

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Alexandre da Silveira Perla

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO FINGOLIMODE EM CULTURAS DE
LINHAGENS CELULARES DE MEDULOBLASTOMA HUMANO**

Porto Alegre

2019

Alexandre da Silveira Perla

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO FINGOLIMODE EM CULTURAS DE
LINHAGENS CELULARES DE MEDULOBLASTOMA HUMANO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Farmacologia e
Terapêutica como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Perla, Alexandre da Silveira
Efeito antineoplásico do fingolimode em culturas de
linhagens celulares de meduloblastoma humano /
Alexandre da Silveira Perla. -- 2019.
66 f.
Orientador: Rafael Roesler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Fingolimode. 2. FTY720. 3. acetilação de
histonas . 4. Meduloblastoma. 5. tumor cerebral. I.
Roesler, Rafael, orient. II. Título.

Alexandre da Silveira Perla

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO FINGOLIMODE EM CULTURAS DE LINHAGENS
CELULARES DE MEDULOBLASTOMA HUMANO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Aprovada em: Porto Alegre, 15 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Roesler
UFRGS

Profa. Dra. Daniela Dornelles Rosa
UFRGS

Prof. Dr. Lauro José Gregiani
UFRGS

Dedico este trabalho aos meus filhos Gabriel e Rafael,
especialmente a minha mãe Dona Chica,
por me ensinar que “não tá morto quem peleia!!!

AGRADECIMENTOS

À Misericórdia Divina por me propiciar mais esse aprendizado em termos de conhecimento moral e intelectual.

Ao meu orientador, professor Rafael Roesler pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal e por compartilhar uma visão moderna e transdisciplinar da pesquisa e na farmacologia.

À Caroline Brunetto de Farias e Mariane Jaeger pelo acolhimento e inúmeros ensinamentos, pela amizade, pela paciência e pela dedicação em proporcionar condições para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha querida parceira de trabalho Livia Fratini, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela oportunidade de convívio.

A minha eterna orientadora professora Maria Beatriz Cardoso Ferreira, pelo apoio e conselhos de sempre.

Ao meu companheiro de caminhada Rodrigo pelo apoio e a compreensão durante os últimos tempos.

À secretária Ieda Regina Oliveira da Silva, pela incansável ajuda e presteza como exímia secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica.

A nossa grande Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por mais essa oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, assim como às instituições e fontes financiadoras pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração e o desenvolvimento deste trabalho. MUITO OBRIGADO!

*“O fardo é proporcional às forças,
como a recompensa será
proporcional à resignação e à coragem”.*

(Allan Kardec)

RESUMO

Os tumores do sistema nervoso central estão associados a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade, sendo que os meduloblastomas representam um grupo heterogêneo de tumores primários malignos, com características agressivas e tendência à formação de metástases. A terapia vigente para tratamento de meduloblastomas envolve, cirurgia, radioterapia e quimioterapia adjuvante. A terapêutica deste tumor é direcionada à minimização dos efeitos adversos a longo prazo, bem como uma maior efetividade dos fármacos antineoplásicos. Os inibidores da histona desacetilase (iHDAC) são agentes epigenéticos que exibem atividades antitumorais em modelos experimentais para estudo meduloblastoma. O fingolimode (FTY720), um agente imunossupressor, atualmente utilizado no tratamento da esclerose múltipla, também pode ter atividade antineoplásica e atuar como iHDAC. O objetivo de nosso trabalho foi analisar a ação antineoplásica do fingolimode em culturas de meduloblastoma humano (linhagens celulares D283 e DAOY), bem como sua ação epigenética. As células em estudo foram tratadas com diferentes concentrações de fingolimode (5, 7.5 ou 10 Mm). A viabilidade celular foi analisada por meio de contagem celular através de um hemocítômetro e a sobrevivência celular por análise de formação de colônias. Ação epigenética do fingolimod foi estudada mediante acetilação da histona H3 medida por método de ELISA. Assim, foi observado que o fingolimode nas concentrações de 7,5 ou 10 μ M, foram capazes de induzir uma redução significativa na viabilidade celular em culturas de meduloblastomas de ambas linhagens celulares, sendo que resultados semelhantes foram observados para a inibição da sobrevivência celular. Em ambas as linhagens celulares, o fingolimode também levou a um aumento significativo nos níveis de acetilação de histonas H3. Nossos resultados fornecem evidências indicando que o fingolimode apresenta atividades antineoplásica por provável mecanismos epigenético .

Palavras-chaves: Fingolimode; FTY720; Acetilação de histonas; Meduloblastoma; Tumor cerebral.

ABSTRACT

Central nervous system (CNS) tumors are associated with a high morbidity and mortality rate, and Medulloblastoma (MB) represents a heterogeneous group of malignant primary tumors, with aggressive characteristics and tendency to metastasis. Current therapy for treatment of medulloblastomas involves surgery, radiotherapy, and adjuvant chemotherapy. MB therapy has been directed to the minimization of long-term adverse effects, as well as to a greater effectiveness of new drugs directed to this extremely aggressive oncology pathology. Histone deacetylase inhibitors (HDACis) are epigenetic agents that exhibit antitumor activities in experimental medulloblastoma (MB). Fingolimod (FTY720), an immunosuppressive agent currently used in the treatment of multiple sclerosis, also has anticancer actions and can act as HDACi. Here we examine whether fingolimod can inhibit the viability and survival of human MB cells, and whether the effects are accompanied by increased histone acetylation. In these study, D283 and DAOY MB cells were treated with different doses of fingolimod and their cell viability was evaluated by counting cells in a hemocytometer and cell survival was analyzed by colony formation assay. Histone H3 acetylation was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Thus, fingolimod at a dose of 7.5 or 10 μ M was able to induce a significant reduction in cell viability in D283 and DAOY cultures, and similar results were observed for inhibition of cell survival. In both cell lines, fingolimod also led to a significant increase in acetylated H 3 levels. These results provide early evidence indicating that fingolimod induces antitumor activities in MB through an epigenetic mechanism in an increase in histone H3 acetylation is observed.

Keywords: Fingolimod; FTY720; Histone acetylation; Medulloblastoma; Brain tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1	Desenvolvimento de células granulares e tumorigênese de meduloblastoma.....	14
FIGURA 2	<i>Sonic hedgehog</i> e <i>wingless</i> sinalizando vias implicadas na formação de meduloblastoma	15
FIGURA 3	Imagem de ressonância magnética de crânio mostrando planos sagital e horizontal.....	16
FIGURA 4	Imagem microscópica histológica, mostrando diferentes tipos de meduloblastomas	20
FIGURA 5	Gráfico de distribuição dos subgrupos moleculares de meduloblastoma, de acordo com a idade (em anos) do paciente	24
FIGURA 6	Esquema do consenso dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas.....	24
FIGURA 7	Estrutura química do fingolimode e miriocina	30
FIGURA 8	Ações do fingolimode em seus vários sítios celulares	32

ARTIGO 1

FIGURA 1	Viability and survival of d283 and daoy mb cells after treatment with fingolimod (fty720)	41
FIGURA 2	Quantification of acetylated histone h3 in (a) d283 and (b) daoy mb cells after treatment with fingolimod (fty720)	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATX	autotaxina
BuA	butirato de Sódio
cGy	entiGray (unidade de dose absorvida de radiação)
COG	Grupo de Oncologia Pediátrica Norte-Americano
CGI	Células Granulares Interna
D283	Linhagem celular originada dos subgrupos 3 e 4 de meduloblastoma humano
DAOY	linhagem celular do subgrupo de meduloblastoma humano <i>sonic hedgehog</i>
FTY720	hidrocloreto de 2 – Amino-2-[2-(4-octilphenil)]-1,3-propanediol ou <i> fingolimod</i>
GFAP	proteína fibrilar ácida da glia
Gy	Gray (unidade de dose absorvida de radiação)
IC50	concentração Inibitória 50%
iHDAC	inibidor das enzimas histona deacetilase
HDAC	enzima histona deacetilases
H3	histona 3
LPA	ácido lipofosfatídico
MB	meduloblastoma
min.	Minutos
mm ³	Milímetros cúbicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PP2A	Proteína fosfatase 2
SIOP	Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica
SHH	subgrupo de meduloblastoma humano <i>sonic hedgehog</i>
SPP1	esfingosinafosfatase
SNC	sistema nervoso central
Sphk ₂	esfingosina quinase 2
S ₁ P	esfingosina-1-fosfato
TSA	ácido hidroxâmico tricostatínico A
WNT	subgrupo de meduloblastoma humano <i>wingless</i>
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.2	TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E MEDULOBLASTOMAS .	17
1.3	CLASSIFICAÇÃO DOS MEDULOBLASTOMAS	18
1.3.1	Classificação Clínica dos Meduloblastomas.....	18
1.3.2	Classificação Histológica dos Meduloblastomas	18
1.3.3	Classificação Molecular dos Meduloblastomas.....	20
2	TRATAMENTO DOS MEDULOBLASTOMAS.....	26
2.1	INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES NO TRATAMENTO DOS MEDULOBLASTOMAS.....	27
2.2	FINGOLIMODE (FTY720).....	30
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	ABORDAGEM METODOLÓGICA	35
5	ARTIGO 1.....	36
6	ARTIGO 2.....	45
7	DISCUSSÃO	56
8	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) estão associados a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade. São considerados os tumores com maior incidência entre as crianças, perdendo apenas para as leucemias (OSTROM *et al.*, 2013).

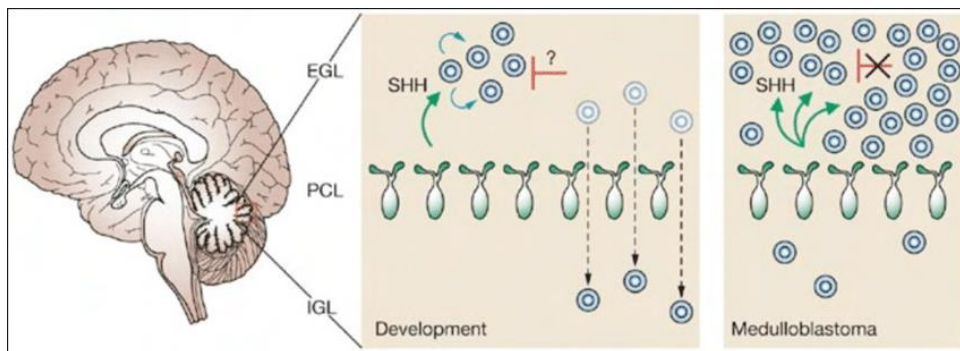
Os meduloblastomas representam um grupo heterogêneo de tumores primários malignos, com características agressivas e tendência à formação de metástases. Sua etiologia ainda é muito controversa, porém especula-se que estejam associados à ativação de cascatas de sinalização, rotas transcricionais e estados da cromatina que promovam ou mantenham a manutenção da polaridade celular na diferenciação celular neuronal (SINGH *et al.*, 2016). Para o desenvolvimento dos circuitos neuronais do SNC, além de se diferenciarem, é preciso que as células precursoras neuronais migrem de uma zona germinativa até o destino final. Moléculas de sinalização, como algumas quinases (LKB1/SAD), estão associadas a esta diferenciação e recrutamento celular. Defeitos neste mecanismo estão relacionados ao desenvolvimento de patologias neurodegenerativas e neurodesenvolvimentais como os meduloblastomas (SINGH *et al.*, 2016).

No desenvolvimento do cerebelo, a migração das células granulares ocorre em duas etapas. Os progenitores neuronais e os neurônios granulares cerebelares migram tangencialmente próximos à superfície cerebelar na camada granular externa, enquanto as outras células migram radialmente da zona germinativa, pela camada molecular, até a camada granular interna. Nos meduloblastomas, excessiva sinalização da atividade mitogênica rompe o intrincado balanço da saída da zona germinativa por meio de mecanismos desconhecidos de motilidade (POLKINGHORN *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2016).

Os meduloblastoma se originam das células precursoras das células granulares do cerebelo (FIGURA 1). A célula de Purkinje fornece o sinal para essas células iniciarem a proliferação ao secretar a glicoproteína *Sonic hedgehog* (*Shh*). Após a expansão, elas saem do ciclo celular e se movem em direção à zona interna da camada granular interna, onde se diferenciam e migram para o interior das fibras gliais de Bergmann para formar essa camada celular. Os mecanismos envolvidos para o desenvolvimento de células granulares aberrantes que resultam no meduloblastoma

incluem excesso de sinalização para proliferação de células precursoras da camada granular ou ausência de sinais reguladores para divisão dessas células (POLKINGHORN *et al.*, 2007). Sob desenvolvimento normal, os GPCs sofrem proliferação maciça na camada granular externa ao receber o sinal *SHH* das Células Purkinje. Os GPCs então saem do ciclo celular e começam a se diferenciar e migrar para baixo para formar o CGI. Desenvolvimento de células granulares desreguladas, incluindo sinais excessivos de proliferação de PPCs ou ausência de sinais para cessar a divisão, pode resultar na formação de meduloblastoma. Abreviações: EGL, Camada Externa Granular; PCG, precursor de células granulares; IGL, camada interna de grânular; SHH, *sonic hedgehog*; PCL, camada celular de Purkinje.

Figura 1 - Desenvolvimento de células granulares e tumorigênese de meduloblastoma



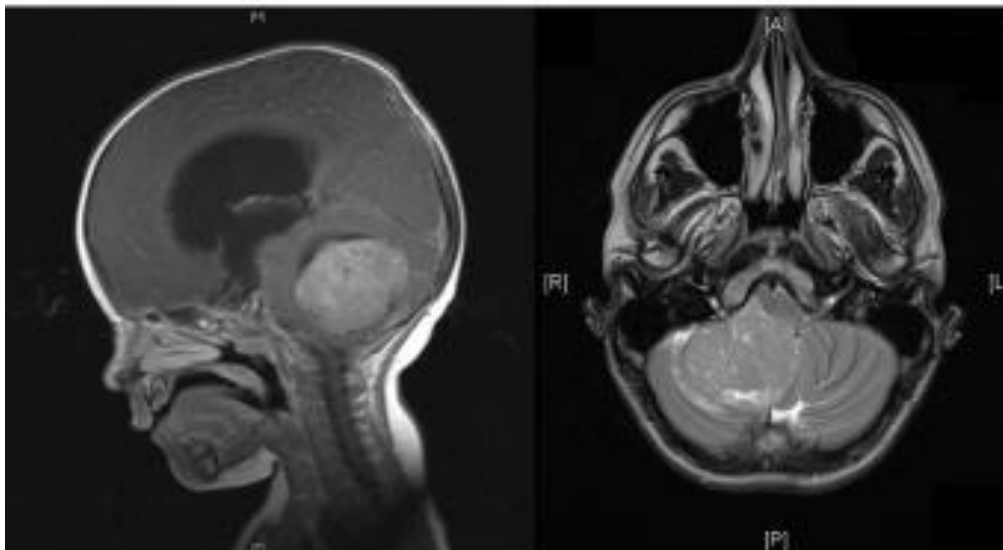
Fonte: Polkinghorn *et al.*(2007)

Uma hipersinalização SHH nas células GPCs na camada granular interna geralmente resulta em aberrações moleculares que acabam no desenvolvimento do meduloblastoma. A sinalização SHH é iniciada quando o *Shh* liga-se ao seu receptor PTCH1. Na ausência de ligante, este receptor inibe a proteína efetora *Smoothened* (SMO), mas quando *Shh* se liga a PTCH1, SMO é liberado dessa inibição, resultando em consequente ativação de fatores de transcrição (POLKINGHORN *et al.*, 2007)(FIGURA 2). A sinalização SHH é iniciada quando o fator *Shh* se liga ao seu receptor, PTCH1, que libera o SMO de sua inibição, resultando na ativação de GLI e MYCN. Após a ligação de WNT ao seu receptor, FRZ, o complexo APC é desestabilizada, liberando β -catenina para entrar no núcleo e ativar fatores de transcrição.

