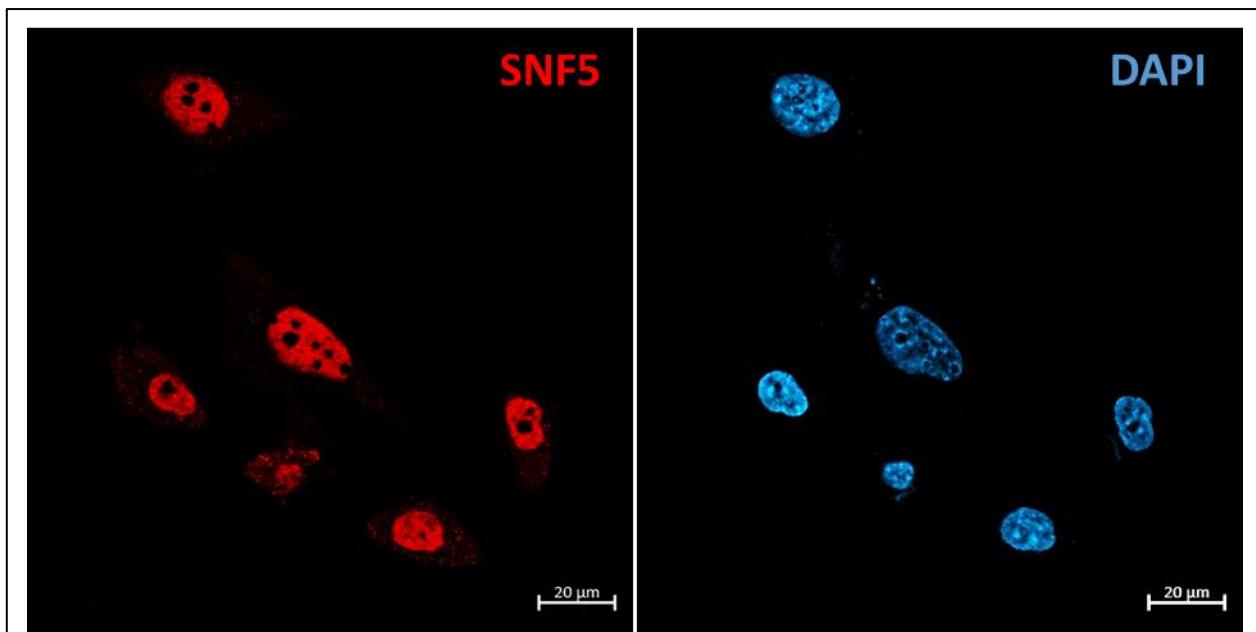


Figura 13: Imagens de imunofluorescência com marcação nuclear de anti-SNF5 (vermelho) e DAPI (azul) da linhagem celular USP7-ATRT. Barra de escala de 20 μm .

Em tumores diagnosticados como ATRT, sem ocorrência de mutação no *SMARCB1*, geralmente é observado mutação no gene *SMARCA4*, sendo considerado como uma mutação alternativa (Hasselblatt et al, 2011). Apesar de USP7-ATRT não apresentar mutação em *SMARCB1*, da mesma forma não foi contatado mutação em *SMARCA4*, porém foi observado mutação deletéria em *SMARCA5*. Não há dados na literatura sobre a associação desse gene e caracterização de ATRT, entretanto, devido as funções semelhantes desempenhadas por *SMARCA5* em relação a sua família de proteínas, esse gene se mostrou um alvo importante para estudos futuros de diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1: Mutações Sómáticas detectadas em USP7-ATRT por sequenciamento de exoma (banco de dados Annovar e programa Ingenuity Pathway Analysis - Qiagen).

Nome do Gene	Chr	Mutação	Exon	Posição da mutação nonsense	Posição da mutação proteína	Funções e Doenças associadas	Vias envolvidas
SMARCA5	4	homozigose	16	c.2110A>G	p.T704A	Pertencente à família SWI/SNF Apoptose, degeneração e indução de crescimento de embrioblasto. Compactação, formação e remodelamento de cromatina. Posição e formação de nucleossomos.	Desenvolvimento Embrionário Crescimento Celular e Proliferação Morte celular Replicação de DNA, Recombinação e Reparo Ciclo Celular
KCNA5	12	homozigose	1	c.1474G>T	p.Q492W	Canal de voltagem de Potássio Morfologia anormal de micróglia. Proliferação de astrócitos. Apoptose de linhagens celulares de tumores pancreáticos. Sarcoma de Ewing's	Desenvolvimento de Órgãos Função e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Sinalização, Morfologia, Morte e Sobrevivência Celular Crescimento Celular e Proliferação Câncer
MYH6	14	homozigose	3	c.115G>A	p.V39M	Regulação da contração muscular. Envolvido na necrose do miocárdio. Perda disfunção e formação de células musculares. Movimentação dos filamentos de actina.	Morte celular Desenvolvimento de Órgãos
PRKAR2A	3	heterozigose	10	c.1009G>C	p.G337R	Transporte Aquaporina-dependente. Envolvido na descondensarão de cromatina e transição epitélio-mesenquimal. Inibição do crescimento de células tumorais.	Ciclo Celular Interação e sinalização do Contato de Célula a Célula Crescimento Celular e Proliferação Câncer Morfologia do Tumor
PIGG	4	homozigose	2	c.344C>T	p. T115I	Metabolismo de proteínas Biossíntese de GPI. Acúmulo de AMP cíclico. Envolvido no retardo mental autossômico recessivo tipo 53	Doenças Hereditárias e do Desenvolvimento. Doenças Neurológicas Modificação Pós-Traducional
RYR1	19	heterozigose	33	c.4747C>T	p.R1583C	Transporte de canal iônico. Oscilação, entrada, concentração e transporte de Ca ²⁺ Invaginação do sarcolema. Neurodegeneração dos axônios.	Cellular Development, Function and Maintenance Crescimento Celular e Proliferação Morte celular Embryonic Development Nervous System Development and Function Neurological Disease

5.2. Estabelecimento da linhagem USP21-EPE

O fragmento tumoral estudado foi coletado em cirurgia realizada no dia 06.07.2015 de paciente pediátrico do sexo feminino, idade de 21 meses e diagnosticado com ependimoma de grau II. As células tumorais dissociadas do tumor foram cultivadas em três condições diferentes: 1- cultivo aderente em DMEM suplementado com 10% SFB; 2- cultivo em meio de formação de neuroesferas (DMEM/F12 suplementado do N-2 1x, B-27 1x, 20 ng/mL de EGF e FGFb); 3- cultivadas em meio de crescimento de células endoteliais (EBM – Lonza) para isolamento de pericitos associados ao tumor.

Em geral, as células cultivadas proliferaram com sucesso. As neuroesferas formadas apresentaram esferas de diâmetro médio de 50 µm. As células cultivadas em EBM e DMEM foram submetidas a citometria de fluxo para caracterização do perfil de marcadores (Tabela 2). Dos quatro marcadores típicos de células endoteliais, as células cultivadas em EBM mostraram alta população positiva para três dos anticorpos testados (CD146: 99,9%; CD105: 86,4%; NG2: 99,8%). Apesar dessas células se mostrarem positiva para CD90, marcadores característicos de células mesenquimais do estroma, o seu perfil de pericito foi confirmado através de estudos funcionais de formação de tubos em que as células foram capazes de gerar estruturas capilares *in vitro* (RIBEIRO et al., 2017). Deste modo, os pericitos derivados do ependimoma (Paciente 21) foram incluídos no estudo publicado na revista científica *Stem cells internacional* em que a doutoranda é segunda autora (RIBEIRO et al., 2017) (Anexo 4).

As células aderentes cultivadas em DMEM, nomeadas como USP21-EPE, se mostraram positivas para marcadores típicos de células progenitoras neurais (Tabela 2). As imagens de imunofluorescência da figura 14 mostram a morfologia dessa célula com marcação do citoesqueleto (anti-vimentina, ABCAM, ab24525) e núcleo (DAPI). Para caracterização dessa linhagem, foram realizados ensaios funcionais *in vitro* como crescimento independente de ancoragem, formação de neuroesfera e PDL, em colaboração da pós-doutoranda Marina Marçola.

Tabela 2: Expressão de marcadores de superfície celular de pericitos derivados do ependimoma (células cultivadas em EBM) e linhagem celular de ependimoma USP21-EPE (células cultivadas em DMEM). Porcentagem de células positivas determinadas por análise em citometro de fluxo (FACS).

