

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
– PPGBCM

**COMBINAÇÃO DE MODULADORES EPIGENÉTICOS COM
ATIVAÇÃO DE RECEPTOR RETINOIDE EM NEUROBLASTOMA:
EFEITOS SOBRE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.**

VIVIANE RÖSNER DE ALMEIDA

Orientador: Prof^o Dr. Rafael roesler

Porto alegre, agosto de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
– PPGBCM

**COMBINAÇÃO DE MODULADORES EPIGENÉTICOS COM
ATIVAÇÃO DE RECEPTOR RETINOIDE EM NEUROBLASTOMA:
EFEITOS SOBRE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.**

Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular.

VIVIANE RÖSNER DE ALMEIDA
Orientador: Prof^o Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre, agosto de 2016

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta tese foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Câncer e Neurobiologia do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e algumas metodologias foram desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica Celular do Departamento de Bioquímica da UFRGS, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), e em outras unidades do CPE/HCPA. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, números 484.185 / 2012-8 e 303276 / 2013-4); PRONON / Ministério de Saúde/Brasil (número: 25000.162.034/2014-21), Fundo de Pesquisa Rafael Koff Acordi do Instituto de Câncer Infantil (ICI); e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA.

“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muito trabalho e persistência.”

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um sinal de que o trabalho ou aquela pessoa fez a diferença em nossas vidas. Ao longo dessa etapa, pude contar com a ajuda de inúmeras pessoas que, de certa forma, compartilharam um pouco do seu tempo comigo nessa caminhada.

Agradeço a Deus, por ter me colocado nesse caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Roesler, um exemplo de pesquisador e professor, que confiou a mim esse trabalho e me deu total liberdade para executá-lo.

A PatiLu, por ser uma amiga, conselheira e excelente pesquisadora que acompanhou esse trabalho através de uma orientação informal e de extrema importância nos últimos anos de doutorado. Amadureci como pesquisadora aprendendo muito contigo, admiro teu trabalho e tua pessoa.

À comissão de acompanhamento, Prof. Dr. Fábio Klamt e Prof. Dr. Alexandre Macedo, que agregaram novas ideias ao trabalho e dispuseram seus laboratórios para execução do meu projeto.

A Carol Brunetto e Ana Abujamra por me apoiarem no início desse projeto e me inserirem na rotina do laboratório.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Câncer e Neurobiologia, Amanda, Lívia, Camila, Mariane, Tiago, Marquito, Matheus, Mirela, Kelly, Duda, Sophia, Marienela, Júlia, Rafa Santos, Sasha, Gabriela Costa, Jéssica, Karol, Pietro, Leonardo, Danielly, Gabriela Steckert, Nathália e a tantos outros que passaram pelo

laboratório durante esses anos, obrigada pelas risadas, pela ajuda e pelo trabalho em equipe.

Aos colegas Eduardo Chiela e Marina Siebert pelo suporte científico em diversos momentos em que precisei.

Aos laboratórios de Psiquiatria, Terapia Gênica, Endocrinologia e UAMP do HCPA, que deram a infraestrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

A Mariusi, Mariana Lobo, Maria Eduarda Amaral e Pâmela, que acompanharam de perto o desenvolvimento desse trabalho, me auxiliaram ativamente na bancada e tornaram-se grandes amigas.

Eu, Bárbara e Igor, juntamente com PatiLu formamos um grupo muito unido que se fortaleceu embasado em conhecimento científico, amizade e muitas risadas. Dias e noites aprendi e me diverti muito com o Igor, exemplo de profissional e pessoa que espero ter sempre ao meu lado. Agradeço a Bárbara, que, mesmo estando longe, pôde manter o contato e compartilhar experiências. Sem vocês, o trabalho se tornaria muito mais desgastante.

Ao Colégio Anchieta, por permitir que eu aprofundasse meu conhecimento científico, e aos colegas da Biologia, Ciências e Química, em especial ao Prof. Flávio Medina.

Também não posso deixar de mencionar o Willian, por também ter dado seu apoio na elaboração dessa tese.

Ao Diogo, meu amigo e companheiro, com quem compartilhei momentos de alegria e tristeza durante os experimentos e que foi paciente e crítico em todas as atividades.

E por último, mas não menos importante, a minha família. Meus pais Roni e Regina, e minha irmã, Gabriela, por me apoiarem nessa caminhada e me darem todo o suporte para que eu pudesse concluir esse estudo. A Gabi foi imprescindível na escrita desse trabalho por seu olhar crítico na formatação. Obrigada, família, dedico a vocês!

Gratidão é a memória do coração!

Estrutura da tese

O presente trabalho está dividido da seguinte forma: Introdução, Objetivos (gerais e específicos), Capítulo I escrito na forma de artigo científico, Capítulo II, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências e Anexos.

A Introdução apresenta os principais conceitos relacionados ao câncer infantil, especificamente neuroblastoma, tumor alvo do estudo. Além disso, são descritas as terapias de epigenética e de diferenciação relacionadas ao tumor. Em cada terapia é feita uma descrição dos mecanismos, bem como as principais drogas utilizadas no estudo.

O Capítulo I consiste de um artigo de dados, no qual foi investigado o papel da associação terapêutica entre moduladores epigenéticos e de diferenciação em células de neuroblastoma. Este artigo deu origem a um manuscrito intitulado: *Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells*, publicado na revista *Molecular Neurobiology*.

O Capítulo II está apresentado na forma de Resultados adicionais, no qual são descritos outras metodologias utilizadas na avaliação dos diferentes tratamentos nas linhagens celulares de neuroblastoma.

A Discussão contempla os comentários sobre os resultados apresentados nos Capítulos I e II, além de ressaltar a importância deste estudo. Por fim, são descritas as Conclusões e Perspectivas geradas pelo trabalho, além das Referências utilizadas na elaboração desta tese e o Anexo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	13
Resumo	14
Abstract.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER INFANTIL	16
1.2 Neuroblastoma	17
1.2.1 Etiologia	17
1.2.2 Histologia e características moleculares	21
1.2.3 Epidemiologia	26
1.2.4 Aspectos clínicos e prognóstico	28
1.2.5 Tratamento	30
1.3 Epigenética	33
1.3.1 Modificação de histonas	36
1.3.1.1 Butirato de sódio (HDACi)	43
1.3.2 Metilação	44
1.3.2.1 Decitabina e 5-azacitidina (DNMTi)	45
1.4 Terapia de diferenciação	50
1.4.1. Vitamina A	51
HIPÓTESE.....	57
OBJETIVO GERAL.....	57
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
Capítulo I	58
Capítulo II	69
Discussão	76
CONCLUSÕES	86
PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS	89
Anexo - Curriculum Vitae.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-Aza	5-Azacitidina
5-Aza-dC	5-Aza-2'-desoxicitidina (decitabina)
ATRA	<i>All trans-retinoic acid</i> (ácido retinoico all trans)
ALL	<i>Acute lymphocytic leukemia</i> (leucemia linfocítica aguda)
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i> (cinase de linfoma anaplásico)
APL	Leucemia promielocítica aguda
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP	Proteína morfogênica óssea-2
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
cDNA	DNA complementar
CHD5	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 5</i> (cromodomínio-helicase 5 proteína ligante de DNA)
COG	Children's Oncology Group (Grupo de Oncologia Infantil -EUA)
CPD	<i>Cumulative Population Doubling</i> (population doubling cumulativo)
CRBP	Proteínas ligantes ao retinol celular
CRABP	Isoformas proteicas ligantes ao ácido retinóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DFS	Taxa de sobrevivência livre de doença
DNMTi	Inibidores de DNA metiltransferase
DOXO	Doxorrubicina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Comidas e Remédios/ EUA)
EFS	<i>Event free survival</i> (sobrevida livre de eventos)

ERK	<i>Extracellular signal–regulated kinases</i> (cinase reguladoras de sinal extracelular)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDACi	Inibidor de histona desacetilases
HIF-1a	Fator indutor de hipóxia
ICI/RS	Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigosidade)
NaB	Butirato de sódio
NB	Neuroblastoma
NFkB	Fator nuclear <i>kappa B</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
NIH	<i>Nacional Institute of Health</i> (Instituto de Saúde Nacional/EUA)
NT3	Neurotrofina 3
PcG	Proteínas <i>polycomb</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PHOX2B	<i>Paired like homeobox 2b</i> (proteína homeobox mesodermal pareada 2B)
pNTs	Tumores periféricos neuroblásticos
PPAR γ	Receptores Nucleares Ativados Por Proliferadores De Peroxissomos
RA	Ácido retinoico

RAR	Receptores de ácido retinoico
RARE	Elementos responsivos ao <i>ácido retinoico</i>
RBP	Proteína sérica retinol
RXR	Receptores x retinoides
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SCA	Anormalidades cromossômicas segmentares
Trk	<i>Tropomyosin receptor kinase</i> (receptor tropomiosina cinase)
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TSA	Tricostatina A
SAHA	<i>Vorinostat</i> ou ácido hidroxâmico suberoilânilida
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VPA	Valproato ou ácido valproico
VCR	Vincristina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VP-16	Etoposídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da crista neural e de NB.	19
Figura 2. Histologia de NB.	22
Figura 3. Fotomicrofotografias de contraste de fase de células de NB humano	24
Figura 4. Apresentações clínicas de NB.	30
Figura 5. Taxas de sobrevivência de cinco anos para dois períodos de tempo para câncer pediátrico diagnosticada desde o nascimento até 19 anos de idade	31
Figura 6. Representação esquemática do nucleossomo.	36
Figura 7. Efeito de inibidores de HDAC na remodelação da cromatina e na transcrição	38
Figura 8. Estrutura molecular do butirato de sódio.	43
Figura 9. Estruturas químicas de nucleosídeo de citidina e azanucleosídeo	46
Figura 10. Mecanismo de azacitidina	48
Figura 11. Representação esquemática dos mecanismos de ação de HDACi (NaB) e DNMTi (5-Azacitidina).	50
Figura 12. Vias de sinalização dos retinoides.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Enzimas histona desacetilase	40
TABELA 2: Os ensaios clínicos com drogas epigenéticas em tumores sólidos	84

Resumo

Neuroblastoma (NB) é a forma mais indiferenciada de tumores neuroblásticos e a principal causa de morte por câncer pediátrico. Alterações epigenéticas interagem em todas as etapas do desenvolvimento do câncer, promovendo a progressão tumoral. A remodelação da cromatina é influenciada pela acetilação de histonas e a metilação de DNA. Acetiltransferases de histona (HATs), desacetilases de histonas (HDAC) e metiltransferase de DNA (DNMTs) são alvos de estratégias terapêuticas em tumores. Os retinoides agem nas vias de diferenciação celular, anti-proliferação e pró-apoptose. Nesse trabalho, é proposto que a combinação desses moduladores epigenéticos e de diferenciação em linhagens de células de NB humano é mais efetiva que os agentes isolados. Os tratamentos induziram mudanças na expressão de marcadores de diferenciação e indiferenciação, como c-Myc, β -3tubulina, NeuN e Bmi1, e alterações morfológicas nas duas linhagens celulares utilizadas, SK-N-BE(2) e SH-SY5Y. Os dados encontrados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares dos moduladores retinoides e epigenéticos em NB capazes de acrescentar melhorias nas atuais estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: neuroblastoma, epigenética, retinoides, diferenciação celular.

Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most undifferentiated form of neuroblastic tumors and the leading cause of death from pediatric cancer. Epigenetic changes interact at all stages of cancer development, promoting tumor progression. Chromatin remodeling is influenced by histone acetylation and DNA methylation. Histone acetyltransferases (HATs), histone deacetylases (HDAC), and DNA methyltransferase (DNMTs) are targets for therapeutic strategies in cancer. Retinoids act on cell differentiation pathways and display anti-proliferation and pro-apoptotic actions. In the present research we examined the effects of combining epigenetic modulators and a retinoid receptor agonist in human NB cells. The retinoid all trans-retinoic acid (ATRA) combined with inhibitors of either histone deacetylases (HDACs) or DNA methyltransferase was more effective than any drug given alone in impairing the proliferation of SH-SY5Y and SK-N-BE(2) NB cells. In addition, the treatments induced differential changes in the expression of differentiation markers including c-Myc, β -3tubulin, NeuN and Bmi1, and morphological changes in SK-N-BE(2) e SH-SY5Y cell lines. The data contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of retinoid modulators and epigenetic in NB able to add improvements in current therapeutic strategies.

Key words: neuroblastoma, epigenetics, retinoids, cell differentiation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER INFANTIL

O câncer infantil corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo.

O desenvolvimento normal dos mamíferos é um processo que resulta na criação de centenas de tipos de células diferenciadas de uma única célula pluripotente. Este processo de diferenciação celular depende da regulação epigenética, que conduz as mudanças hereditárias na expressão gênica independentemente das alterações na sequência de DNA (Lee TI, *et al.* 2006; Mikkelsen TS, *et al.* 2007; Meissner A, *et al.* 2008).

Os tipos de câncer que se desenvolvem em crianças são muitas vezes diferentes dos tipos que se desenvolvem em adultos. A caracterização de mutações de câncer pediátrico em todo o genoma tem produzido informações importantes sobre a patologia molecular dos principais subtipos de câncer observados em crianças (Downing, J. R. *et al.* 2012; Huether R, *et al.* 2014). Duas observações gerais que emergem desses estudos são que os cânceres pediátricos, em média, contêm menos mutações somáticas comparáveis com os tumores que ocorrem em adultos e que os genes que codificam as proteínas envolvidas na regulação epigenética são mutados a uma alta frequência num subconjunto de tumores pediátricos (Huether R, *et al.* 2014).

Nos Estados Unidos, os tumores mais frequentes na infância e na adolescência são leucemia linfocítica aguda (ALL), tumores cerebrais, tumores do

sistema nervoso central e neuroblastoma (NB) (NIH, 2015). No Brasil, o câncer já representa a primeira causa de morte (7% do total) por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, para todas as regiões (INCA, 2015). Estima-se que ocorrerão cerca de 12.600 novos casos de câncer em crianças e adolescentes no Brasil por ano em 2016 e em 2017. Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Hoje, em torno de 70% das crianças e adolescentes acometidos de câncer podem ser curados, se diagnosticados precocemente e tratados em centros especializados. A maioria deles terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado (INCA, 2015).

Há exceções, mas o câncer infantil tende a responder melhor aos tratamentos como a quimioterapia. As crianças também tendem a tolerar a quimioterapia melhor do que os adultos. Mas os tratamentos de câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, podem ter efeitos colaterais em longo prazo. Por isso, as crianças que sobrevivem ao câncer precisam de atenção cuidadosa para o resto de suas vidas (American Cancer Society, 2015).

Dentre os tumores pediátricos, NB se destaca por ser um tumor sólido progressivo na infância e é um desafio clínico (Roy Choudhury S, *et al.* 2012).

1.2 Neuroblastoma

1.2.1 Etiologia

Neuroblastoma está classificado dentro do grupo de tumores periféricos neuroblásticos (pNTs). Origina-se de células embrionárias precursoras do sistema nervoso simpático e se desenvolve durante o crescimento fetal ou nos primeiros

anos de vida. Surge da linhagem da crista neural simpatoadrenal que normalmente se desenvolve e diferencia em gânglios simpáticos, células cromafins da medula adrenal e paragânglios (Park JR, *et al.* 2010). Estas estruturas neuronais derivam de células da crista neural ventrolateral, que migram precocemente para longe do tubo neural durante embriogênese, aproximadamente na terceira para quarta semana do desenvolvimento embrionário (Better E, *et al.* 2010). A maioria dos tumores NB parece surgir a partir de células derivadas da crista neural no abdômen adjacente à aorta na região dos rins ou na região medular da glândula adrenal (Brodeur GM, 2003; Maris JM, *et al.* 2007). A crista neural surge da região dorsal do tubo neural abaixo da ectoderme (Figura 1) (Le Douarin N, *et al.* 1999). Esta população transitória de células produz células progenitoras multipotenciais que dão origem ao sistema nervoso periférico, ao sistema nervoso entérico, às células pigmentares, às células de Schwann, às células medulares adrenais e às células do esqueleto craniofacial (Le Douarin N, *et al.* 1999). As vias de sinalização *Hedgehog* e *Wnt* são especialmente cruciais para o bom desenvolvimento da crista neural (Dupin E, *et al.* 2007; Le Douarin N, *et al.* 1999; Morales AV, *et al.* 2005). Estudos no embrião humano em desenvolvimento têm mostrado que células da crista neural na região do tronco geram melanócitos, células de Schwann, glia e neurônios ganglionares da raiz dorsal (Fontaine-Perus JC, *et al.* 1982; Lallier TE, *et al.* 1988; Teillet MA, *et al.* 1987; Weston JA, 1963).

A inibição deste processo de maturação pode predispor no início os precursores neurais multipotentes da crista para transformação maligna.

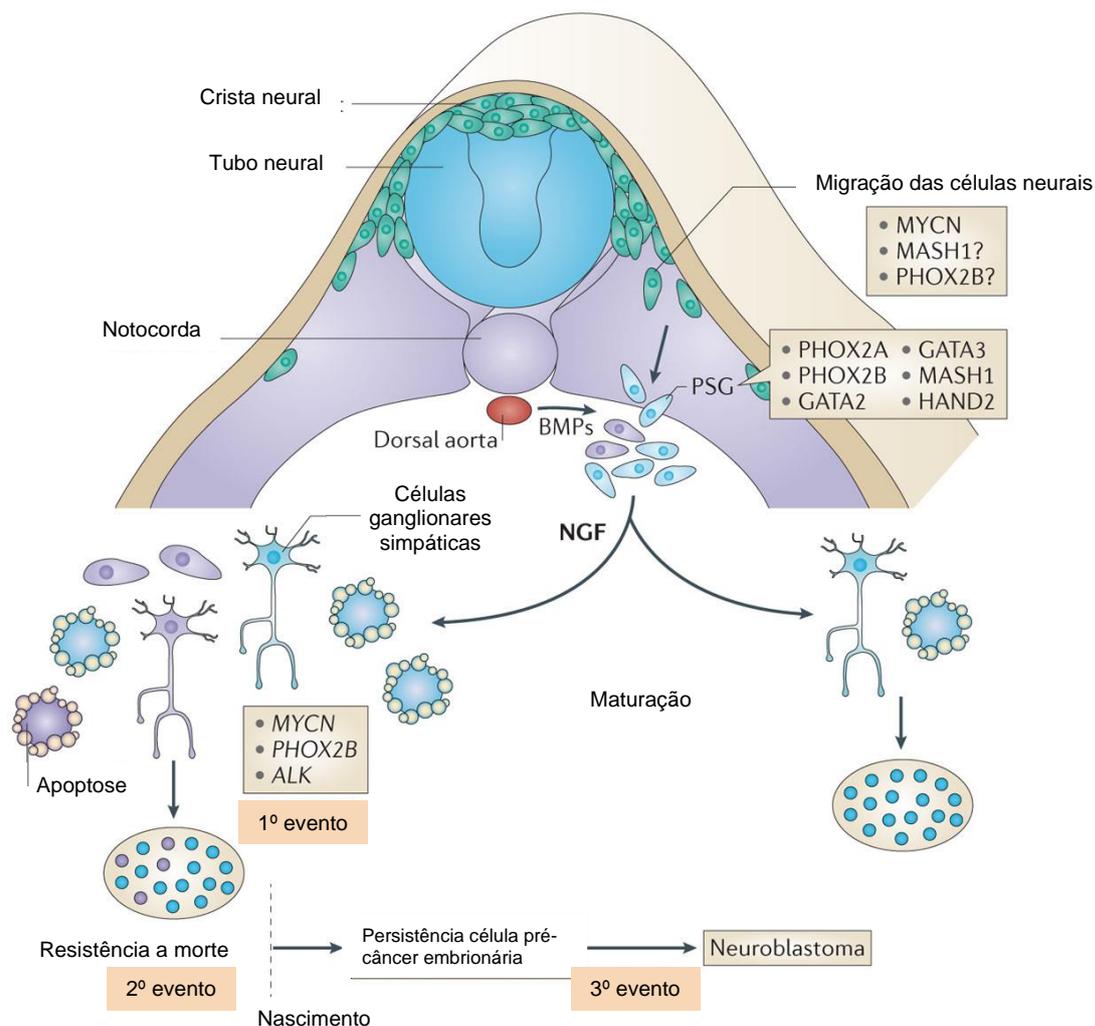


Figura 1: Desenvolvimento da crista neural e de NB. Sob a influência de MYCN e proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), os progenitores neuroblastos migram da crista neural e em torno do tubo neural para uma região que é imediatamente lateral à notocorda e à aorta dorsal. Neste local, as células sofrem a diferenciação como os gânglios simpáticos primário (PSG) antes da divergência em células neuronais de gânglios simpáticos madura ou células cromafins (não mostrado). MYCN é o "primeiro evento" em virtude das observações de tirosina hidroxilase (Th), enquanto que mutações em cinase de linfoma anaplásico (ALK) e proteína homeobox mesodermal pareada 2B (PHOX2B) são mutações germinativas. O acesso local para o fator de crescimento do nervo (NGF) determina se o gânglio simpático normal (azul) amadurece em um gânglio terminal ou sofre morte celular por apoptose. Um estado patológico relativamente comum é a sobrevivência pós-natal das células neuroblastos pré-tumorais (roxo), que exige que a célula que está destinada a se tornar maligna seja resistente ao fator trófico antes da retirada destas células pré-tumorais persistentes submetidas a um terceiro evento que induz a transformação, que apresenta como neuroblastoma na primeira infância. HAND2, derivados do coração e da crista neural expressa 2; Mash1, homólogo murino *achaete-scute 1*. Adaptado: Marshall GM (2014).