Aproximadamente 15% dos meduloblastomas demonstram mutações na sinalização WNT. Curiosamente, o SHH e vias de sinalização WNT compartilham alguns mecanismos de inibição: GSK3 β , o inibidor proteína de sinalização SHH, também tem uma função de inibição na via WNT pela fosforilação da β -catenina, levando à sua degradação. Além disso, durante a sinalização SHH, o *Supressor od Fused* (SUFU) exporta β -catenina e GLI1 para fora do núcleo. Outras vias implicadas na formação de meduloblastoma incluem sinalização NOTCH aumentada, sinalizando via família de receptores ErbB e Mecanismos de reparo de DNA defeituosos (POLKINGHORN *et al.*, 2007).

Inicialmente, a sintomatologia clínica relacionada ao meduloblastoma, assim como outras patologias da fossa posterior, podem ser decorrentes da hipertensão intracraniana secundária à obstrução do fluxo liquórico no 4º ventrículo (FIGURA 3). Além disso, pode ser difícil de detectar, principalmente em crianças, levando às vezes a um diagnóstico tardio. Os sintomas incluem dor de cabeça, mal-estar geral, falta de apetite, vômitos, alteração na coordenação motora apendicular ou axial, dependendo da área afetada do cerebelo (DESOUZA *et al.*, 2014). O plano sagital mostra meduloblastoma de linha média com intensidade de sinal intermediário. Observa-se obstrução do fluxo liquórico no aqueduto de Sylvius (4º ventrículo), marcada hidrocefalia e edema. O plano horizontal, mostra uma imagem de meduloblastoma de padrão mais homogêneo no hemisfério cerebelar direito com desvio do verme cerebelar.

Figura 3 – Imagem de Ressonância Magnética de Crânio mostrando planos sagital e horizontal



Fonte: DeSouza *et al.*(2014)

1.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E MEDULOBLASTOMAS

Conforme Organização Mundial da Saúde (OMS, 2007), os tumores que acometem o SNC podem ser classificados em tumores de tecidos neuroepiteliais, tumores de crânio e nervos para-espinais, tumores de meninges, linfomas e neoplasias hematopoiéticas, tumores de células germinativas e tumores metastáticos. Os primeiros são de origem embrionária e compreendem os meduloblastomas (LOUIS *et al.*, 2007).

Entre os tumores cerebrais pediátricos, os gliomas e os tumores embrionários são os mais comuns, sendo responsáveis respectivamente por cerca de 53% e 16% dos casos entre crianças entre zero e 14 anos (OSTROM *et al.*, 2013). É importante reconhecer que tumores do SNC são diferentes entre adultos e crianças em muitos aspectos, incluindo frequência relativa e incidência dos tipos de tumores, características moleculares, comportamentos clínico e biológico e formas de tratamento (XU *et al.*, 2015).

A ocorrência dos tumores cerebrais pediátricos é rara. Todavia, o meduloblastoma é a neoplasia maligna sólida mais prevalente na infância. Apresenta uma incidência de cerca de 1.000 novos casos por ano na população entre 3 e 7 anos. Representa cerca de 20% dos casos de tumores intracranianos e 40% dos tumores de fossa posterior, sendo que a taxa de sobrevivência em 5 anos está em torno de 40-70% (GIANGASPERO *et al.*, 2006; ROUSSEL; HATTEN, 2011; NORTHCOTT *et al.*, 2012). Apesar de predominarem na infância, 30% dos casos podem ocorrer em adultos (ROSSI *et al.*, 2008).

No Brasil, existe pouca literatura com relação à incidência dos meduloblastomas. Estima-se que são tumores que predominam no sexo masculino, ocorrendo principalmente em crianças menores de 15 anos, com pico de incidência aos 10 anos (MUTTI; PAULA; SOUTO, 2010). Estudo brasileiro realizado no Paraná constatou que, de 3.318 biópsias de tumores cerebrais, 623 (18,7%) eram de pacientes pediátricos, sendo que destes, 9,95% eram tumores classificados histologicamente como meduloblastoma (TORRES *et al.* 1997). Outro estudo, realizado em São Paulo, avaliando tumores cerebrais entre 1974 e 2003, descreveu ocorrência de 1.195 tumores pediátricos e uma prevalência de meduloblastoma em cerca de 11% dos casos (ROSEMBERG; FUJIWARA, 2005).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DOS MEDULOBLASTOMAS

1.3.1 Classificação Clínica dos Meduloblastomas

Inicialmente, os meduloblastomas foram classificados com base em tamanho e invasão tumoral, conforme determinado durante a cirurgia, e em presença de metástases. Este sistema não é mais utilizado, porém é importante porque é utilizado como base para estratificação de risco clínico desta patologia (TABELA 1), auxiliando, assim, no plano de tratamento. Os fatores envolvidos nessa classificação são apenas clínicos: idade do paciente, metástase e padrão de ressecção tumoral. A idade é um fator que pode refletir a agressiva história natural do tumor e a limitação e os efeitos adversos dos tratamentos em vigência (CHANG; HOUSEPIAN; HERBERT JR, 1969; DESOUZA *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Variáveis prognósticas aceitas pelo Grupo de Oncologia Pediátrica Norte-Americano (COG) e Grupo da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP) para classificação de riscos em pacientes com meduloblastoma.

Classificação de Risco	Características
Tumor de risco padrão	≥ 3 anos de idade, sem evidência de metástase e área residual de doença após cirurgia de no máximo ≤1,5 cm ²
Tumor de alto risco	≥ 3 anos de idade, com evidência de disseminação líquórica (M1–M3), área residual de doença após cirurgia menor (≥1.5 cm ²) Idade menor que 3 anos

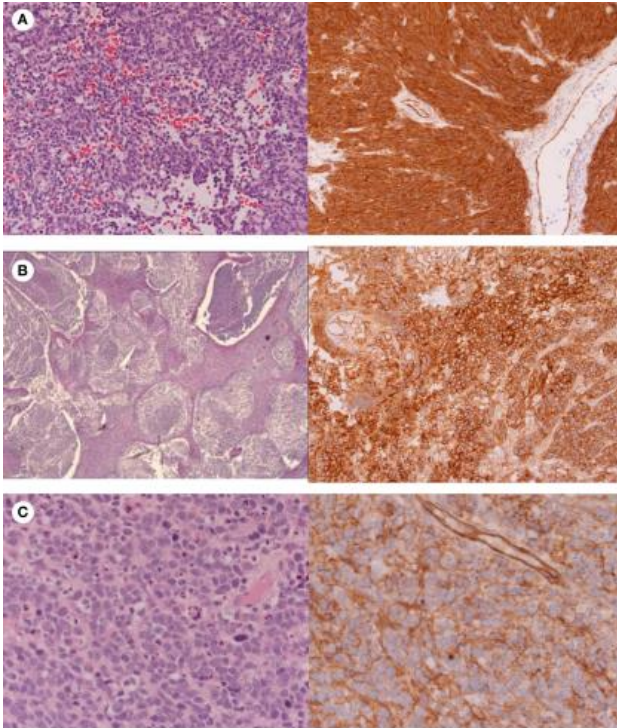
Fonte: Modificado de Wilme *et al.* (2012)

1.3.2 Classificação Histológica dos Meduloblastomas

O sistema de classificação proposto pela OMS (2007), reconhece a existência de variantes histológicas dos meduloblastomas, sendo todas categorizadas como neoplasias de Grau IV dentro da classificação de tumores embrionários neuroepiteliais (MILART *et al.*, 2016). Esse sistema classifica histologicamente os meduloblastomas em três grandes grupos: (A) Clássico, (B) Desmoplásico ou de células nodulares e (C)

Meduloblastoma de células grandes ou células anaplásicas (FIGURA 4 - onde (A) meduloblastoma clássico, com núcleos imunopositivos para β -catenina, (B) meduloblastoma nodular, com citoplasma imunopositivos para β -catenina, e (C) meduloblastoma anaplásico, com citoplasma imunopositivos para β -catenina).). Meduloblastoma clássico é o subtipo histológico mais comum (66%), composto de lâminas densamente compactas de pequenas células azuis redondas (basófila), com uma elevada relação nuclear / citoplasmática, atividades mitótica e apoptótica, podendo ocorrer na linha média, como visto anteriormente na figura 2. Os meduloblastomas desmoplásicos representam cerca de 15% dos casos. Tipicamente, apresentam prognóstico favorável, podendo surgir lateralmente nos hemisférios cerebelares. São caracterizados por células tumorais azuis, redondas, pequenas distribuídas em "Ilhas pálidas", sem reticulina, porém dentro de um estroma rico em reticulina. São frequentemente imunopositivos para a sinaptofisina, indicando diferenciação. Os meduloblastomas anaplásicos, aproximadamente 15% destas neoplasias, apresentam marcado pleomorfismo nuclear entre as células e moldagem nuclear. A variante de células grandes (2-4% dos casos) exibe uma população monomórfica de células grandes, cujos núcleos têm nucleolos proeminentes. Ambas variantes apresentam atividade proliferativa muito elevada, abundante apoptose e pior prognóstico. A maioria dos meduloblastomas exibe diferenciação neuronal conforme a imunorreatividade à sinaptofisina observada nos estudos histopatológicos. Alguns também são GFAP (*glial fibrillary acidic*) positivos e raramente mostram diferenciação miogênica ou melanótica (DESOUZA, 2014; MILART *et al.*, 2016).

Figura 4 - Imagem microscópica histológica, mostrando diferentes tipos de meduloblastomas



Fonte: modificado de DESOUZA *et al.*(2014)

1.3.3 Classificação Molecular dos Meduloblastomas

Uma das descobertas mais importantes no estudo dos meduloblastomas é o fato de se tratar de uma doença heterogênea (FIGURAS 5 e 6). O consenso proposto na Conferência de Boston de 2010, dividiu esta neoplasia em 4 subgrupos, identificados conforme seu perfil de transcrição molecular: *wingless* (WNT), *sonic hedgehog* (SHH), grupo 3, grupo de 4, que podem variar conforme a idade, visto na figura 3 (TAYLOR *et al.*, 2012; DESOUZA *et al.*, 2014; MILART *et al.*, 2016).

Os subgrupos moleculares são diferentes dos subtipos histológicos, embora haja sobreposição demonstrada por meta-análise que incluiu dados de sete estudos, com um total de 550 pacientes com meduloblastoma. Nesta meta-análise, 97% dos 58 pacientes do subgrupo WNT foram do subtipo histológico clássico dos meduloblastomas. Observou-se, ainda, que 89% dos 44 pacientes do subtipo desmoplásico em lactentes pertenciam ao subgrupo molecular SHH. Em termos de localização, a via WNT parece estar mais relacionada com tumores que surgem na cisterna do ângulo ponto-cerebelar e no pedúnculo cerebelar, enquanto que o subgrupo SHH origina-se mais comumente nos hemisférios cerebelares

(PERREAULT *et al.*, 2014). Os subgrupos 3 e 4 geralmente surgem na linha média do 4º ventrículo, sendo que o subgrupo 4 apresenta nenhum ou pequeno realce ao contraste (PERREAULT *et al.*, 2014).

Os **subgrupos WNT e SHH** são caracterizados, respectivamente, pela ativação anormal das vias de sinalização WNT e SHH. Os grupos 3 e 4 foram assim denominadas por não existir envolvimento de vias de sinalização claramente definidas. Recentemente, com o desenvolvimento de novas tecnologias genéticas, tais como mapeamento de nucleotídeos relacionados a polimorfismos gênicos e estudos de sequenciamento, foi mais bem identificado o panorama genético do meduloblastoma, expandindo mais nossa compreensão sobre os subgrupos (NORTHCOTT; TUKA; TAYLOR, 2010). Sob o ponto de vista molecular, os meduloblastomas tem demonstrado pelo menos 30% a 40 % de alterações somáticas (isto é, variantes únicas de nucleotídeos, *indels* e alterações no número de cópias somáticas) relacionadas a genes modificadores de cromatina, o que confirma que uma provável desregulação epigenética seria uma das principais causas do desenvolvimento dos Meduloblastomas (NORTHCOTT *et al.*, 2012).

Subgrupo WNT: acomete cerca de 10 % dos pacientes, sendo que a célula de origem parece surgir do lábio rômico inferior (GIBSON *et al.*, 2010). Conseqüentemente, os tumores deste subgrupo, em geral, se desenvolvem em uma localização mais cranial na região do tronco cerebral e em indivíduos mais velhos (idade média de 10 anos). Quase todos os tumores WNT exibem histologia clássica e raramente são metastáticos. Cerca de 80% a 85% estão associados com monossomia do cromossomo 6. Pacientes com este subtipo de tumor apresentam excelente taxa de sobrevida com a terapia atual vigente, com taxa de sobrevivência livre de eventos em 5 anos maior que 90% (ELLISON *et al.*, 2005). A mutação gênica mais frequentemente envolvida neste subtipo tumoral é a *CTNNB1*, que ocorre em cerca de 85% dos tumores analisados. Mutação *DDX3X* também foi identificada neste tumores, sendo que 11% dos tumores SHH e 3% do Grupo 3 também expressam esta mutação (ROBINSON *et al.*, 2012; PUGH *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2012). Aproximadamente 15% dos tumores WTN apresentam mutação no gene TP53, gene regulador da homeostase e crescimento celular, sendo envolvido na capacidade de reparo do DNA e apoptose das células. Este achado contrasta fortemente com a mutação TP53 dos tumores SHH (ZHUKOVA, 2013).

Subgrupo SHH: este subgrupo corresponde a cerca de 25% das ocorrências de meduloblastoma, sendo que a maioria apresenta histologia tipo desmoplásica nodular. Eles também podem ter apresentação histológica clássica ou de grandes células (KOOL *et al.*, 2012). Células precursoras dos neurônios granulares cerebelares são as que originam os MEDULOBLASTOMAS de subtipo SHH. Assim, eles frequentemente surgem em um hemisfério cerebelar (GIBSON *et al.*, 2010). Existem três subcategorias dominantes deste subtipo tumoral: SHH lactente (0 a 4 anos), SHH infanto-juvenil (4 aos 17 anos) e SHH adulto (17 anos) (KOOL, *et al.*, 2014).

Mutações *PTCH1* ocorrem em todas as três subcategorias de tumores SHH em frequências aproximadamente iguais (42% em SHH lactente; 36% em SHH infanto-juvenil ; 54% em tumores SHH adulto). SHH lactentes são os mais propensos a abrigar mutações *SUFU* (32%). O subtipo SHH infanto-juvenil é tipificado pela mutação TP53 (48%), sendo frequentemente germinal (80%). Eles raramente expressam mutações *SUFU* (3%). Este subgrupo SHH com tumores de linhagem germinativa com mutação TP53 está mais freqüentemente associado com ampliações *MYCN* (42%) e *GLI2* (30%). SHH adulto é também caracterizado por mutações no *SMO* (30%) e a ativação aberrante da fosfatidilinositol-3-quinase/Akt, que é alvo da rapamicina em mamíferos na via de sinalização mTOR (30%) (KOOL *et al.*, 2014).

O prognóstico do subtipo meduloblastoma SHH é bastante variável. Pacientes com o tipo lactente SHH apresentam um excelente prognóstico quando tratados com quimioterapia única (RUTKAUSKI *et al.*, 2005). O tipo infanto-juvenil SHH com mutação TP53 é o que apresenta o pior resultado ao tratamento, especialmente quando há amplificação *MYCN* e *Gli2*. Estes pacientes que não expressam mutações TP53 apresentam risco médio e SLE de 5 anos de aproximadamente de 60%. Os tipos adulto SHH apresentam um SLE de 5 anos de aproximadamente 40%, levando-se em conta estudos retrospectivos (KOOL; KORSHUNOV; PFISTER, 2012).

