

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**MODULAÇÃO DE ZEB1 EM CÉLULAS DE
MEDULOBLASTOMA HUMANO**

LÍVIA FRATINI DUTRA

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**MODULAÇÃO DE ZEB1 EM CÉLULAS DE
MEDULOBLASTOMA HUMANO**

LÍVIA FRATINI DUTRA

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2018

“A experiência mais bonita que podemos ter é o mistério. É a emoção fundamental que está no berço da verdadeira arte e da verdadeira ciência. Quem não sabe disso e não consegue mais se maravilhar poderia tão bem estar morto.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Aos meus pais, Lilia e Paulo, por todo incentivo, suporte e amor.

À minha madrinha, Ana Medeiros, pelo seu flamenco, pelos conselhos, companhia, risadas e por me fazer equilibrar tão bem arte e ciência.

Aos meus colegas de Laboratório de Câncer e Neurobiologia; por aprender um pouco com cada um de vocês, por formarem um ambiente agradável de se estar, pela colaboração em discussões, experimentos e fazerem a minha vida acadêmica mais divertida.

Agradeço ao professor Rafael Roesler por me aceitar como aluna há tantos anos, por acreditar na minha ideia de projeto e me permitir realizá-lo.

Agradeço à Caroline Brunetto de Farias, por todas as contribuições, pela preocupação e carinho, mesmo à distância.

Agradeço muito à Mariane Jaeger, que se tornou uma amiga muito especial. Obrigada por todas as conversas e conselhos, por me valorizar como profissional, por ser sincera e honesta sempre, por me dar segurança quanto às escolhas certas. Obrigada pela orientação no laboratório, por clarear e organizar minhas próprias ideias e me fazer tua aluna.

Obrigada à minha dupla para tudo, Duda Battistella, pela parceria, pelas caronas, por deixar tudo mais leve, por entender meus momentos difíceis e nunca desistir de mim. Ao Bruninho, por dividir aflições e risadas, desabafos e encher o laboratório de carisma.

À Natalia Freire, por ser meu braço direito no final do mestrado, por cuidar tão bem das minhas células, pela positividade, pela parceria e pela nossa amizade

À Victoria Oliveira, por me inspirar à docência e ser a melhor aluna que eu poderia ter. Obrigada a todos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e ao próprio hospital, onde nasci e tive a oportunidade de iniciar a vida científica.

Obrigada a todos os funcionários e voluntários do Instituto do Câncer Infantil, por me proporcionarem tantos aprendizados de vida, pelo carinho e descontração, por fazerem a luta por essa causa muito mais fácil de ser vencida.

Muito obrigada a todos os pacientes e seus familiares que conheci como voluntária do Instituto do Câncer Infantil: cada sorriso, abraço e risada foram a maior inspiração para esse trabalho. A cada gol, a cada quebra cabeça e a cada fantasia, percebia que estava no lugar certo, com as pessoas certas, com o objetivo certo.

Aos meus amigos Larissa, Victoria, Igor e Aline e à todas minhas amigas do flamenco por fazerem mais leves os momentos de incerteza desse caminho.

RESUMO

Meduloblastoma é a neoplasia maligna mais comum de sistema nervoso central em pacientes pediátricos. Além da morbidade referente à doença, o tratamento de meduloblastoma acarreta déficits psicossociais e neurocognitivos. Aproximadamente 30% dos pacientes são refratários ao tratamento e, dentre os pacientes que respondem à terapia com sucesso, há muitos casos de recidivas. ZEB1 é um fator de transcrição fisiologicamente ligado à formação do cerebelo e, no contexto oncológico, é relacionado à malignidade em diversos tumores. O fingolimod está emergindo como terapia antitumoral por inibir histonas deacetilases, modular a expressão gênica e interferir em processos essenciais à sobrevivência do câncer. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão de ZEB1 em meduloblastoma e sua modulação por FTY720. Foram utilizadas as linhagens celulares Daoy e D283 e realizados RT-qPCR para o gene ZEB1. A linhagem celular D283 apresentou maior expressão de ZEB1 que Daoy. O tratamento com o IC50 de fingolimod por 48h reduziu significativamente a expressão de ZEB1 na linhagem celular D283. No modelo de resistência celular desenvolvido, não foram encontradas alterações na expressão de ZEB1. O fingolimod é um promissor candidato à terapia para meduloblastoma, uma vez que já apresentou atividade antitumoral em diversas neoplasias e demonstra efeito neuroprotetor, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes de meduloblastoma.

Palavras chave: ZEB1, meduloblastoma, FTY720, Fingolimod, HDACi.

ABSTRACT

Medulloblastomas are the most common malignant Central Nervous System neoplasia in pediatric patients. In addition to disease morbidity, medulloblastoma treatment induces psychosocial and neurocognitive impairment. Approximately, 30% of medulloblastoma patients are refractory and many of the successfully treated patients relapsed. ZEB1 is a transcriptional factor physiologically related to cerebellum formation and pathologically linked to severe tumor malignancies. Fingolimod (FTY720) is an emerging antitumoral drug which acts by inhibiting of histone deacetylases and consequently modulating gene expression and essential cancer processes. The aim of this study was to investigate ZEB1 expression in medulloblastoma and its regulation by fingolimod. Daoy and D283 human medulloblastoma cell lines were used and RT-qPCR was performed to measure ZEB1 expression. D283 cells line presented higher ZEB1 expression compared to Daoy cells. Cells treated with FTY720 for 48 hours showed a significant decrease in ZEB1 expression. No alterations in ZEB1 expression were found in chemoresistant cells. The results suggest that epigenetic mechanisms regulating chromatin state can regulate ZEB1 in medulloblastoma, and modulation of ZEB1 expression may be involved in mediating the effects of fingolimod

Key-words: ZEB1, medulloblastoma, FTY720, Fingolimod, HDACi

LISTA DE FIGURAS

Dissertação:

Figura 1 – Marco conceitual de Fingolimod e ZEB1 em meduloblastoma

Artigo:

Figura 1- ZEB1 relative expression analysis in medulloblastoma cell lines.

Figura 2- FTY720 decreases ZEB1 relative expression in D283 cell line.

Figura 3- Chemotherapy resistance in D283 cells.

Figura 4- ZEB1 relative expression in D283 and D283-R cell lines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; ácido desoxirribonucleico
EMT	<i>Epithelial-mesenquimal transition</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTY720	Fingolimod
HDAC	<i>Histone deacetylase</i> ; histona deacetilase
HDACi	<i>Histone deacetylase inhibitors</i> ; inibidores de histona deacetilase
IARC	Internation Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; ácido ribonucleico
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT	<i>Wingless</i>
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	12
2.2	CÂNCER	12
2.3	TUMORES PEDIÁTRICOS	12
2.4	MEDULOBLASTOMA	13
2.5	ZEB1	14
2.6	FINGOLIMOD	15
3	MARCO CONCEITUAL	17
4	JUSTIFICATIVA	18
5	OBJETIVOS	19
5.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	19
5.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	19
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
7.	ARTIGO	25
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	41

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome conferido ao conjunto de doenças caracterizadas por proliferação celular desordenada, migração, angiogênese, escape da morte celular programada, invasão de tecidos adjacentes e metástases (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Cerca de 1 a 4% de todos os tumores malignos são diagnosticados em pacientes infanto-juvenis, representando a principal causa de morte por doença em indivíduos de 0 a 19 anos (INCA, 2018).

O meduloblastoma é o tumor de sistema nervoso central mais comum em crianças. Entre os principais sintomas ao diagnóstico estão dores de cabeça, enjoos e letargia, devido ao aumento da pressão intracraniana (MICHALOWSKI *et al.*, 2012). A sobrevida do paciente com meduloblastoma está relacionada aos subgrupos moleculares: Wnt, SHH, Grupo 3 e Grupo 4, que apresentam alterações em vias de sinalização diferentes, variando sua incidência, de acordo com a idade e malignidade – pior prognóstico para subgrupos onde metástases são frequentes (TAYLOR *et al.*, 2012). Mesmo com protocolos de tratamento combinando cirurgia, radioterapia crânio-espinal e quimioterapia, somente 51% dos pacientes atingem 5 anos de sobrevida global após o diagnóstico, e cerca de 30% dos pacientes tratados recidivam, com prognóstico desfavorável (YALÇIN *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 1994). Em pacientes submetidos a radioterapia, déficits cognitivos e de aprendizagem são frequentemente encontrados (HAZIN *et al.*, 2015).