Células cultivadas em EBM	Marcadores típicos de células endoteliais	CD146	99,9%
		CD31	19,8%
		CD105	86,4%
		NG2	99,8%
	Marcador típicos de células mesenquimais do estroma	CD45	5,4%
		CD90	99,7%
	Marcador de células hematopoiéticas	CD34	0,7%
	Marcadores típicos de células progenitoras neurais	CD133	83,8%
		SOX2	60,3%
		NESTIN	99,9%
	Marcadores típicos de células tumorais	CD15	3,8%
	Marcadores típicos de células neurais	CD271	14,2%

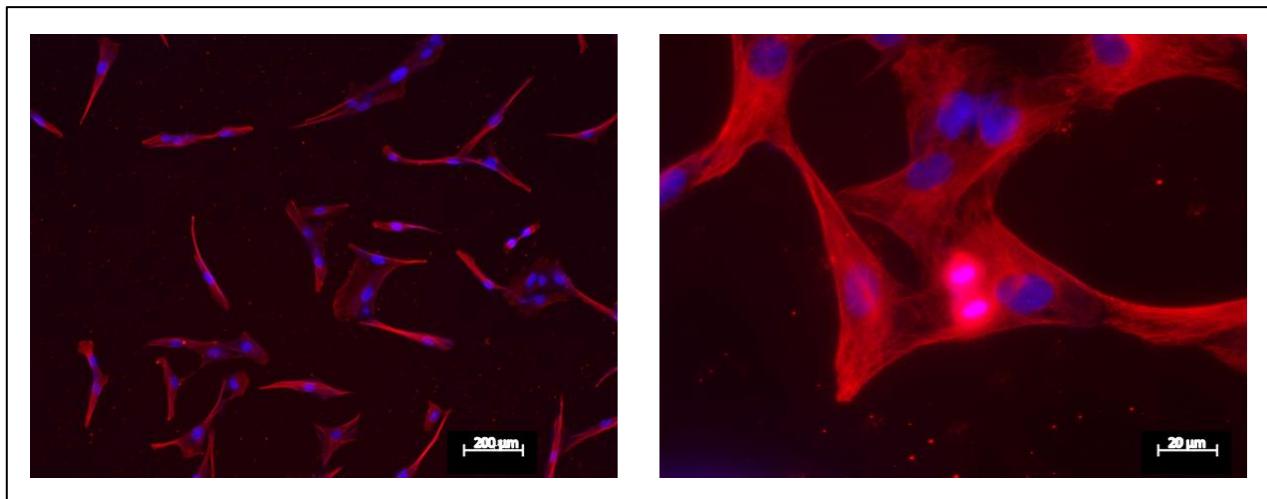


Figura 14: Imagens de imunofluorescência com marcação de citoesqueleto anti-vimentina (vermelho) e DAPI (azul) da linhagem celular USP21-EPE. Barra de escala de 200 e 20 μm .

O PDL de USP21-EPE apresentou curva de crescente até 35 dias de cultivo, porém a partir deste período as células apresentaram uma diminuição do crescimento *in vitro* (Figura 15, gráfico esquerdo). Deste modo a linhagem celular de ependimoma foi submetida ao crescimento unicelular em agarose (crescimento independente de ancoragem) para isolamento de clone

agressivo com capacidade de se multiplicar neste meio inóspito (Figura 16). As esferas de maior diâmetro foram retiradas da agarose e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Dentre as 20 esferas isoladas, apenas o clone 9 apresentou um crescimento exponencial após 35 dias de experimento. Novamente como observado no PDL da linhagem parental, após 42 dias o clone 9 apresentou uma diminuição no crescimento celular (Figura 15, gráfico direito).

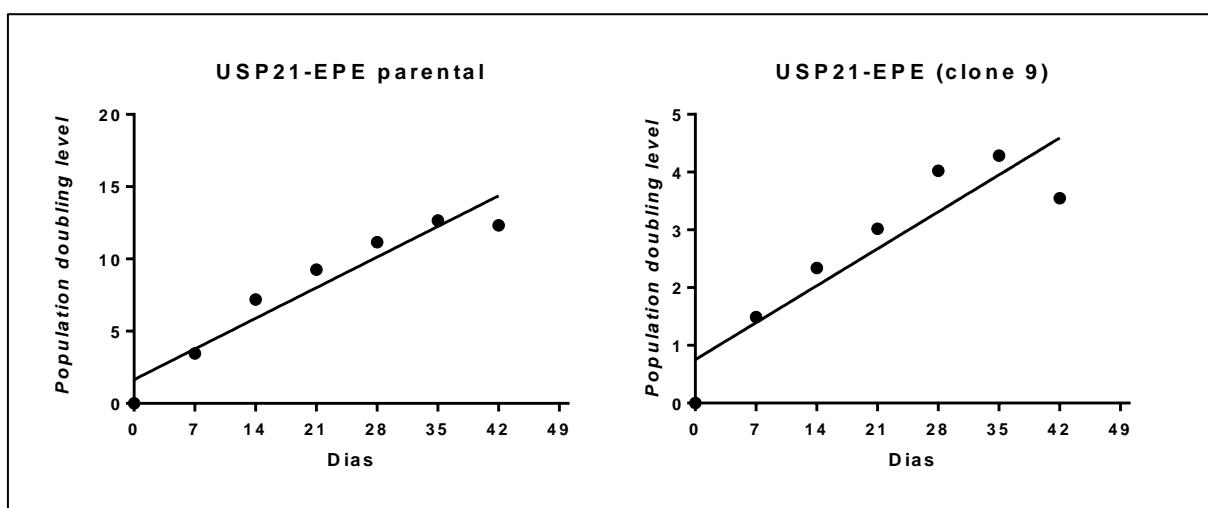


Figura 15: Crescimento celular *in vitro* da linhagem celular de epedimoma parental e do clone isolado após crescimento de esfera em agarose (crescimento independente de ancoragem). O PDL foi calculado a partir da formula: $PDL = \log_{10} (N/N_0) \times 3.33$; em que N = número de células aderidas na garrafa após o período de crescimento e N₀ = número de células plaqueadas no início de cada novo cultivo.

A linhagem celular USP21-EPE foi capaz de gerar Neuroesferas após 4 e 7 dias de cultivo (Figura 17-A e B, respectivamente) em meio que favorece o crescimento de células progenitoras (DMEM-F12 suplementado 20 ng/ml de cada um dos fatores EGF e FGF, 1X B-27 e 1X N2 e mantidas em estufa a 37°C e pCO₂ 5%) em placa de 24 poços de baixa aderência (Ultra-Low Attachment Surface - Corning). Após 4 dias de cultivo, as neuroesferas apresentaram diâmetro médio de 85,9 μm, com média de 16 esferas por poço (72% = 100 μm; 28% = 50 μm). Após 7 dias de cultivo, as neuroesferas continuaram com aproximadamente o mesmo diâmetro médio (73 μm), porém houve um pequeno aumento do número de neuroesferas por poço (18 esferas) (Figura 17).



Figura 16: Imagens representativas de esferas da linhagem celular de ependimoma USP21-EPE após 7 dias de crescimento independente de ancoragem. Barra de escala de 50 μm.

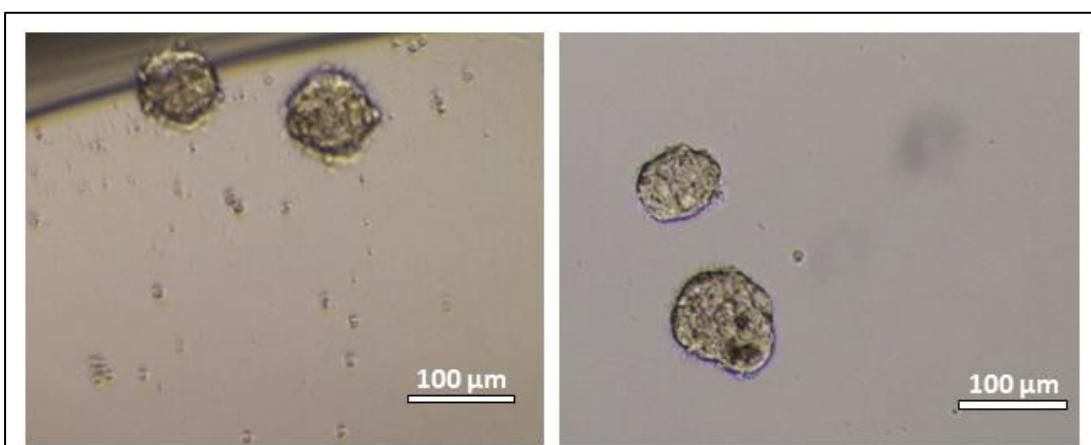


Figura 17: Imagens representativas da linhagem de ependimoma USP21-EPE cultivadas em meio de formação de neuroesferas após 4 dias (esquerda) e 7 dias (direita) de cultivo. Barra de escala de 100 μm.

5.3. Sequenciamento de EXOMA do paciente 22

Em colaboração com o Dr. José Albino da Paz, médico do Instituto da Criança (FMUSP), amostras de tecido tumoral e de tecido normal (saliva) foram coletadas no dia 28.09.2015 de um paciente com idade de 10 anos e 2 meses, portador da Síndrome de Mowat-Wilson devido a mutação de ponto no exon 8 do gene *ZEB2* e diagnosticado com astrocitoma pilocístico na região do cerebelo. Com amostras de tecido tumoral e normal, foi possível identificar mutações germinativas e somáticas na tentativa de encontrar mutações responsáveis pelo surgimento do tumor como também buscar alguma correlação com o gene *ZEB2* responsável pelo fenótipo da síndrome.

A saliva do paciente foi coletada pelo kit coletor *Oragene DNA / OG-500* (DNAGenotek). O DNA das amostras de saliva e do tecido tumoral foram extraídas pelo kit *AllPrep DNA/RNA Mini* (Qiagen). O sequenciamento do EXOMA e a análise dos dados foi realizado como descrito acima com a linhagem USP7-ATRT. Ao comparar as amostras de tecido normal e de tecido tumoral, foi possível identificar 15 mutações germinativas em 13 genes diferentes e 1 mutação somática no tumor (Tabela 3). A mutação germinativa em *ZEB2* foi a mesma encontrada em análise de sequenciamento do gene realizado em laboratório internacional (França) após encaminhamento da amostra pela equipe médica para confirmação do diagnóstico da síndrome. Dos 13 genes com mutações germinativas, 4 estão envolvidos em vias da biogênese do câncer (*CACNA1E*, *DKC1*, *KCNJ5*, *ZNF717*) e 2 desempenham funções importantes do desenvolvimento neural (*CHD8*, *SCUBE2*). O gene *CDH8* é importante para o desenvolvimento embrionário e do SNC e pouco estudado na biogênese do câncer, porém pode estar envolvido na transformação neoplásica por apresentar sítios de ligação do tipo *enhancer* (Identificador *GeneHancer*: GH16I062035; banco de dados de genes humano GeneCard®) para o fator de transcrição SUZ12 (*GeneHancer Score*: 550,8), amplamente discutido no Capítulo 2 como sendo alvo do miR-367. O gene *SCUBE2* é responsável por aumentar a secreção intracelular da proteína HEDGEHOG levando a ativação da via SHH importante para o desenvolvimento neural e, como descrito anteriormente, esta via comumente está alterada em tumores embrionários do SNC como meduloblastoma (TUKACHINSKY et al., 2012). A análise de vias no programa *Ingenuity Pathway Analysis-IPA* (Qiagen) identificou 26 doenças associadas as mutações germinativas encontradas no paciente 22, das quais apenas 4 não são neoplasias (Tabela 4). Três genes foram correlacionados ao surgimento de tumores embrionários (p-Value = 0,00285): *CACNA1E*, *TRRAP* e *KNF717*. Mutações encontradas no gene responsável pela síndrome, *ZEB2*, juntamente com o gene *TRRAP* e *ZNF717* estão associadas ao surgimento de astrocitomas, o tumor do SNC encontrado no paciente 22 (p-Value = 0,0274).