Subgrupos 3 e 4: são responsáveis por 25% e 35% das ocorrências de meduloblastomas, respectivamente. Apesar de estarem no mesmo subgrupo, são molecularmente distintos, embora compartilhem algumas características. Ambos apresentam preponderância no sexo masculino e presença de isocromossomo 17q, embora estas características predominem no subgrupo 4 (80% versus 26%). Os

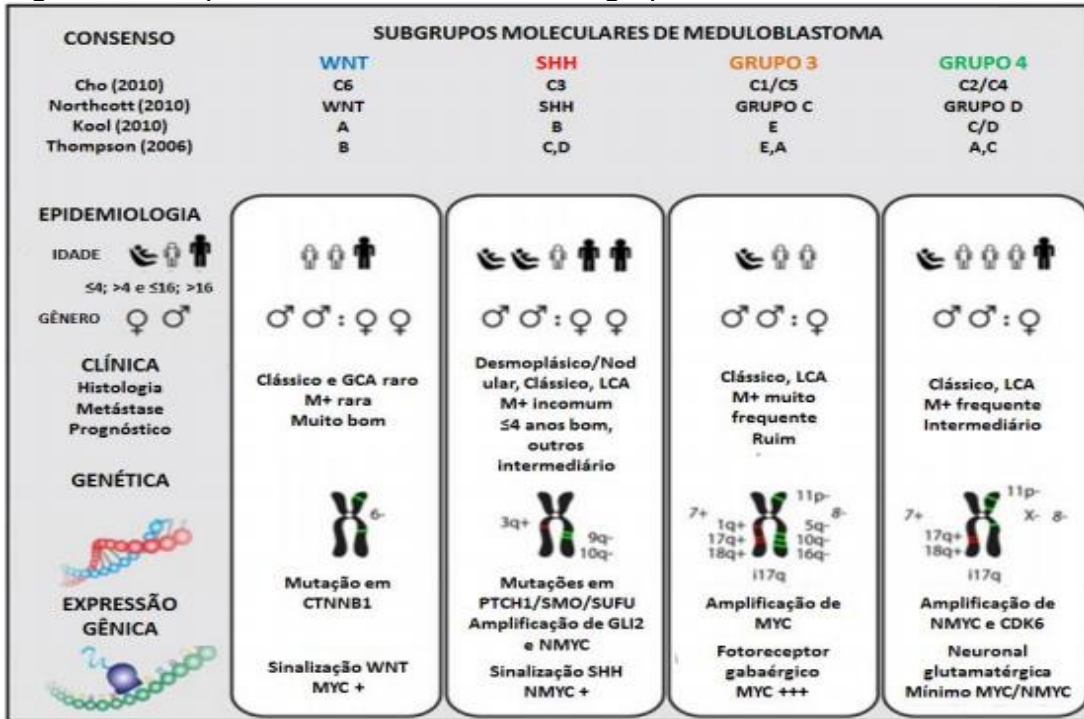
subgrupos 3 e 4 demonstram uma escassez relativa de mutações condutoras recorrentes e são caracterizados por recorrentes variantes estruturais, incluindo deleções, duplicações, inversões, que estão relacionadas à ativação da família de proto-oncogenes do Fator de Crescimento Independente GF11 e GF11B, resultando na ativação aberrante. Este mecanismo de ativação GF11/GF11B está presente em aproximadamente 41% e 10% do subgrupo de tumores 3 e 4, respectivamente (NORTHCOT *et al.*, 2014). O gene que mais mais frequentemente encontra-se mutado no subgrupo 3 é o *SMARCA 4* (11%) .

Com relação aos mecanismos desregulados que modificam a cromatina, a inativação de mutações no gene 6A da lisina (K)-histona-demetilase específica (KDM6A) codifica uma proteína que especificamente desmetila o resíduo K27 da histona H3 (H3K27). O subgrupo 3 está associado com a histologia GCA e doença metastática em cerca de 50% dos casos. Os subgrupos 3 e 4 também são caracterizados por uma superexpressão *MYCC* na maioria dos casos (aproximadamente 17%). A presença de doença metastática, isocromossomo 17q ou amplificação *MYCC*, confere ao subgrupo 3 um pior prognóstico. Em adição a alterações de genes modificadores de cromatina, modificações no número de cópias que controlam a via de sinalização do Fator de Crescimento β ocorrem em 20% dos pacientes com doença do subgrupo 3, geralmente por meio da amplificação de *OTX2* (8%) (NORTHCOTT *et al.*, 2009; NORTHCOTT *et al.*, 2012; NOTHCOTT *et al.*, 2012a).

Tumores do subgrupo 4 geralmente apresentam uma histologia clássica, embora alguns tenham histologia GCA. Este grupo está associado à amplificação *MYCN*, fato que em contraste com o subgrupo SHH, não está associado com pobre resultado no tratamento. Os pacientes deste subgrupo apresentam um prognóstico intermediário. Todavia aqueles com doença metastática têm um maior risco de recidiva, exceto na presença de deleção do cromossomo 11 ou acréscimo do cromossomo 17, fato que parece identificar um subgrupo de prognóstico favorável. O subtipo 4 foi encontrado em um pequeno número de crianças que apresentavam uma baixa taxa de sobrevida (SHIH *et al.*, 2012).

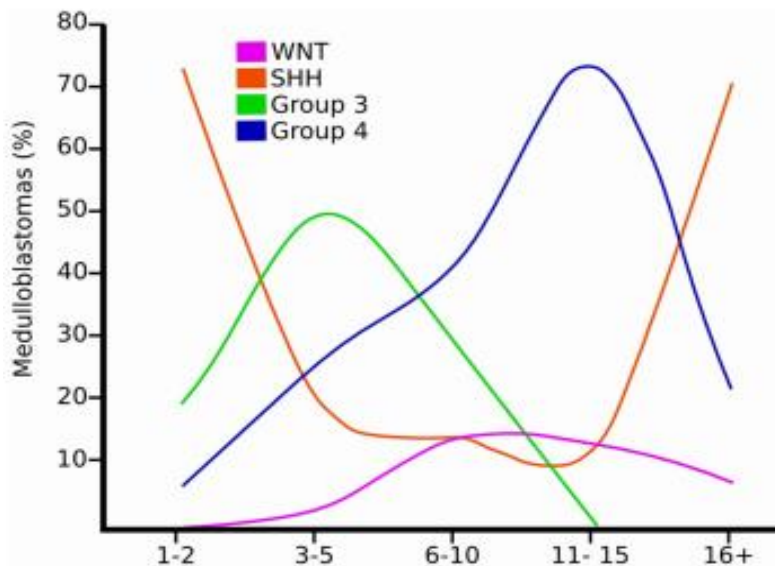
A figura 5 mostra os subgrupos prévios antes do consenso, epidemiologia e perfil gênico; M (metástases), GCA (tipo anaplásico de grandes células):

Figura 5 – Esquema do consenso dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas



Fonte: adaptado de TAYLOR (2012)

Figura 6 - Gráfico de distribuição dos subgrupos moleculares de meduloblastoma, de acordo com a idade (em anos) do paciente



Fonte: adaptado de DESOUZA *et al* (2014)

Embora os diferentes subtipos de meduloblastomas apresentem características histológicas e moleculares diversas, a atual estratégia de tratamento para a maioria dos pacientes permanece a mesma, ou seja, ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e elevadas doses de quimioterapia. No entanto, muitos pacientes morrem

em decorrência do tratamento, e os indivíduos que sobrevivem sofrem com alterações cognitivas, distúrbios endocrinológicos e tumores secundários (Rusert et al. 2014).

2 TRATAMENTO DOS MEDULOBLASTOMAS

A terapia vigente para tratamento de meduloblastomas envolve, além da cirurgia com ressecção do máximo de tumor possível, radioterapia e quimioterapia adjuvante. A radioterapia padrão e manejo quimioterápico variam conforme a extensão da doença e ou idade do paciente, sendo demonstrado melhor resultado aqueles pacientes que foram tratados com quimioterapia adjuvante (MILARD; DE BRAGANÇA., 2016).

Conforme visto, anteriormente, na tabela 1, pacientes com 3 anos ou mais de idade são classificados como tendo médio ou alto risco, conforme o volume residual tumoral pós-operatório e a presença ou não de doença disseminada. Os casos de risco médio são definidos como aqueles que apresentam menos de 1,5 cm² de tumor residual e citologia líquórica e exames de imagem sem presença de doença no neuroeixo. Os de alto risco, são os casos com lesão residual igual ou maior que 1,5 cm² e/ou presença de disseminação de doença. Um terceiro grupo de pacientes, aqueles com pacientes com menos de 3 anos, são tratados sem radioterapia inicial, devido ao inaceitável risco de prejuízo neurocognitivo grave. Os resultados nestes pacientes são muito pobres (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016). Estudo CGC-9921, realizado pelo *Children's Cancer Group*, reporta sobrevida de 5 anos livre de doença de cerca de 25% em lactentes com doença metastática no tempo do diagnóstico inicial e de 41% nos casos não metastáticos com tumor residual mínimo após ressecção cirúrgica (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016; GEYER, 2016). Nestes pacientes, pobre prognóstico também está associado com a presença de amplificação do pró-oncogene *MYC*, histologia de grandes células ou anaplásica e tumores molecularmente categorizados como subgrupo SHH ou 3 com mutações do gene *TP53* (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016).

No passado, irradiação do eixo cranioespinhal já estava associada a importante melhora na sobrevida dos pacientes com esta neoplasia. Altas doses, como 5.000 cGy na fossa posterior e 3.500 cGy no restante do neuroeixo, podem aumentar a sobrevida para cerca de 65% em 3 anos, apesar dos efeitos adversos já referidos anteriormente (RUSERT *et al.*, 2014; MILARD; DE BRAGANÇA, 2016).

O uso empírico da radioterapia no eixo crânio-espinhal e a quimioterapia após a ressecção cirúrgica transformaram uma doença fatal e agressiva em uma doença com alta taxa de cura.

Apesar da radioterapia ser o pilar do tratamento pós-cirúrgico dos meduloblastomas, o uso de quimioterapia adjuvante, como a cisplatina, tem sido feito com a finalidade de reduzir as sequelas do tratamento radioterápico e reduzir as doses de radiação no tratamento (PACKER *et al.*, 1999; 2006).

Para pacientes com doenças de risco médio, com idade acima de 3 anos, recomenda-se tratamento radioterápico com 23,4 a 24 Gy, associado à quimioterapia com vincristina, que é administrada semanalmente.

Atualmente, recomenda-se uso de quimioterapia pós-irradiação em pacientes de risco médio, incluindo aproximadamente um ano de terapia de 8 ciclos, com intervalos de 6 semanas, de cisplatina, lomustina (CCNU) e vincristina (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016). Para esta mesma faixa etária, porém com doença de alto risco, inicialmente é utilizada dose padrão de radioterapia (36 Gy, com reforço em fossa posterior e sítios de doença metastática de até 55,8 Gy) associada a quimioterapia adjuvante (vincristina, seguida por quimioterapia de manutenção com lomustina) (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016).

O tratamento de crianças menores de 3 anos e lactentes esbarra nos efeitos adversos gerados pela terapia padrão, principalmente os relacionados aos prejuízos neurocognitivos. Esta evidente que tratamento baseado em boa ressecção cirúrgica associada à quimioterapia, sem radioterapia, pode ter sucesso em muitos pacientes. Melhora na sobrevida foi demonstrada com uso de metotrexato sistêmico e intraventricular associado ao regime de quimioterapia sistêmica pós-operatória de ciclofosfamida, carboplastina, etoposide e vincristina, assim como associação de tratamento com resgate com células tronco (MILARD; DE BRAGANÇA, 2016).

Assim, fica clara a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas e agentes farmacológicos para o tratamento dos meduloblastomas.

2.1 INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES NO TRATAMENTO DOS MEDULOBLASTOMAS

Cada vez mais, a terapêutica dos meduloblastomas vem sendo direcionada à minimização dos efeitos adversos a longo prazo do tratamento direcionado a esta neoplasia, bem como a uma maior efetividade de novos fármacos dirigidos a essa

patologia oncológica extremamente agressiva. Pesquisas são necessárias para identificação de novos fármacos antineoplásicos com a finalidade de reduzir a dose de irradiação, como também a dose de quimioterapia, principalmente levando-se em conta os subgrupos tumorais dos meduloblastomas e suas vias de sinalização pró-oncogênica.

Terapias baseadas em alvos epigenéticos, visando fármacos que possam atuar nas enzimas responsáveis pelo remodelamento da cromatina, como inibidores de histonas deacetilases (HDAC), estão cada vez mais sendo estudadas.

É de conhecimento que HDACs são expressas em tecidos normais e neoplásicos de cérebro, de cólon, de rins, de mamas e de próstata. São responsáveis pela catalisação e hidrólise de grupos acetila de acetamidas de resíduos de lisina das proteínas, incluindo caudas de histonas. A deacetilação das histonas pelas HDACs esta associada com a condensação da cromatina e com a indução da repressão transcricional. Conseqüentemente, alguns inibidores de HDAC (iHDAC) com diversas estruturas químicas, como o ácido hidroxâmico tricostatina A (TSA) ou o ácido graxo de cadeia curta (SCFA) e o ácido butírico (BuA), induzem hiperacetilação de histonas e parecem alterar diretamente a transcrição de alguns genes.

Inibidores de HDACs possuem várias atividades biológicas, incluindo a indução da diferenciação, parada de crescimento e apoptose de células transformadas. Assim, iHDAC, incluindo alguns anticonvulsivantes como ácido valpróico, estão sendo analisados como drogas antineoplásicas.

A literatura refere que iHDAC, como SHHA, TSA e Butirato de Sódio, são efetivos na indução de morte celular por apoptose em culturas de células de meduloblastomas (linhagens celulares DAOY). Este processo apoptótico pode ser desencadeado por vários estímulos, incluindo agentes antineoplásicos, e usualmente é mediado por ativação das caspases, resultando em mudanças morfológicas típicas, como fragmentação do DNA. A exposição aos iHDAC leva ao acúmulo de células em fase G1, que é um achado consistente com fragmentação do DNA e apoptose. Inibidores de HDAC ativam caspases-3, o que é um achado característico do processo apoptótico, que pode ser desencadeado por 2 vias: extrínseca (por meio de morte dos receptores) e intrínseca (via mitocondrial) (SONNEMANN *et al.*, 2006).

É reconhecido que alterações nas histonas acetiltransferases (HATs) e (HDACs), enzimas responsáveis pelo controle do processo de acetilação de histonas, são identificadas em meduloblastomas. Pfister *et al.* (2008), mostraram que o MOF

humano (hMOF), uma acetiltransferase específica da histona H4 de K16 da lisina, é frequentemente regulada negativamente em meduloblastomas em comparação com o tecido cerebelar normal. Além disso, o perfil de expressão da proteína hMOF e a acetilação H4K16 foram associadas ao prognóstico desse tumor. Os pacientes com baixa expressão de hMOF ou baixos níveis de H4K16ac apresentaram uma sobrevida global significativamente pior (PFISTER *et al.*, 2008). Alterações somáticas em outros genes relacionados à acetilação de histonas, como CREBBP, EP300, KAT6B e BRPF1, foram encontradas em meduloblastomas. Essas mutações são superrepresentadas em tumores de subgrupo SHH (NORTCHOTT *et al.*, 2017).