ZEB1 é um fator de transcrição promotor da transição epitélio-mesenquimal, essencial ao desenvolvimento embrionário para formação dos sistemas respiratório, imunológico e esquelético (FUNAHASHI *et al.*, 1993; TAKAGI *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2008). Durante o desenvolvimento do cerebelo, ZEB1 demonstrou ser fator chave na regulação da diferenciação neuronal, controlando genes determinantes da polaridade, migração e adesão celular, garantindo a migração dos neurônios progenitores granulares para as camadas mais externas do cerebelo. O mesmo estudo mostrou a expressão diferencial de ZEB1 em amostras de pacientes do subgrupo SHH de meduloblastoma, sugerindo ZEB1 como um importante alvo terapêutico (SINGH *et al.*, 2016).

Em diversos tumores, como tumores de pulmão, pâncreas, útero, estômago, cólon, fígado e mama, ZEB1 foi relacionado a pior prognóstico por promover metástase e regular processos chave para quimiorresistência (SPOELSTRA *et al.*, 2006; BRONSERT *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2012; OKUGAWA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Entre os potenciais candidatos a modulação de ZEB1, encontram-se principalmente microRNAs e moduladores epigenéticos (YAN *et al.*, 2018; SAKATA *et al.*,

2017; MEIDHOF *et al.*, 2015).

O fingolimod (FTY720) é um imunossupressor oral, aprovado pelo FDA em 2010 para o tratamento de pacientes de esclerose múltipla refratários a outros tratamentos (CLAYTON, *et al.*, 2015). Seu principal mecanismo de ação é via sinalização de esfingolípídeos, agindo como agonista de S1P. Recentemente, outra propriedade farmacológica do fingolimod vem sendo estudada: a inibição de histonas deacetilases em células tumorais (HAIT *et al.*, 2015). Em linhagens celulares do grupo 3 de meduloblastoma já foi demonstrado que o fingolimod reduz a viabilidade e proliferação de células tumorais, via receptor de S1P (GARNER *et al.*, 2018). Mais estudos podem ser conduzidos em meduloblastoma para investigar o fingolimod como possível terapia para essa neoplasia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados à modulação ZEB1 por fingolimod e seu papel em meduloblastoma humano. A estratégia de busca envolveu as bases de dados SciELO, PubMed e PubMed Central, no período de 1993 a 2018. Foram realizadas buscas por meio dos termos “ZEB1”, “Medulloblastoma”, “Fingolimod”, “HDAC”, “FTY720”, “ZEB1 and medulloblastoma”, “ZEB1 and FTY720”, “FTY720 and HDAC”.

2.2 Câncer

Um tumor compreende uma população celular que não obedece às regras primordiais de comportamento, reproduzindo-se desordenadamente. Quando a população tumoral passa a invadir tecidos adjacentes é denominado tumor maligno ou câncer (ALBERTS; JOHNSON; WALTER, 2017). Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram seis habilidades fisiológicas necessárias ao estabelecimento do câncer: sinalização de crescimento celular autossuficiente, resistência a sinais inibitórios do crescimento celular, escape da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão de tecidos e metástase.

Dados da Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*IARC*) apontam que 18,1 milhões de novos casos serão diagnosticados e 9,6 milhões de mortes pela doença serão registrados mundialmente em 2018. Entre os tumores mais prevalentes, encontram-se o câncer de pulmão, mama, próstata, cólon e câncer de pele não-melanoma (BREY *et al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, entre 30% e 50% dos tumores poderiam ser evitados se a exposição a fatores de risco bem estabelecidos, como tabaco, sobrepeso, etilismo, infecções virais e exposição à radiação, fosse reduzida (WHO, 2018).

2.3 Tumores pediátricos

Enquanto tumores de maior prevalência em adultos têm fatores de risco bem estabelecidos, poucos tumores pediátricos têm sua gênese associada a fatores ambientais ou a mutações somáticas adquiridas. A exposição a altas doses de radiação ionizante e quimioterapia prévia são eventos fortemente associados à geração de um tumor. Entre os fatores intrínsecos estudados, foram relacionados o peso ao nascer e idade avançada dos pais, porém as associações ainda não foram seguramente explicadas (SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015).

Tumores pediátricos são apontados como a principal causa de morte por doença em indivíduos de 1 a 19 anos. No Brasil, são estimados cerca de 420 mil novos casos para o ano de 2018, sendo a leucemia o tipo de tumor mais frequente, seguido de outros tumores epiteliais, linfomas e sistema nervoso central (INCA, 2017). A magnitude de um tumor depende da sua localização anatômica, da sua histologia, do seu grau de diferenciação, do tamanho da lesão primária, da sua disseminação para linfonodos regionais, presença ou ausência de metástases e da acessibilidade dos pacientes a centros de referência, com equipe multidisciplinar diferenciada e infraestrutura adequada para receber um paciente oncológico (SOCIEDADE DE PEDIATRIA, 2014).

2.4 Meduloblastoma

Tumores de sistema nervoso central configuram 16% de todos os tumores que acometem pacientes de 0 a 19 anos de idade. Dentre eles, a neoplasia maligna de SNC mais prevalente é o meduloblastoma, acometendo a fossa cranial posterior dos pacientes (INCA, 2018; COLUCCIA *et al.*, 2016). Os principais sintomas reportados ao diagnóstico de meduloblastoma são letargia, náuseas e dores de cabeça – relacionados ao aumento da pressão intracraniana (MICHALOWSKI *et al.*, 2012).

Muitas vias de sinalização estão envolvidas em meduloblastoma, tendo sua classificação reestruturada pela Organização Mundial da Saúde, atribuindo características moleculares às já existentes classes histopatológicas (LOUIS *et al.*, 2016). Molecularmente, meduloblastomas são divididos em quatro grupos: Wnt, SHH, Grupo 3 e Grupo 4. Aqueles classificados como Wnt apresentam melhor prognóstico quando comparados a outros grupos: o índice de sobrevida ultrapassa 90%; acredita-se que a via Wnt tenha papel fundamental na patogênese dos meduloblastomas deste grupo. O subgrupo SHH, que também é nomeado dessa maneira pela hipótese de que mutações nessa via de sinalização tenha originado tumores desse subgrupo, apresenta bom prognóstico em pacientes de até 3 anos e prognóstico intermediário em adultos. Há poucas evidências sobre a origem dos grupos 3 e 4; frequentemente metastáticos, acometem mais pacientes do sexo masculino que do sexo feminino (TAYLOR *et al.*, 2012).

A morbidade severa dessa neoplasia, que já ocasiona déficits físicos e neuropsicológicos *per se*, pode ser agravada devido ao próprio tratamento (MICHALOWSKI *et al.*, 2012). Em estudo realizado no Brasil, a análise de sobrevida global em 60 meses para 35 pacientes pediátricos de meduloblastoma, foi de 51% (DE ARAÚJO *et al.*, 2011). A

terapia de meduloblastoma pode envolver cirurgia, radioterapia crânio-espinhal e quimioterapia sistêmica, com o uso de vincristina, cisplatina, carmustina e lomustina. A radioterapia, que está associada a melhor taxa de sobrevida em meduloblastoma, por outro lado apresenta neurotoxicidade, causando sequelas cognitivas severas. Após o tratamento, foi observado que pacientes de meduloblastoma apresentaram pior desempenho em testes cognitivos quando comparados com pacientes de outras neoplasias. (DE ARAÚJO *et al.*, 2011; HAZIN *et al.*, 2015).

Entre os pacientes que obtêm sucesso no tratamento, ainda que com déficits cognitivos, cerca de 30% apresentam recidiva (YALÇIN *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 1994). Ainda não há protocolo padrão para tratamento de pacientes de meduloblastoma que recidivam: em um estudo norte-americano, pacientes receberam entre 1 a 6 tipos de tratamento diferentes, incluindo quimioterapia de alta dose e reirradiação e ainda assim, a média de sobrevida constatada foi de 10,3 meses após o diagnóstico (KOSCHMANN *et al.*, 2016). Nesse contexto, o melhor entendimento da biologia do meduloblastoma e de candidatos a alvos terapêuticos se fazem necessários para uma melhor abordagem de pacientes refratários ao tratamento ou que recidivam.

2.5 ZEB1

Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) é um fator de transcrição constituído por dois domínios de zinco nas extremidades N-terminal e C-terminal, de ligação a sequências específicas do DNA chamadas E-box e um homeodomínio central com função repressora (Postigo, 2003). ZEB1 está fortemente relacionado à transição epitélio-mesenquimal, uma vez que ele reprime o promotor da proteína E-caderina e afeta a expressão e a localização de marcadores epiteliais, como E-caderina e mesenquimais, como Vimentina e N-caderina (EGER *et al.*, 2005).

Durante a embriogênese, ZEB1 tem papel fundamental na formação de diversos tecidos. Em experimentos *in vivo*, foi demonstrada sua expressão em tecidos mesodérmicos e sua relação com o desenvolvimento dos sistemas respiratório, imunológico e esquelético (FUNAHASHI *et al.*, 1993; TAKAGI *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2008). Em estudo com amostras humanas, a expressão de ZEB1 foi encontrada em quase todos os 50 tipos diferentes de tecidos analisados, exceto em algumas partes do cérebro. Entretanto, a expressão variou de quase indetectável, como no pâncreas e fígado, a altamente expressa, como na bexiga e útero (HURT *et al.*, 2008).