Neuroblastoma pode se manifestar de duas formas: esporádico e/ ou familiar. O câncer familiar (hereditário) mais prevalente em indivíduos de uma mesma família ocorre por transmissão vertical (de uma geração para outra). A idade precoce ao diagnóstico, mais de uma neoplasia em um mesmo indivíduo, vários membros de uma mesma família apresentando a mesma neoplasia são algumas características associadas ao câncer hereditário (Alvarenga M, *et al.* 2003). A forma esporádica manifesta-se de forma isolada no indivíduo, aparece naquele que não têm histórico familiar de que o câncer ou uma mudança herdada em seu DNA aumentaria o risco para esse câncer (NIH, 2016). Cerca de 1-2% dos pacientes com NB têm histórico familiar (Mossé YP, *et al.* 2008). Dois genes foram identificados, ALK (gene do receptor linfoma anaplásico de tirosina cinase) e PHOX2B (proteína homeobox mesodermal pareada 2B), que respondem por aproximadamente 80% da doença hereditária. Especificamente, vários grupos demonstraram que mutações de ativação ALK são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos de NB hereditária. (Mossé YP, *et al.* 2008; Shojaei-Brosseau T, *et al.* 2004; Mosse YP, *et al.* 2004; Maris JM, *et al.* 2002; Chen Y, *et al.* 2008). ALK é um receptor tirosina-cinase (RTK) e está também implicado como um oncogene em linfomas e câncer de pulmão (Minuti G, *et al.* 2014; Ulivi P, *et al.* 2013). Estudos recentes associam ALK ao desenvolvimento neuronal simpático e sobrevivência das células da crista neural migratórias, sendo essencial para a neurogênese em modelos de *zebrafish* (Wang M, *et al.* 2013). Dados recentes em modelos de neuroblastoma em ratos geneticamente modificados confirmam que ALK e MYCN cooperam promovendo a tumorigênese (Schulte JH, *et al.* 2013). O gene PHOX2B conduz à diferenciação de precursores da crista

neural em neurônios simpáticos (Pei D, *et al.* 2013). Mutações nesta via estão associadas com a doença de Hirschsprung e de síndrome hipoventilação central (Butler Tjaden NE, *et al.* 2013; Di Lascio S, *et al.* 2013). Em alguns estudos, as mutações de perda de função em PHOX2B demonstraram bloquear a diferenciação de neuroblastoma por perturbar a regulação do cálcio (Wang W, *et al.* 2013). PHOX2B pode também inibir a expressão ALK no NB (Bachetti T, *et al.* 2010), sugerindo ainda que a perda de função de PHOX2B contribui para a patogênese de um subconjunto de tumores de NB.

As mutações resultantes da ativação de ALK e PHOX2B também são somaticamente adquiridas em 5 a 15% de neuroblastomas (Mossé YP, *et al.* 2008; Janoueix-Lerosey I, *et al.* 2008; George RE, *et al.* 2008; Chen Y, *et al.* 2008). Assim, os testes genéticos para mutações em ALK e PHOX2B devem ser considerados sempre que um paciente tem histórico familiar de NB ou tem outras condições clínicas que são fortemente sugestivas de mutações altamente transmissíveis, como tumores primários bilaterais das glândulas adrenais. Em NB, a forma esporádica resulta em perdas cromossômicas, tais como a perda de heterozigidade, 1p36.31, e ocorre em 36% dos tumores primários.

1.2.2 Histologia e características moleculares

Histológica e geneticamente, NB é um tumor heterogêneo com 60% de probabilidade de formar metástase (Cheung NK, *et al.* 2013).

Dentro de um único tumor, muitos fenótipos celulares estão presentes (Figura 2), particularmente neuroblastos, células não-neuronais (Schwann, perineural ou satélite) e até mesmo melanócitos podem estar presentes.

A heterogeneidade celular e a maturação (por exemplo, tumores ricos em estroma e pobres em estroma ou tumores de alto risco e de baixo risco com base no grau histológico) correlacionaram-se com comportamento clínico, e estas propriedades foram utilizadas para a classificação e prognóstico da doença (Shimada H, *et al.* 2001).

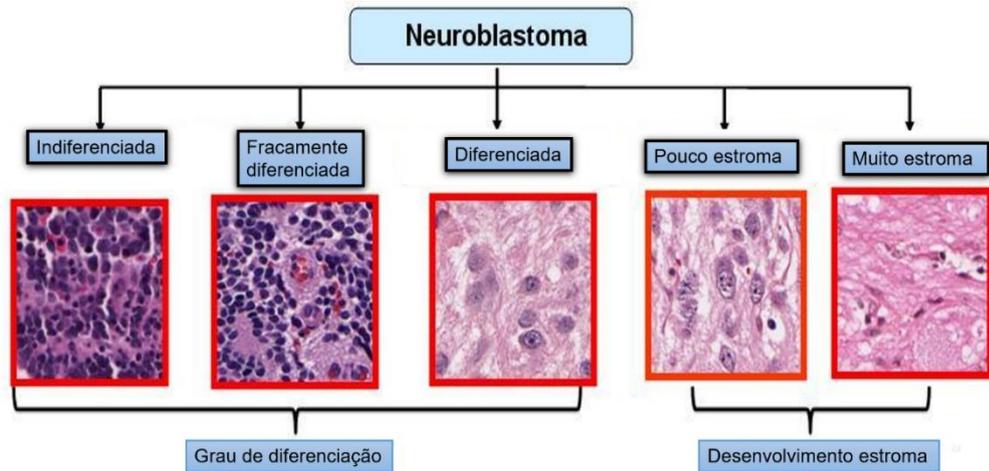
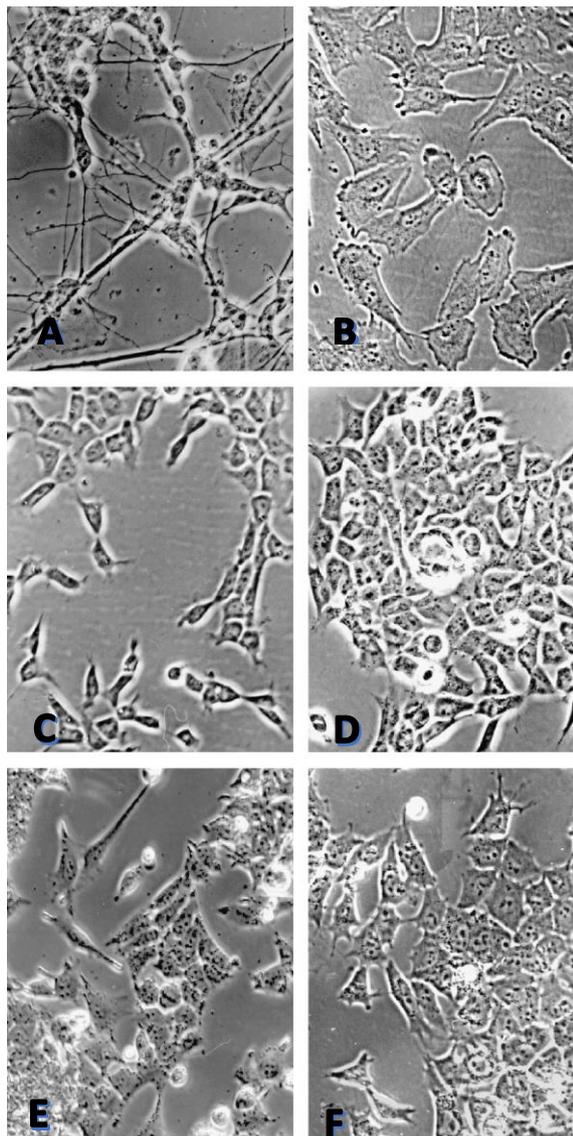


Figura 2: Histologia de Neuroblastomas humanos. Categorização de neuroblastomas em subgrupos que têm importância prognóstica com base no desenvolvimento de estroma de Schwann e o grau de diferenciação. Adaptado: Clinical Image Analysis Laboratory (CIALAB), Ohio State University Medical Center (disponível em: http://bmi.osu.edu/cialab/mia_nb.php, acesso em 10 de maio de 2016).

A mesma heterogeneidade celular encontrada nos tumores dos pacientes é manifestada nas linhagens celulares derivadas destes tumores. Há três fenótipos celulares distintos frequentemente presentes em linhagens celulares de NB (Rettig WJ, *et al.* 1987; Ciccarone V, *et al.* 1989) (Figura 3). Os mais comuns são neuroblastos simpatoadrenal (tipo N), que se caracterizam como células arredondadas com processos neuríticos curtos e expressão de genes associados à diferenciação neuronal. Um segundo tipo de célula (tipo S) se assemelha a

células precursoras não neuronais, uma vez que estas células grandes e achatadas anexam-se fortemente ao substrato e mostram inibição por contato no crescimento celular. Um terceiro tipo de célula (tipo I, por exemplo) apresenta morfologia intermediária entre os tipos N e S; são células pequenas, achatadas, moderadamente aderentes, com ou sem processos neuríticos, as quais formam agregados em cultivo celular *in vitro*. Este último tipo de célula parece representar uma célula-tronco primitiva, um progenitor celular dos tipos N ou S, capaz tanto de autorrenovação quanto de diferenciação bidirecional - capaz de se diferenciar ao longo de duas vias distintas de desenvolvimento da crista neural, neuronal e não neuronal (Ross RA, *et al.* 1995). Em modelos experimentais, o tipo I foi significativamente mais maligno, e a presença nos tumores pode ser relacionada com prognóstico desfavorável (Kamijo T, 2012; Ross RA, *et al.* 2003; Walton JD, *et al.* 2004).

Figura 3: Fotomicrofotografias de contraste de fase de células de NB humano. Linhagens dos três fenótipos diferentes, todos em x135 de ampliação. (A) tipo N, SK-N-CH; (B) tipo S, SH-EP1; e tipos I, (C) SK-N-JD, (D) SK-N-LP, (E) SK-N-HM, e (F) SK-N-ER. Adaptado: Walton JD (2004).



Estudos genéticos extensos sobre NB descobriram uma variedade de alterações genéticas que podem ser agrupadas como aberrações cromossômicas e mutações genéticas. Os ganhos de cromossomo também podem ocorrer, tais como a amplificação MYCN, resultando em teor de DNA diploides ou tetraploides dentro das células afetadas (Maris JM, *et al.* 1999).

Semelhante a outros tipos de câncer, NB se manifesta em alteração genética (Hayat MA, 2012) dos genes responsáveis pelo crescimento celular, ciclo celular e a imunidade, incluindo alterações fenotípicas que podem inibir a diferenciação.

A perda de heterozigossidade (LOH) do 1p36 é altamente associada com a amplificação MYCN. Em geral, a amplificação de MYCN ocorre em aproximadamente 25% dos NB primários, em 40% dos pacientes com doença avançada e em 5% a 10% dos pacientes com a doença em estágio baixo (Brodeur GM, *et al.* 1984). A amplificação de MYCN, é definida como superior a 10 cópias

do gene por célula, e está associada com estágios avançados da doença, a progressão rápida do tumor e o mau prognóstico. Portanto, essa amplificação atua como um poderoso indicador de prognóstico tumoral de comportamento biologicamente agressivo e tem permanecido assim desde sua identificação em 1983 (Brodeur GM, *et al.* 1984; Seeger RC, *et al.* 1985). No entanto, muitos casos de alto risco têm expressão mínima de n-Myc, sugerindo mecanismos adicionais para tumorigênese independentemente da participação de MYCN (Maris JM, 2010).

Várias alterações genômicas foram identificados em NB por gerarem tumores com genótipos distintos caracterizados por diferentes padrões de comportamento clínico. NB pode ser dividido em três principais subtipos baseados em perfis citogenéticos: subtipo 1, 2A e 2B. Subtipo 1 é caracterizada por alterações cromossômicas numéricas, resultando em hiperdiploidia ou próximo triploidia, mas com poucas ou nenhuma anormalidade cromossômica segmentar (SCA), níveis elevados de expressão do receptor cinase tropomiosina (Trk) A (Mosse YP, *et al.* 2007; Schleiermacher G, *et al.* 2012). Os pacientes com estes tumores têm características favoráveis (idade jovem e baixo estágio tumoral) e resultados satisfatórios. O subtipo 2 é caracterizado por uma diploidia acentuada e recorrentes SCAs, alteração no cromossomo 17q e uma alta expressão de receptores tropomiosina cinase (TrkB) e seu ligante (BDNF). No entanto, este subtipo pode ser ainda subdividido em subtipo 2A, que frequentemente tem a perda segmentar de cromossomas 3p, 4p e/ou 11q; e subtipo 2B, que tem deleção do cromossomo 1p e/ou amplificação MYCN. Os subtipos 2A e 2B estão associados com idade avançada, estágio de tumor avançado e um pior resultado clínico (Esteller M, 2007).