As HDACs removem o grupo acetil das histonas, aumentando a interação histona-DNA. Então, essas enzimas promovem a condensação da cromatina e impedem a transcrição. Isoformas específicas de HDACs são diferencialmente expressas em MB. As HDAC 5 e 9, por exemplo, são reguladas positivamente no prognóstico de tumores MB desfavoráveis e as expressões destas HDACs têm sido associadas com uma sobrevida global fraca (MILDE *et al.*, 2010). Semelhante a outros tumores cerebrais, os MB também mostram uma regulação positiva de HDAC1 e 3 e uma regulação negativa de HDAC11 em comparação com o tecido cerebral normal. Há uma expressão diferencial de padrão HDAC1 e 2 entre subgrupos de MB. A HDAC1 é relativamente menos regulada no Grupo 4, enquanto a HDAC2 é expressada em excesso consideravelmente nos grupos SHH e 3 e 4 em relação ao WNT. HDAC5 e 6 têm distribuição padrão de expressão semelhante à HDAC2 (ECKER; WITT.; MILDE, 2013; ECKER *et al.*, 2015). Alterações somáticas na HDAC2 foram descritas no Grupo MB4 e outros genes que codificam componentes do complexo co-repressor nuclear (N-CoR), que recruta HDACs para repressão transcricional, são mutados principalmente dentro do subgrupo SHH (PUGH *et al.*, 2012).

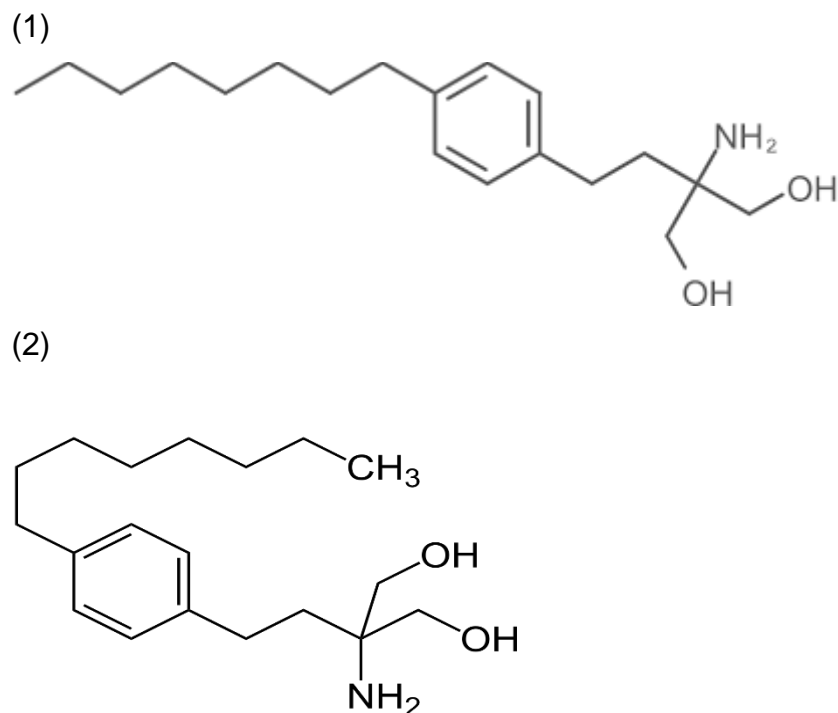
Alterações somáticas na HDAC2 foram descritas no Grupo 4 dos meduloblastomas e outros genes que codificam componentes do complexo co-repressor nuclear (N-CoR), que recruta HDACs para repressão transcricional, são mutados principalmente dentro do subgrupo SHH (PUGH *et al.*, 2012). A taxa de mutação dos genes HDAC no meduloblastoma parece estar em níveis muito baixos, mas o desequilíbrio da acetilação do processo tem um impacto na patogênese desse tumor. A importância dessas proteínas tem sido demonstrada pelos efeitos

aneoplásicos dos inibidores de HDAC em modelos de meduloblastoma pré-clínicos (RUSSEL; STRIPAY, 2018; ZWERGEL *et.al.*, 2018).

2.2 FINGOLIMODE (FTY720)

O Hidrocloreto de 2-amino-2-[2-(4-octilphenil)] -1,3-propanediol ou fingolimode (FTY720) é um derivado de miriocina (ISP-1), que é um metabólito do fungo entomopatogênico *Isaria sinclairii* (CHUN; BRINKMANN, 2011) (FIGURA 7). Esse composto pode ter efeito imunossupressor quando interagir com receptores esfingosina-1-fosfato (S1P), mais especificamente nos subgrupos S1P_{1,3,4,5} (STRADER, C.R.; PEARCE, C.J.; OBERLIES, 2011; PITMAN *et al.* , 2012).

Figura 7 – Estrutura química do fingolimode (1) e da miriocina (2)



Fonte: Modificado de STRADER, C.R.; PEARCE, C.J.; OBERLIES (2011).

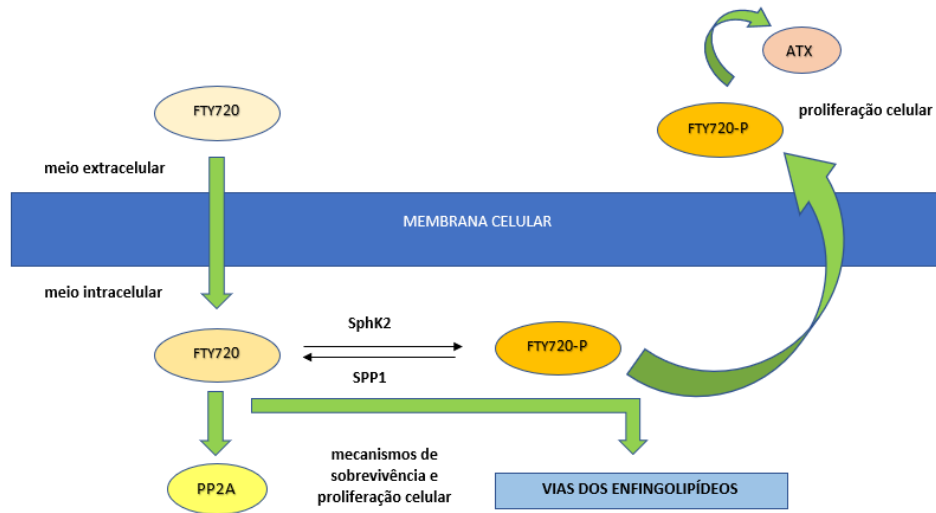
O FTY720 atua como uma pré-droga que precisa ser fosforilada. Este processo é mediado pela esfingosina quinase 2 (Sph2). O equilíbrio entre a forma fosforilada e não fosforilada é exercida por uma série de enzimas como a fosfatase lipídio-fosfato 1 (LPP1) e fosfatase lipídio-fosfato 3 (LPP3), ambas localizadas na superfície extracelular da membrana das células endoteliais, e pela fosfatase esfingosina 1-fosfato (SPP1), localizadas intracelularmente nas plaquetas (PITMAN *et al.*, 2012). A processo de fosforilação é diretamente proporcional a dose administrada deste composto, conforme visto na figura 6.

Fingolimode, na forma fosforilada, pode ter ação inibitória enzimática de autotaxinas, que são enzimas que atuam na produção de ácido lisofosfatídico (LPA), a partir de sua ação sobre a lisofosfatidilcolina sérica. Por sua vez, este composto está envolvido em sinalização, migração e sobrevivência celular, estando associado com aumento da capacidade de invasão das células neoplásicas, desenvolvimento de metástases e angiogênese tumoral (FIGURA 8 - modulações dos processos de sobrevivência e proliferação celular intra e extracelular: fingolimode (FTY720), proteína fosfatase 2 (PP2A), esfingosinaquinase 2 (SphK2), esfingosinafosfatase 1 (SPP1), autotaxinas (ATX),) (PITMAN *et al.*, 2012).

As propriedades imunossupressoras e antitumorais do fingolimode podem ser bem diferentes, variando em muitos aspectos farmacológicos.

Apesar do efeito imunomodulador, agindo via sinalização S1P, o fingolimode apresenta inúmeras outros efeitos celulares. Uma importante ação que vem sendo cada vez mais estudada é sua atividade antitumoral, tendo ação em várias vias de sinalização relacionadas a processos celulares envolvidos no desenvolvimento e controle de vários tumores. Investigações relacionadas a sua potencial atividade antineoplásica mostraram que é capaz de induzir apoptose em leucemias de linhagem mieloide e linfocítica, além de apresentar propriedades antineoplásicas em tumores sólidos como tumores de mama, cólon, pâncreas, pulmão, rim, próstata, fígado e tumores cerebrais (PITMAN *et al.*, 2012).

Figura 8 – Ações do fingolimode em seus vários sítios celulares



Fonte: modificado de PITMAN *et al.* (2012)

Em 2015, Hait *et al.*, relataram que o FTY720 é fosforilado pela esfingosina quinase-2 nuclear e se acumula no núcleo destas células, onde atua como potente inibidor das histona-desacetilases de classe I (HDAC), aumentando as acetilações das histonas e regulando a expressão de um conjunto restrito de genes, independentemente dos seus efeitos conhecidos na sinalização canônica, por meio dos receptores esfingosina-1-fosfato. A administração oral de doses clinicamente relevantes de FTY720 suprimiu o desenvolvimento, a progressão e a agressividade de tumores de mama espontâneos, em modelos animais de estudo oncológico. Nesta situação, o fingolimode reduziu a atividade da HDAC e inverteu a perda induzida por HFD de receptores de estrogênio e progesterona em carcinomas avançados. Em células humanas de câncer de mama ER α -negativas, FTY720 reativou a expressão de ER α silenciado e sensibilizou-as para tamoxifeno.

A dose oral para efeito antineoplásico, varia de 1-10 mg/kg/dia (1-2 micromolar), suportando a ideia de que há diferentes mecanismos de ação envolvidos na ação deste composto (PITMAN *et al.*, 2012).

A forma não fosforilada é capaz de modular importantes vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento de neoplasia, como processos inflamatórios, sobrevivência e proliferação celular, tanto intra como extracelular.

O FTY720 apresenta uma importante habilidade em reduzir o crescimento celular e desencadear apoptose em diversos tipos de células normais e neoplásicas,

além de ter um potencial terapêutico como na sensibilização de tratamentos antitumorais, como observado no tratamento do câncer colorretal, em que apresenta efeito aditivo ao 5-fluoracil, SN-38 e oxcisplatina (CRISTOBAL *et al.*, 2014). Esse fármaco também apresentou resultados na ressensibilização ao cetuximabe, *in vitro* e *in vivo*, com inibição do crescimento tumoral. (ROSA *et al.*, 2013). Esses fatos, torna extremamente relevante o estudo desse fármaco como agente antineoplásico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ação antineoplásica do tratamento com fingolimode em duas linhagens celulares de meduloblastoma humano (DAOY e D283).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos do fingolimode sobre a viabilidade e sobrevivência das duas linhagens celulares de meduloblastoma humano (DAOY e D283);
- b) estudar possível mecanismo de ação epigenético do fingolimode no tratamento de células de meduloblastoma humano (DAOY e D283); e
- c) realizar uma revisão da literatura sobre uso de medicamentos com ação epigenética para tratamento do meduloblastoma, com a finalidade de resumir evidências relacionadas ao efeito desses fármacos no tratamento dessa neoplasia.

4 ABORDAGEM METODOLÓGICA

A biologia e tratamento das neoplasias humanas podem ser estudadas por uma série de modelos experimentais, por meio de uso direto de amostras de tumores, modelos com animais geneticamente modificados, culturas celulares, entre outros. A escolha do modelo depende do objetivo da pesquisa. Amostras cirúrgicas de tumores representam um instantâneo da histologia, da composição tumoral, da heterogeneidade e do microambiente do tumor original. Amostras de tumores podem ser implantadas diretamente em cobaias. Todavia, essa técnica torna-se restrita, devido ao alto custo e ao risco de mudança do comportamento do tumor. Quando células tumorais puras são necessárias para experimentos, o mais comum é usar células de linhagem tumoral, que podem ser usadas em experimentos *in vitro* e *in vivo*. As linhagens celulares de meduloblastoma mais comumente utilizadas são: D283MED, D341MED E UW228-2, além da DAOY, em que se baseiam centenas de artigos publicados nos últimos anos (XU *et al.*, 2015)

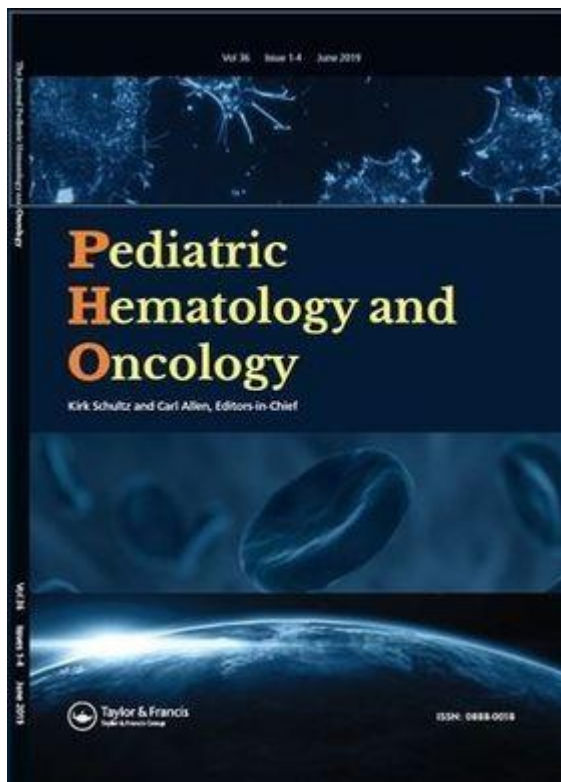
Para realizar o estudo utilizamos duas linhagens tumorais de meduloblastoma humano (DAOY e D283) para estudar a ação do fingolimode, pois Células DAOY representam o subgrupo molecular SHH dos meduloblastomas e a D283, o subgrupo 3 e 4 oriunda de sítios de metástases desse tumor, ambas apresentando mutações relacionadas a transcrição de HDACs e a última linhagem proveniente de sítios metastáticos (PUGH *et al.*, 2012; IVANOV, 2016).

5 ARTIGO 1

FINGOLIMOD (FTY720) REDUCES VIABILITY AND SURVIVAL AND INCREASES HISTONE H3 ACETYLATION IN MEDULLOBLASTOMA CELLS

Situação: ACEITO

Revista: Pediatric Hematology-Oncology



Journal:	<i>Pediatric Hematology and Oncology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Perla, Alexandre; Federal University of Rio Grande do Sul Fratini, Livia; Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Pharmacology Cardoso, Paula; Federal University of Rio Grande do Sul DE FARIAS, CAROLINE; Children's Cancer Institute Jaeger, Mariane; Children's Cancer Institute Roesler, Rafael; Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Pharmacology
Keywords:	FTY720, Fingolimod, Histone, Medulloblastoma, Brain tumor

Fingolimod (FTY720) reduces viability and survival and increases histone H3 acetylation in medulloblastoma cells

Alexandre S. Perla, M.D. ^{a,b}, Livia Fratini, M.Sc. ^{a,b}, Paula S. Cardoso ^{a,b}, Caroline B. de Farias, Ph.D. ^{a,c}, Mariane da Cunha Jaeger, Ph.D. ^{a,c}, Rafael Roesler, Ph.D. ^{a,b}

^aCancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPEHCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^bDepartment of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^cChildren's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil

CONTACT: R. Roesler, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul; Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: +55 51 33083183; fax: +5551 33083121. E-mail: rafaelroesler@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Histone deacetylase inhibitors (HDACis) are epigenetic agents that display antitumor activities in experimental medulloblastoma (MB). Fingolimod (FTY720), an immunosuppressant agent currently used in the treatment of multiple sclerosis, also has anticancer actions and can act as an HDACi. Here we examined whether fingolimod can inhibit human MB cell viability and survival, and if the effects are accompanied by increased histone acetylation. D283 and DAOY MB cells were treated with different doses fingolimod. Cell viability was assessed by cell counting in a hemocytometer, and cell survival was analyzed with a colony formation assay. Histone H3 acetylation was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fingolimod at 7.5 or 10 μ M, but not at 5 μ M, induced a significant reduction in cell viability in D283 and DAOY cultures, and similar results were observed for inhibition of cell survival. In both cell lines, fingolimod also led to a significant increase in the levels of acetylated H3. These findings provide preliminary evidence indicating that fingolimod induces antitumor activities in MB, through a mechanism possibly an increase in H3 histone acetylation.