Tabela 3: Mutações Germinativas detectadas no paciente 22 por sequenciamento de exoma (banco de dados Annovar e programa Ingenuity Pathway Analysis – Qiagen).

Nome do Gene	Chr	Mutação	Exon	Posição da mutação (nonsense)	Posição da mutação proteína	Funções e Doenças associadas	Vias envolvidas
ZEB2	2	heterozigose	8	c.1027C>T	p.R343X	Síndrome de Mowat-Wilson. Envolvido na transição epitelio-mesenquimal, invasão, migração, adesão e senescência de linhagens celulares. Diferenciação de melanócitos. Envolvido na adesão de célula-a-célula e movimentação de linhagens celulares de carcinoma.	Doenças do Desenvolvimento Doenças Neurológicas Crescimento celular, Desenvolvimento e Proliferação Interação e Sinalização Celular Movimentação Celular Ciclo Celular
AQR	15	heterozigose	26	c.2936A>T	p.Q979L	Proteína spliceossomal com ligação de ítrons	-
CACNA1E	1	heterozigose	20	c.275C>T	p.R919W	Canal de Cálcio dependente de voltagem. Envolvido na biogênese de osteosarcoma.	Câncer Doenças Musculares e Esqueléticas
CHD8	14	heterozigose	32	c.4829G>T	p.R1610L	Pertencente à família das caderinas. Envolvido na formação cerebral.	Desenvolvimento Embrionário e do SNC
DKC1	X	homozigose	9	c.838A>C	p.S280R	Biogênese de snoRNAs. Processamento de rRNAs. Manutenção e estabilização de telomerase.	Recombinação e Replicação do DNA Reparo do DNA e Câncer
DPYSL4	10	heterozigose	10	c.1082G>A	p.R361H	Dihydropyrimidinase-like 4	Biologia do Desenvolvimento
KCNJ5	11	heterozigose	2	c.439G>A	p.E147K	Canal de potássio dependente de voltagem. Associado a adenomas produtores de aldosterona e Síndrome de Andersen.	Doenças Cardiovasculares Doenças do Desenvolvimento Câncer Doenças do Sistema Endócrino
PNLIPRP3	10	heterozigose	9	c.1036A>C	p.T346P	Proteína relacionada a lipase pancreática.	-
PPP1R16B	20	heterozigose	11	c.1625G>A	p.G542E	Regulador positivo de células endoteliais pulmonares. Envolvido na regulação da sinalização P13K/AKT, angiogênese e proliferação das células endoteliais.	-
SCUBE2	11	heterozigose	21	c.2707G>C	p.D903H	Peptídeo Sinal. Interage com DISP1 para aumentar a secreção de SHH	Desenvolvimento Neural Via de SHH
SLC7A2	8	heterozigose	2	c.174A>T	p.K58N	Membro da família de transportadores APC	-
TRRAP	7	heterozigose	70	c.11077C>T	p.P3693S	Componente do complexo de histone acetiltransferase. Atua na transcrição e reparo do DNA. Proliferação de linhagens celulares de linfoblastoide.	Proliferação, Crescimento e Desenvolvimento Celular
ZNF717	3	heterozigose	5	c.398G>C	p.C133S		Câncer
ZNF717	3	heterozigose	5	c.397T>C	p.C133R	Proteína <i>zinc-finger</i> . Relacionado a vias de expressão genica. Envolvido com tumores ganglionares.	Doenças Neurológicas
ZNF717	3	heterozigose	5	c.1592A>G	p.H531R		

Tabela 4: Doenças associadas às mutações germinativas deletérias detectadas no paciente 22 após sequenciamento de EXOMA (análise realizada no programa Ingenuity Pathway Analysis – Qiagen).

Categorias da Doença Associada	Doença Associada	p-Value	Genes com mutações germinativas envolvidos	# Genes
Câncer	Adenocarcinoma gastrointestinal	0,000211	<i>AQR, CACNA1E, CHD8, DKC1, KCNJ5, PNLI PRP3, PPP1R16B, SCUBE2, SLC7A2, TRRAP, ZEB2, ZNF717</i>	12
Câncer	Adenocarcinoma colorretal	0,000729	<i>AQR, CACNA1E, CHD8, DKC1, KCNJ5, PPP1R16B, SCUBE2, SLC7A2, TRRAP, ZEB2, ZNF717</i>	11
Câncer	Carcinoma de esôfago	0,00151	<i>CACNA1E, PNLI PRP3, TRRAP, ZNF717</i>	4
Câncer, Doenças do Sistema Endócrino	Neoplasia benigna da glândula endócrina	0,002	<i>DKC1, KCNJ5</i>	2
Doenças Cardiovasculares	Doenças coronárias	0,00266	<i>CACNA1E, KCNJ5, PNLI PRP3</i>	3
Câncer	Tumores embrionários	0,00285	<i>CACNA1E, TRRAP, ZNF717</i>	3
Câncer, Doenças Respiratórias	Adenocarcinoma de pulmão	0,00335	<i>AQR, CACNA1E, DKC1, SCUBE2, TRRAP</i>	5
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Adenocarcinoma de esôfago	0,00376	<i>CACNA1E, PNLI PRP3, TRRAP</i>	3
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Adenocarcinoma de colón	0,00413	<i>AQR, CACNA1E, CHD8, KCNJ5, PPP1R16B, SCUBE2, SLC7A2, TRRAP, ZEB2, ZNF717</i>	10
Câncer, Doenças Neurológicas	Tumor neuroectodermal primitivo	0,00837	<i>TRRAP, ZNF717</i>	2
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Carcinoma de esôfago	0,0113	<i>CACNA1E, CHD8, PNLI PRP3, TRRAP, ZNF717</i>	5
Câncer	melanoma	0,0134	<i>AQR, CACNA1E, KCNJ5, PPP1R16B, SCUBE2, SLC7A2, TRRAP, ZEB2, ZNF717</i>	9
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Carcinoma do ducto da bile	0,0155	<i>DKC1, ZNF717</i>	2

Câncer	Carcinoma ductal	0,018	<i>CACNA1E,CHD8,KCNJ5,PPP1R16B,SCUBE2,ZEB2</i>	6
Doenças Cardiovasculares	Doenças da artéria coronariana	0,0186	<i>CACNA1E,PNLIPRP3</i>	2
Câncer	Adenocarcinoma do endométrio	0,0205	<i>AQR,CACNA1E,CHD8,SLC7A2,TRRAP,ZEB2</i>	6
Câncer	Câncer de estruturas secretórias	0,0267	<i>CACNA1E,CHD8,KCNJ5,PPP1R16B,TRRAP,ZEB2,ZNF717</i>	7
Câncer, Doenças Neurológicas	Astrocitoma	0,0274	<i>TRRAP,ZEB2,ZNF717</i>	3
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Carcinoma de fígado	0,0285	<i>CACNA1E,CHD8,DKC1,PPP1R16B,SCUBE2,TRRA,P,ZEB2,ZNF717</i>	8
Câncer, Doenças Dermatológicas	Melanoma cutâneo maligno	0,0303	<i>AQR,CACNA1E,KCNJ5,PPP1R16B,SCUBE2,SLC7A2,TRRAP,ZNF717</i>	8
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Adenocarcinoma de esôfago	0,0319	<i>CACNA1E,CHD8,PNLIPRP3,TRRAP</i>	4
Doenças do Sistema Endócrino, Gastrointestinal e do Metabolismo	Diabetes mellitus	0,035	<i>KCNJ5,PNLIPRP3</i>	2
Câncer, Doenças Gastrointestinais	Adenocarcinoma de cécum	0,0441	<i>CACNA1E,PPP1R16B,SCUBE2</i>	3
Câncer	Células de câncer	0,0464	<i>CACNA1E,CHD8,PNLIPRP3,SLC7A2,TRRAP,ZEB2,ZNF717</i>	7
Câncer, Doenças Gastrointestinais e do Sistema Endócrino	Carcinoma de pâncreas	0,0485	<i>CACNA1E,CHD8,KCNJ5,PPP1R16B,ZEB2</i>	5
Câncer	Neoplasias Benignas	0,0494	<i>DKC1,KCNJ5,ZEB2</i>	3

As principais vias afetadas pelas mutações germinativas encontradas no paciente 22 então representadas pelo mapa da figura 18, gerado após análise no programa Ingenuity Pathway Analysis - IPA (*score* = 16). O mapa mostra as interações diretas (linha contínua) e indiretas (linha pontilhada) entre 7 genes com mutações germinativas (em vermelho) e outras proteínas reguladoras do crescimento, proliferação e desenvolvimento celular. As interações regulatórias convergem na alteração de β -CATENINA e de MYC, duas proteínas envolvidas no desenvolvimento neural em estágios embrionários. Como descrito anteriormente, essas duas proteínas são importantes para a biogênese dos tumores embrionários do SNC e o gene MYC tem sido associado ao pior prognóstico de pacientes com tumores pediátricos.