Em uma célula normal diploide, encontramos 46 cromossomos, porém a maioria das células de NB (55%) são primárias triploide ou "quase-triploide", contendo entre 58 e 80 cromossomos; o restante (45%) são "quase-diploides" (35-57 cromossomos) ou "quase-tetraploides" (81-103 cromossomos). Pacientes com tumores quase-triploides (também denominado *hyperdiploid*) tipicamente têm prognósticos clínicos e biológicos favoráveis e taxas de sobrevivência excelentes em comparação com aqueles pacientes que têm tumores quase-diploide ou quase-tetraploide (Look AT, *et al.* 1984; Wang M, *et al.* 2013; Brodeur GM, *et al.* 2014).

A patogênese de NB no contexto da embriogênese da crista neural pode ajudar a explicar a heterogeneidade molecular desta doença complexa e ajudar a identificar moléculas e vias biologicamente específicas para intervenções mais objetivas (Louis CU, *et al.* 2015).

1.2.3 Epidemiologia

Atualmente o NB é a principal causa de morte por câncer pediátrico em crianças com idade entre 1 e 5 anos e responsável por aproximadamente 13% de toda a mortalidade por câncer pediátrico (Louis CU, *et al.* 2015). Apresenta uma incidência de 1,3 casos por 100.000 crianças (0-14 anos de idade) (Schwab M, *et al.* 2003; Park JR, *et al.* 2010). É o tumor maligno mais frequente na infância, sendo responsável por >20% dos cânceres diagnosticados durante o primeiro ano de vida, e pode ser detectado no embrião ainda no útero (National Cancer Institute, 2015; Maris JM, *et al.* 2007).

A incidência anual varia entre 7 e 12 casos por milhão de crianças até 15 anos, alcançando estimadamente 7,3 casos/milhão no Brasil. Sendo um tumor embrionário, via de regra se manifesta precocemente. A grande maioria (75%)

apresenta-se em crianças abaixo de 5 anos de idade, com idade média ao diagnóstico de 21 meses, variando de recém-nascidos a 22 anos (Cartum J, 2012).

Em câncer, a regressão espontânea é definida como a diminuição do tamanho ou desaparecimento de um tumor primário ou metastático da doença sem intervenção terapêutica. O NB é consistentemente considerado como um dos cânceres mais comuns de se submeter a regressão espontânea, além do carcinoma renal, melanoma maligno, coriocarcinoma, e tumores linfoides (Challis GB, *et al.* 1990; Papac RJ, 1998; Brodeur GM, *et al.* 2014). Além disso, apresenta-se como um tumor heterogêneo tanto na clínica quanto no prognóstico. Crianças com NB podem apresentar regressão espontânea, enquanto outras apresentam tumores com características genômicas favoráveis e excelente sobrevida global com quimioterapia citotóxica limitada, a qual visa diretamente à morte da célula tumoral (Spix C, *et al.* 2006; Buck J, *et al.* 1991; Brodeur GM, *et al.* 1984).

Embora as características histológicas e biológicas utilizadas dentro de esquemas de classificação continuam a evoluir com base em novos dados científicos, elas são usadas para dividir em estratos os pacientes com baixo, intermediário e alto risco. Em geral, aqueles com a doença de baixo risco têm taxas livres e globais excelentes de sobrevivência com só observação ou mínima intervenção terapêutica. A sobrevida de pacientes com risco intermediário, usando principalmente cirurgia e quimioterapia, tem melhorado ao ponto em que muitos grupos estão focando na utilização de marcadores biológicos para ajudar a diminuir ainda mais a terapia em subpopulações específicas de crianças (Park JR, *et al.* 2013). Em neuroblastoma, rotineiramente consideram-se fatores biológicos (por exemplo, histologia, grau de diferenciação do tumor, DNA ploidia, alterações

cromossômicas, *MYCN* oncogene). Assim, grupos de pesquisa têm permitido a caracterização das informações clínicas e biológicas como um pré-tratamento altamente prognóstico que irá facilitar a comparação nos futuros ensaios clínicos (Hudson M, *et al.* 2014; Ambros PF, *et al.* 2009).

Os pacientes com a doença de alto risco que, compreendem aproximadamente metade de todos os novos casos de NB, necessitam de tratamento com a terapia multimodal usando quimioterapia, cirurgia, radioterapia, alta dose de quimioterapia com uso autólogo de células-tronco da medula óssea, terapia de manutenção biológica e imunoterapêutica, a fim de melhorar a sobrevida. Atualmente o transplante de células-tronco autólogas em associação com ácido retinoico 13-cis (13-cis-RA) são usados como terapia padrão para esse grupo (Davidoff AM, 2012).

1.2.4 Aspectos clínicos e prognóstico

A apresentação clínica é altamente variável, apresentando três padrões distintos: rápida progressão para a doença com risco de vida, maturação para ganglioneuroma benigno (outro tipo de pNT) (Brodeur GM, 2003; Hoehner JC, *et al.* 1995; Haas D, *et al.* 1988; Garvin JH, *et al.* 1984; Shimada H, *et al.* 1999) e regressão espontânea. Cada vez mais evidências indicam que as características biológicas e moleculares de NB são altamente preditivas de comportamento clínico (Davidoff AM, 2012).

A probabilidade de sobrevivência depende da idade do paciente, do estágio e das características biológicas da doença. Crianças com 18 meses de idade ou com idade superior apresentam tumores frequentemente irressecáveis ou

metastáticos, que requerem terapia multimodal intensiva e estão associados a uma taxa de sobrevivência de 40-50%. No entanto, em crianças com menos de 18 meses de idade, os tumores se comportam de forma muito diferente.

Os tumores podem surgir em qualquer lugar ao longo do sistema nervoso simpático, com a maioria ocorrendo na medula adrenal. Os tumores primários no pescoço ou parte superior do tórax podem causar síndrome de Horner (ptose, miose e anidrose). Os tumores ao longo da coluna vertebral podem se expandir através dos espaços intraforaminal e causar compressão das raízes nervosas, resultando em paralisia. Embora muitos NBs em estágio inicial estejam encapsulados e possam ser retirados cirurgicamente com pouca chance de complicações, os tumores de estágio tardio, muitas vezes, se infiltram em estruturas de órgãos locais, cercado nervos, como o eixo celíaco, que são em grande parte não operáveis no momento do diagnóstico. NB formam metástase em nódulos linfáticos regionais e na medula óssea por meio do sistema hematopoiético. Células metastáticas da medula podem se infiltrar na região cortical. NBs também formam metástase no fígado, principalmente em pacientes com tumores estágio 4S, nos quais o envolvimento pode ser mais extenso; no entanto, a regressão transitória e completa muitas vezes ocorre sem intervenção (Maris JM, 2010) (Figura 4).

Embora os pacientes possam inicialmente ter uma resposta à quimioterapia, eles eventualmente desenvolvem recorrência da doença com metastase multifocal e resistência à quimioterapia (Li Z, *et al.* 2015).

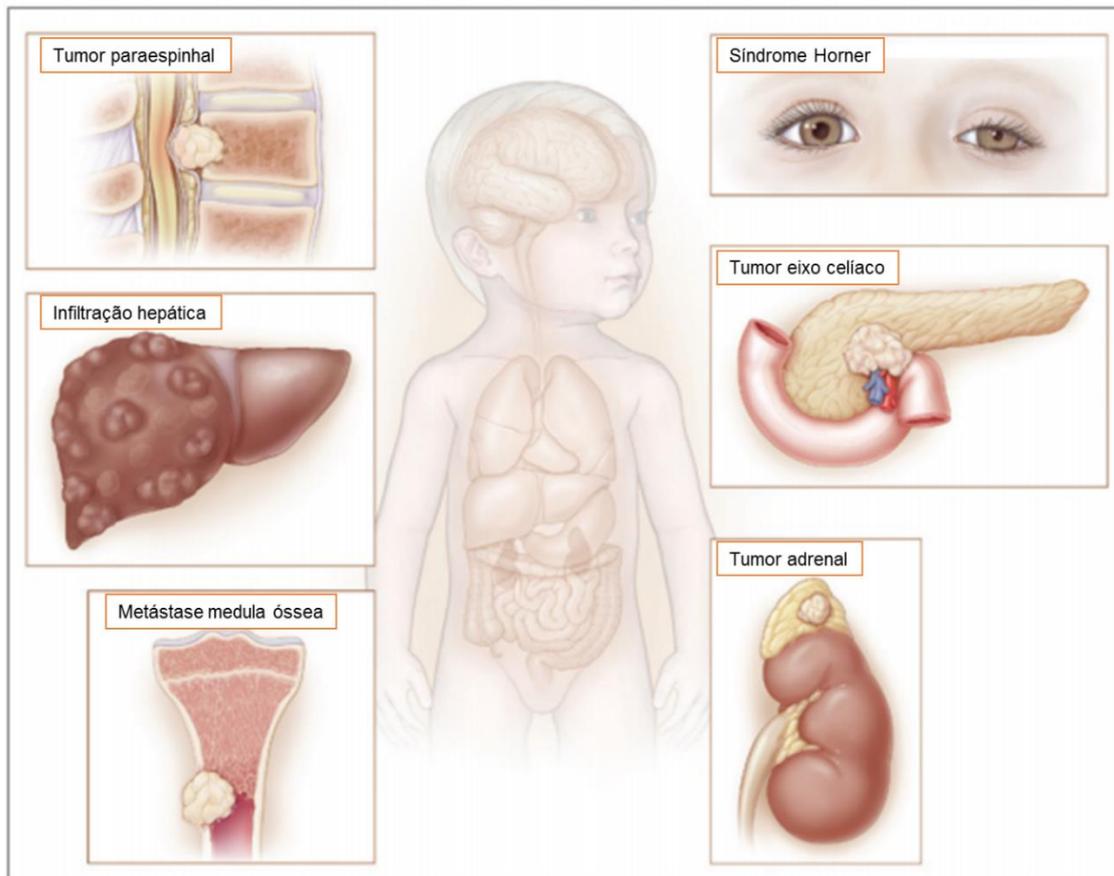


Figura 4: Apresentações clínicas de NB. Locais onde podem ocorrer metástases de NB. Adaptado: Maris JM (2010).