Keywords: FTY720; Fingolimod; Histone; Medulloblastoma; Brain tumor; Childhood cancer

INTRODUCTION

Medulloblastoma (MB), the most common malignant brain tumor of the childhood, is currently classified into four molecular subgroups presenting different molecular and clinical features: WNT, SHH, Group 3, and Group 4 [1]. Fingolimod (2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)]-1,3-propanediol; FTY720) is a sphingosine immunosuppressant agent used in the treatment of multiple sclerosis [2]. Anticancer activities of fingolimod have also been described, including in experimental glioblastoma [3, 4]. In addition to its immunosuppressant properties, fingolimod acts as a histone deacetylase inhibitor (HDACi), modulating epigenetic processes that may mediate its antitumor activities [5, 6]. Only one previous study has investigated the effect of fingolimod in experimental MB and found anticancer effects. However, that study did not address increased acetylation as a possible mechanism of action [7]. Here we describe reduced cell viability and survival accompanied by increased histone H3 acetylation in human MB cells treated with fingolimod. The two cell lines used in this study are representative of two distinct MB molecular subgroups: the D283 cell line displays *MYC* amplification and is classified as Group 3/4 MB, whereas DAOY is *TP53*-mutated and considered a SHH Group cell line [8].

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

D283 and DAOY MB human cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL, Carlsbad, USA) containing 2 % (w/v) H-glutamine and 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, Sorali, Campo Grande, Brazil). The cells were maintained in temperature of 37 °C, a minimum relative humidity of 95 %, and an atmosphere of 5 % CO₂ in air.

Cell viability and treatments

Cells were seeded at 3×10^3 cells per well in DMEM/10 % FBS into 96-well plates and allowed to grow for 24 h. The medium was replaced, and fingolimod (FTY720; 0.1, 5, 7.5 or 10 μM ; Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) was added to the culture. Cell counting was carried out 48 h after treatment. The medium was removed, cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 50 μM of 0.25 % trypsin/EDTA solution was added to detach cells. Cell suspension was homogenized with 0.4 % Trypan blue 1:1 then immediately counted in a hemocytometer [9]. Experiments were performed three times with four to six replicates for each drug concentration.

Colony formation

Cells were seeded into 6-well plates (400 cells/well) after treatment with fingolimod for 48 h. After incubation for 10–14 days, the cells were fixed with 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet. Only colonies containing 50 or more cells were scored under a microscope, as previously described [10]. The treatment-surviving fraction was then calculated as:

$$\text{SF} = \text{Number of colonies in treatment cells} / \text{Number of colonies in control} \times 100$$

Histone H3 acetylation

Cells treated for 48 h with fingolimod at the doses found to correspond to the IC₅₀ for viability inhibition (8.9 μM for D283 and 6.2 μM for DAOY cells) were lysed with a lysis solution buffer and acetylation of H3 was measured with PathScan® Acetylated Histone H3 Sandwich enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Colorimetric signals were measured by spectrophotometric determination (OD_{450nm}) on Biochrom® Anthos Zenyth 200 Microplate Reader Technology, Danvers measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ChemiKine™, CYT306; Millipore, Billerica, USA).

Statistics

Data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM) number of cells. Differences between mean values were evaluated by one-way analysis of variance

(ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons tests for cell viability and survival assays. Student's independent *t*-tests were used to compare treatment groups with corresponding controls in the H3 acetylation measurement assay. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistically significant differences.

Results

Fingolimod at 7.5 or 10 μM , but not at 5 μM , significantly reduced cell number in D283 and DAOY cultures (D283, 5 μM , $p = 0.81$; 7.5 μM , $p < 0.0001$; 10 μM , $p = 0.01$; DAOY, 5 μM , $p = 0.65$; 7.5 μM , $p < 0.0001$; 10 μM , $p = 0.01$; Fig. 1-A). Overall, similar results were observed for cellular survival assessed with the colony formation assay (D283, 5 μM , $p = 0.26$; 7.5 μM , $p = 0.02$; 10 μM , $p = 0.02$; DAOY, 5 μM , $p = 0.99$; 7.5 μM , $p = 0.07$; 10 μM , $p < 0.0001$; Fig. 1-B). In both cell lines, fingolimod treatment resulted significant increase in the levels of acetylated H3 (D283, $p = 0.04$; DAOY, $p = 0.02$; Fig. 2).

Discussion

Fingolimod is a compound based on the fungal secondary metabolite myriocin (ISP-I) from *Isaria sinclairii*, originally developed as an immunosuppressant drug for clinical use in transplantation [11], and currently used in the treatment of multiple sclerosis [2]. Increasing evidence has indicated that fingolimod can also display antitumor activities in several cancer cell types [12]. In brain tumors, fingolimod induces apoptosis and inhibits viability, migration and invasion in glioblastoma cells [3, 4, 13] and patient-derived Group MB cells [7]. Following activation by phosphorylation mediated by sphingosine kinase 2, fingolimod binds to G protein-coupled sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors to prevent the release of lymphocytes from lymphoid tissue. However, fingolimod displays a range of effects likely HDACis induce MB cell death and neural differentiation and constitute a class of candidate therapeutic agents in MB [9, 15, 16]. Abnormal post-translational modifications of histone H3 lysine 27 (H3K27) are often found in MB [17], and the antitumor effects of the HDACis on D283 and DAOY cells *in vitro* or when the cells are xenografted into immunodeficient mice correlated with increased histone H3 acetylation [18, 19]. These data are strongly consistent with our finding of enhanced H3 acetylation by fingolimod.

Declaration of interest statement

The authors have no conflict of interest.

Funding

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 303276/2013-4 and 409287/2016-4 to R.R.); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21); the Children's Cancer Institute (ICI); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

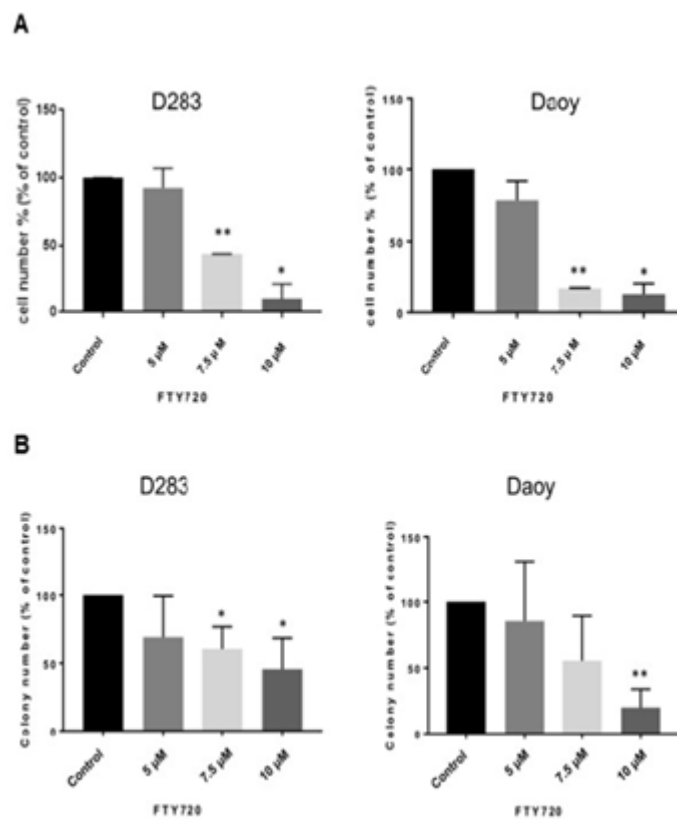


Figure 1. (A) Viability and (B) survival of D283 (left panels) and DAOY (right panels) MB cells after treatment with fingolimod (FTY720). Cells were and treated with fingolimod (5, 7, or 10 μM) for 48 h. Viability was assessed by cell counting and survival with a colony formation assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean ± SEM of 3 different experiments. The mean value for control cells was taken as 100%; * p ≤ 0.02 and ** p < 0.0001 compared to control cells.

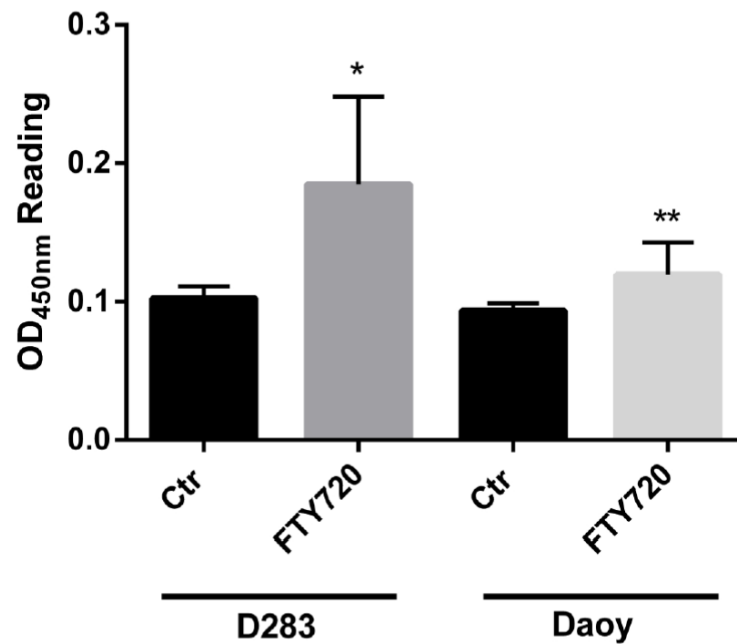


Figure 2. Quantification of acetylated histone H3 in (a) D283 and (b) DAOY MB cells after treatment with fingolimod (FTY720). Cells were treated for 48 h with fingolimod (8.9 μ M for D283 and 6.2 μ M for DAOY cells) and H3 acetylation was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SEM of 3 different experiments; * $p = 0.04$ and ** $p = 0.02$ compared to control cells (Ctr).

REFERENCES

1. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123:465-472.
2. Kappos L, Antel J, Comi G, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;355:1124-1140.
3. Estrada-Bernal A, Palanichamy K, Ray Chaudhury A, Van Brocklyn JR. Induction of brain tumor stem cell apoptosis by FTY720: a potential therapeutic agent for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2012;14:405-415.
4. Zhang L, Wang H, Zhu J, Ding K, Xu J. FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Tumour Biol.* 2014;35:10707-10714.

- 5.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*. 2015;4:e156.
- 6.Hait NC, Wise LE, Allegood JC, et al. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci*. 2014;17:971-980.
- 7.Garner EF, Williams AP, Stafman LL, et al. FTY720 decreases tumorigenesis in Group 3 medulloblastoma patient-derived xenografts. *Sci Rep*. 2018;8:6913.
- 8.Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol*. 2016;236:10-25.
- 9.Jaeger M, Ghisleni EC, Fratini L, et al. Viability of D283 medulloblastoma cells treated with a histone deacetylase inhibitor combined with bombesin receptor antagonists. *Childs Nerv Syst*. 2016;32:61-64.
- 10.Souza BK, da Costa Lopez PL, Menegotto PR, et al. Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma. *Mol Neurobiol*. 2018;55:7242-7258.
- 11.Suzuki S, Enosawa S, Kakefuda T, et al. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation*. 1996;61:200-205.
- 12.White C, Alshaker H, Cooper C, Winkler M, Pchejetski D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget*. 2016;7:23106-23127.
- 13.Sonoda Y, Yamamoto D, Sakurai S, et al. FTY720, a novel immunosuppressive agent, induces apoptosis in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281:282- 288.

14. Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, Pitson SM. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Curr Mol Med*. 2012;12:1207-1219.
15. Jaeger M, Ghisleni EC, Fratini L, et al. Viability of D283 medulloblastoma cells treated with a histone deacetylase inhibitor combined with bombesin receptor antagonists. *Childs Nerv Syst*. 2016;32:61-64.
16. Nör C, Sassi FA, de Farias CB, et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol*. 2013;48:533-543.
17. Parsons DW, Li M, Zhang X, et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science*. 2011;331:435-439.
18. Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:1912-1922.
19. Li XN, Parikh S, Shu Q, et al. Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1150-1159.

6 ARTIGO 2

SHORT REVIEW

**ANTITUMORAL ACTIVITIES OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS IN
MEDULLOBLASTOMA**

Situação: artigo a ser submetido
Periódico: Frontier in Pharmacology

ANTITUMORAL ACTIVITIES OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS IN MEDULLOBLASTOMA

Alexandre S. Perla^{1,2}, Mariane Jaeger^{1,3}, Rafael Roesler^{1,2*}

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

2 Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

3 Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil

*** Correspondence:**

Corresponding Author: rafaelroesler@hcpa.edu.br

Abstract

Medulloblastoma (MB) is the most common type of childhood malignant brain cancer and consists of a heterogeneous group of tumors. Currently, there is an emerging focus on the role of epigenetics in MB origin, and its pathogenesis is likely influenced by deregulation of epigenetic mechanisms such as histone acetylation. Indeed, inhibitors of histone deacetylases (HDACs) have been proposed as therapeutic agents for MB treatment.

Keywords: medulloblastoma, epigenetics, histone acetyltransferase, histone deacetylase, HDAC inhibitors.

INTRODUCTION

Medulloblastoma (MB) is an embryonal tumor of the cerebellum and the most common malignant brain tumor among children. Its incidence is 10x higher in children than in adults and 70-80% of these patients are 0-14 years old (Tulla M, Berthold F, Graf N, Rutkowski S, von Schweinitz D, Spix C et al. 2015).

According to World Health Organization classification to central nervous system tumors, MB is classified in four subtypes: WNT-MB, SHH-MB, Group 3 and Group 4 MB. They have specific molecular characteristics, demographic distribution and clinical prognosis (Louis et al. 2016). The integrative genomic studies that contributed to the establishment of the MB molecular subgroups also demonstrated the importance of epigenetics to pathogenesis of this tumor.

Epigenetic alterations are inherited changes in the cellular phenotype that do not involve modifications in nucleotides sequences. These modifications are mediated by DNA methylation, histone post-translational modifications (PTMs), chromatin remodeling, microRNAs (miRNA), and long non-coding RNAs (lncRNAs). Histones are proteins responsible to DNA compaction and PTMs in these proteins induces structural and dynamic changes in DNA-packaging resulting in regulation of genes expression patterns. Acetylation is one of the most studied histone modifications and the imbalance in the equilibrium of this process has been associated with tumorigenesis and cancer progression (Allis, Jenuwein, 2016).

2. UNBALANCED OF ACETYLATION/DEACETYLATION PROCESS IN MEDULLOBLASTOMA

Alterations in histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), enzymes responsible by the control of histone acetylation process, are identified in MB tumors. HATs transfer an acetyl functional group from an Acetyl-Coenzyme A to a lysine amino acid residue in the histone in specific positions. This weak connection of acetylated histone and DNA results in a more accessible DNA to transcription factors binding. Pfister et al. (2007) showed that the human MOF (hMOF), a histone H4 lysine K16-specific acetyltransferase, are frequently downregulated in MB compared to normal cerebellum. Besides that, hMOF protein expression profile and H4K16 acetylation were associated with MB prognosis. The patients with low hMOF expression or low H4K16ac levels presented a significantly worse overall survival (Pfister et al., 2007). Somatic alterations in other histone acetylation related genes, such as CREBBP, EP300, KAT6B and BRPF1, have been found in MB. These mutations are overrepresented in a SHH subgroup tumors (Nortchott et al., 2017).