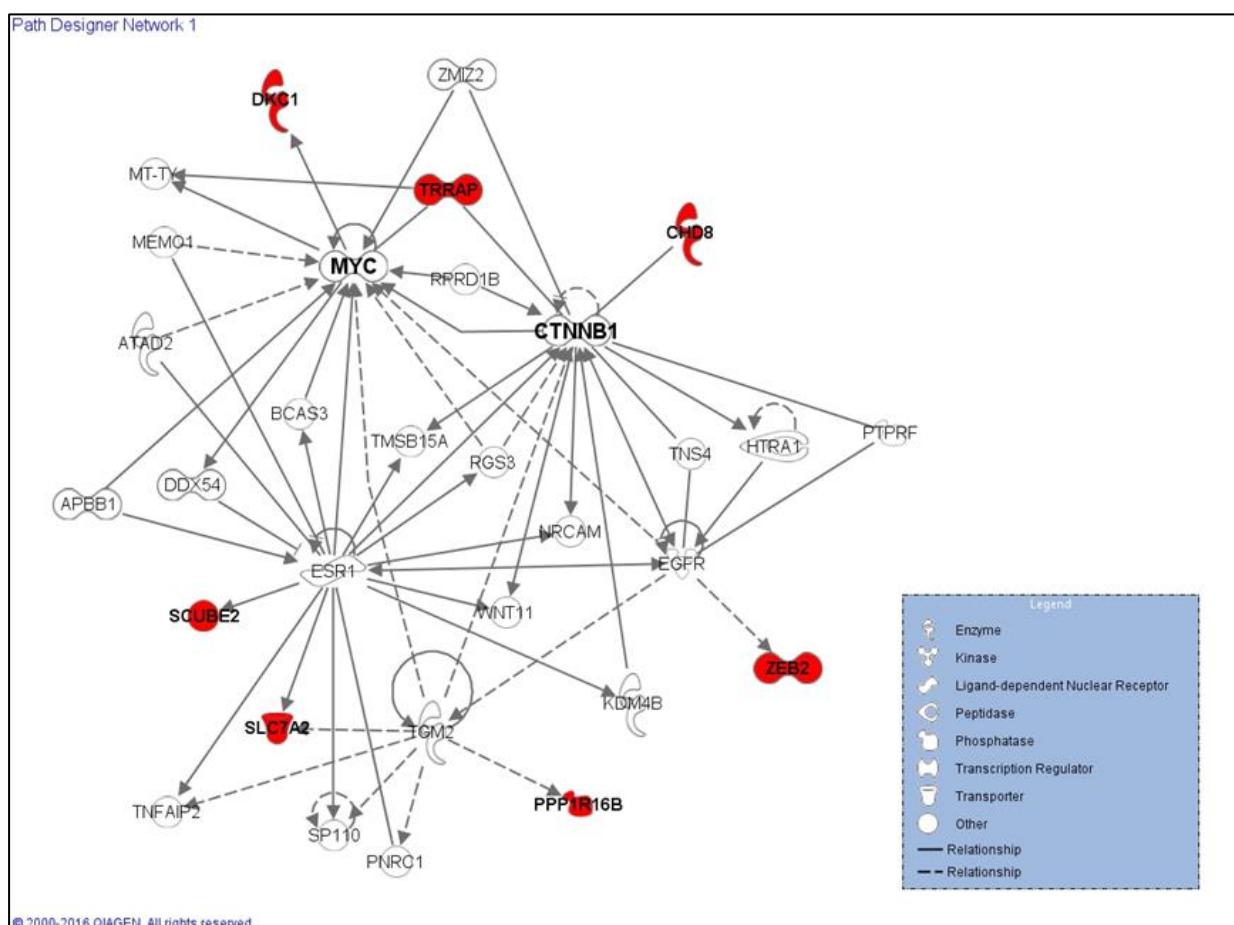


Figura 18: Mapa de interações diretas (seta contínua) e indiretas (seta pontilhada) entre as principais vias alteradas pelas mutações germinativas em 7 genes (em vermelho) encontradas no paciente 22, portador da Síndrome de Mowat-Wilson e diagnosticado com astrocitoma pilocístico na região do cerebelo. Imagem gerada no programa Ingenuity Pathway Analysis – IPA (Qiagen).

Ao comparar amostras de tecido normal com o tecido tumoral, foi possível identificar a alteração de apenas uma mutação somática deletéria c.4901C>A (exon 25) em heterozigose no gene *SRCAP* correspondendo a substituição de C>A na posição 4901 da sequência codificadora do gene (alteração proteica: P1634Q). Esta deficiência molecular resulta na perda da proteína SRCAP (*SNF2-related CBP activator protein*), componente catalítico (ATPase) do complexo SRCAP mediador da incorporação da histona H2A.Z no nucleossomo, atuando também como ativador transcracional de Notch (DONG et al., 2014). A mutação única neste gene modificador de histonas pode ter levado a uma ampla modificação no perfil epigenético da célula neural induzindo a transformação neoplásica, assim como é observado nos genes da família SWI/SNF (*SMARCB1*, *SMARCA4*) responsáveis pela origem dos ATRTs.

Os dados da análise do sequenciamento de exoma do paciente 22 foram apresentados no 11º Congresso Nacional de Neurologia Infantil pela médica Isabella Peixoto de Barcelos residente do Departamento de Neurologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 8).

6. Efeito Oncolítico do vírus ZIKA em linhagens celulares de tumores do SNC

Ao avaliar as propriedades oncolíticas do vírus ZIKA brasileiro (ZIKV^{BR}), foi constatado que o vírus infecta seletivamente células de tumores embrionários do SNC. A infecção do ZIKV^{BR} levou a morte das células tumorais após três dias de cultivo em placa aderente e em condições de formação de neuroesfera. Posteriormente vimos que uma única injeção intracerebroventricular de ZIKV^{BR} em modelos *in vivo* (camundongos Balb/C nude com tumores embrionários humanos) foi capaz de aumentar a sobrevida, diminuir a massa tumoral, metástases e em alguns casos levar a remissão total do tumor. O ZIKV^{BR} apresenta infecção seletiva para as células com fenótipo de células progenitoras neurais, e seu efeito oncolítico foi maior nas células com ativação anormal

da via Wnt (Capítulo 3). Esses resultados nos motivaram a investigar a fundo o efeito oncolítico do ZIKV^{BR} em outras linhagens celulares de tumores do SNC.

6.1. Efeito Oncológico do ZIKV^{BR} em USP21-EPE

Ependimoma, terceiro tumor pediátrico mais incidentes, ficando atrás apenas do astrocitomas e meduloblastoma, é um tumor maligno do SNC originados das células ependimárias que revestem as paredes do sistema ventricular (VITANZA; PARTAP, 2016). Apesar de ser um tumor de origem glial, foi avaliado o efeito oncolítico do ZIKV^{BR} na linhagem celular USP21-EPE devido ao seu perfil de expressão positivo dos marcadores de célula progenitora neural (NESTIN, CD133, SOX2) e sua baixa taxa de sobrevida (32,5%) para os pacientes pediátricos que não respondem às terapias clássicas vigentes (HÜBNER et al., 2018).

A infecção do ZIKV^{BR} em cultura 2D de USP21-EPE levou a morte significativa das células tumorais em todos os MOIs testados (MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1 e MOI 2) após 3 dias do início da infecção (Figura 19). O mesmo resultado foi observado ao infectar neuroesferas formadas a partir de USP21-EPE com o ZIKV^{BR} neuroesferas USP21-EPE (Figura 20). Após 72 horas de infecção com o vírus, todas as esferas formadas se dissociaram e as células morreram.

Esses resultados indicam que o ZIKV^{BR} apresenta o mesmo efeito seletivo oncolítico observado nas linhagens celulares de tumores embrionários, porém mais experimentos devem ser realizados, como ensaio de morte celular e teste *in vivo*, para podermos confirmar a infecção do ZIKV^{BR} como possível tratamento para os ependimoma.