ZEB1 também desempenha papel crucial no desenvolvimento do cerebelo, controlando a diferenciação neuronal, reprimindo genes associados à maturação, polaridade e adesão, e regulando a transição epitélio mesenquimal, para garantir a saída dos neurônios progenitores granulares da zona germinal. Foi demonstrado ainda que ZEB1 é expresso em um modelo de meduloblastoma do subgrupo SHH em níveis superiores aos encontrados durante o desenvolvimento, e que amostras de pacientes desse mesmo subgrupo apresentam mais ZEB1 quando comparados a pacientes dos subgrupos Wnt, Grupo 3 e Grupo 4 (SINGH *et al.*, 2016).

Osteossarcomas, tumores de pulmão, de pâncreas, de útero, de estômago, de cólon, de fígado e de mama demonstraram expressão aberrante de ZEB1, correlacionando com metástase e pior prognóstico (SPOELSTRA *et al.*, 2006; BRONSERT *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2012; OKUGAWA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Além de promover metástase, conferindo malignidade aos tumores, ZEB1 também está envolvido no processo de quimiorresistência, regulando genes que reparam danos no DNA após quimioterapia (ZHANG *et al.*, 2018). Entre os diversos mecanismos para modulação de ZEB1, destacam-se os mecanismos epigenéticos: microRNAs e fármacos inibidores de histona deacetilases atenuaram a quimiorresistência em células tumorais, ressaltando ZEB1 como promissor alvo terapêutico (YAN *et al.*, 2018; SAKATA *et al.*, 2017; MEIDHOF *et al.*, 2015).

2.6 Fingolimod

O fingolimod (FTY720) foi o primeiro fármaco de uso oral aprovado pelo FDA, em 2010, para pacientes refratários de esclerose múltipla (ENGLISH; ALOI, 2015). Ele atua como análogo da esfingosina, agindo como antagonista do receptor acoplado à proteína G esfingosina-1-fosfato (S1P), tendo como alvo as células do sistema imune nos linfonodos. Além disso, o fingolimod é capaz de permear a barreira hematoencefálica (MEHLING, M., KAPPOS, L., & DERFUSS, 2011). Após a ligação ao receptor S1P nos linfócitos, o receptor é internalizado e degradado, e as células perdem a capacidade de sair dos linfonodos para a circulação (GRALER; GOETZL, 2004; MATLOUBIAN *et al.*, 2004).

Além da regulação do sistema imune, a sinalização de esfingolipídeos regula mecanismos convenientes ao câncer como a neovascularização (LICHT *et al.*, 2003), a migração celular (DOLL; PFEILSCHIFTER; HUWILER., 2007) e a proteção contra apoptose, oportunizando a quimiorresistência (PCHEJETSKI *et al.*, 2005; BONHOURE *et*

al., 2006), evidenciando o potencial terapêutico do bloqueio dessa via (White et al., 2016). Foi também reportado que S1P pode agir intracelularmente independentemente de seu receptor (SPIEGEL & MILSTIEN, 2003). S1P age como modulador epigenético, ligando-se às enzimas histonas deacetilases (HDAC) HDAC2 e HDAC3 e aumentando a acetilação dos resíduos de lisina das histonas H2B, H3 e H4 (HAIT *et al.*, 2009). Por ser análogo de S1P, o fingolimod também possui capacidade de inibir histona deacetilases de classe I, inclusive de maneira independente da presença do receptor S1PR, em linhagens celulares de câncer de mama (HAIT *et al.*, 2015).

Em estudo com linhagens celulares do grupo 3 de meduloblastoma, o fingolimod reduziu a viabilidade, a proliferação e a migração no modelo *in vitro*. No modelo *in vivo*, o fingolimod também desempenhou papel antitumoral, refreando o crescimento de tumores cultivados em Matrigel™ e injetados no flanco de camundongos nude (GARNER *et al.*, 2018).

3 MARCO CONCEITUAL

Nesse trabalho, será investigado a expressão de ZEB1 em células de meduloblastoma humano e sua modulação por um inibidor de histona deacetilase.

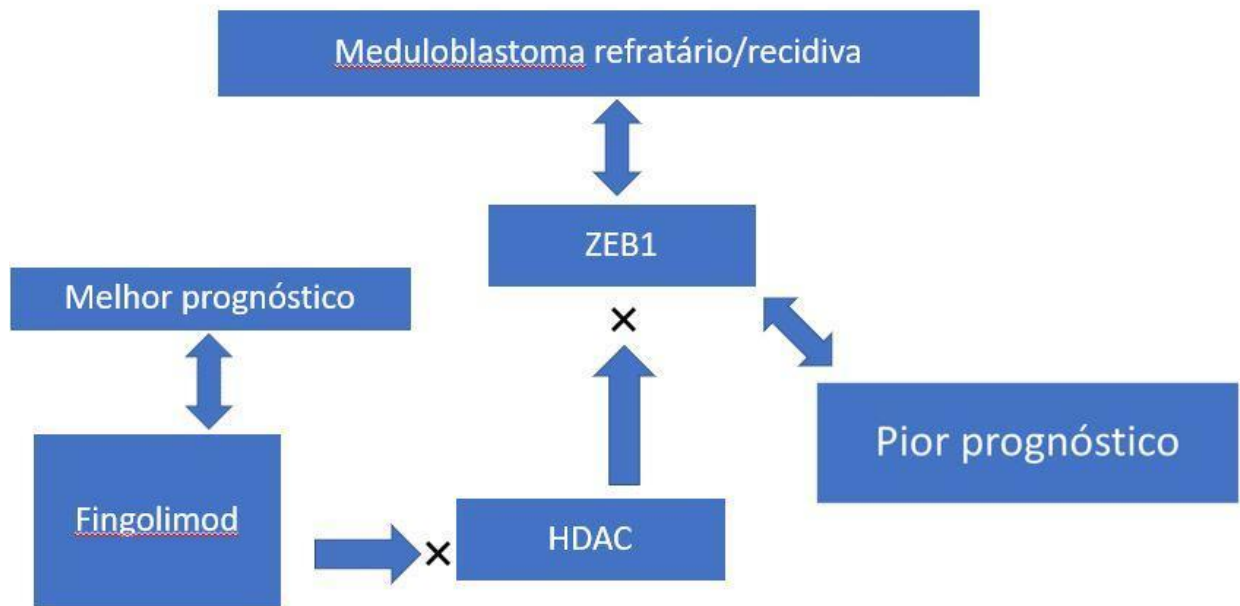


Figura 1. Marco conceitual de fingolimod e ZEB1 em meduloblastoma. Tumores com alta expressão de ZEB1 correlacionam com metástases, resistência a quimioterapia e, por isso, pior prognóstico. O fingolimod age como inibidor de histona deacetilases, favorecendo a transcrição gênica. Nesse trabalho foi demonstrado que o tratamento com fingolimod diminui a expressão ZEB1 em células de meduloblastoma, e a diminuição de ZEB1 está correlacionada a melhor prognóstico, segundo a literatura.

4 JUSTIFICATIVA

Considerando os pacientes refratários aos protocolos de tratamento em meduloblastoma, o índice de recidivas da doença e os efeitos colaterais dos protocolos terapêuticos em meduloblastoma, a busca por novos fármacos antitumorais e alvos terapêuticos se faz necessária. Portanto, investigamos o efeito do fingolimod, um fármaco já aprovado e comercializado, sobre ZEB1, um fator de transcrição intimamente ligado à malignidade tumoral.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Investigar o efeito do fingolimod sobre ZEB1 em células de meduloblastoma humano.

5.2 Objetivos secundários

- Analisar e comparar a expressão de ZEB1 nas linhagens de meduloblastoma Daoy e D283;
- Analisar a expressão de ZEB1 após tratamento com FTY720;
- Induzir resistência à cisplatina em D283;
- Analisar a expressão de ZEB1 em células quimiorresistentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A. & WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª Ed., Artmed Editora, 2017.

DE ARAUJO O. L., DA TRINDADE K.M., TROMPIERI N.M., FONTENELE J.B., FELIX F.H.) Analysis of survival and prognostic factors of pediatric patients with brain tumor. **Jornal de Pediatria** (Rio J). 87(5):425-32, 2011.

BONHOURE E., PCHEJETSKI D., AOUALI N., MORJANI H., LEVADE T., KOHAMA T. AND CUVILLIER O. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. **Leukemia**.; 20(1):95- 102, 2006.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. AND JEMAL, A. (2018), Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 2018.