In opposition to HATs effects, HDACs remove the acetyl-group of histones, increasing the interaction histone-DNA. So, these enzymes promote chromatin condensation and prevent the transcription. Specific isoforms of HDACs are differentially expressed in

MB. HDAC 5 and 9, for example, are upregulated in prognostic unfavorable MB tumors and the expressions of these HDACs have been associated with poor overall survival (Milde et al., 2010). Similar to other brain tumors, MB also show an upregulation of HDAC1 and 3 and a downregulation of HDAC11 compared with normal brain tissue. There is a differential HDAC1 and 2 pattern expression between MB subgroups. HDAC1 is relatively downregulated in Group 4, while HDAC2 is considerably overexpressed in SHH, Groups 3 and 4 relative to WNT. HDAC5 and 6 have expression pattern distribution similar to HDAC2 (Ecker et al., 2013; Ecker et al., 2015). Somatic alterations in HDAC2 have been describe in MB Group4 and other genes encoding components of the nuclear co-repressor (N-CoR) complex, that recruits HDACs to transcriptional repression, are mutated mainly within the SHH subgroup (Pugh et al., 2012).

The mutation rate of HDAC genes in medulloblastoma seems to be at very low levels, but the unbalance of process acetylation has an impact in pathogenesis of this tumor. The importance of these proteins has been demonstrated by the antineoplastic effects of HDAC inhibitors (HDACis) in preclinical MB models (Roussel and Stripay, 2018; Zwergel et al., 2018).

3 HDAC INHIBITORS ANTI-CANCER EFFECTS IN MEDULLOBLASTOMA

HDACis are natural or synthetic chemical compounds that induced an acetylation of histones and non-histone proteins. According to its target, the HDACis are classified in pan-HDAC, class-selective or isoform-selective inhibitors. Their activities alter diverse cancer-related process such as cell cycle, DNA repair, apoptosis and differentiation (Khan and Thangue, 2012). In MB in-vitro and animal models, HDACis can decrease cell proliferation and clonogenic growth, induce apoptosis and differentiation, inhibit invasion and migration. Different HDACis have been tested in MB cells. An earlier study showed that Entinostat (MS-275), a class I HDACi, decreased the proliferation of MB cell lines (DAOY and D283) and others pediatric tumors cell lines. Although the mechanism of MS-275 was not verified in MB, in the others paediatrics cells its antiproliferative effect was explained by an induction in cell cycle arrest or by an induction of apoptosis (JABOIN *et al.*, 2002). Using another HDACi, valproic acid (VPA), Li et al. identified the same mechanisms related to suppressing of MB proliferation. The arrest in cell cycle and apoptosis was dose- and time-dependent, with high concentrations and longer exposure of VPA resulting in apoptosis instead

cell cycle arrest. VPA treatment also induced senescence and differentiation, decrease colony-formation and tumorigenicity in MB cells, and, in vivo xenograft subcutaneous model was able to suppress the growth of tumors (Li et al, 2005).

Similar to VPA, others class I and IIa HDACis have been demonstrated to induce differentiation in MB models. Antiproliferative effects of phenylbutyrate in MB cells were followed by morphological changes and increased expression of GFAP and SYN, a glial and neuronal differentiation marker, respectively. In vivo experiments showed that 3mM phenylbutyrate treatment by 28 days increased latency time of MB xenografts tumors and reduced its volume. The hiperacetylation of H4 was associated to phenotype changes (Li et al., 2004). Sodium butyrate (NaB) also induced the expression of differentiation markers and reduced the expansion of MB cancer stem cells (Nor et al, 2013), a specific population of the tumor responsible by tumorigenic capability, metastasis, and tumor relapse (ref). A characteristic related to recurrent MB is leptomeningeal seeding. Panobinostat decreased adhesion and cell migration in MB cells, and reduced spinal leptomeningeal seeding and increased survival in a mouse model of MB. In the panobinostat-treated tumors, synaptophysin positive cells were increased and ID3 positive cells were decreased, suggesting a role of neuronal differentiation (Phi et al., 2017).

Current therapy for medulloblastoma treatment involves, in addition to surgery, radiotherapy and adjuvant chemotherapy (ref). HDACis improves the susceptibility to ionizing radiation and etoposide in MB cells. Cells treated with the HDACis trichostatin A (TSA), a class I and II HDACi, and vorinostat (suberoyl anilide hydroxamic acid - SAHA), a pan-HDACi, activated caspase-9 and -3, inducing an apoptotic cell death and improved the cytotoxic effect of ionization radiation (Sonnemann et al., 2006, Kumar et al., 2007). Entinostat, Vorinostat and VPA sensitized MB primary and cells lines to apoptosis induced by DNA-damaging drugs doxorubicin, VP16 and cisplatin. This effect was mediated by caspase-3 and -9 activation as observed in radiosensitivity studies (Häcker et al., 2011).

Combinations of HDACis with others target therapies have been tested. Yuan and colleagues (2017) showed that Daoy and D283 cells overexpress HDAC1 and DNMT1 (a DNA methyltransferase) and the blocked of these two different epigenetic mechanisms by HDACis (vorinostat and parthenolide) and DNMT inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) had a synergic effect in decrease cell growth. The 5-aza-dC and VPA treatment was capable to increase tumor-free survival of Patched (Ptch)

heterozygous mice that develop spontaneous medulloblastoma (MB) but did not affect the growth of advanced stages tumors (Ecke et al., 2009). The combination of phenylbutyrate with 5-aza-dC also had synergic antiproliferative effect in MB and the addition of receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKi, Imatinib) to this combination enhanced the cell cytotoxicity (Marino *et al.*, 2014).

In addition to the RTKi mentioned above, sorafenib, gefitinib and vandetanib were also able to interact with HDACis. Gefitinib (an EGFR inhibitor) or vandetanib (EGFR/VEGFR inhibitor) enhanced cell death induced by phenylbutyrate in D324 MB cell line (Marino et al., 2011) and the sorafenib (a multi kinase inhibitor) toxicity and radiosensibility were enhanced by pre-treatment with valproate in Daoy and D283 cells lines (Tang et al., 2012). A phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is a downstream signaling pathway of RTK. The HDACi panobinostat synergized with PI3K inhibitor BKM-120 to inhibit tumor growth in vitro and in vivo in a MYC-amplified MB, a model of Group 3-MB. The synergism observed was mediated, at least in part, by activation of FOXO1 (Pei Y et al., 2016).

Alterations in Sonic Hedgehog (HH) signaling pathway drive tumor SHH-MB initiation. Coni and colleagues (2017) showed that blockade of HDAC1/2 by Mocetinostat (MGCD0103), an isotype inhibitor of class I HDACs, inhibits Hh signaling, cell proliferation and promotes apoptosis in SHH-MB cells. In SHH-MB animal models, the treatment with mocetinostat was able to prolong survival by acting as a downstream HH inhibitor that increase acetylation of Gli1 (Coni et al., 2017). Dhanyamraju and colleagues showed that Gli1 is regulated by HDAC6 and its blockade strongly reduced tumor growth in an in vivo SHH-MB allograft model. The antitumoral effect of HDAC6 inhibition was not correlated with histone acetylation, but with increase in acetylated tubulin (Dhanyamraju et al., 2015).

The acetylation of tubulin was also correlated with the antiproliferative effect of curcumin in medulloblastoma cells and Smo/Smo transgenic medulloblastoma mouse model (Lee et al., 2011). Curcumin is a major component of the spice turmeric derived from the plant *Curcuma longa* and has been used in medicine due to anti-inflammatory and anti-oxidant properties. In MB cells, curcumin reduced HDAC4 expression, induce tubulin acetylation, cell cycle and cell death (Lee et al., 2011).

Like curcumin, other compounds have been demonstrated HDAC inhibition capability and anticancer activity. The classic example is the valproic acid. VPA is a well-tolerated anticonvulsant with an extensively characterized toxicity profile that is currently used

as an HDACi. The FTY720 (2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)]-1,3-propanediol, fingolimod) is a synthetic sphingosine immunosuppressant that was approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of Multiple Sclerosis (Kaposi et al., 2010) and that also showed HDAC inhibitor effects (Hait et al., 2014). In G3 MB, FTY720 decreased viability, proliferation, and motility in vitro and reduces tumors growth in vivo (Garner *et al.*, 2018). Although the similar HDACi-anticancer effects, the inhibition of HDAC by FTY720 was not tested in MB cells.

4 CONCLUSION

MB is a childhood tumor with alterations in epigenetic factors, included alterations in essential enzymes of acetylation process. These modifications are potential target therapies to this tumor, once the current treatment causes severe adverse effects. Thus, HDAC inhibitors emerge as an alternative therapy due to their multiple anticancer effects in MB. In in vitro, different HDACis have shown to reduce MB cell viability, to induce cell cycle arrest and apoptosis, to decrease cell adhesion and migration. In vivo, they were able to reduce tumorigenicity and growth tumor and to avoid leptomeningeal seeding. The HDACis-induced effects comprise the acetylation of histone and non-histone proteins and are dependent of MB molecular subgroup. The HDACis are promising therapies for MB, however, from our knowledge, only a few clinical studies are reported to use HDACis in this tumor.

5 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6 FUNDING

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 303276/2013-4 and 409287/2016-4 to R.R.); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21); the Children's Cancer Institute (ICI); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

REFERENCE

Tulla M, Berthold F, Graf N, Rutkowski S, von Schweinitz D, Spix C et al. (2015) Incidence, Trends, and Survival of Children With Embryonal Tumors. *Pediatrics*. 136(3):e623-32. doi: 10.1542/peds.2015-0224.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 131(6):803-20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.

Allis CD, Jenuwein T (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 17:487-500.

Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T et al. (2017) The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*. 547(7663):311-317. doi: 10.1038/nature22973.

Milde T, Oehme I, Korshunov A, Kopp-Schneider A, Remke M, Northcott P et al. (2010) HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clin Cancer Res*. 16(12):3240-52. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0395.

Ecker J1, Witt O, Milde T.(2013) Targeting of histone deacetylases in brain tumors. *CNS Oncol*. 2(4):359-76. doi: 10.2217/cns.13.24.

Ecker J, Oehme I, Mazitschek R, Korshunov A, Kool M, Hielscher T et al (2015) Targeting class I histone deacetylase 2 in MYC amplified group 3 medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. Apr 3;3:22. doi: 10.1186/s40478-015-0201-7.

Pugh TJ1, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D, Bochicchio J et al. (2012) Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature*. 488(7409):106-10. doi: 10.1038/nature11329

Roussel MF, Stripay JL. (2018). Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. *Cerebellum*. 17(1):28-36. doi: 10.1007/s12311-017-0899-9.

Zwergel C, Romanelli A, Stazi G, Besharat ZM, Catanzaro G, Tafani M et al. (2018) Application of Small Epigenetic Modulators in Pediatric Medulloblastoma. *Front Pediatr*. 6:370. doi: 10.3389/fped.2018.00370

Khan O and Thangue NBL (2012) HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol*. 90(1):85-94. doi: 10.1038/icb.2011.100

Coni S, Mancuso AB, Di Magno L, Sdruscia G, Manni S, Serrao SM et al. (2017) Selective targeting of HDAC1/2 elicits anticancer effects through Gli1 acetylation in preclinical models of SHH Medulloblastoma. *Sci Rep*. 7:44079. doi: 10.1038/srep44079.

Pei Y, Liu KW, Wang J, Garancher A, Tao R, Esparza LA et al. (2016) HDAC and PI3K Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC-Driven Medulloblastoma. *Cancer Cell*. 29(3):311-323. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.011.

Dhanyamraju PK, Holz PS, Finkernagel F, Fendrich V, Lauth M (2015) Histone deacetylase 6 represents a novel drug target in the oncogenic Hedgehog signaling pathway. *Mol Cancer Ther*. 14(3):727-39. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0481

Lee SJ, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA (2011) Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 11:144. doi: 10.1186/1471-2407-11-144.

Garner EF, Williams AP, Stafman LL, Aye JM, Mroczek-Musulman E, Moore BP et al. (2018) FTY720 Decreases Tumorigenesis in Group 3 Medulloblastoma Patient-Derived Xenografts. *Sci Rep*. 8(1):6913. doi: 10.1038/s41598-018-25263-5.

Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R et al. (2002) MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res.* 62(21):6108-15.

Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. (2005) Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther.* 4(12):1912-22.

Li XN, Parikh S, Shu Q, Jung HL, Chow CW, Perlaky L et al. (2004) Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res.* 10(3):1150-9.

Nör C, Sassi FA, de Farias CB, Schwartzmann G, Abujamra AL, Lenz G et al. (2013) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol.* 48(3):533-43. doi: 10.1007/s12035-013-8441-7

Phi JH, Choi SA, Kwak PA, Lee JY, Wang KC, Hwang DW et al (2017) Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses leptomeningeal seeding in a medulloblastoma animal model *Oncotarget.* 8(34):56747-56757. doi: 10.18632/oncotarget.18132

Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M et al. (2006) Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int J Oncol.* 28(3):755-66.

Kumar KS, Sonnemann J, Hong le TT, Buurman C, Adler F, Maass M et al (2007) Histone deacetylase inhibitors, but not vincristine, cooperate with radiotherapy to induce cell death in medulloblastoma. *Anticancer Res.* 27(1A):465-70.

Häcker S, Karl S, Mader I, Cristofanon S, Schweitzer T, Krauss J et al (2011) Histone deacetylase inhibitors prime medulloblastoma cells for chemotherapy-induced

apoptosis by enhancing p53-dependent Bax activation. *Oncogene* 30(19):2275-81. doi: 10.1038/onc.2010.599.

Yuan J, Llamas Luceño N, Sander B, Golas MM. (2017) Synergistic anti-cancer effects of epigenetic drugs on medulloblastoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 40(3):263-279. doi: 10.1007/s13402-017-0319-7

Ecke I, Petry F, Rosenberger A, Tauber S, Mönkemeyer S, Hess I et al. (2009) Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxyctidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice. *Cancer Res*. 69(3):887-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0946

Marino AM1, Sofiadis A, Baryawno N, Johnsen JI, Larsson C, Vukojević V, Ekström TJ. (2011) Enhanced effects by 4-phenylbutyrate in combination with RTK inhibitors on proliferation in brain tumor cell models. *Biochem Biophys Res Commun*.411(1):208-12. doi: 0.1016/j.bbrc.2011.06.141

Marino AM1, Frijhoff J2, Calero R3, Baryawno N3, Ostman A2, Johnsen JI (2014) Effects of epigenetic modifiers in combination with small molecule inhibitors of receptor tyrosinekinases on medulloblastoma growth *Biochem Biophys Res Commun*. 450(4):1600-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.042

Tang Y, Yacoub A, Hamed HA, Poklepovic A, Tye G, Grant S, Dent P. (2012) Sorafenib and HDAC inhibitors synergize to kill CNS tumor cells. *Cancer Biol Ther*. 13(7):567-74. doi: 10.4161/cbt.19771

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):387-401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494

Hait NC1, Wise LE2, Allegood JC3, O'Brien M4, Avni D3, Reeves TM et al. (2014) Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinctionmemory. *Nat Neurosci*. 17(7):971-80. doi: 10.1038/nn.3728.

7 DISCUSSÃO

Os resultados de nosso estudo, no ensaio para avaliação do crescimento celular e sobrevivência celular, em ambas as linhagens D283 (representativa do subgrupo SHH) e DAOY (que representam o Grupo 3 e 4) (IVANOV, 2016), demonstraram que o fingolimode foi capaz de reduzir o crescimento celular e formação de colônias nas concentrações de 7.5 e 10 μM . Esse achado difere um pouco dos dados prévios da literatura que utilizaram concentrações em torno de 2 μM para efeito antimorfológico para o fingolimode (PATMANATHAN *et al.*, 2015, CRISTÓBAL *et al.*, 2016), todavia esses estudos se referem a tumores não relacionados ao SNC e meduloblastomas.

Constatamos, que o fingolimode, foi capaz de atuar como fármaco antineoplásico em culturas de linhagens celulares de meduloblastoma humano (D283 e DAOY), mostrando sua atividade por meio de mecanismos de ativação de vias apoptóticas, assim como também como um inibidor de deacetilases. Isso foi evidenciado através de um aumento significativo de acetilação de histonas H3 nas culturas de células após 48 horas de tratamento com o composto em estudo.