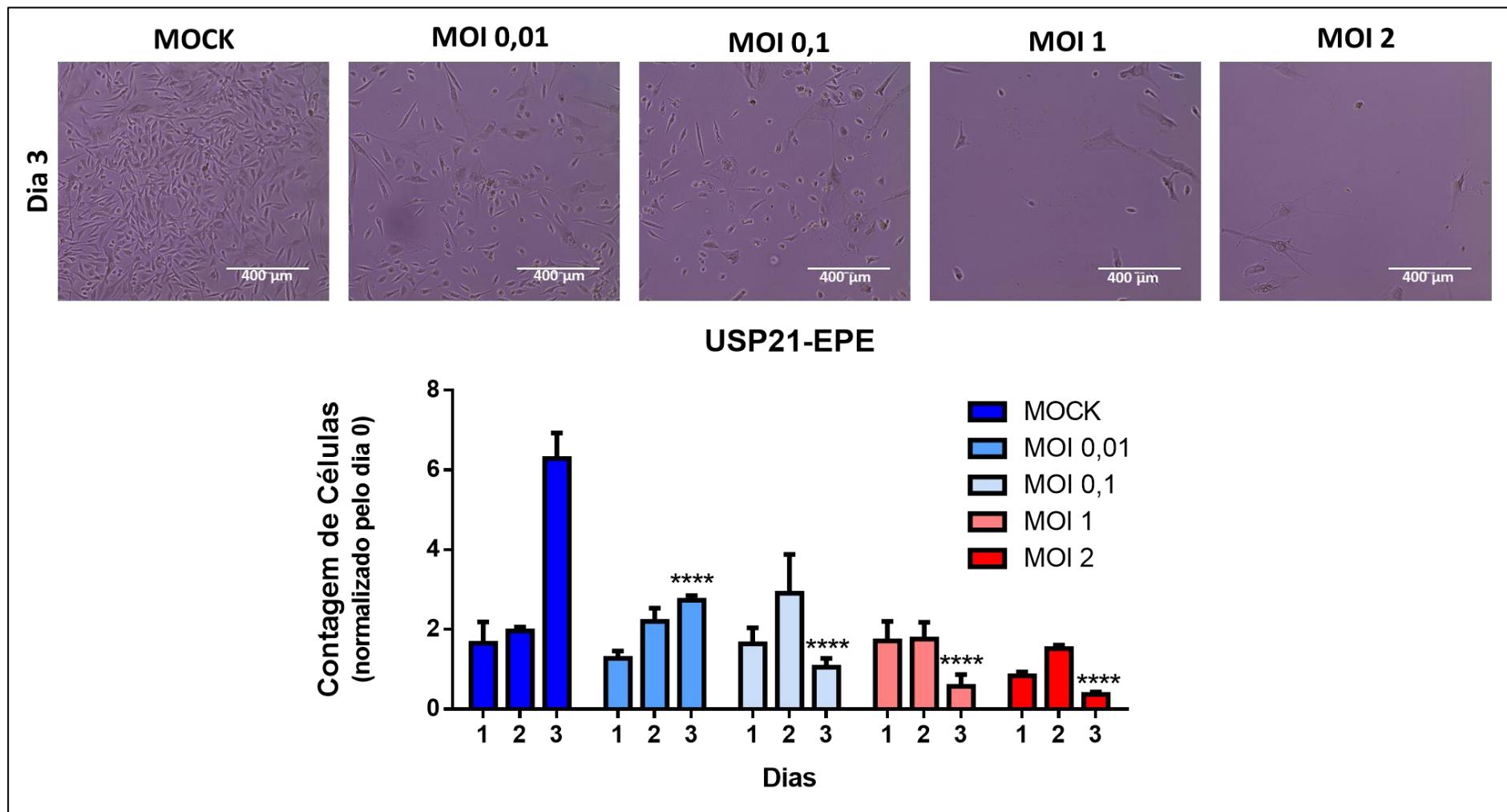


Figura 19: Acima, imagens representativas da cultura 2D da linhagem celular de ependimoma, USP21-EPE, 3 dias após a infecção do ZIKV^{BR} em MOIs diferentes. Barra de escala = 400 µm. Gráfico abaixo representando a quantificação de células vivas (aderidas a placa) através do programa ImageJ, normalizadas pelo dia 0 de infecção, nos diferentes MOIs testados. Teste *t* estatístico aplicado em comparação ao respectivo controle negativo de infecção (MOCK). ****p<0,0001.

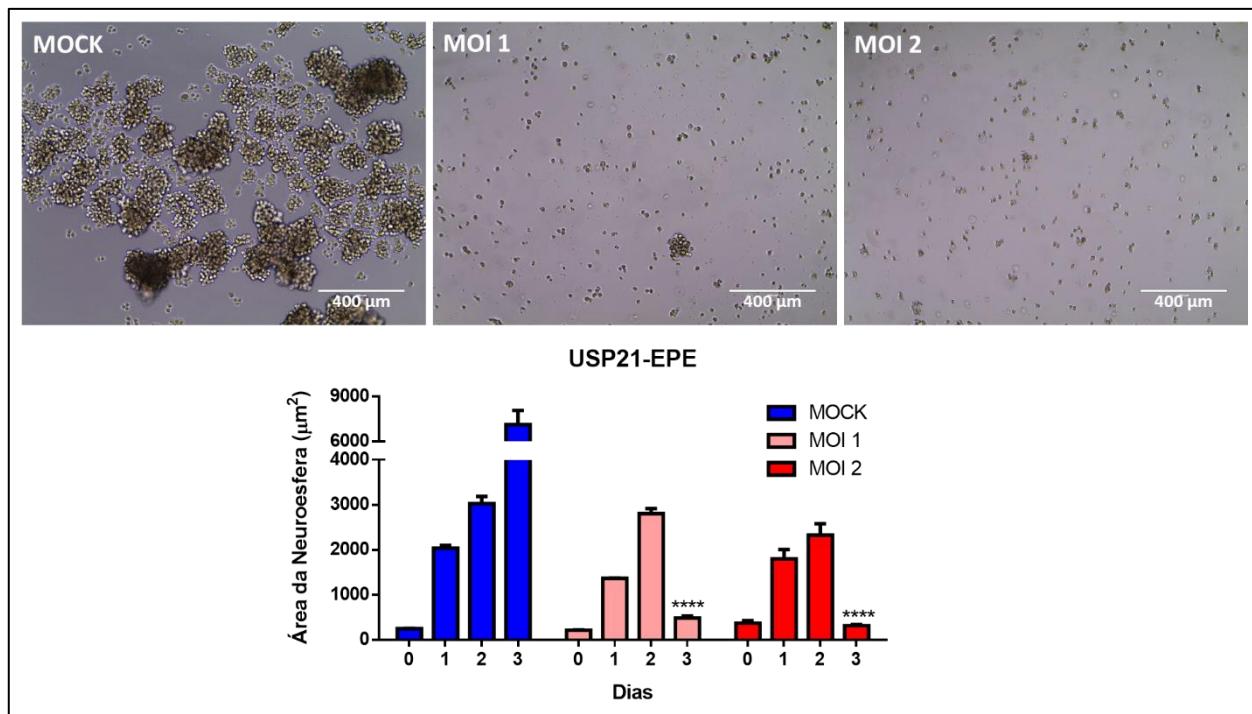


Figura 20: Acima, imagens representativas da cultura 3D (formação de neuroesferas) da linhagem celular de ependimoma, USP21-EPE, 3 dias após a infecção do ZIKV^{BR} em dois MOIs diferentes. Barra de escala = 400 µm. Gráfico abaixo representando a quantificação da área das esferas, através do programa ImageJ, nos diferentes MOIs testados. Teste *t* estatístico aplicado em comparação ao respectivo controle negativo de infecção (MOCK). ***p<0,0001.

6.2. Efeito Oncolítico do ZIKV^{BR} em linhagens celulares de glioblastoma

Devido aos efeitos oncolíticos seletivos do ZIKV^{BR} nas linhagens celulares de tumores pediátricos de origem neural (meduloblastoma e ATRT) e glial (ependimoma), foi realizado a infecção do vírus em linhagens celulares de glioblastoma, o tumor maligno cerebral adulto com maior incidência e taxa média de sobrevivência de 12-15 meses após ressecção tumoral máxima seguida de radioterapia e quimioterapia (STUPP; ROILA; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP, 2009). O rápido crescimento e disseminação das células de glioblastoma dificultam a ressecção total, facilitando assim a recidiva tumoral (RODINI et al., 2018).

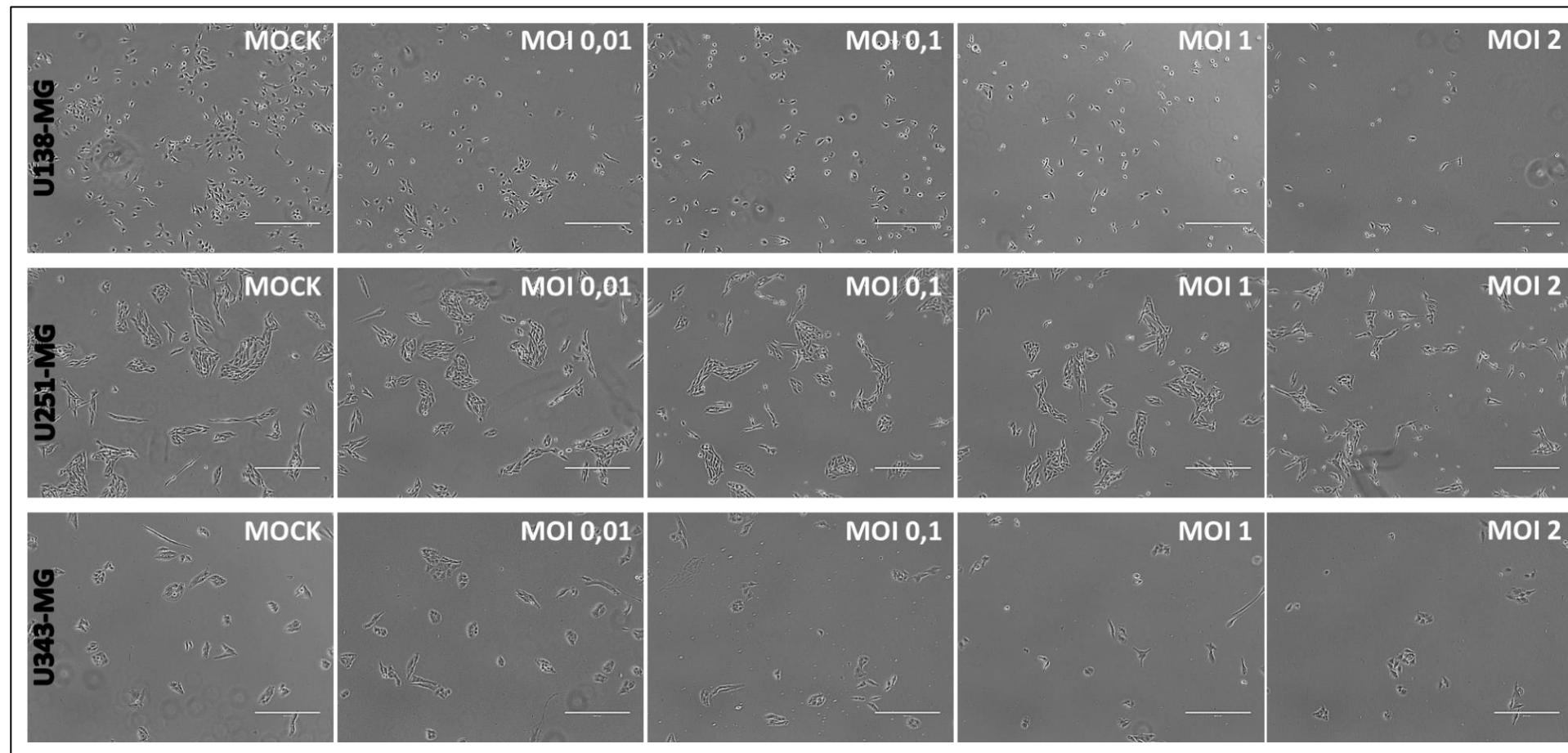


Figura 21: Imagens representativas, em contraste de fase, das linhagens celulares de glioblastoma após 72h de infecção com o ZIKV^{BR}. Barra de escala = 400μm.