BRONSERT P., KOHLER I., TIMME S., KIEFER S., WERNER M., SCHILLING O., VASHIST Y., MAKOWIEC F., BRABLETZ T., HOPT U. T., *et al.* Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. **Surgery**; 156:97-108, 2014.

COLUCCIA, D., FIGUEREIDO, C., ISIK, S., SMITH, C., & RUTKA, J. T. (2016). Medulloblastoma: Tumor Biology and Relevance to Treatment and Prognosis Paradigm. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, 16(5), 43, 2016.

DOLL F, PFEILSCHIFTER J AND HUWILER A. Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced proliferation and migration. **Endocrine-Related Cancer**.; 14(2):325-335, 2007.

EGER, A., AIGNER, K., SONDEREGGER, S., DAMPIER, B., OEHLER, S., SCHREIBER, M., FOISNER, R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. **Oncogene**, 24, 2375–2385, 2005.

ENGLISH, C., & ALOI, J. J. New FDA-approved disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *Clinical Therapeutics*, 37(4), 691–715, 2015.

FUNAHASHI, J., SEKIDO, R., MURAI, K., KAMACHI, Y., & KONDOH, H. (1993). Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development*, 119(2), 433–446, 1993.

GARNER, E. F., WILLIAMS, A. P., STAFMAN, L. L., AYE, J. M., MROCZEK-, E., MOORE, B. P., ... BEIERLE, E. A. (2018). FTY720 Decreases Tumorigenesis in Group 3 Medulloblastoma Patient- Derived Xenografts. *Scientific Reports*, 8(6913), 1–10, 2018.

GRALER M. H., GOETZL E.J. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*; 18:551–3, 2004.

HAIT, N. C., ALLEGOOD, J., MACEYKA, M., STRUB, G. M., KUZHUVELIL, B., SINGH, S. K., ... SPIEGEL, S. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science*, 325(5945), 1254–1257, 2009.

HAIT NC, AVNI D, YAMADA A, *et al.* The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. *Oncogenesis*.;4(6):e156, 2015.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.2000.

HAZIN, Izabel *et al.* Desempenho Intelectual Pós Tratamento de Câncer: Um Estudo com Crianças. **Psicologia: Reflexão e Crítica.**, Porto Alegre, v. 28, n. 3, p. 565-573, 2015.

HURT E.M., SAYKALLY J.N., ANOSE B.M., KALLI K. R., SANDERS M. M. Expression of the ZEB1 (deltaEF1) transcription factor in human: additional insights. *Molecular and Cellular Biochemistry* ; 318:89-99; 2018.

INCA. *Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil.* Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017.

KOSCHMANN, C., BLOOM, K., UPADHYAYA, S., GEYER, J. R., & LEARY, S. E. S. Survival after relapse of medulloblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 38(4), 269–273, 2016.

LICHT T, TSIRULNIKOV L, REUVENI H, YARNITZKY T AND BEN- SASSON SA. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood*; 102(6):2099-2107, 2003.

LIU Y., EL-NAGGAR S., DARLING D. S., HIGASHI Y., DEAN D. C. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*; 135:579-88; 2008.

LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., ... ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820, 2016.

MATLOUBIAN M, LO CG, CINAMON G, *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*.;427:355–60, 2004.

MEHLING, M., KAPPOS, L., & DERFUSS, T. Fingolimod for multiple sclerosis: Mechanism of action, clinical outcomes, and future directions. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(5), 492–497, 2011.

MEIDHOF S, BRABLETZ S, LEHMANN W, *et al.* ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine*.; 7(6):831-47, 2015.

MICHALOWSKI MB, LOREA CF, RECH A, SANTIAGO P, LORENZONI M, TANIGUCHI A, *et al.* Diagnóstico precoce em oncologia pediátrica: uma urgência médica. *Boletim Científico de Pediatria*; 01(1):13-18, 2012.

OKUGAWA Y, TOIYAMA Y, TANAKA K, MATSUSITA K, FUJI-KAWA H, SAIGUSA S, OHI M, INOUE Y, MOHRI Y, UCHIDA K, *et al.* Clinical significance of Zinc finger E-box Binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology*; 106:280-5, 2012.

PCHEJETSKI D, GOLZIO M, BONHOURE E, CALVET C, DOUMERC N, GARCIA V, MAZEROLLES C, RISCHMANN P, TEISSIE J, MALAVAUD B AND CUVILLIER O. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Research*.; 65(24):11667-11675, 2005.

POSTIGO AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *The EMBO Journal*; 22:2443-52, 2003.

SAKATA J, UTSUMI F, SUZUKI S, *et al.* Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*; 8(59):99482-99494, 2017.

SHEN A, ZHANG Y, YANG H, XU R, HUANG G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *Journal of Surgical Oncology*; 105:830-4, 2012.

SINGH, S., HOWELL, D., TRIVEDI, N., KESSLER, K., ONG, T., ROSMANINHO, P., ... SOLECKI, D. JZeb1 controls neuron differentiation and germinal zone exit by a mesenchymal-epithelial-like transition. *ELife*, 1–31, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Tratado de Pediatria**. 3^a ed. São Paulo: Editora Manole; 2014.

SPECTOR, L. G., PANKRATZ, N., & MARCOTTE, E. L. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. *Pediatric clinics of North America*, 62(1), 11-25, 2014.

SPIEGEL, S., & MILSTIEN, S. Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 397–407, 2003.

SPOELSTRA N. S., MANNING N. G., HIGASHI Y., DARLING D., SINGH M., SHROYER K. R. , BROADDUS R.R. , HORWITZ K. B., RICHER J.K. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Research*; 66:3893-902, 2006.

TAKAGI, T., MORIBE, H., KONDOH, H., & HIGASHI, Y . DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development*, 125(1), 21–31, 1998.

TAYLOR, M. D., NORTHCOTT, P. A., KORSHUNOV, A., REMKE, M., CHO, Y.-J., CLIFFORD, S. C., ... PFISTER, S. M. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica*, 123(4), 465–472, 2012.

TORRES CF, REBSAMEN S, SILBER JH *et al.* Surveillance scanning of children with

medulloblastoma. *New England Journal of Medicine*. 330(13):892–895, 1994.

WHITE, C., ALSHAKER, H., COOPER, C., WINKLER, M., & PCHEJETSKI, D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget*, 7(17), 23106–23127, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer Prevention**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/en/> . Acesso em 17/11/2018.

YALÇIN B, BÜYÜKPAMUKÇU M, AKALAN N *et al*. Value of surveillance imaging in the management of medulloblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*. 38(2):91–97. 10, 2002.

YAN, H., ZHANG, B., FANG, C., & CHEN, L. miR-340 alleviates chemoresistance of osteosarcoma cells by targeting ZEB1. *Anti-Cancer Drugs*, 29(5), 440–448, 2018.

ZHANG J, LU C, KANG J, CAO C, LI M. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. *Molecular Biology Reports*; 40:949-56, 2013.

ZHANG GJ, ZHOU T, TIAN HP, LIU ZL, XIA SS. High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Oncology Letters*; 5:564-8; 2013.

ZHANG, X., ZHANG, Z., ZHANG, Q., ZHANG, Q., SUN, P., XIANG, R., & REN, G. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM. *Cell Death and Disease*, 9(57) 2018. .

ZHOU YM, CAO L, LI B, ZHANG RX, SUI CJ, YIN ZF, YANG JM. Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*; 19:1700-6; 2012.

7. ARTIGO

Periódico: Oncology Reports
Status: a submeter

FTY720 DOWNREGULATES ZEB1 IN HUMAN MEDULLOBLASTOMA CELLS

Lívia Fratini Dutra¹, Alexandre da Silveira Perla¹, Bárbara Kunzler Souza¹, Mariane da Cunha Jaeger^{1,2}, Algemir Lunardi Brunetto², Caroline Brunetto de Farias², Rafael Roesler³

1 Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

2 Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

3 Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Rafael Roesler. Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 305 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Key-words: ZEB1, medulloblastoma, FTY720, Fingolimod, HDACi

DUTRA, L. F., *et al.* FTY720 DOWNREGULATES ZEB1 IN HUMAN MEDULLOBLASTOMA CELLS

ABSTRACT

Medulloblastomas are the most common malignant Central Nervous System neoplasia in pediatric patients. In addition to disease morbidity, medulloblastoma treatment induces psychosocial and neurocognitive impairment. Approximately, 30% of medulloblastoma patients are refractory and many of the successfully treated patients relapsed. ZEB1 is a transcriptional factor physiologically related to cerebellum formation and pathologically linked to severe tumor malignancies. Fingolimod (FTY720) is an emerging antitumoral drug which acts by inhibiting histone deacetylases and consequently modulating gene expression and essential cancer processes. The aim of this study was to investigate ZEB1 expression in medulloblastoma and its regulation by fingolimod. Daoy and D283 human medulloblastoma cell lines were used, and RT-qPCR was performed to measure ZEB1 expression. D283 cells presented higher ZEB1 expression compared to Daoy. Cells treated with FTY720 for 48 hours showed a significant decrease in ZEB1 expression. No alterations in ZEB1 expression were found in chemoresistant cells. The results suggest that epigenetic mechanisms regulating chromatin state can regulate ZEB1 in medulloblastoma, and modulation of ZEB1 expression may be involved in mediating the effects of fingolimod.