1.2.5 Tratamento

O tratamento do câncer infantil é indiscutivelmente a história mais notável e gratificante da terapia do câncer nas últimas cinco décadas. Durante este tempo, as taxas de sobrevivência de cinco anos têm aumentado constantemente e atualmente é superior a 80% nos países desenvolvidos para todos os locais de câncer pediátrico (Hudson MM, *et al.* 2014) (Figura 5). Enquanto as oportunidades para melhorar o resultado são facilmente visíveis para as malignidades hematológicas, elas são menos aparentes para os tumores sólidos, embora haja exceções. Apesar do sucesso na identificação de tratamentos eficazes para alguns

diagnósticos de câncer, no final do século XX, mais de 20% das crianças diagnosticadas com câncer ainda sucumbiram à doença, e muitos sobreviventes experimentam efeitos em longo prazo que afetam negativamente a sua qualidade de vida. Dadas as alterações genômicas distintas associadas com muitos cânceres infantis, em comparação aos cânceres adultos, será cada vez mais importante identificar e desenvolver agentes que são alvos terapêuticos exclusivos capazes de bloquear seletivamente a atividade oncogênica destes cânceres infantis (Smith MA, *et al.* 2014).

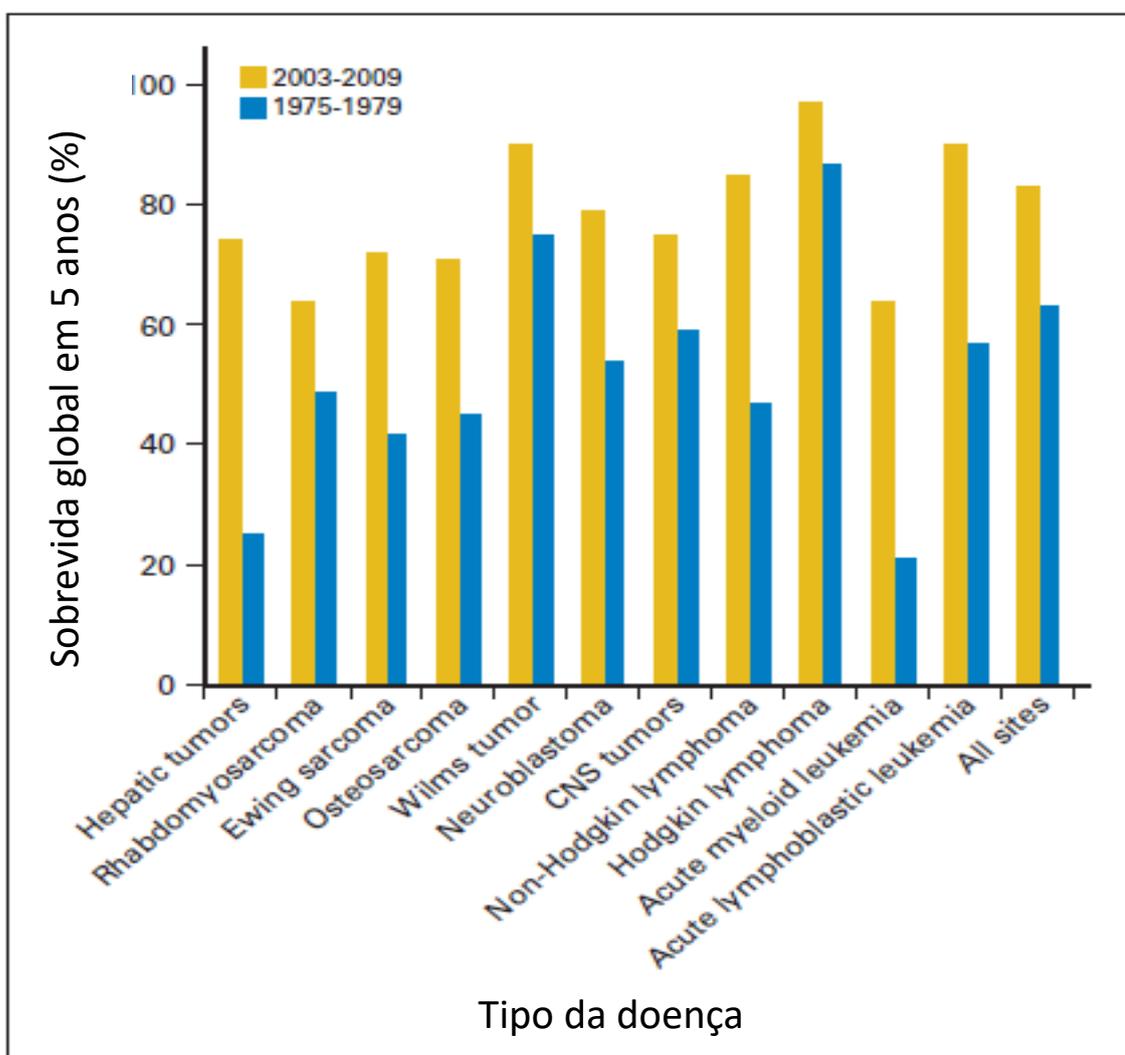


Figura 5: Taxas de sobrevivência de cinco anos para dois períodos de tempo para câncer pediátrico diagnosticada desde o nascimento até 19 anos de idade. Sobrevivência de cinco anos é apresentada para todos os locais (Classificação Internacional de cânceres infantis) e subtipos histológicos específicos, contrastando os resultados para as crianças diagnosticadas entre 1975 e 1979 com aquelas diagnosticadas entre 2003 e 2009. Os dados foram obtidos no Programa Nacional Instituto do Câncer (SEER) com base em casos de pacientes observados através de 2010. Adaptado: Hudson M (2014).

A heterogeneidade biológica dos tumores neuroblásticos que ocorre durante a infância resulta numa dicotomização das estratégias terapêuticas. Para tumores que têm características biológicas favoráveis, há uma tendência de reduzir a intensidade terapêutica. Em contraste, a abordagem para tumores com prognósticos de características adversas mudou ao longo das últimas duas décadas, intensificando a quimiorradioterapia (Maris JM, 2010).

Experimentos realizados na década de 1980 mostraram que linhagens celulares de NB podem ser induzidas a se diferenciarem por exposição a componentes retinoides (Sidell N, 1982; Thiele CJ, *et al.* 1985). Estas observações levaram a um ensaio clínico randomizado em que a isotretinoína (13-cis-RA) foi usada depois da terapia de consolidação mieloablativa em pacientes com NB; o risco de recidiva foi reduzido entre aqueles que receberam isotretinoína (Matthay KK, *et al.* 1999). Embora a isotretinoína faça parte da terapia padrão durante a primeira remissão em pacientes com alto risco de NB, ainda há muitas perguntas não respondidas sobre a dosagem adequada, variação intraindividual e interindividual em características farmacocinéticas, bem como a frequência de toxicidades potenciais de longo prazo.

O tratamento atual para NB de alto risco podem ser divididos em três fases distintas: indução da remissão, consolidação da remissão, e finalmente uma fase

de manutenção focada na erradicação da doença residual mínima. Os dados disponíveis indicam que o aumento da intensidade de quimioterapia de indução está associado a melhorias em taxas de resposta e taxas de sobrevida global (Cheung NV, *et al.* 1991).

Na quimioterapia, os tratamentos atuais incluem ciclos de doses intensivas de cisplatina e etoposídeo (VP-16) com doses alternadas de vincristina (VCR), doxorubicina (doxo) e ciclofosfamida (Kushner BH, *et al.* 1994). Recentemente, pesquisadores do Grupo de Oncologia Infantil (COG/EUA) adicionaram topotecano a este regime de indução com base em dados que mostram atividade antitumoral em casos de recidiva (Längler A, *et al.* 2002; Garaventa A, *et al.* 2003; London WB, *et al.* 2010; Park JR, *et al.* 2006).

A presença de células-tronco tumorais residuais na medula óssea é a mais provável explicação para o fracasso do tratamento. A resistência às drogas é um fator importante que limita a eficácia da quimioterapia. Os tumores podem ser intrinsecamente resistentes antes de quimioterapia, ou podem adquirir resistência durante o tratamento (Kerbel RS, *et al.* 1994). O problema de resistência aos medicamentos é complexo, com inúmeros fatores que afetam a sensibilidade, incluindo: efluxo acelerado de drogas; ativação de drogas e sua inativação; alterações no alvo da droga; metilação de DNA; tratamento de danos induzidos por drogas; e evasão de apoptose. Por isso, alterações epigenéticas podem conferir aquisição de quimiorresistência em tumores sólidos (Wilson TR, *et al.* 2006).

1.3 Epigenética

Epigenética é o estudo das mudanças hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem uma mudança na sequência do DNA (Wolffe AP, *et al.* 1999). Em uma

definição mais ampla, epigenética estuda as adaptações estruturais nas regiões cromossômicas que registram, sinalizam ou perpetuam atividades alteradas (Bird A, 2007). A maioria destas alterações hereditárias é estabelecida durante a diferenciação e mantidas estavelmente através de múltiplos ciclos de divisão celular, permitindo que as células tenham identidades distintas, enquanto contêm a mesma informação genética. Esta herdabilidade dos padrões de expressão gênica é mediada pelas modificações epigenéticas, as quais incluem acetilação, ubiquitinação, fosforilação de histonas e metilação de DNA e remodelação da cromatina (Jenuwein T, *et al.* 2001). O complemento destas modificações, coletivamente referido como o epigenoma, fornece um mecanismo para a diversidade celular, regulando o acesso a informação genética pela maquinaria celular (Sharma S, *et al.* 2010).

Alterações genéticas e epigenéticas interagem em todas as etapas do desenvolvimento do câncer, trabalhando em conjunto para promover a progressão tumoral (Jones PA, *et al.* 1999). A origem genética do câncer é amplamente aceita; no entanto, estudos sugerem que alterações epigenéticas podem ser os principais eventos de iniciação em algumas formas de câncer (Feinberg AP, *et al.* 2006). O fato é que as aberrações epigenéticas, ao contrário das mutações genéticas, são potencialmente reversíveis e podem ser restauradas ao seu estado normal pela terapia epigenética (uso de moduladores epigenéticos), tornando as iniciativas terapêuticas promissoras e relevantes (Yoo CB, *et al.* 2006). Por exemplo, acredita-se que células que contêm mutações gênicas devem ser mortas ou removidas para evitar propagação descontrolada do DNA danificado (Kanherkar RR, *et al.* 2014). Além disso, as mudanças epigenéticas são diferentes das mutações genéticas no

sentido de que uma hipermetilação epigenética afeta muitos genes dentro de uma única célula tumoral (Coppede, 2014).

O câncer é uma doença complexa impulsionada por múltiplas alterações genéticas e epigenéticas. Compreender as alterações (epi) genéticas e a consequente desregulação das vias, que são perturbadas nas células tumorais pode fornecer pistas para novas oportunidades terapêuticas. Além disso, tais evidências sobre a patologia molecular de um dado tipo de câncer podem oferecer marcadores genéticos relevantes clínicos ou assinaturas moleculares para avaliação do prognóstico e resposta terapêutica ou predição de risco de recidiva. Portanto, como para muitos outros tumores, o NB tem sido alvo de intensivas pesquisas epigenômicas (Decock A, *et al.* 2011).

As mudanças epigenéticas que afetam a expressão de genes relevantes para o desenvolvimento NB foram inicialmente relatadas há mais de uma década (Astuti D, *et al.* 2001; Takita J, *et al.* 2000) e vários estudos têm sugerido que as alterações na metilação do gene e modificação das histonas estão relacionados com o resultado do paciente (Barbieri E, *et al.* 2014; Grau E, *et al.* 2010; Yang Q, *et al.* 2007; Decock A, *et al.* 2011). A correlação entre mudanças epigenéticas e o comportamento de NB tem sido cada vez mais estudada, especialmente porque a análise de sequenciamento nova geração (NGS) de NB tem relatado um número muito limitado de mutações somáticas recorrentes antes não reconhecidas (Pugh TJ, *et al.* 2013; Cheung NK, *et al.* 2012; Sausen M, *et al.* 2013; Molenaar JJ, *et al.* 2012). Além disso, os dados de outros tipos de tumores infantis, particularmente o tumor de Wilms e o meduloblastoma, sugerem que as mudanças epigenéticas podem ajudar a explicar aspectos pouco conhecidos da apresentação da doença e

o comportamento clínico (Batora NV, *et al.* 2014; Feinberg AP, 2004; Feinberg AP, *et al.* 2004).