Em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, foram utilizadas três linhagens celulares de glioblastoma humano, U138-MG, U251-MG e U343-MG. Como podemos ver na figura 21, as células de glioblastoma se mostraram mais resistentes ao efeito oncolítico do ZIKV^{BR}. A infecção com o vírus não foi capaz de levar à 100% de morte das células, sendo possível observar células vivas e aderidas à placa mesmo nas concentrações mais altas do vírus (MOI 1 e 2).

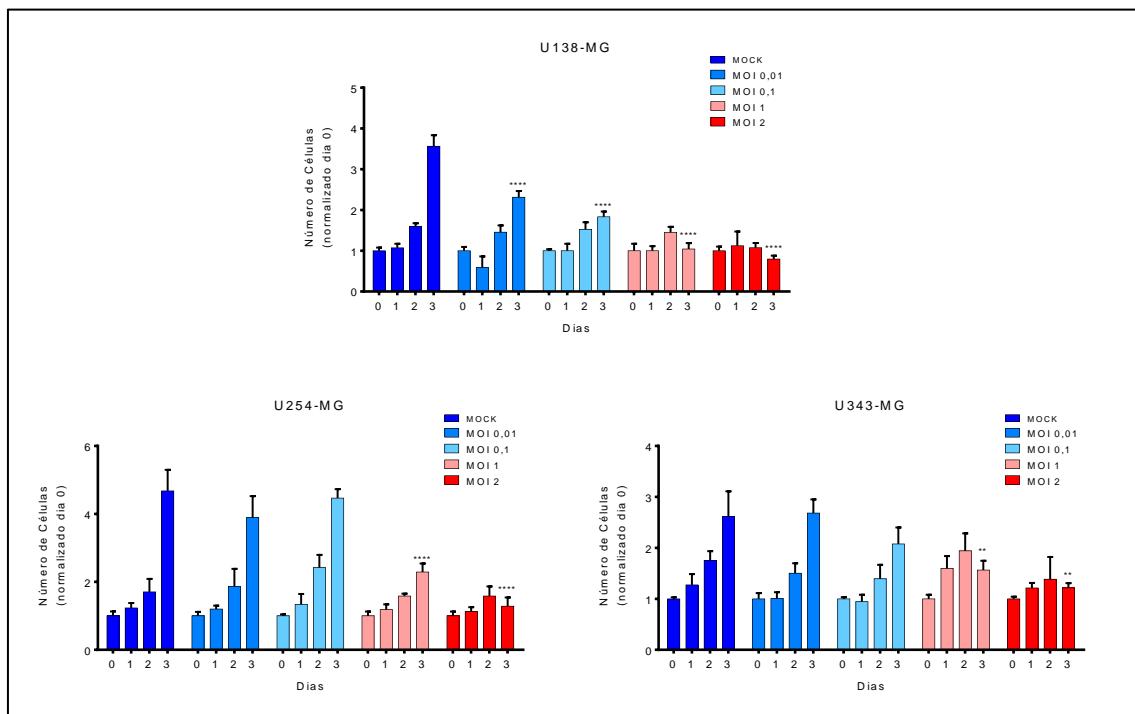


Figura 22: Quantificação de células vivas (aderidas a placa) através do programa ImageJ, normalizadas pelo dia 0 de infecção, nos diferentes MOIs testados. Teste t estatístico aplicado em comparação ao respectivo controle negativo de infecção (MOCK). ***p<0,0001.

A linhagem celular U251-MG foi a que menos respondeu ao efeito oncolítico do ZIKV^{BR}, apresentando uma diminuição no número de células aderidas de apenas 40% quando comparado ao respectivo controle negativo (MOCK) no MOI mais alto (MOI 1 e MOI 2) (Figura 22). A linhagem U343-MG respondeu ao tratamento com o vírus apenas após 72h de infecção do ZIKV^{BR}, apresentando uma mortalidade média de 50% nos MOIs 1 e 2. Como podemos ver nas

figuras 21 e 22, a linhagem celular U138-MG foi a mais sensível ao vírus, com morte significativa desde o segundo dia de tratamento.

Analises de PFU (*Plaque-Forming Units* - ensaio de formação de placa), medidas referentes à quantificação de partículas virais infecciosas derivadas do sobrenadante da cultura das células de glioblastoma submetidas à de infecção com ZIKV^{BR} por 72h, identificou uma relação indireta entre a quantidade de vírus viáveis e a quantidade de células mortas (Figura 23). A quantidade de vírus diminui conforme ocorre a diminuição de células vivas em condições favoráveis para a infecção e proliferação do ZIKV^{BR}. Resultados semelhantes foram observados nas linhagens celulares de tumores embrionários do SNC discutidos no Capítulo 3.

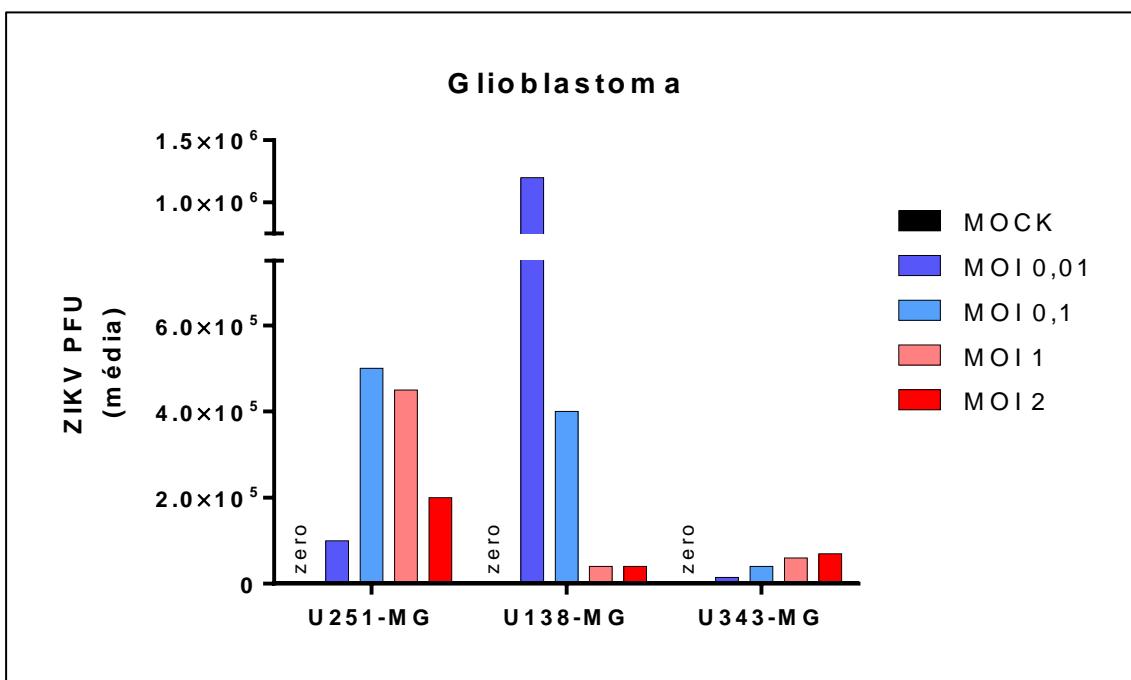


Figura 23:Média de PFU do sobrenadante da cultura das linhagens celulares de glioblastoma 72h após infecção do vírus ZIKV^{BR} nos diferentes MOIs.