INTRODUCTION

Cancer comprises the set of diseases characterized by disorderly cell proliferation, migration angiogenesis, apoptosis escape, invading neighbor tissue and metastasis (1). Upon 1 to 4% of all cancers are diagnosticated in children, representing the main cause of death by disease in patients under 19 years old (2)

Medulloblastoma is the most common central nervous system (CNS) cancer in children. Among the main symptoms, there is headaches, nausea and lethargy, due to the high intracranial pressure (3). Survival in medulloblastoma is related to molecular subgroups: Wnt, SHH, Group 3 and Group 4, which present alterations in specific signaling pathways, variance in incidence according to age and malignancy – worst prognosis in subgroups where metastasis are frequent (4).

Even with treatment protocols combining surgery, spinal-cord radiotherapy and chemotherapy, only 51% of patients reaches 5 years of overall survival after diagnosis and 30% of treated patients relapses, with poor prognosis (5, 6). In patients submitted to radiotherapy, cognitives and learning deficits are commonly reported (7).

ZEB1 is a transcriptional factor promoting EMT, essential to the embryo growing to create lungs, immune cells and bones (8-10). During cerebellum development, ZEB1 has been identified as a master-key in neuronal differentiation, modulating genes which controls cell polarity, migration and adhesion, ensuring granular neuronal progenitors to migrate to external cerebellar layers. The same study presents higher ZEB1 expression in patients' samples from SHH subgroup, suggesting ZEB1 as an important therapeutic target (11).

In several tumors, as lung cancer, pancreatic cancer, uterus cancer, gastric cancer, colorectal cancer, liver cancer and breast cancer, ZEB1 has been related to poor prognosis, by promoting metastasis and chemoresistance. (12-18). Among the potential candidates to modulate ZEB1, there is mostly non-coding RNAs and epigenetic drugs (19-21).

Fingolimod, also known as FTY720, is an oral immunosuppressor, FDA approved in 2010, to treating relapsed multiple sclerosis (22). Its main mechanism is acting as agonist of sphingosine-1-phosphate, but others have been studied. Fingolimod can act as a histone deacetylase inhibitor: in cancer cell lines (23). In medulloblastoma group 3 cell lines, FTY720 reduced cell viability and cell proliferation, by S1P pathway (24). Herein, ZEB1 importance was evidenced, and Fingolimod treatment was investigated in medulloblastoma cells.

METHODS

Cell lines and treatments

The human medulloblastoma cell lines Daoy and D283 were purchased from ATCC. The cell lines were cultivated in DMEM low glucose, in the presence of 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin and 0,1% amphotericin B, and maintained at 37°C and 5% CO₂.

Fingolimod (FTY720) (Sigma-Aldrich -St Louis, MO, USA) was diluted in injection water and stored at -20°C. Cisplatin (Citoplax®, Bergamo, Taboão da Serra, SP, Brazil) was diluted in cultured medium to a final concentration of 100µM for experiments and discarded right after use.

Chemoresistance induction.

For chemotherapy resistance induction, D283 cells underwent treatment for 96 h, with increasing drug concentration every 2 weeks, for a period of ≥10 weeks. The cisplatin concentrations were 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM, 50 nM, 100 nM e 1 µM. The resultant resistant cells were referred as D283-R.

Cell viability

Cells were seeded at a density of 3×10^3 cells/well in 96-well plates or $1,5 \times 10^4$ cells/well in 24-well plate. After 24h, cells were treated with cisplatin in doses 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM. The medium was removed 72 h after experimental treatments, and the cells were detached with trypsin solution, and counted by the trypan blue exclusion method in a hemocytometer.

RNA extraction and cDNA synthesis.

RNA was extracted using Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's protocol. After the RNA extraction, samples were treated with DNase (RQ1, Promega, Madison, QI) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized using the reverse transcription (RT)-

PCR kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

RT-qPCR

qPCR was performed using the Quant Studio 3 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.), with negative controls. Reactions were prepared with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, San Louis Obispo, CA, USA). 10 ng sample input cDNA. Every reaction contained 10 ng sample input cDNA, 500nM each primer. The Standard cycle program was followed. ZEB1 expression levels were evaluated using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method, with β -actin used as the housekeeping gene. The following primers were used 5'-ACCCTTGAAAGTGATCCAGC-3' (forward) and 5'-CATTCCATTTTCTGTCTTCCGC-3' (reverse) for ZEB1 and 5'AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' (forward) and 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT- 3' (reverse) for β -actin.

Statistical Analysis

All data are shown as means \pm standard deviation and analyzed using T-test. Experiments were conducted three times and in triplicates. The differences were considered statistically significant when P-values were <0.05 .

RESULTS

ZEB1 expression is higher in D283 than Daoy cell line

Before performing the further experiments, ZEB1 expression in two human medulloblastoma cell lines was confirmed. ZEB1 is differentially expressed in Daoy and D283 cell lines. The results revealed upon fivefold increased expression in D283 cell line when compared to Daoy (Figure 1).

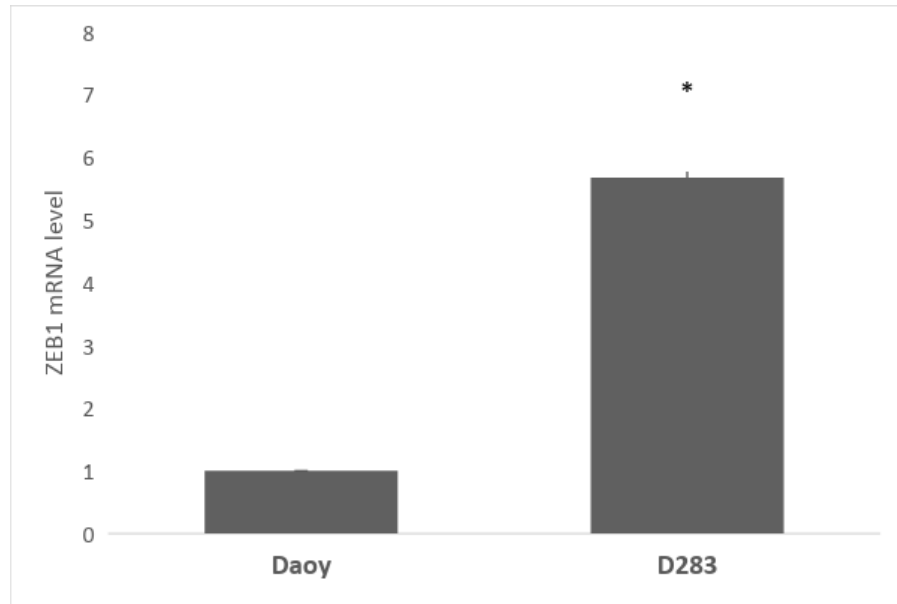
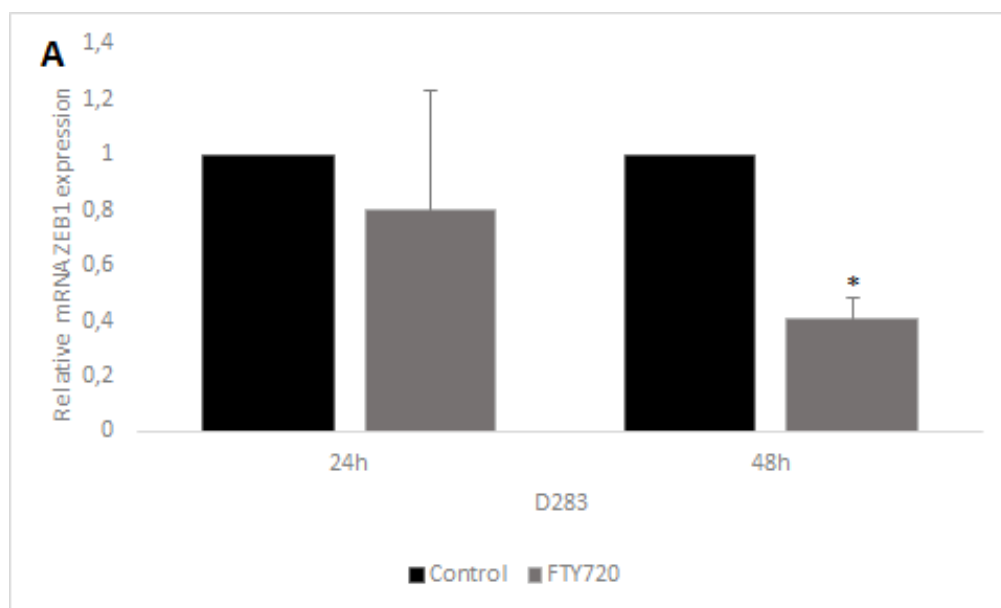


Figure 1. ZEB1 relative expression analysis in Daoy and D283 cell line. Values represent the relative expression of ZEB1 in D283 compared with Daoy cells. * $P < 0.005$

FTY720 decreases ZEB1 expression in D283

To investigate the potential role of FTY720 on modulating ZEB1, Daoy and D283 cells were treated with FTY720 in the IC50 dose for each lineage (6,2 μM and 8,9 μM , respectively), for 24 and 48 hours. ZEB1 expression was significantly decreased in D283 treated for 48 hours. No significant changes were found in the 24h treatment. Daoy cell line did not presented alterations in both periods.