As alterações epigenéticas são alterações genômicas que não envolvem modificações nas seqüências de nucleotídeos e ocorrem principalmente durante o desenvolvimento de um determinado órgão, podendo influenciar processos como o ciclo celular, reparo de DNA e diferenciação celular. Provavelmente, não seria diferente no SNC durante o desenvolvimento do meduloblastoma. No crescimento embrionário do cerebelo, quando ocorre uma excessiva sinalização da atividade mitogênica, rompimento do intricado balanço dos mecanismos de motilidade de migração das células germinativas, guiado possivelmente pelo fator de transcrição (ZEB1) que controla a diferenciação e a plasticidade celular, pode inibir a diferenciação do epitélio e dirigir as células em direção a um estado mesenquimal e bloquear a diferenciação celular. Há mais de uma década, persiste a ideia de que a sinalização *sonic hedgehog*, envolvida na tumorigênese do meduloblastoma, bloqueia a saída das células precursoras dos neurônios da camada granular da zona de crescimento, fato também relacionado ao surgimento e à metastatização deste tipo de tumor (SINGH *et al.*, 2016).

As modificações epigenéticas podem ser intermediadas por processos de metilação do DNA, que pode resultar em repressão transcricional, de modificações do DNA, que podem ser regulados via enzimas modificadoras de histonas, de remodelação da cromatina, microRNAs (miRNA) e RNAs longos não codificantes (LncRNA) (ROUSSEL *et al.*, 2017)

Mecanismos reguladores epigenéticos desempenham um papel significativo na oncogênese. Eles podem muitas vezes resultar no silenciamento de genes supressores tumorais ou ativar oncogenes. A patogênese tumoral do meduloblastoma é provavelmente influenciada por um evento epigenético durante o desenvolvimento do cerebelo como visto anteriormente.

Alterações epigenômicas reguladas por enzimas modificadoras de histonas são mediadas via moduladores epigenéticos e múltiplos genes que codificam esses processos que estão presentes no meduloblastoma, havendo fortes evidências da alteração desses reguladores nesse tipo de tumor (ROUSSEL *et al.*, 2017; ESTELLER, 2010).

Os fármacos de ação epigenética, que podem atuar sobre as enzimas responsáveis pelo remodelamento da cromatina, como os iHDACs, estão sendo cada vez mais estudados. Eles podem ser uma opção promissora como antineoplásico. Já foram testados em uma variedade de tumores humanos, incluindo tumores cerebrais malignos. Estudos demonstram efeitos supressores dos iHDAC em linhas celulares de tumores cerebrais, incluindo células do Grupo 3 de meduloblastoma (MILDE *et al.*, 2012; SHU *et al.*, 2006). A expressão de HDAC5 e HDAC9 foi altamente observada em subgrupos desfavoráveis de meduloblastomas (MILDE *et al.*, 2010), sugerindo iHDACs como novos candidatos a antineoplásicos, principalmente em meduloblastomas, onde HDACs podem estar envolvidos no crescimento tumoral. Atualmente, os fármacos de ação epigenética tem sido foco de vários estudos, principalmente relacionados ao meduloblastoma.

Diferentes HDACs foram testados em células de meduloblastomas. Um estudo anterior mostrou que o Entinostat (MS-275), um HDACi de classe I, diminuiu a proliferação de linhagens de células MB (DAOY e D283) e outras linhas celulares de tumores pediátricos. Embora o mecanismo do MS-275 não tenha sido verificado nesse tumor em estudo, nas demais células pediátricas seu efeito antiproliferativo foi explicado por uma indução na parada do ciclo celular ou por uma indução de apoptose (JABOIN *et al.*, 2002). Usando outro iHDAC, ácido valpróico (VPA), LI *et al.* (2005).

identificaram os mesmos mecanismos relacionados à supressão da proliferação de meduloblastomas. A parada no ciclo celular e na apoptose foi dependente da dose e do tempo, com altas concentrações e maior exposição do VPA resultando em apoptose, em vez da parada do ciclo celular. O tratamento com VPA também induziu senescência e diferenciação, diminuiu a formação de colônias e tumorigenicidade em células tumorais e, in vivo, o modelo subcutâneo de xenoinxerto foi capaz de suprimir o crescimento de tumores (LI *et al.*, 2005).

Semelhante ao VPA, outros HDACs de classe I e IIa demonstraram induzir a diferenciação em modelos meduloblastoma. Os efeitos antiproliferativos do fenilbutirato nas células desse tipo de tumor foram seguidos por alterações morfológicas e expressão aumentada de GFAP e SYN, marcadores de diferenciação glial e neuronal, respectivamente. Uma característica relacionada aos meduloblastomas é a metastatização em leptomeninges. O panobinostatato outro iHDAC diminuiu a adesão e a migração celular nas células tumorais, reduziu a semeadura leptomeníngea e aumentou a sobrevida em um modelo experimental com camundongo (PHI *et al.*, 2017).

Combinações de iHDACs com outras terapias alvo também já foram testadas. Yuan *et al.*, em 2017, mostraram que as células DAOY e D283 superexpressam HDAC1 e DNMT1 (uma DNA metiltransferase) e o bloqueio desses dois mecanismos epigenéticos diferentes por iHDACs (vorinostat e partenólídeo) e inibidor de DNMT 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) teve um efeito sinérgico no crescimento de células deacritas. O tratamento com 5-aza-dC e VPA foi capaz de aumentar a sobrevida livre de tumor de camundongos heterozigotos Patched (Ptch) que desenvolvem meduloblastoma espontâneo, mas não afetaram o crescimento de tumores em estágios avançados (Ecke *et al.*, 2009). A combinação de fenilbutirato com 5-aza-dC também teve efeito antiproliferativo sinérgico em MB e a adição de inibidor de receptor de tirosina quinase (RTKi, Imatinib) a essa combinação aumentou a citotoxicidade celular (MARINO *et al.*; 2014).

Assim, esses dados reafirmam a importância de nossos achados demonstrando o provável mecanismo de ação epigenético de ação antineoplásica do fongolimode e mostram que os iHDAC são alvos terapêuticos altamente promissores a serem estudados para o tratamento de neoplasias humanas, especialmente no que tange a tumores que comprometem o SNC.

Além disso, o fingolimode já é um fármaco atualmente utilizado como tratamento via oral para esclerose múltipla (KAPPOS *et al.*, 2006). Apesar de seu efeito imunomodulador, como já sabemos, ele também apresenta outros efeitos celulares, sendo que sua ação antitumoral vem sendo de grande interesse. Hait *et al.* (2014), demonstraram que o fingolimod apresenta efeitos benéficos no SNC ainda pouco compreendidos, independentemente dos seus efeitos sobre o tráfego de células imunológicas. Estes autores mostraram que o FTY720 entra no núcleo e após é fosforilado pela esfingosina quinase 2 (SphK2) e depois é capaz de se ligar e inibir as histona-desacetilases de classe I (HDAC) e ocasionar um aumento na acetilação das histonas, evento que também observamos em nosso estudo.

Esse composto certamente também deve apresentar atividades em várias vias de sinalização relacionadas a processos celulares envolvidos no desenvolvimento e controle tumoral. Investigações relacionadas a sua potencial atividade antineoplásica mostraram que é capaz de induzir apoptose em leucemias de linhagem mieloide e linfocítica, além de apresentar propriedades antitumorais em tumores sólidos como neoplasias de mama, cólon, pâncreas, pulmão, rim, próstata, fígado e tumores cerebrais (PITMAN *et al.*, 2012).

O fingolimode está envolvido em sinalização, migração e sobrevivência celular, estando associado com aumento da capacidade de invasão das células neoplásicas, desenvolvimento de metástases e angiogênese tumoral (PITMAN *et al.* 2012). As suas propriedades imunossupressoras e antitumorais podem ser bem diferentes, variando em muitos aspectos farmacológicos. Hait *et al.* (2014), demonstraram que o fingolimode apresenta efeitos benéficos no SNC ainda pouco compreendidos, independentemente dos sua ação imunológica. Esses autores demonstraram que esse composto é capaz de inibir HDAC de classe I aumentando as acetilações histonas 3.

O mecanismo de ação do fingolimode como antineoplásico ainda é controverso. Classicamente, ele atua em receptores esfingosinas-1-fosfato (S1P_{1/3/4/5}) após fosforilação pela esfingosina-quinase 2 das plaquetas ainda na corrente sanguínea (PITMAN *et al.*, 2012). Nesta situação, agindo nos S1P₁, atua como imunossupressor, impedindo a liberação de linfócitos dos tecidos linfoides para a corrente sanguínea. Todavia, sua ligação com esses receptores também pode ser capaz de afetar outras vias de sinalização, principalmente aquelas relacionadas a processos neoplásicos.

Quando o fingolimode atua no metabolismo da esfingosina, por ser estruturalmente semelhante a este pequeno lipídio, é capaz de influenciar essa via esfingolipídica, ocasionando uma desregulação na via das ceramidas, esfingosina e esfingosina-1-fosfato liase (PATMANATHAN *et al.*, 2015; PITMAN *et al.*, 2012; PONNUSAMY *et al.*, 2010). Isto, provavelmente, afetaria a sobrevivência e a proliferação celular, podendo gerar extermínio de células neoplásicas por meio de processos apoptóticos, como foi observado na Figura 6.

Assim como em outros processos tumorais, no meduloblastoma também ocorre metabolismo lipídico anormal, que é uma característica das células cancerígenas. Os esfingolipídeos se mostraram estar relacionados a papéis críticos na oncogênese, como crescimento e proliferação e morte celular. Além disso, também se podem estar envolvidos no desenvolvimento e na patogênese do meduloblastoma, incluindo seu papel em vias específicas de sinalização celular, como Shh e Wnt, e em mecanismos de sobrevivência do subgrupo SHH (CLARK *et al.*, 2018).

A morte celular e a redução formação de colônias, em ambas as linhagens celulares de meduloblastoma, após o tratamento com fingolimode, observadas em nosso estudo, possivelmente podem estar relacionadas ao mecanismo de regulação celular baseada no metabolismo da esfingosina, que também pode estar alterado nas células em estudo deste processo tumoral.

Teoricamente, o fingolimode atua no nível nuclear, modulando expressão de proto-oncogenes, ao influenciar a produção da proteína fosfatase 2A (PP2A). Esta fosfatase, por sua vez, atua sobre resíduos de serina/treonina, e participa de vários mecanismos celulares, incluindo regulação do metabolismo e do ciclo celular, além de mecanismos apoptóticos. Mutações que reduzem sua atividade estão relacionadas ao desencadeamento de tumores, sendo esta enzima amplamente aceita como um supressor tumoral (GARNER *et al.*, 2018; WEY *et al.*, 2019). Ela pode ser inibida após formação do complexo com o proto-oncogene nuclear SET. Desta maneira, o fingolimode atua diretamente sobre o complexo PP2A/SET e também reduz a expressão de SET, levando à reativação da PP2A que estaria inativada ou *down* regulada em vários processos neoplásicos (PATMANATHA *et al.*, 2015, CRISTÓBAL *et al.*, 2016; Garner *et al.*, 2018). Estudo realizado por Włodarski *et al.*, em 2006, demonstrou que existe uma *down* regulação no da PP2A nos meduloblastomas.

Reforçando a hipótese desta atuação do fingolimode, as ceramidas, assim como este composto, também é capaz de ativar a PP2A, ligando-se diretamente ao SET, rompendo a interação inibitória com PP2A. No entanto, a ativação desta última parece ser independente dos níveis das ceramidas (PITMAN *et al.*, 2012).

Várias moléculas de sinalização estão associadas com o desenvolvimento do meduloblastoma. O crescimento tumoral está intrinsecamente associado à ativação da via Shh, que é uma via mitógena crítica para o desenvolvimento das células granulares cerebelares, assim como ativação da via Wnt. Esta última está relacionada ao controle dos fatores de transcrição da β -catenina, que por sua vez, está envolvida na regulação gênica da proliferação celular através dos genes C-MYC e N-MYC. Mutações nesta via seriam responsáveis por cerca de 15% dos casos esporádicos de meduloblastomas. Sinalização Shh é necessária para proliferação celular responsável pelo desenvolvimento cerebelar, que é um processo ativado por ligantes Shh secretados pelas células de Purkinje. Este processo também requer ativação do receptor do fator de crescimento relacionado à insulina (IGF) que ativa a sinalização PI3K/Akt, que é uma via de sinalização que promove a expansão e a sobrevivência dessas células. A via PI3K/Akt, por sua vez, também tem um papel importante na regulação do crescimento e sobrevivência de células precursoras neuronais no desenvolvimento cerebelo (BARYAVNO *et al.*, 2010).

Outro fator que provavelmente está relacionado ao controle da proliferação deste tumor são os fatores de crescimento relacionados à insulina (IGFs) e seus preceptores 1 e 2 (IGF-R₁ e IGF-R₂). Eles promoveriam a proliferação e inibem a morte celular por apoptose (WŁODARSKI *et al.*, 2006).

Após ativação, o IGF-R₁ ligam-se a uma série de substratos, como PI3K e IRS-1, e desencadeia eventos, por meio da AKT e ERK (via ERK), que estão *up* regulados nos meduloblastomas. Essa superregulação está relacionada a níveis reduzidos da PP2A, pois esta enzima age controlando os níveis de fosforilação de inúmeras quinases, como a AKT e ERK (WŁODARSKI *et al.*, 2006).

O fingolimode, ao reativar a PP2A, poderia modular a via de sinalização AKT e ERK, uma vez que é responsável pela ativação/fosforilação PI3K/AKT e ERK, que seriam alvos-chaves de ação da PP2A. Segundo Cristóbal *et al.* (2016), a ativação AKT e ERK parece ser crucial na ação antitumoral do FTY720.

Recentemente, foi demonstrado que o fingolimode foi capaz de reativar a PP2A e reduzir a tumorigenicidade relacionada ao meduloblastomas. Esse fármaco reduziu

a proliferação, migração e invasão celular em xenoenxertos oriundos de paciente com meduloblastoma, além de parar o ciclo celular em G1 nas três linhagens celulares de meduloblastoma em estudo (D341, D384 e D425), sugerindo que esse ele deve ser investigado como um potencial agente terapêutico para esse tipo de tumor (GARNER *et al.*, 2018).

Outro provável mecanismo de ação antineoplásico interessante do FTY720 é a inibição de autotaxinas (lisofosfolipase D), que é a enzima responsável pela metabolização da lisofosfatidilcolina e produz o ácido lisofosfatídico no plasma. Esse composto é um lipídio mediador de proliferação, migração e sobrevivência celular e tem sido associado o metástase e angiogênese tumoral e também está *over* expresso em tumores humanos (PITMAN *et al.*, 2012, CLARK *et al.*, 2018). Van Meeteren *et al.*, em 2008, demonstraram que o fingolimode foi capaz de reduzir atividade desta enzima, sugerindo que ele pode exercer atividade antineoplásica também por meio de inativação ou redução da atividade das autotaxinas que também poderia estar alterada nos mecanismos metastáticos do meduloblastomas, assim como na linhagem celular D283 a que foi utilizada em nosso estudo, mas que certamente devem ser melhor estudados.

Como visto anteriormente, Hait *et al.* (2015) relatou que o FTY720 apresenta ação como inibidor das histona-desacetilases de classe I (HDAC), aumentando as acetilações das histonas e regulando a expressão de um conjunto restrito de genes independentemente dos seus efeitos conhecidos na sinalização canônica através dos receptores esfingosina-1-fosfato. Resultados semelhantes foram constatados em nosso estudo após o tratamento das células com FTY720.