Dois grupos de agentes que provocam modificações epigenéticas serão estudados nesse trabalho, os inibidores de histonas desacetilases (HDACi) e os inibidores de DNA metiltransferase (DNMTi).

1.3.1 Modificação de histonas

A estrutura da cromatina é composta de unidades repetidas chamadas de nucleossomos, os quais consistem de aproximadamente 146 pares de bases de DNA enrolados ao redor de um octâmero de quatro núcleos de proteínas histonas (H3, H4, H2A e H2B) (Luger K, *et al.* 1997) (Figura 6).

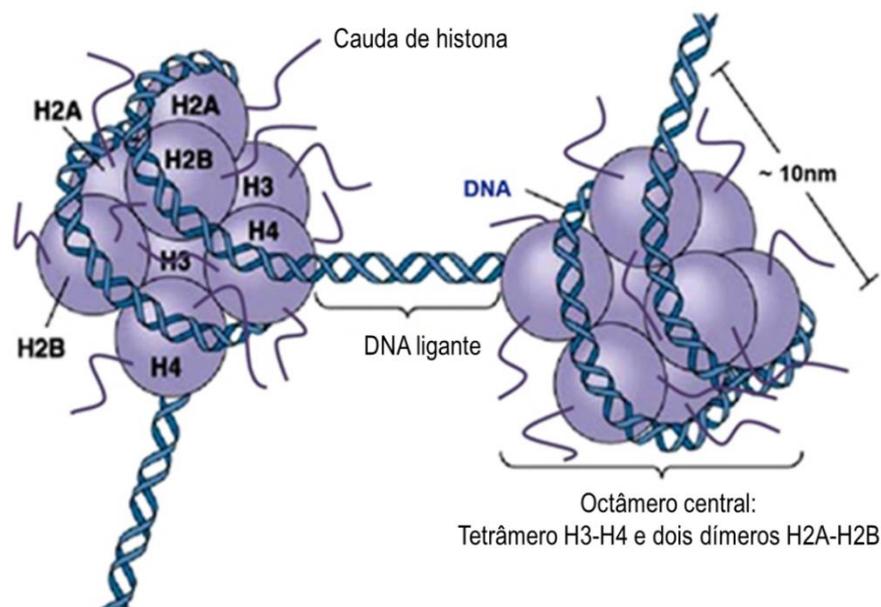


Figura 6: Representação esquemática do nucleossomo. As histonas fornecem a base para o nucleossomo, a unidade básica da estrutura da cromatina. O núcleo do nucleossomo é constituído por um octâmero de histona, tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B

H2A-H2B. A dupla hélice do DNA é enrolada em torno (~ 1,7 vezes) do octâmero de histonas. Adaptado: Kim YZ (2014).

Essa estrutura da cromatina define o estado em que a informação genética na forma de DNA é organizada dentro de uma célula. Esta organização do genoma em uma estrutura compacta e precisa influencia muito nas habilidades dos genes de serem ativados ou silenciados (Sharma S, *et al.* 2010).

As proteínas histonas contêm um domínio C-terminal globular e uma cauda desestruturada N-terminal (Luger K, *et al.* 1997). As caudas N-terminais das histonas podem ser submetidas a uma variedade de modificações covalentes pós-traducionais, incluindo a metilação, acetilação, ubiquitinação, sumoilação e fosforilação específica sobre resíduos. Estas modificações regulam processos celulares chave tais como a transcrição, a replicação e a reparação (Kouzarides T, 2007; Thomas LR, *et al.* 2015).

Ao contrário da metilação do DNA, a acetilação nas histonas pode conduzir a ativação ou repressão, dependendo de quais os resíduos são modificados e do tipo de modificação presente (Sharma S, *et al.* 2010). A acetilação de histonas abre a estrutura de cromatina condensada, reduzindo a afinidade do DNA pelas histonas e libertando as caudas das histonas do DNA ligante, permitindo assim que fatores de transcrição, co-factores, e complexos RNA polimerase II acessem o DNA. Os níveis de acetilação são o resultado do equilíbrio das atividades de enzimas denominadas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC). HATs acetilam caudas amino-terminais do aminoácido lisina das proteínas histonas; em contraste, as HDACs são enzimas que removem os grupos acetil do aminoácido lisina das proteínas histonas, devolvendo o estado basal às histonas ou a repressão gênica (Chen HP, *et al.* 2015; Kazantsev AG, *et al.* 2008) (Figura 7).

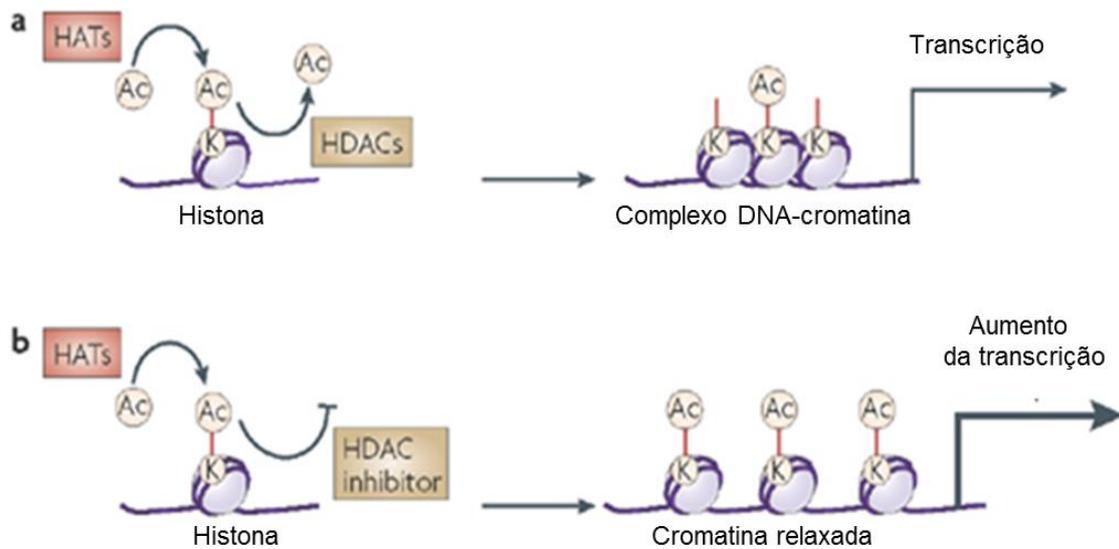


Figura 7: Efeito de inibidores de HDAC na remodelação da cromatina e na transcrição. **a.** Níveis de acetilação da histona em resíduos específicos de lisina (K) são determinados por meio de reações simultâneas de acetilação (Ac) e desacetilação, as quais são mediadas por histona acetilases (HATs) e histona desacetilases (HDACs). Esta acetilação das histonas é vital para estabelecer a estrutura conformacional de complexos de DNA-cromatina e a expressão gênica posteriormente da transcrição. **b.** Ao bloquear a reação de desacetilação, os inibidores de HDAC alteram o equilíbrio dos níveis de acetilação da histona, levando ao aumento da acetilação, a modificação da cromatina, conformação mais relaxada e o aumento da transcrição. Adaptado: Kazantsev AG (2008).

As HDAC estão tipicamente presentes em complexos multiproteicos corepressores. Há 18 HDACs identificadas em mamíferos (Verdin E, *et al.* 2003). Estas HDACs podem ser subdivididas em quatro classes (Tabela 1) com base na sua homologia com levedura (Bolden JE, *et al.* 2006). A classe I inclui HDAC1, -2, -3, -8 e mostra homologia com Rpd3 em levedura, e é geralmente detectada no núcleo. HDACs de classe I são ubiquamente expressas em vários tecidos e linhagens celulares de mamíferos (Yang XJ, *et al.* 2008). A classe II compreende HDAC4, -5, -6, -7, -9 e -10, que têm um elevado grau de homologia com a proteína Hda1 e podem ser subdivididas em duas subclasses: classes de IIa (HDAC 4, -5, -

7, E -9) e IIb (HDAC 6 e -10). A classe II exibe expressão específica em tecidos e pode transitar entre o núcleo e o citoplasma regulado por fosforilação, a qual sugere que as HDACs de classe II podem estar envolvidas na acetilação de proteínas não-histonas. A classe III consiste em Sirt1, -2, -3, -4, -5, -6 e -7, que são homólogas ao repressor transcricional de levedura. A estrutura e função de HDAC classe III são distintas de todas as outras HDACs (Michishita E, *et al.* 2005). A HDAC 11 é o único membro das HDACs de classe IV. As HDACs de classes I, II, e IV dividem características comuns, tais como a sua dependência do íon zinco para a sua atividade enzimática e a inibição por inibidores de amplo espectro de inibidores de HDAC, tais como tricostatina A (TSA), ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) e LB589, enquanto as enzimas desacetilases de classe III são NAD⁺ dependentes, que são insensíveis a TSA (Scroggins BT, *et al.* 2007). HDACs têm um aumento de expressão em muitos tipos de câncer, incluindo os de ovário, de mama, bexiga e outros (Hayashi A, *et al.* 2010; Muller BM, *et al.* 2013; Poyet C, *et al.* 2014) e acredita-se que promovem a carcinogênese através da acetilação e interação com os reguladores transcricionais. Assim, as enzimas de HDAC são identificadas como alvos importantes para a terapia do câncer. Inibidores de HDAC causam mudanças no estado de acetilação cromatina e em outras proteínas não-histona, resultando em alterações na expressão gênica, indução de apoptose, parada do ciclo celular e na inibição da angiogênese e de metástases (Ma X, *et al.* 2009).

Tabela 1: Enzimas histona desacetilase: classificação, tamanho de aminoácidos, localização celular, funções fisiológicas e disponibilidade de estrutura cristal. Adaptado: Mottamal M (2015).