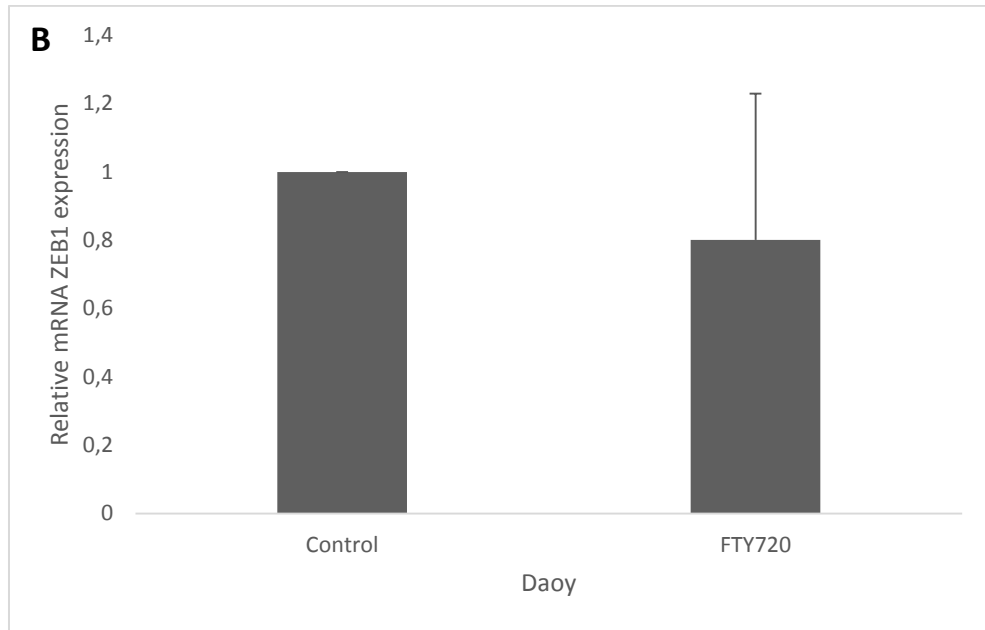


Figure 2. FTY720 decreases ZEB1 relative expression in D283 cell line. A) ZEB1 expression in D283 cell line treated with IC50 FTY720 for 24 and 48 hours. B) ZEB1 expression in Daoy cell line, treated with FTY720 IC50 for 48 hours. Values represent the relative expression of ZEB1 in cells treated with compared with untreated cells. * $P < 0.005$

Induction of chemotherapy resistance

Chemotherapy resistance was successfully induced by cisplatin in D283 cells. D283 and D283-R cells were treated by 48 hours with Cisplatin with 1 μM and 3 μM . Resistance was evidenced at concentration of 1 μM . It was observed a 35% cell viability increase in D283-R compared to D283 parental cell line.

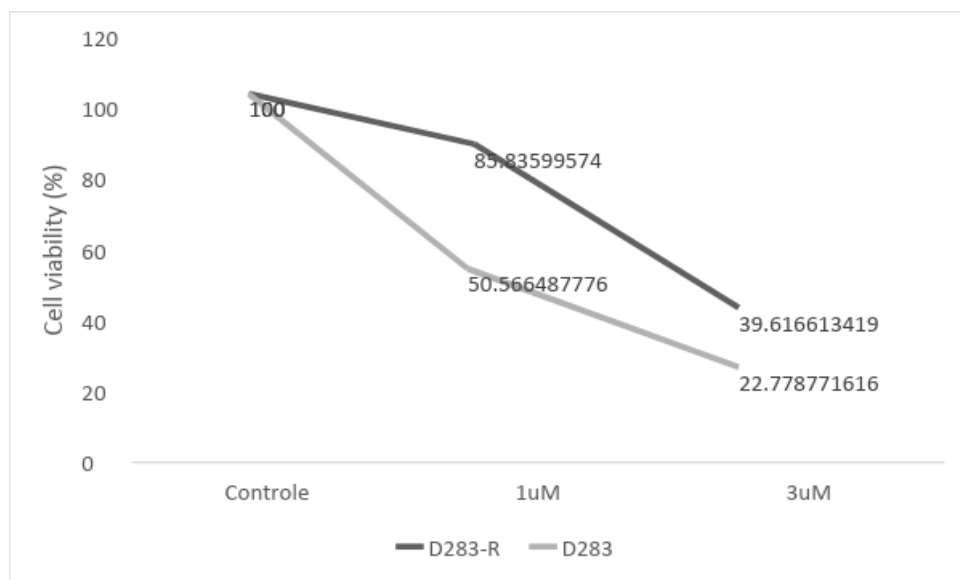


Figure 3. Chemotherapy resistance in D283 cells. Resistance is observed at 1 μM cisplatin concentration, with an increase in cell viability in the D283-R compared to D283. Data from a single experiment.

ZEB1 is not increased in chemoresistant D283-R cells

D283-R cells maintained without cisplatin showed no significant alteration in ZEB1 expression levels when compared to D283 cell line.

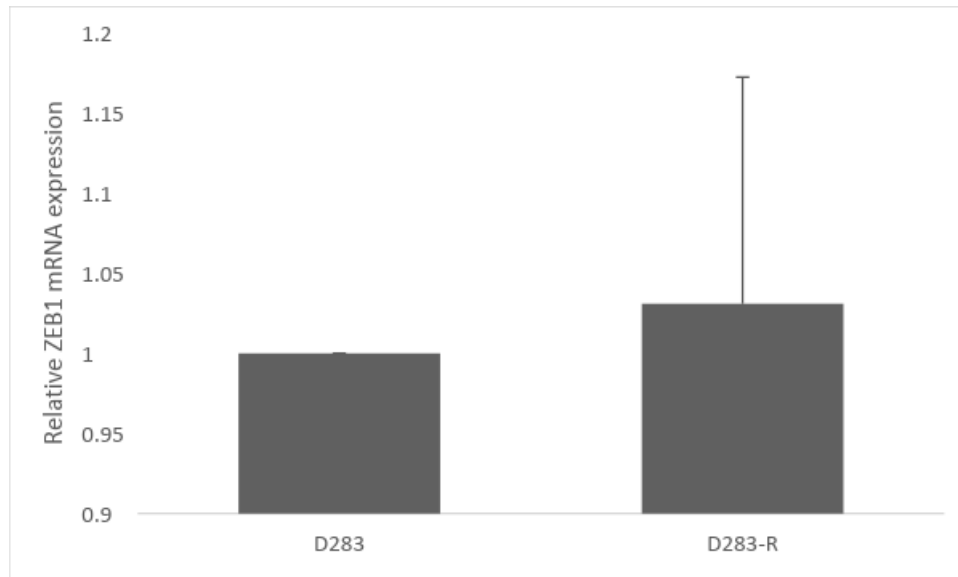


Figure 4. ZEB1 relative expression in D283 and D283-R cell lines. No significant alteration has been found.

DISCUSSION

Advances in pediatric cancer requires efforts in diagnosis, access to treatment, professional qualification and government support. Also, barriers to better outcomes are therapy abandonment, death from toxicity, and relapse (25). Nowadays, in the global scenario, survival rates are upon 30%, mostly because pediatric cancer patients in low- and middle-income countries are four times most likely to die than pediatric patients from developed countries (26).

Medulloblastomas are tumors grown in the post cranial fossa and belong to the central nervous system tumors, the solid tumors most common in children. To better understanding this neoplasia, two well-established cell lines were used in this study: Daoy – derived from a SHH subgroup and mutated for TP53 – and D283, derived from a metastatic site with characteristics of 3 and 4 subgroups and MYC overexpressed (27).

Here, we found that D283 shows higher levels of ZEB1, comparing to Daoy cell line. This result contradicts Singh *et al.*, where ZEB1 was found to be four times higher in SHH than in the other subgroups, in a dataset counting 74 samples (11). A possible explanation for lower levels of ZEB1 in Daoy is the TP53 mutation: ZEB1 is downregulated in wild-type TP53, but not in missense or severe TP53 mutation breast cancer samples (28). TP53

mutations were found in 28% of SHH analyzed tumors and represents the most important risk factor in this molecular subgroup (29).