Outro fato interessante em nosso trabalho, foi a utilização de duas linhagens celulares de meduloblastomas. A linhagem DAOY é derivada de sítio tumoral primário e a D283 é de sítio metastático, que teoricamente apresentam anormalidades genéticas adicionais que lhes garantem maior chance de sobrevivência, podendo levar a uma maior resistência quimioterápica. Apesar disso, observamos que o fingolimode foi igualmente eficaz na inibição de crescimento celular e de formação de colônias. Isso pode inferir que este composto poderia ter efeito tanto em tumores primários, quanto em tumores metastáticos. Em concentrações acima de 2 micromolar, o FTY720 provavelmente seja capaz de reduzir a migração e habilidade de invasão de células de glioblastoma, assim como de outras neoplasias como câncer

de ovário hepatocarcinoma, além de induzir desorganização do citoesqueleto, diminuir e deformar microfilamentos (PATMANATHAN *et al.*, 2015).

Assim, nosso estudo corrobora os dados de literatura demonstrando que o fingolimode pode realmente atuar como droga antineoplásica, não apenas via promovendo morte celular via metabolismo dos esfingolípídios, mas também por meio de regulação de mecanismos epigenômicos.

8 CONCLUSÃO

O tratamento com quimio e radioterapia dos tumores do sistema nervoso central, principalmente dos meduloblastomas, por predominarem em indivíduos na faixa etária pediátrica, apresentam alta incidência de efeitos adversos. Desta maneira, novos compostos antineoplásicos são exaustivamente estudados com a finalidade de ser mais efetivos e causar menos efeitos colaterais indesejáveis. O objetivo de nosso estudo foi avaliar o uso de fingolimode como agente antineoplásico para o tratamento de meduloblastomas humanos.

Observamos que o fingolimode foi capaz proporcionar uma redução significativa na viabilidade celular e sobrevivência nas culturas D283 e DAOY, além de aumentar significativamente os níveis de acetilação de histona H3.

Assim, concluímos que o fingolimode pode apresentar atividade antineoplásica em células de meduloblastoma humanos por mecanismos que provavelmente regulam crescimento e sobrevivência celular, assim como também atuando na regulação de vias de controle epigenéticos do desenvolvimento e manutenção celular.

Além disso, pensando em estudos clínicos no futuro, é um fármaco já aprovado pelo FDA para uso via oral, apresenta baixa incidência de efeitos adversos, e, em comparação com outros quimioterápicos, apresenta boa tolerância de uso, além de apresentar uma excelente passagem pela barreira hemato-encefálica, fato o que tornaria esse composto um excelente alvo como nova terapia oncológica para os meduloblastomas.

Enfim, a idéia do uso de medicamentos de ação epigenética para tratamento do câncer é extremamente interessante, porque esses compostos tendem a ser melhor tolerados pelo organismo que a quimioterapia convencional e possivelmente mais eficazes. Além disso, os genes reguladores onco e pró-oncogênicos alterados podem ser restaurados ou mesmo silenciados, podendo, muitas vezes extinguir a neoplasia.

REFERÊNCIAS

BARYAWNO, N *et al.*. Medulloblastoma: A disease with disorganized developmental signaling cascades. **Cell Cycle**, v. 9 , n.13, p. 2548-2554, 2010.

doi:10.4161/cc.9.13.12170. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20581434/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

CHANG, C.H., HOUSEPIAN. E.M.; HERBERT JR., C. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technique for cerebellar medulloblastos.

Radiology, v.93, n.6, p.1351–9, 1969.. doi: 10.1148/93.6.1351. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4983156/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

CLARK, A.R. *et al.* Rapid discrimination of pediatric brain tumors by mass spectrometry imaging. **Journal of Neuro-Oncology**. v.140, n.2, p.269-279, 2018.

doi: 10.1007/s11060-018-2978-2. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/327119908_Rapid_discrimination_of_pediatric_brain_tumors_by_mass_spectrometry_imaging Acesso em 02 abr. 2019.

CRISTÓBAL, I *et al.*, Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: a brief review. **Current Medical Research Opinion**, v.32. n.6, p.1137-41, 2016. doi:10.1185/03007995.2016.1162774. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26950691/> . Acesso em 02 abr. 2019.

DESOUZA, R.M. *et al.* Pediatric medulloblastoma – update on molecular classification driving targeted therapies. **FRONTIERS IN ONCOLOGY**, v. 4, p: 1- 8, 22 jul. 2014. doi: 10.3389/FONC.2014.00176. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105823/> Acesso em: 02 abr. 2019.

ECKER, J *et al.* Targeting class I histone deacetylase 2 in MYC amplified group 3 medulloblastoma. **Acta Neuropathologica Communications** , v.3, p.22, 2015. doi:

10.1186/s40478-015-0201-7. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382927/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ECKER, J.; WITT, O.; MILDE, T. Targeting of histone deacetylases in brain tumors.

CNS Oncology, v.2, n.4, p. 359-76, 2013. doi: 10.2217/cns.13.24. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25054580/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ELLISON, D.W. *et al.* Beta-catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the united kingdom children’s cancer study group brain tumour committee.

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, v. 23, p.7951-7957, 2005.. doi:

10.1200/JCO.2005.01.5479. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16258095/> . Acesso em: 02 abr. 2019.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **New England of Journal Medicine**, v.358, n.11, p.1148–59, 2008. doi: 10.1056/NEJMra072067. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337604/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

GARNER, E.F. *et al.* FTY720 decreases tumorigenesis in Group 3 medulloblastoma patient-derived xenografts. **Scientific Reports** v.8, p.6913, 2018. doi : 10.1038/s41598-018-25263-5.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720672/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

GEYER, J.R. *et al.* Multiagent chemotherapy and deferred radiotherapy in infants with malignant brain tumors: a report from Children's Cancer Group. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n.30, p. 7621-7631, 2016. doi: 10.1200/JCO.2005.09.095. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16234523/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

GIANGASPERO, F. *et al.* Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. **Acta Neurophatologica**, v. 112, n.1, p. 5-12, 2006. doi: 10.1007/s00401-006-0064-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16685513/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

GIBSON, P. *et al.* Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. **Nature**, v.468,n. 7327, p. 1095-1099, 2010. Doi: 10.1038/nature09587.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150899/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

HAIT, N.C. *et al.* Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. **Nature Neuroscience**, v.17, n.7, p. 971-980, jul. 2014. doi: 10.1038/nn.3728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24859201/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

HAIT, N.C. *et al.* The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. **Oncogenesis**, n.4, p: e156, jun. 2015. doi: 10.1038/oncsis.2015.16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053034/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

JABOIN, J. *et al.* MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. **Cancer Research**, v.62, n.21, p.6108-15, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6659113/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

JONES, D.T. *et al.* Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488,n. 7409, p.100-105, 2012. doi: 10.1038/nature11284. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22832583/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

KAPPOS, L. *et al.* Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. **New England Journal Medical**, v. 355, n.11, p.1124-1140, 2006. doi:

10.1056/NEJMoa052643. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16971719/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

KOOL, M. *et al*: Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. **Cancer Cell**. v.25, p.393-405, 2014. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.004. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651015/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

KOOL, M. *et al*: Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, group 3, and group 4 medulloblastomas. **Acta Neuropathological**, v.123, p. 473-484, 2012. doi: 10.1007/s00401-012-0958-8. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22358457/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

KOOL, M., KORSHUNOV, A, PFISTER, S.M. Update on molecular and genetic alterations in adult medulloblastoma **Magazine of European Medical Oncology**, v.5 n.3, p.228-232, 2012. doi: 10.1007/s12254-012-0037-9. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23864912/>. Acesso em: 02 abr. 2019

LI, XN *et al*. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. **Molecular Cancer Therapy**, v. 4, n.12, p.1912-22, 2005. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0184. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/7396964_Valproic_acid_induces_growth_arrest_apoptosis_and_senescence_in_medulloblastomas_by_increasing_histone_hyperacetylation_and_regulating_expression_of_p21Cip1_CDK4_and_CMYC. Acesso em: 02 abr. 2019.

LOUIS, D.N. *et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathological**, v. 114, p.97-109, 2007. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17618441/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

MARINO, A.M. *et al*. Effects of epigenetic modifiers in combination with small molecule inhibitors of receptor tyrosine kinases on medulloblastoma growth. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.450, n.4, p.1600-5, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.042. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25026552/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

MILARD, N.E.; DE BRAGANÇA, K.C.. Medulloblastoma. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n.12, p.1341-53, 2016. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0883073815600866>. Acesso em: 02 abr. 2019

MILDE, T. *et al*. HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p.3240-3252, 2010. Disponível em:
https://www.academia.edu/16446413/HDAC5_and_HDAC9_in_Medulloblastoma_No

vel_Markers_for_Risk_Stratification_and_Role_in_Tumor_Cell_Growth. Acesso em: 02 abr. 2019.

MILDE, T. *et al.* HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 110, p.335-3, 2012. doi: 10.1007/s11060-012-0978-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23054560/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

MUTTI, C.F.; PAULA, C.C.; SOUTO, M.D.. Assistência à Saúde da Criança com Câncer na Produção Científica Brasileira. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.1, p. 71-83, 2010. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2010v56n1.1537. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1537>. Acesso em: 30 ago. 2022

NORTHCOTT, P.A. *et al.* Medulloblastomics: The end of the beginning. **Nature Reviews Cancer**, v.12, p.818-834, 2012. doi: 10.1038/nrc3410. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23175120/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

NORTHCOTT, P.A. *et al.* Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. **Nature Genetics**, v.41, p. 465-472, 2009. doi: 10.1038/ng.336. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270706/>. Acesso em: 02 abr. 2019

NORTHCOTT, P.A. *et al.* Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastomagenomes, **Nature**, v.488, p.49-56, 2012a. doi: 10.1038/nature11327. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/230568058_Subgroup-specific_structural_variation_across_1000_medulloblastoma_genomes. Acesso em: 02 abr. 2019.

NORTHCOTT, P.A. *et al.* Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. **Nature**, v. 511, p. 428-434, 2014. doi: 10.1038/nature13379.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043047/> . Acesso em: 02 abr. 2019.

NORTHCOTT, P.A., TUKA, J.T., TAYLOR, M.D. Genomics of medulloblastoma: From Giemsa-banding to next-generation sequencing in 20 years. **Neurosurgical Focus**. v. 28, p. E6, 2010. doi: 10.3171/2009.10.FOCUS09218. Disponível em: https://academic.naver.com/article.naver?doc_id=455197764. Acesso em: 02 abr. 2019

OSTROM, Q.T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol**. v.15 SUPPL 2, nov. 2013. DOI: 10.1093/neuonc/not151. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798196/> . Acesso em: 02 abr. 2019.

PACKER, R.J. *et al.* Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p.4202-4208, 2006. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4980.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16943538/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PACKER, R.J. *et al.* Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. **Journal of Clinical Oncology**; v.17:p.2127-2136, 1999. Disponível em:

<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.993.9836&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PATMANATHAN, S.N. *et al.* The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, n. 10, p. 2329-40, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12635>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.12635>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PERREAULT, S. *et al.* MRI surrogats for molecular subgroups of medulloblastom. **American Journal of Neuroradiology**, v. 35, p. 1263-1269, 2014. doi:

10.3174/ajnr.A3990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24831600/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PFISTER, S. *et al.* The Histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. **International Journal Cancer**. v.122, p.1207-12013, 2008. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12435>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5545598/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PHI, J.H. *et al.* Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses leptomeningeal seeding in a medulloblastoma animal model. **Oncotarget**, v. 8, n.34, p. 56747-56757, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.18132. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593598/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PITMAN, M.R. *et al.* Molecular Targets of FTY720 (Fingolimod). **Current Molecular Medicine**, v.12, p.1207-1219, 2012. doi:

<https://doi.org/10.2174/156652412803833599>. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmm/2012/00000012/00000010/art00001> . Acesso em: 02 abr. 2019.

POLKINGHORN, W. R.; TARBELL, N.J. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. **Nature Clinical Practice Oncology**, v.4, n 5, p. 295-304. Maio 2007. doi:10.1038/ncponc0794. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17464337/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PONNUSAMY, S. *et al.* Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. **Future Oncology**, v.6, n.10, p.1603-1624, out. 2010. doi: 10.2217/fon.10.116, Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071292/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

PUGH, T.J., *et al.* Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. **Nature**, v.488, n. 7409, p 106-110, 2012. doi:

10.1038/nature11329. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22820256/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ROBINSON, G. *et al.* Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. **Nature**, v.488 p.43-48, 2012. doi: 10.1038/nature11213. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412905/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ROSEMBERG, S.; FUJIWARA, D. Epidemiology of pediatric tumor of the nervous system according to the WHO 200 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. **Childs Nervous System**, v. 21, n.11, p. 940-944, 2005. doi: 10.1007/s00381-005-1181-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16044344/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ROSSI, A. *et al.* Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. 971-976, 2008. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2072. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3222918/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ROUSSEL, M.F. ;STRIPAY, J.L.. Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. **The Cerebellum**, v.17, n.1, p.28-36, 2018. doi: 10.1007/s12311-017-0899-9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321294466_Epigenetic_Drivers_in_Pediatric_Medulloblastoma. Acesso em: 02 abr. 2019.

ROUSSEL, M.F.; HATTEN, M.E. Cerebellum: Development and Medulloblastoma. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 94, p.235-82, 2011. Disponível em: <https://www.academia.edu/14375776/Cerebellum>. Acesso em: 02 abr. 2019.

RUTKOWSKI, S. *et al.* Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. **New England of Journal Medicine**, v.352, p.978-986, 2005. doi: 10.1056/NEJMoa042176. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa042176>. Acesso em: 02 abr. 2019.

SHIH, D.J. *et al.* Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. **Journal of Clinical Oncology**, v.32, p.886-896, 2012. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9539. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3948094/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

SHU, Q *et al.* Valproic acid prolongs survival time of severe combined immunodeficient mice bearing intracerebellar orthotopic medulloblastoma xenografts. **Clinical Cancer Research**, v.12, p.4687-94, 2006. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2849. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16899619/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

SINGH, S. *et al.* Zeb1 controls neuron differentiation and germinal zone exit by a mesenchymal-epithelial-like transition. **ELife**; v.5: 1-31, may 2016. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.12717>. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/12717>. Acesso em: 02 abr. 2019

SONNEMANN, J. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. **Int. Journal of Oncology**, v. 28, p.755-766, 2006. doi:

10.1007/s00432-007-0227-8. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486365/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

STRADER, C.R.; PEARCE, C.J.; OBERLIES, .N.H. Fingolimod (FTY720): A Recently Approved Multiple Sclerosis Drug Based on a Fungal Secondary Metabolite. **Journal of Natural Products**, v.74, n.4, p.900–907, 2011. Disponível em: <https://asset-pdf.scinapse.io/prod/1991931105/1991931105.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2019.

TAYLOR, M.D. *et al.* Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. **Acta Neuropathological**, v. 23, p. 465-472, 2012. doi:

10.1007/s00401-011-0922-z. . Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306779/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

TORRES, L.F. *et al.* Primary pediatric tumor of central nervous system:

anatomopathology study of 623 cases. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 55, n.4, p. 795-800, 1997. doi: 10.1590/s0004-282x1997000500017. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9629340/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

VAN MEETEREN, L.A *et al.* Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxins, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D.

Cancer Letters, v.266, n.2, p.203-208, ago. 2008. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.052.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943588/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

WEI, Y *et al.* P53 function is compromised by inhibitor 2 of phosphatase 2a in sonic hedgehog medulloblastoma. **Molecular cancer research**, v.17, n.1, p.186-198, Jan.

2019. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0485. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6318027/>. Acesso em 02 abr. 2019.

XU, J. *et al.* Pediatric brain tumor cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**.

v.116, n.2, p. 218-224, 2015. doi: 10.1002/jcb.24976. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25211508/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ZHUKOVA, N. *et al.*: Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.31, p.2927-2935, 2013. doi:

10.1200/JCO.2012.48.5052. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23835706/>. Acesso em: 02 abr. 2019.

ZWERGEL, C. *et al.* Application of Small Epigenetic Modulators in Pediatric Medulloblastoma. **Frontiers in Pediatrics**, v.6, p.370, 2018. doi:

10.3389/fped.2018.00370. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286966/>. Acesso em 02 abr. 2019.