Metal dependente					
Classe	Membros	Tamanho (aa)	Localização celular	Função fisiológica	Cristalografia raio X
I	HDAC 1	483	Núcleo	Sobrevivência e proliferação celular	Sim
	HDAC 2	488	Núcleo	Proliferação celular e resistência insulina	Sim (domínio do núcleo)
	HDAC 3	428	Núcleo	Sobrevivência e proliferação celular	Sim
	HDAC 8	377	Núcleo	Proliferação celular	Sim
IIA	HDAC 4	1084	Núcleo/citoplasma	Regulação de esqueletogênese e gliconeogênese,	Sim (catalítico e domínios ricos em glutamina)
	HDAC 5	1122	Núcleo/citoplasma	Crescimento e função cardiovascular, gliconeogênese, miócitos cardíacos e função celular endotelial	Não
	HDAC 7	912	Núcleo/citoplasma	Diferenciação de timócitos, função endotelial, glicogenose	Sim (domínio catalítico)
	HDAC 9	1069	Núcleo/citoplasma	Recombinação homóloga, diferenciação timócitos, função e crescimento cardiovascular	N (estrutura é conhecida por 138-158 aa)
IIB	HDAC 6	1215	Citoplasma	Motilidade celular, controle da dinâmica do citoesqueleto	Sim (dedo de zinco e domínios ligantes a ubiquitina)
	HDAC 10	669	Citoplasma	Recombinação homóloga, sobrevivência celular mediada por autofagia	Não
IV	HDAC11	347	Núcleo	Imunomoduladores na replicação de DNA	Não
NAD⁺ Dependente					
III	SIRT 1	747	Núcleo/citoplasma	Envelhecimento, regulação redox, sobrevivência celular, regulação do sistema auto-imune	Sim (domínio catalítico)
	SIRT 2	389	Núcleo	Migração, sobrevivência e invasão celular	Sim
	SIRT 3	399	Mitocôndria	Ciclo da ureia, equilíbrio redox, regulação ATP, metabolismo, apoptose e sinalização celular	Sim
	SIRT 4	314	Mitocôndria	Metabolismo energético, regulação ATP, metabolismo, apoptose e sinalização celular	Não

SIRT 5	310	Mitocôndria	Ciclo da ureia, metabolismo energético, regulação ATP, metabolismo, apoptose e sinalização celular	Sim
SIRT 6	355	Núcleo	Regulação metabólica	Sim
SIRT 7	400	Núcleo	Apoptose	Não

Além disso, a expressão das enzimas HDAC pode ser regulada positiva ou negativamente em vários tipos de câncer. No entanto, a maioria dos estudos mostram que há uma variação considerável nos níveis de expressão entre tumores da mesma entidade. Em geral, a expressão de HDAC classe I tende a ser maior em amostras tumorais em comparação com o tecido normal correspondente. Em contraste, a HDAC classe II parece ser regulada negativamente, e a alta expressão é correlacionada com um melhor prognóstico (Weichert W, 2009). O aumento da atividade de HDAC leva à hipoacetilação de proteínas alvo, por exemplo, histonas em regiões promotoras de genes supressores tumorais, resultando assim na repressão transcricional (Santos-Rosa H, *et al.* 2005). Curiosamente, mutações em genes que codificam as HDACs são raramente encontradas no câncer (Lafon-Hughes L, *et al.* 2008).

Dentre os fármacos que inibem a modulação de histonas Vorinostat (Zolinza®), à base de hidroxamato, foi o primeiro inibidor HDAC a ser aprovado pelo FDA em 2006 para o tratamento de linfoma cutâneo de células T refratário em pacientes que receberam duas ou mais terapias sistêmicas anteriormente. É considerado inibidor de todas as HDACs dependentes de zinco em concentrações nanomolares. Estudos sugerem que tem efeito inibitório fraco em enzimas Classe IIa (Bradner JE, *et al.* 2010). Vorinostat induz a diferenciação celular, por exemplo, de células de eritroleucemia, provoca o aumento dos níveis de p21 (regulador de progressão do ciclo celular) e a parada do ciclo celular na fase G1. Este composto inibe o crescimento celular em grande parte das linhagens celulares tumorais e em modelos animais gera pouca toxicidade (Jones P, *et al.* 2008). Um segundo inibidor de HDAC aprovado pelo FDA para linfoma cutâneo de células T refratário foi Romidepsina (Istodax®) em 2009. Romidepsina foi isolado de *Chromobacterium*

violaceum e inibe a atividade de HDAC a concentrações nanomolares. É um pró-fármaco que é ativado por um composto denominado tiol (Furumai R, *et al.* 2002).

O butirato é sintetizado através da fermentação de fibras não digeríveis por bactérias no cólon (Pryde SE, *et al.* 2002; Barcenilla A, *et al.* 2000). Também pode ser produzido em concentrações muito mais baixas em células de mamíferos através da oxidação de ácidos graxos e do metabolismo da glicose (Pouteau E, *et al.* 2003; Wolever TM, *et al.* 1997) e pode ser encontrado em óleos vegetais e gorduras de animais (Layden BT, *et al.* 2013).

1.3.1.1 Butirato de sódio (HDACi)

Butirato de sódio (NaB) (Figura 8) é um ácido graxo de cadeia curta com fórmula molecular $C_4H_7O_2Na$, é comumente utilizado em estudos farmacológicos e conhecido pela sua ação de inibir HDAC (HDACi), o que resulta em um aumento da acetilação de histona (Sealy L, *et al.* 1978; Candido EP, *et al.* 1978).

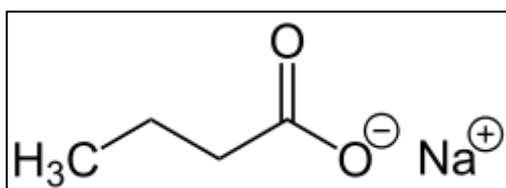


Figura 8: Estrutura molecular do butirato de sódio.

Em vários modelos, como a doença de Huntington, estudos mostram que NaB e fenilbutirato, um análogo estruturalmente semelhante, resgatam a acetilação de histona, evitando a morte celular neuronal e estendendo o tempo de vida de ratos (Ferrante RJ, *et al.* 2003; Gardian G, *et al.* 2005). Os mecanismos de ação de NaB são múltiplos, mas muitos deles estão relacionados com a regulação da expressão gênica (Berni Canani R,

et al. 2012). A capacidade de NaB para reativar genes epigeneticamente silenciados em células tumorais, tais como o inibidor do ciclo celular, p21 e a proteína pró-apoptótica Bcl-2 e, para ativar estes genes em células normais, tem importante implicações para a prevenção e terapia do câncer. NaB também tem capacidade de reprimir a angiogênese *in vitro* e *in vivo* e reduzir a expressão de fatores pró-angiogênicos, incluindo fatores indutíveis por hipoxia (HIF-1a) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Deroanne CF, *et al.* 2002; Bolden JE, *et al.* 2006; Liang D, *et al.* 2006).

Em células tumorais, o NaB apresenta atividade antitumoral significativa em vários tipos de câncer. Estudos do nosso grupo relataram efeito anti-proliferativo em células de neuroblastoma murino (Abujamra AL, *et al.* 2009) e meduloblastoma humano (Nör C, *et al.* 2013). Outros estudos demonstraram que o NaB induz apoptose em células de melanoma metastático aumentando a acetilação e conseqüentemente aumentando a expressão de p53 (gene supressor tumoral, que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose) e aumentando a expressão de Bax (proteína pró-apoptótica) (Bandyopadhyay D, *et al.* 2004) e redução do nível de Bcl-2 no câncer de mama (Louis M, *et al.* 2004). Em células tronco tumorais de câncer do endométrio, NaB inibiu a proliferação celular (Kato K, *et al.* 2011).

1.3.2 Metilação

A metilação do DNA é uma importante modificação epigenética que está fortemente envolvida no controle fisiológico da expressão genômica. Processos de desenvolvimento e funções biológicas são fortemente dependentes de padrões de expressão gênica hierárquicos. Numerosos processos moleculares controlam a expressão gênica, e a metilação do DNA é um desses processos epigenéticos que conduz a repressão prolongada da expressão (Lissa D, *et al.* 2016). A metilação é a modificação epigenética

mais comum que envolve a adição do grupo metil a resíduos 5'-citosina e é muitas vezes detectada em sequências de dinucleotídeos de CpG (Liu H, *et al.* 2016). Esse processo está frequentemente localizado em regiões promotoras e ocasionalmente em regiões reguladoras de transcrição em mamíferos, plantas e até procariotos. A metilação de DNA pode ser classificada como hiper ou hipo- metilação, de acordo com o aumento ou diminuição dos níveis de modificação genômica, respectivamente. Hipermetilação é uma alteração epigenética que muitas vezes leva à inativação de genes a deleções e translocações. Células hipermetiladas podem exibir um fenótipo de resistência a drogas (Wilson TR, *et al.* 2006) ou a proliferação celular; em células eucarióticas, a metilação pode levar ao silenciamento de genes importantes, tais como os genes supressores tumorais, que afetam vias de transcrição, podendo ter como consequência o desenvolvimento de doenças como o câncer (Bird A, 2002). Portanto, a metilação considera-se uma característica tumoral, sendo detectada em vários tipos de células tumorais, incluindo as do cólon, de mama, de ovário e de câncer de colo de útero, e está associada com alterações na expressão gênica específica (Alokail MS, *et al.* 2015; Brevini TA, *et al.* 2016).

1.3.2.1 Decitabina e 5-azacitidina (DNMTi)

Azanucleosídeos (Figura 9) são ferramentas moleculares que atuam na indução da desmetilação de DNA em modelos celulares. No entanto, é sabido que doses elevadas podem induzir pronunciada toxicidade em pacientes. Quando esquemas de dosagem foram adaptados para aperfeiçoar efeitos epigenéticos, tornou-se cada vez mais importante demonstrar a desmetilação de DNA em pacientes. Vários estudos têm mostrado que 5-Aza-2'-desoxicitidina (decitabina) pode induzir uma desmetilação significativa em pacientes com leucemia e com síndrome mielodisplásica (Mund C, *et al.*

2005; Yang AS, *et al.* 2006), e resultados adicionais sugerem que azacitidina pode ter efeitos epigenéticos comparáveis em pacientes (Gore SD, *et al.* 2006; Soriano AO, *et al.* 2007).

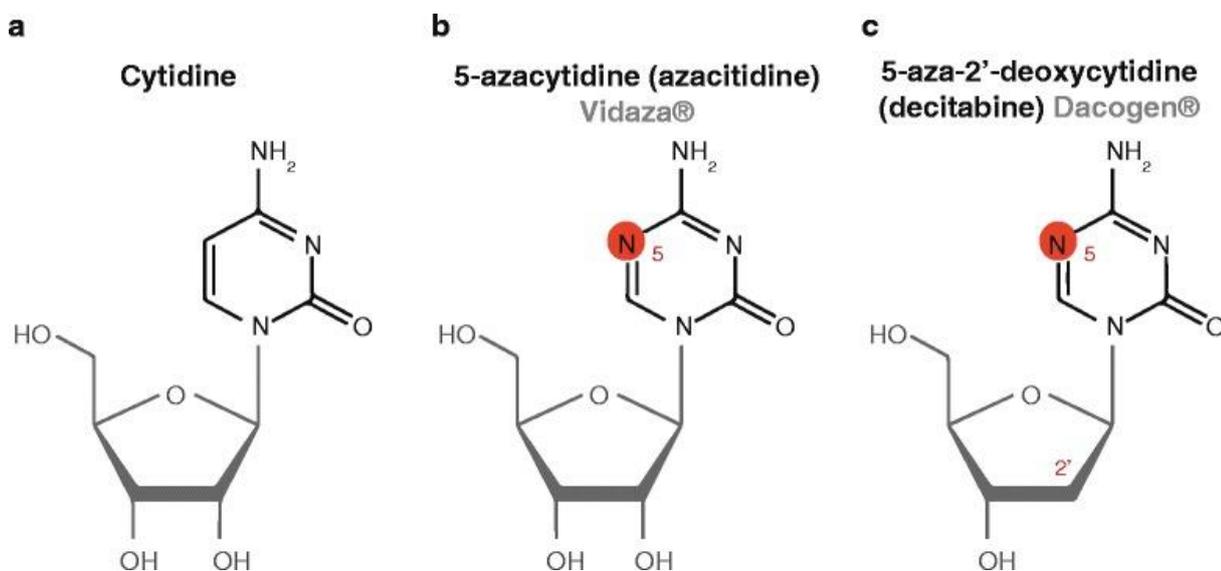


Figura 9: Nucleosídeo de citidina (a) e azanucleosídeo (b, c), estruturas químicas. As porções de açúcar são indicadas em cinza, e as mudanças químicas entre nucleosídeos citidina e azanucleosídeos são destacadas em vermelho. Adaptado Diesch J, (2016).