Targeting ZEB1 can be a wise approach, once this transcriptional factor controls EMT, metastasis and therapy resistance (30). In pancreatic cancer, ZEB1 recruits HDAC1 and HDAC2 to prevent E-cadherin expression and promoting EMT. When ZEB1 was silenced, HDAC was unable to bind E-cadherin gene promoter, keeping histones acetylated and E-cadherin could be expressed (31). Souza and colleagues treated Ewing sarcoma cells with an HDAC inhibitor called NaB. NaB induced strong reduction in HDAC activity, cell cycle arrest, decreased stemness markers and increased differentiation markers (32). NaB alone was also capable of induce cell death and differentiation in human medulloblastoma cells (33, 34).

Targeting HDACs is a clever strategy, once these enzymes not only regulates acetylation status of histones proteins, but also of non-histones proteins such as DNA-binding proteins, DNA-repair proteins and transcriptional factors, affecting gene expression, protein activity and protein stability related to this non-histone proteins (35). High histone acetylation is seen in active regions on DNA, and facilitates transcriptional factors binding (36).

Focusing in HDAC inhibitors, fingolimod stands out as a promising therapeutic approach in medulloblastoma treatment. Hereby, FTY720 reduced ZEB1 expression in D283 cell line. We suppose that no alterations were seen in Daoy cell line once ZEB1 levels were already insignificant, due to the presence of TP53 muted. In medulloblastoma cell lines, FTY720 promoted cell cycle arrest and decreased viability, proliferation, migration and invasion. FTY720 also decreased tumor growth in animal model (24).

Beyond antitumoral effects, fingolimod exerts neuroprotective roles. Antiepileptogenic (37) and anti-convulsive effects were described in mouse model (38), properties that could improve quality of life for medulloblastoma patients which presents seizures owing to tumor location, histology, recurrence and incomplete resection (39). Brain cancer survivors may evolve neurocognitive sequelae as deficits in learning, attention, processing speed and memory and psychosocial negative outcomes, as depression and anxiety (40). Fingolimod attenuated cognitive impairs induced by radiotherapy, in a mouse model (41). In a rat model of autism, FTY720 also reduced social learning and memory deficits, asserting FTY720 as a neuroprotective drug (42). Recently, FDA extended FTY720 approval to treating pediatric patients, up to 10 years old, with multiple sclerosis (43).

At this present time, there are four HDAC inhibitors approved for cancer: SAHA (approved for cutaneous T-cell lymphoma), Belinostat (for peripheral T-cell lymphoma), Panabioostat (approved for multiple myeloma) and Romidepsin (approved for cutaneous T-cell

lymphoma) (44). Differently from these FDA approved HDAC inhibitors, FTY720 is superior in crossing the blood brain barrier and operating in CNS impairments (45- 51).

Cisplatin-based chemotherapy reside in medulloblastoma protocols for both pediatric and adult patients (52, 53) and, for this reason, was the drug chosen to induce resistance in medulloblastoma cells. Furthermore, cisplatin promoted survival of cancer stem cells, in head and neck carcinoma (54). We choose the dose of 1 μM to induce resistance with cisplatin, once this dose decreased the cell viability in 50%, in D283 cell line. ZEB1 present no alterations in D283-R cell line compared to D283. The maximum plasma concentration found to cisplatin was 14,4 μM , so we hypothesized higher resistant doses are needed to reach further molecular alterations (55).

Hereby, we presented the differential ZEB1 expression in medulloblastoma cell lines, supporting the validity of molecular characteristics in medulloblastoma. ZEB1, a master key in malignant tumors, was successfully decreased by FTY720 treatment. FTY720 acts as a HDAC inhibitor, with antitumoral and neuroprotective properties, emerging as a potential medicine in medulloblastoma treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable.

FUNDING

The present study was supported by FIPE- HCPA.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The analyzed datasets generated during the study are available from the corresponding author on reasonable request, while preserving the necessary confidentiality and anonymity.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

LF conceived, designed the study and performed the experiments, analyzed the data and was a major contributor in writing the manuscript. AS, BK and MC gave advice on the experiments and contributed with reagents and technical assistance. MC, AL, CB and R supervised the study. All authors have read and approved the final manuscript.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

PATIENT CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. HANAHAHAN D, & WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70, 2000.
2. INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.
3. MICHALOWSKI MB, LOREA CF, RECH A, SANTIAGO P, LORENZONI M, TANIGUCHI A, *et al.* Diagnóstico precoce em oncologia pediátrica: uma urgência médica. *Bol Cient Pediatr*; 01(1):13-18, 2012.
4. TAYLOR MD, NORTHCOTT PA, KORSHUNOV A, REMKE M, CHO YJ, CLIFFORD SC, ... PFISTER, SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, 123(4), 465–472, 2012
5. YALÇIN B, BÜYÜKPAMUKÇU M, AKALAN N, *et al.* Value of surveillance imaging in the management of medulloblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 38(2):91–97.10, 2012.
6. TORRES CF, REBSAMEN S, SILBER JH *et al.* Surveillance scanning of children with medulloblastoma. *N Engl J Med*. 330(13):892–895, 1994. HAZIN I, Garcia D, Gomes E, Leite D, Balaban B, Guerra A. Intellectual outcome after cancer treatment: A study with children. *Psicol. Reflexão e Crítica* 28, 565–573, 2015.
7. HAZIN I, GARCIA D, GOMES E, LETE D, BALABAN B, GUERRA A, VILAR C. Intellectual outcome after cancer treatment: A study with children. *Psicol. Reflexão e Crítica* 28, 565–573 (2015).
8. FUNAHASHI J, SEKIDO R, MURAI K, KAMACHI Y, & KONDOH H. Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development*, 119(2), 433–446, 1993.
9. TAKAGI T, MORIBE H, KONDOH H, & HIGASHI Y. DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development*, 125(1), 21–31, 1998.

10. LIU Y, EL-NAGGAR S, DARLING DS, HIGASHI Y, DEAN DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*; 135:579-88, 2008.
11. SINGH S, HOWELL D, TRIVEDI N, KESSLER K, ONG T, ROSMANINHO P., ...SOLECKI, D. J. Zeb1 controls neuron differentiation and germinal zone exit by a mesenchymal-epithelial-like transition. *ELife*, 1–31, 2006.
12. SPOELSTRA NS, MANNING NG, HIGASHI Y, DARLING D, SINGH M, SHROYER KR, BROADDUS RR, HORWITZ KB, RICHER JK. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res*; 66:3893-902, 2006.
13. BRONSERT P, KOHLER I, TIMME S, KIEFER S, WERNER M, SCHILLING O, VASHIST Y, MAKOWIEC F, BRABLETZ T, HOPT UT, et al. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery*; 156:97-108, 2014.
14. SHEN A, ZHANG Y, YANG H, XU R, HUANG G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *J Surg Oncol*; 105:830-4, 2012.
15. ZHANG J, LU C, KANG J, CAO C, LI M. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*; 40:949-56, 2013.
16. ZHOU YM, CAO L, LI B, ZHANG RX, SUI CJ, YIN ZF, YANG JM. Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*; 19:1700-6, 2012.
17. OKUGAWA Y, TOIYAMA Y, TANAKA K, MATSUSITA K, FUJI-KAWA H, SAIGUSA S, OHI M, INOUE Y, MOHRI Y, UCHIDA K, *et al.* Clinical significance of Zinc finger E-box Binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer. *J Surg Oncol*; 106:280-5, 2012.
18. ZHANG GJ, ZHOU T, TIAN HP, LIU ZL, XIA SS. High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Oncol Lett*; 5:564-8, 2013.
19. YAN, H., ZHANG, B., FANG, C., & CHEN, L. miR-340 alleviates chemoresistance of osteosarcoma cells by targeting ZEB1. *Anti-Cancer Drugs*, 29(5), 440–448, 2018.
20. SAKATA J, UTSUMI F, SUZUKI S, *et al.* Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*; 8(59):99482-99494, 2017.
21. MEIDHOF S, BRABLETZ S, LEHMANN W, et al. ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol Med*.; 7(6):831-47, 2015.
22. ENGLISH C, & ALOI JJ. New FDA-approved disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *Clin Ther*, 37(4), 691–715, 2015.