ANEXOS

ANEXO 1

Revista Científica: *Cancer Science*

Data de Publicação: 06 de agosto de 2015

Fator de Impacto: 4.372

Número de Citações: 13

Cancer Science
Japanese Cancer Association 
Open Access

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

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

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

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

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

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

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

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

Cancer Sci 106 (2015) 1188-1195
doi: 10.1111/cas.12733

ANEXO 2

Revista Científica: *Cytotechnology*

Data de Publicação: 10 de setembro de 2015

Fator de Impacto: 1.461

Número de Citações: 2

Cytotechnology
DOI 10.1007/s10616-015-9914-5

 CrossMark

ORIGINAL ARTICLE

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 3

Revista Científica: *Oncotarget*

Data de Publicação: 10 de setembro de 2015

Fator de Impacto: 5.168

Número de Citações: 2

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 12), pp: 19192-19204

Research Paper

High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells

Patrícia Benites Gonçalves da Silva¹, Márcia Cristina Teixeira dos Santos¹, Carolina Oliveira Rodini¹, Carolini Kaid¹, Márcia Cristina Leite Pereira¹, Gabriela Furukawa¹, Daniel Sanzio Gimenes da Cruz², Mauricio Barbugiani Goldfeder³, Clarissa Ribeiro Reily Rocha⁴, Carla Rosenberg¹, Oswaldo Keith Okamoto¹

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

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

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

⁴Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

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

Keywords: OCT4A, POU5F1, LIN28A, medulloblastoma, aggressiveness

Received: May 26, 2016

Accepted: January 22, 2017

Published: February 07, 2017

ABSTRACT

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

ANEXO 4

Revista Científica: *Stem Cells International*

Data de Publicação: 03 de maio de 2017

Fator de Impacto: 3.989

Número de Citações: 1

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



Research Article

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

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

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

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

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

Academic Editor: Dominique Bonnet

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

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

ANEXO 5

Revista Científica: *Molecular Neurobiology*

Data de Publicação: 11 de novembro de 2017

Fator de Impacto: 5.075

Número de Citações: 1

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



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

Bruno H. S. Araujo^{1,2} · **Carolini Kaid³** · Janaina S. De Souza⁴ ·
 Sérgio Gomes da Silva^{5,6} · Ernesto Goulart³ · Luiz C. J. Caires³ ·
 Camila M. Musso³ · Laila B. Torres⁷ · Adriano Ferrasa^{8,9} · Roberto Herai⁹ ·
 Mayana Zatz³ · Oswaldo K. Okamoto³ · Esper A. Cavalheiro¹

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

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

astrocytes contributes to neuronal abnormalities in addition to cell autonomous dysfunctions caused by 21 trisomy in neurons. Further research in this direction will likely yield additional insights, thereby improving our understanding of DS and potentially facilitating the development of new therapeutic approaches.

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

Introduction

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

ANEXO 6

Revista Científica: *Cancer Research*

Data de Publicação: 15 de junho de 2018

Fator de Impacto: 9.130

Capa da Revista – edição junho/2018

Translational Science

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

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

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

[Article](#) [Figures & Data](#) [Info & Metrics](#) [PDF](#)

Abstract

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



June 2018
Volume 78, Issue 12
[Table of Contents](#)
[Table of Contents \(PDF\)](#)
[About the Cover](#)
[Index by Author](#)
[Editorial Board \(PDF\)](#)



[Sign up for alerts](#)

 [View this article with LENS](#)

ANEXO 7

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



ANEXO 8

Certificado de Apresentação de trabalho científico em Congresso Nacional:

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



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; XIE, X.; PARADA, L. F. Cell of Origin and Cancer Stem Cells in Tumor Suppressor Mouse Models of Glioblastoma. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, p. 31–36, 2016.
- BERARDI, E. et al. miRNAs in ESC differentiation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 303, n. 8, p. H931-9, 15 out. 2012.
- BRAOUDAKI, M. et al. Microrna expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms. **Journal of hematology & oncology**, v. 7, n. 1, p. 96, jan. 2014.
- BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. **The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control**. [s.l: s.n.].
- BUDHU, A.; JI, J.; WANG, X. W. The clinical potential of microRNAs. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, p. 37, 6 out. 2010.
- BUSCAROLLO, D. L. et al. Survival outcomes in atypical teratoid rhabdoid tumor for patients undergoing radiotherapy in a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. **Cancer**, v. 118, n. 17, p. 4212–4219, 1 set. 2012.
- BÜSSING, I.; SLACK, F. J.; GROSSHANS, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 14, n. 9, p. 400–9, set. 2008.
- CABRERA, M. C.; HOLLINGSWORTH, R. E.; HURT, E. M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 27, 26 jan. 2015.
- CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2 dez. 2018.
- CAVALLI, F. M. G. et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 737–754.e6, 12 jun. 2017.
- CHAFFER, C. L. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7950–5, 10 maio 2011.
- CHAKRABORTY, C. et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 8, p. 132–143, 15 set. 2017.
- CHAKRAVADHANULA, M. et al. Wnt pathway in atypical teratoid rhabdoid tumors. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 4, p. 526–35, abr. 2015.
- CHOI, S. A. et al. LIN28B is highly expressed in atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) and suppressed through the restoration of SMARCB1. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 1, p. 32, 18 dez. 2016.
- CHULPANOVA, D. S. et al. Therapeutic Prospects of Extracellular Vesicles in Cancer Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1534, 3 jul. 2018.
- CLEVERS, H. Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469–480, 3 nov. 2006.
- CORDEIRO, B. M. et al. SHH, WNT, and NOTCH pathways in medulloblastoma: when cancer stem cells maintain self-renewal and differentiation properties. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 30, n. 7, p. 1165–72, jul. 2014.
- CURTIS, C. D.; GRIFFIN, C. T. The Chromatin-Remodeling Enzymes BRG1 and CHD4

- Antagonistically Regulate Vascular Wnt Signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 7, p. 1312–1320, 1 abr. 2012.
- DA SILVA, P. B. G. et al. High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, 2017.
- DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275–284, 1 abr. 2005.
- DEL SIN, L. E. A. et al. Downregulated Adhesion-Associated microRNAs as Prognostic Predictors in Childhood Osteosarcoma. **Pathology & Oncology Research**, 25 set. 2017.
- DOLECEK, T. A et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro-oncology**, v. 14 Suppl 5, p. v1-49, nov. 2012.
- DONG, S. et al. The Human SRCAP Chromatin Remodeling Complex Promotes DNA-End Resection. **Current Biology**, v. 24, n. 18, p. 2097–2110, 22 set. 2014.
- DU, W.; ELEMENTO, O. Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. **Oncogene**, v. 34, n. 25, p. 3215–3225, 15 jun. 2015.
- ETHERIDGE, A. et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 85–90, 1 dez. 2011.
- FIDLER, M. M.; BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. The global cancer burden and human development: A review. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 46, n. 1, p. 27–36, fev. 2018.
- FISCHER-VALUCK, B. W. et al. Assessment of the treatment approach and survival outcomes in a modern cohort of patients with atypical teratoid rhabdoid tumors using the National Cancer Database. **Cancer**, v. 123, n. 4, p. 682–687, 15 fev. 2017.
- FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; VERMA, I. M. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. **EMBO reports**, v. 15, n. 3, p. 244–53, mar. 2014.
- GINN, K. F.; GAJJAR, A. Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor: Current Therapy and Future Directions. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 114, 2012.
- GONG, C. et al. Up-regulation of *miR-21* Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy for Breast Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 21, p. 19127–19137, 27 maio 2011.
- GRIFFIN, C. T. et al. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 modulates vascular Wnt signaling at two levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2282–7, 8 fev. 2011.
- GUERREIRO STUCKLIN, A. S. et al. Review of molecular classification and treatment implications of pediatric brain tumors. **Current opinion in pediatrics**, v. 30, n. 1, p. 3–9, fev. 2018.
- HABERLER, C. et al. Immunohistochemical Analysis of INI1 Protein in Malignant Pediatric CNS Tumors: Lack of INI1 in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors and in a Fraction of Primitive Neuroectodermal Tumors without Rhabdoid Phenotype. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 11, p. 1462–1468, nov. 2006.
- HAMILTON, S. R. et al. The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 13, p. 839–847, 30 mar. 1995.
- HASSELBLATT, M. et al. SMARCA4-mutated atypical teratoid/rhabdoid tumors are associated with inherited germline alterations and poor prognosis. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 3, p. 453–456, 25 set. 2014.
- HENNCHEN, M. et al. Lin28B and Let-7 in the Control of Sympathetic Neurogenesis and Neuroblastoma Development. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16531–44, 16 dez. 2015.

- HO, D. M.-T. et al. Integrated genomics has identified a new AT/RT-like yet INI1-positive brain tumor subtype among primary pediatric embryonal tumors. **BMC medical genomics**, v. 8, p. 32, 25 jun. 2015.
- HO, D. M. et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a comparative study with primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. **Acta neuropathologica**, v. 99, n. 5, p. 482–8, maio 2000.
- HOVESTADT, V. et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 537–41, 26 jun. 2014.
- HSIEH, T.-H. et al. Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced malignancy in central nervous system embryonal tumors. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2164–2174, out. 2014.
- HUANG, R.; ROFSTAD, E. K. Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 35351–35367, 23 maio 2017.
- HUANG, Z. et al. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. **Protein & cell**, v. 1, n. 7, p. 638–55, jul. 2010.
- HÜBNER, J.-M. et al. Epidemiology, molecular classification and WHO grading of ependymoma. **Journal of neurosurgical sciences**, v. 62, n. 1, p. 46–50, fev. 2018.
- JACKSON, E. M. et al. Genomic Analysis Using High-Density Single Nucleotide Polymorphism-Based Oligonucleotide Arrays and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Provides a Comprehensive Analysis of INI1/SMARCB1 in Malignant Rhabdoid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 1923–1930, 10 mar. 2009.
- JOHANN, P. D. et al. Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 379–393, 14 mar. 2016.
- JOHNSTON, D. L. et al. Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, p. 1, 9 fev. 2018.
- JONES, D. T. W. et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 100–5, 2 ago. 2012.
- KAID, C. et al. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. **Cancer Science**, v. 106, n. 9, 2015a.
- KAID, C. et al. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. **Cancer science**, 6 jul. 2015b.
- KAID, C. et al. Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, p. canres.3201.2017, 26 abr. 2018.
- KONGKHAM, P. N. et al. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. **Oncogene**, v. 29, n. 20, p. 3017–3024, 8 maio 2010.
- KUNDER, R. et al. Real-time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. **Neuro-Oncology**, v. 15, n. 12, p. 1644–1651, dez. 2013.
- KUO, C.-H. et al. A novel role of miR-302/367 in reprogramming. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 1, p. 11–6, 6 jan. 2012.
- LAUGHTON, S. J. et al. Endocrine Outcomes for Children With Embryonal Brain Tumors After Risk-Adapted Craniospinal and Conformal Primary-Site Irradiation and High-Dose Chemotherapy With Stem-Cell Rescue on the SJMB-96 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1112–1118, 1 mar. 2008.
- LEE, K. et al. ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of β -catenin. **Oncogene**, v. 34, n. 50, p. 6055–6065, 9 dez. 2015.

- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.
- LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.
- MANSOURI, S. et al. Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. **CNS Oncology**, v. 5, n. 3, p. 159–173, jul. 2016.
- MARGARITI, A. et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13793–13798, 21 ago. 2012.
- MARSHALL, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 4, p. 277–89, abr. 2014.
- MELTON, C.; BLELLOCH, R. MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 695, p. 105–17, jan. 2010.
- MORA-BLANCO, E. L. et al. Activation of β -catenin/TCF targets following loss of the tumor suppressor SNF5. **Oncogene**, v. 33, n. 7, p. 933–938, 25 fev. 2014.
- MURRAY, M. J. et al. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 151–162, 15 jan. 2016.
- MURRAY, M. J.; HUDDART, R. A.; COLEMAN, N. The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 12, p. 715–725, 18 dez. 2016.
- NANA-SINKAM, S. P.; CROCE, C. M. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 1, p. 98–104, 5 jan. 2013.
- NASSER, M. W. et al. Down-regulation of Micro-RNA-1 (miR-1) in Lung Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33394–33405, 28 nov. 2008.
- NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, 1 mar. 2010.
- NETH, P. et al. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. **Stem cell reviews**, v. 3, n. 1, p. 18–29, jan. 2007.
- NGUYEN, D. T. T. et al. The ubiquitin ligase LIN41/TRIM71 targets p53 to antagonize cell death and differentiation pathways during stem cell differentiation. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 6, p. 1063–1078, 21 jun. 2017.
- NGUYEN, L. V et al. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 2, p. 133–43, fev. 2012.
- NORTHCOTT, P. A. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 871–84, jul. 2012a.
- NORTHCOTT, P. A et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 818–34, dez. 2012b.
- OBIER, N. et al. Polycomb Protein EED is Required for Silencing of Pluripotency Genes upon ESC Differentiation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 1, p. 50–61, 19 fev. 2015.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. suppl_5, p. v1–v75, 1 out. 2016.
- OZTURK, S. et al. *Epab* and *Pabpc1* Are Differentially Expressed During Male Germ Cell Development. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 9, p. 911–922, 18 set. 2012.

- PANOSYAN, E. H. et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. **Pediatric blood & cancer**, v. 55, n. 4, p. 644–51, out. 2010.
- PARSONS, D. W. et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6016, p. 435–9, 28 jan. 2011.
- PAVLAKIS, E. et al. Interaction between transcription factors PAX6/PAX6-5a and specific members of miR-183-96-182 cluster, may contribute to glioma progression in glioblastoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1579–1592, mar. 2017.
- PFISTER, S. M. et al. Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 5, p. 553–66, nov. 2010.
- PIETSCH, T. et al. Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. **Acta neuropathologica**, v. 128, n. 1, p. 137–49, jul. 2014.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 1 nov. 2013.
- RALEIGH, D. R. et al. Survival after chemotherapy and stem cell transplant followed by delayed craniospinal irradiation is comparable to upfront craniospinal irradiation in pediatric embryonal brain tumor patients. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 131, n. 2, p. 359–368, 24 jan. 2017.
- RAMASWAMY, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 821–831, 4 jun. 2016.
- RAO, P.; BENITO, E.; FISCHER, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 6, p. 39, 26 nov. 2013.
- RIBEIRO, A. L. et al. Inhibition of Lysyl Oxidases Impairs Migration and Angiogenic Properties of Tumor-Associated Pericytes. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.
- ROBINSON, G. W. et al. Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog–Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 24, p. 2646–2654, 20 ago. 2015.
- ROCHA, C. R. R. et al. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1505, jan. 2014.
- RODINI, C. O. et al. Aberrant signaling pathways in medulloblastomas: a stem cell connection. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 68, n. 6, p. 947–52, dez. 2010.
- RODINI, C. O. et al. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 106, n. 1, p. 71–79, jan. 2012.
- RODINI, C. O. et al. Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms. **Oncotarget**, v. 9, n. 37, p. 24766–24777, 15 maio 2018.
- ROUSSEL, M. F.; ROBINSON, G. W. Role of MYC in Medulloblastoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 11, p. a014308–a014308, 1 nov. 2013.
- SANTOS, M. C. T. et al. Embryonic Stem Cell-Related Protein L1TD1 Is Required for Cell Viability, Neurosphere Formation, and Chemoresistance in Medulloblastoma. **Stem cells and development**, v. 24, n. 22, p. 2700–8, 15 nov. 2015.
- SCHREY, D. et al. Multimodal therapy in children and adolescents with newly diagnosed atypical teratoid rhabdoid tumor: individual pooled data analysis and review of the literature. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 1, p. 81–90, 25 jan. 2016.
- SCHÜLLER, U. et al. Acquisition of Granule Neuron Precursor Identity Is a Critical Determinant of

- Progenitor Cell Competence to Form Shh-Induced Medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 123–134, 12 ago. 2008.
- SHAH, H.; UBHALE, B.; SHAH, J. Demographic and histopathologic profile of pediatric brain tumors: A hospital-based study. **South Asian Journal of Cancer**, v. 4, n. 3, p. 146, 2015.
- SHALABY, T. et al. Significance and Therapeutic Value of miRNAs in Embryonal Neural Tumors. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5821–5862, 6 maio 2014a.
- SHALABY, T. et al. MicroRNA Signatures as Biomarkers and Therapeutic Target for CNS Embryonal Tumors: The Pros and the Cons. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 21554–21586, 24 nov. 2014b.
- SHIH, A. H. et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p. 599–612, 17 set. 2012.
- SILVA, P. B. G. et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, 2016.
- SINGH, M. et al. Brain metastasis-initiating cells: survival of the fittest. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9117–33, jan. 2014.
- SINGH, S. K. et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 18, p. 5821–5828, 15 set. 2003.
- SNUDERL, M. et al. Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1065–76, 28 fev. 2013.
- SREDNI, S. T. et al. Upregulation of mir-221 and mir-222 in atypical teratoid/rhabdoid tumors: potential therapeutic targets. **Child's Nervous System**, v. 26, n. 3, p. 279–283, 10 mar. 2010.
- STARGATT, R. et al. Multiple Factors Contribute to Neuropsychological Outcome in Children With Posterior Fossa Tumors. **Developmental Neuropsychology**, v. 32, n. 2, p. 729–748, 3 set. 2007.
- STUPP, R.; ROILA, F.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Malignant glioma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 20, n. Supplement 4, p. iv126-iv128, 1 maio 2009.
- SUKI, D. et al. Brain metastases in patients diagnosed with a solid primary cancer during childhood: experience from a single referral cancer center. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 14, n. 4, p. 372–385, out. 2014.
- SUVA, M. L.; RIGGI, N.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic Reprogramming in Cancer. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1567–1570, 29 mar. 2013.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.
- TAKEBE, N. et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch and Hedgehog pathways. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 2, p. 97–106, 14 fev. 2011.
- TAYLOR, M. D. et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. **Cancer cell**, v. 8, n. 4, p. 323–35, out. 2005.
- TAYLOR, M. D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 465–72, abr. 2012.
- TEPLYUK, N. M. et al. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 268–287, 1 mar. 2016.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 1 jan. 2016.

- TUKACHINSKY, H. et al. Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand. **Cell Reports**, v. 2, n. 2, p. 308–320, 30 ago. 2012.
- VAN ROOIJ, E.; PURCELL, A. L.; LEVIN, A. A. Developing MicroRNA Therapeutics. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 496–507, 3 fev. 2012.
- VERMEULEN, L. et al. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. **The lancet oncology**, v. 13, n. 2, p. e83-9, fev. 2012.
- VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–322, 20 jan. 2011.
- VITANZA, N. A.; PARTAP, S. Pediatric Ependymoma. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n. 12, p. 1354–1366, 20 out. 2016.
- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 29 mar. 2013.
- WEINGART, M. F. et al. Disrupting LIN28 in atypical teratoid rhabdoid tumors reveals the importance of the mitogen activated protein kinase pathway as a therapeutic target. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3165–77, 20 fev. 2015.
- XIA, Z. et al. AURKA Governs Self-Renewal Capacity in Glioma-Initiating Cells via Stabilization/Activation of -catenin/Wnt Signaling. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 1101–1111, 1 set. 2013.
- XU, J. et al. Disseminated Medulloblastoma in a Child with Germline BRCA2 6174delT Mutation and without Fanconi Anemia. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 191, 27 ago. 2015.
- YANG, Z.-J. et al. Medulloblastoma Can Be Initiated by Deletion of Patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 135–145, 12 ago. 2008.
- YOO, J. K. et al. Discovery and Characterization of Novel MicroRNAs During Endothelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 11, p. 2049–2057, 20 jul. 2012.
- ZHAO, Y.; XU, K.; LIU, P. Post-Transcriptional Control of Angiotensin II Type 1 Receptor Regulates Osteosarcoma Cell Death. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1581–1589, 2018.
- ZHAO, Z. et al. Nestin positively regulates the Wnt/β-catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. **Breast cancer research : BCR**, v. 16, n. 4, p. 408, jan. 2014.
- ZHI, F. et al. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 3, p. 383–391, mar. 2015.