23. HAIT NC, AVNI D, YAMADA A, et al. The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. *Oncogenesis*.;4(6):e156, 2015.
24. GARNER EF., WILLIAMS AP, STAFMAN LL, AYE JM, MROCZEK E, MOORE BP, ... BEIERLE EA. FTY720 Decreases Tumorigenesis in Group 3 Medulloblastoma Patient- Derived Xenografts. *Sci. Rep.* 8(6913), 1–10, 2018.
25. HOWARD SC, ZAIDI A, CAO X, WEIL O, BEY P, PATTE C, ... GAGNEPAIN-LACHETEAU A. The My Child Matters programme: effect of public – private partnerships on paediatric cancer care in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol.*, 19(5), e252–e266, 2016.
26. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Initiative for Childhood Cancer. Website: <https://www.who.int/cancer/childhood-cancer/en/> accessed in 21/11/2018
27. IVANOV DP, COYLE B, WALKER, DA, & GRABOWSKA AM.. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol*, 236, 10–25, 2016.
28. CORADINI D, FORNILI M, AMBROGI F, BORACCHI P, & BIGANZOLI E. TP53 Mutation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Stemlike Features in Breast Cancer Subtypes. [J Biomed Biotechnol](#) 2012, 1–13, 2012
29. ZHUKOVA N, RAMASWAMY V, REMKE M, PFAFF E, SHIH DJH, MARTIN DC, ... TAYLOR MD.. Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma. *J Clin Oncol*, 31(23), 2927–2937, 2013.
30. ZHANG, P., SUN, Y., & MA, L. . ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle*, 14(4), 481–487, 2015.
31. AGHDASSI A, SENDLER M, GUENTHER A, MAYERLE J, BEHN CO, HEIDECKE CD, ... WEISS FU. . Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut*, 61(3), 439–448, 2012.
32. SOUZA BK, DA COSTA LOPEZ, PL, MENEGOTTO PR, VIEIRA IA, KERSTING N, ABUJAMRA AL, ... ROESLER R Targeting Histone Deacetylase Activity to Arrest Cell Growth and Promote Neural Differentiation in Ewing Sarcoma. *Mol Neurobiol*, 55(9), 7242–7258, 2018.
33. JAEGER M, GHISLENI EC, FRATINI L, BRUNETTO AL, GREGIANIN LJ, BRUNETTO AT., ... ROESLER R. Viability of D283 medulloblastoma cells treated

- with a histone deacetylase inhibitor combined with bombesin receptor antagonists. *Childs Nerv Syst*, 32(1), 61–64, 2016.
34. NÖR C, SASSI FA DE FARIAS CB, SCHWARTSMANN G, ABUJAMRA AL, LENZ G, ... ROESLER R. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol* 48(3), 533–543, 2013.
 35. OCKER M, ECKSCHLAGER T, PLCH J, STIBOROVA M, & HRABETA J. . Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–25, 2017.
 36. KAZANETS A, SHORSTOVA T, HILMI K, MARQUES M, & WITCHER M. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1865(2), 275–288, 2016.
 37. LEO A, CITRARO R, AMODIO N, DE SARRO C, GALLO CANTAFIO ME, CONSTANTINI A, ... RUSSO E. Fingolimod Exerts only Temporary Antiepileptogenic Effects but Longer-Lasting Positive Effects on Behavior in the WAG/Rij Rat Absence Epilepsy Model. *Neurotherapeutics*, 14(4), 1134–1147, 2017.
 38. PITSCH J, KUEHN JC, GNATKOVSKY V, MÜLLER JA, VAN LOO KMJ, DE CURTIS M, ... BECKER AJ. Anti-epileptogenic and Anti-convulsive Effects of Fingolimod in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Neurobiol*, 1–16, 2018.
 39. ULLRICH NJ, POMEROY SL, KAPUR K, MANLEY PE, GOUMNEROVA LC AND LODDENKEMPER T. Incidence, risk factors, and longitudinal outcome of seizures in long- term survivors of pediatric brain tumors. *Epilepsia*, 56: 1599-1604, 2015.
 40. STAVINOHA PL, ASKINS MA, POWELL SK, PILLAY SMILEY N. & ROBERT RS. Neurocognitive and Psychosocial Outcomes in Pediatric Brain Tumor Survivors. *Bioengineering*, 5(3), 2018.
 41. STESSIN AM, BANU MA, CLAUSI MG, BERRY N, BOOCKVAR JA, & RYU S. FTY720/fingolimod, an oral S1PR modulator, mitigates radiation induced cognitive deficits. *Neurosci Lett*, 658, 1–5, 2017.
 42. WU H, WANG X, GAO J, LIANG S, HAO Y, SUN C, ... WU L. . Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci*, 173, 43–54, 2017.

- 43.** FDA. FDA expands approval of Gilenya to treat multiple sclerosis in pediatric patients. Website: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm607501.htm> . Accessed in 22/11/2018.
- 44.** ECKSCHLAGER T, PLCH J, STIBOROVA M, & HRABETA J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci*, 18(7), 1–25, 2017.
- 45.** FOSTER, CA, HOWARD LM, SCHWEITZER A, PERSOHN E, HIESTAND PC, BALATONI B, ... BILLICH A. Brain Penetration of the Oral Immunomodulatory Drug FTY720 and Its Phosphorylation in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Consequences for Mode of Action in Multiple Sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 323(2), 469–475, 2007.
- 46.** MENO-TETANG GML, LI H, MIS S, PYSZCZYNSKI N, HEINING P, LOWE P, & JUSKO WJ. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of FTY720 (2-Amino-2[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride) in Rats After Oral and Intravenous Doses. *Drug Metab Dispos*, 34(9), 1480–1487, 2006.
- 47.** IWAMOTO FM, LAMBORN KR, KUHN JG, WEN PY, ALFRED YUNG WK, GILBERT MR, CHANG SM, LIEBERMAN FS, PRADOS MD, FINE HA. A phase I/II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American Brain Tumor Consortium Study 03-03, *Neuro Oncol*, 13, 5, 509–516, 2011.
- 48.** SINGLETON WGB, BIENEMAN AS, WOOLLEY M, JOHNSON D, LEWIS O, WYATT MJ, ... GILL SS. . The Distribution, Clearance, and Brainstem Toxicity of Panbinostat administered by Convection-Enhanced Delivery. *J. Neurosurg. Pediatr.*, 3(22), 288–296, 2018.
- 49.** WARREN KE, MCCULLY C, DVINGE H, TJØRNELUND J, SEHESTED M, LICHENSTEIN HS, & BALIS FM. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the histone deacetylase inhibitor, belinostat (PXD101), in non-human primates. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62(3), 433–437, 2008.
- 50.** HANSON, JE, LA H, PLISE E, CHEN YH, DING X, HANANIA T, ... ZHOU Q. . SAHA Enhances Synaptic Function and Plasticity In Vitro but Has Limited Brain Availability In Vivo and Does Not Impact Cognition. *PLoS One*, 8(7), 1–11, 2013.
- 51.** TAN, SF, KIRBY BP, STANSLAS J, & BASRI, HB. Characterisation, in-vitro and in-vivo evaluation of valproic acid-loaded nanoemulsion for improved brain bioavailability. *J Pharm Pharmacol*, 69(11), 1447–1457, 2017.

52. WAISSBLUTH S, DEL VALLE Á, CHUANG A, & BECKER A. Incidence and associated risk factors for platinum-induced ototoxicity in pediatric patients. *Int J Pediat Otorhinolaryngol*, 111, 174–179, 2018.
53. ATALAR B, OZSAHIN M, CALL J, NAPIERALSKA A, KAMER S, VILLA S, ... SIO TT.. Treatment outcome and prognostic factors for adult patients with medulloblastoma: The Rare Cancer Network (RCN) experience. *Radiother Oncol*, 127(1), 96–102, 2018.
54. NÖR C, ZHANG Z, WARNER KA, BERNARDI L, VISIOLI F, HELMAN JI, ... NÖR JE. Cisplatin Induces Bmi-1 and Enhances the Stem Cell Fraction in Head and Neck Cancer. *Neoplasia*, 16(2), 137-W8, 2014.
55. LISTON DR, & DAVIS M. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: A guide for nonclinical studies. *Clin Cancer Res*, 23(14), 3489–3498, 2017.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O papel de ZEB1 em meduloblastoma precisa ser mais profundamente estudado, em diferentes modelos experimentais e cenários moleculares, para a futura aplicabilidade clínica. O fingolimod demonstrou ser um potencial agente modulador de ZEB1. Além dos diversos efeitos antitumorais já descritos pela literatura, seja como agonista de S1P, seja como inibidor de histona deacetilases, vários autores demonstraram seu papel neuroprotetor, minimizando convulsões e melhorando aspectos cognitivos como memória e aprendizagem, que contabilizam importantes comorbidades nos pacientes de meduloblastoma.

Mais experimentos serão realizados para investigar o papel de ZEB1 em células de meduloblastoma resistentes ao tratamento com quimioterápicos. A avaliação da expressão de ZEB1 por RT-qPCR será conduzida em triplicata, e doses mais altas de resistência poderão ser alcançadas.