A lógica por trás da terapia de desmetilação é a capacidade de inibidores de DNA metiltransferases reverterem o silenciamento gênico induzido pela hipermetilação (Mund C, *et al.* 2006). O silenciamento gênico de supressores tumorais e de outros genes relacionados ao câncer induzido pela hipermetilação desempenha um papel fundamental na tumorigênese humana (Esteller M, 2007). A reversão destas mutações epigenéticas pode, portanto, restaurar o controle de proliferação e a sensibilidade a apoptose. A identificação de tais eventos em pacientes submetidos à terapia desmetilação tem sido notavelmente difícil. Os nucleosídeos 5-Azacitidina (5-Aza) e decitabina foram desenvolvidos como clássicos agentes citostáticos (Sorm F, *et al.* 1964). Posteriormente, foi demonstrado que estes compostos inibem a metilação do DNA em linhagens celulares

humanas, o que proporcionou uma explicação mecanicista para a sua atividade de modulação à diferenciação (Jones PA, *et al.* 1980). Estudos anteriores confirmam que a atividade máxima de desmetilação foi observada após 48 horas, mostrando que a exposição prolongada ao fármaco pode causar respostas mais pronunciadas (Bender CM, *et al.* 1999). Após a absorção celular, os nucleosídeos precisam ser ativados e metabolicamente convertidos em um nucleotídeo ativo para a inibição da metilação do DNA. Após terem sido metabolizados, os azanucleosídeos podem tornar-se substratos para a maquinaria de replicação do DNA e serão incorporados no DNA, onde 5-Aza pode substituir a citosina. Os dinucleotídeos aza-citosina-guanina são reconhecidos pelas DNA metiltransferases como um substrato natural, e as enzimas iniciarão a reação de metilação por um ataque nucleofílico. Isto resulta na criação de uma ligação covalente entre o átomo de carbono-6 do anel citosina e a enzima (Santi DV, *et al.* 1984; Chen L, *et al.* 1991).

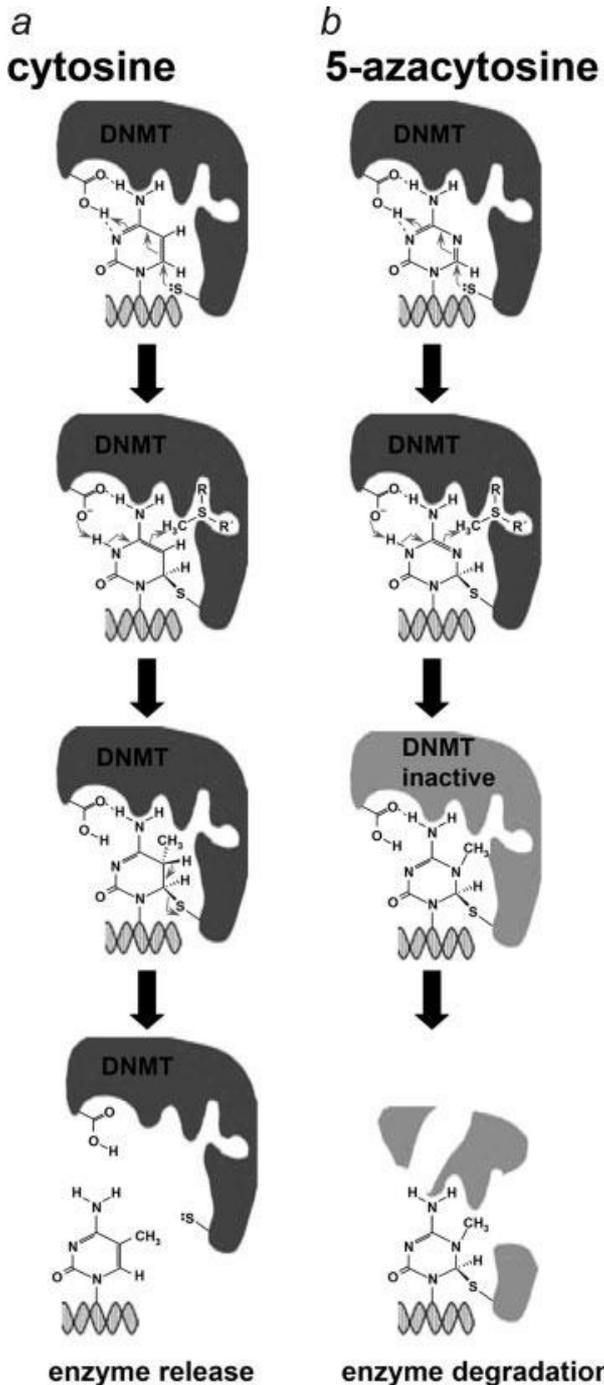


Figura 10: Mecanismo de 5-aza. **a.** Um ataque nucleofílico do grupo de proteína-tiol na posição C6 da citosina impulsiona a subsequente transferência do grupo metil do doador de metil S-adenosil-L-metionina. A transferência prossegue através de um complexo covalente na posição C6 entre o DNA e a proteína DNMT. O complexo é resolvido através de uma reação β -eliminação resultando na liberação da enzima DNA metiltransferase ativa. **b.** Inibição baseada em mecanismo de DNMTs por conter azacitossina-DNA. O complexo covalente em C6 não pode ser resolvido através de β -eliminação, devido à presença de um átomo de nitrogênio na posição 5. Covalentemente DNMTs são degradadas, resultando na depleção de DNMTs celulares. Adaptado: Stresemann C, (2008).

A ligação é normalmente resolvida por β -eliminação através do átomo de carbono-5, mas a reação é bloqueada com azacitidina, em que o carbono-5 é substituído pelo nitrogênio. Assim, a enzima permanece covalentemente ligada ao DNA, e a sua função DNA metiltransferase é bloqueada. Além disso, a ligação covalente da proteína também compromete a funcionalidade do DNA que ativa as vias de sinalização de reparo,

resultando na degradação de DNA metiltransferase (Figura 10). Como consequência, a marca da metilação torna-se perdida durante a replicação do DNA.

Estudos mostraram que o pré-tratamento de linhagens celulares de NB com 5-Aza-dC significativamente aumentou a sensibilidade a apoptose induzida por cisplatina, VP-16 e doxo. Interessantemente, as linhagens celulares de NB variam no seu grau de desmetilação de DNA em resposta a 5-Aza-dC, associado à expressão alterada de enzimas e transportadores envolvidos no metabolismo de 5-Aza-dC (Charlet J, *et al.* 2012).

Além disso, alguns estudos usaram a combinação TSA e 5-Aza-dC. Genes que são novamente expressos após tratamento com 5-Aza-dC e / ou TSA (reativada) podem ser silenciados devido a metilação do DNA /modificações de histonas. Esta abordagem pode ser aplicada apenas em linhagens celulares em que ocorre desmetilação após várias divisões celulares (Decock A, *et al.* 2011).

Assim como em outros tipos de câncer, é claramente mostrado que NB é uma doença regulada por mecanismos epigenéticos (Figura 11). As abordagens de genes candidatos conduziram à descoberta de regiões metiladas em vias relacionadas com a apoptose em NB. Os genes supressores tumorais "clássicos" não mostram um sinal claro de metilação em NB (Decock A, *et al.* 2011).

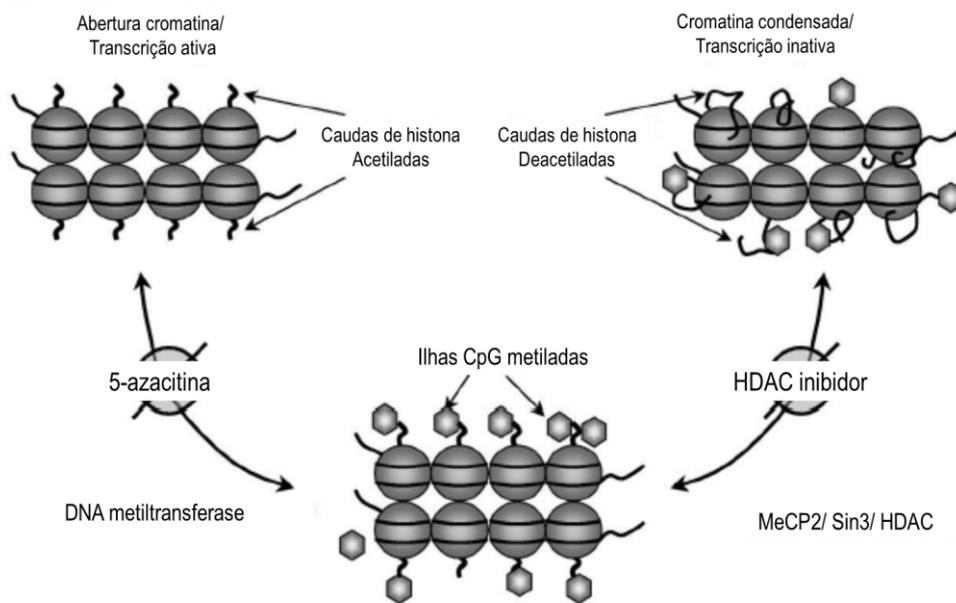


Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos de ação de HDACi (NaB) e DNMTi (5-Azacitidina). NaB permite a transcrição gênica, inibindo a retirada do grupo acetil da cauda de histonas realizado pelas enzimas HDAC. A 5-Azacitidina ativa a transcrição gênica através da inibição de enzimas DNA metiltransferase, não ocorrendo o silenciamento gênico. Adaptado: Griffiths EA, (2008).

1.4 Terapia de diferenciação

Os últimos 50 anos nos mostram que o tratamento de pacientes com câncer, em abordagens convencionais (por exemplo, agentes citotóxicos convencionais, anticorpos direcionados ou inibidores de moléculas pequenas) não é suficiente para curar uma proporção significativa de pacientes com câncer (Cruz FD, *et al.* 2012).

A terapia de diferenciação é uma modalidade terapêutica destinada à reativação endógena do programa de diferenciação em células cancerosas com subsequente maturação tumoral celular e perda concomitante do fenótipo do tumor; pelo trabalho de G. Barry Pierce, pode-se traçar as origens conceituais da terapia de diferenciação, que postulou que células malignas podem diferenciar-se em células não malignas (Pierce GB, *et al.* 1971; Pierce GB, 1983). Uma desvantagem da terapia de diferenciação é a

inferioridade teórica e prática em comparação às abordagens citotóxicas novas e até mesmo às convencionais. A terapia de diferenciação faz alusão a um processo mais complexo de transição de câncer para o tecido normal (Cruz FD, *et al.* 2012).

1.4.1. Vitamina A

A vitamina A e seus derivados (retinoides) exercem uma grande variedade de efeitos sobre desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação e apoptose. A vitamina A não pode ser sintetizada por qualquer espécie animal e é obtida somente através da dieta, na forma de retinol, éster de retinol, ou β -caroteno, tendo sido usada para o tratamento de cegueira noturna por milhares de anos (Bushue N, *et al.* 2010).

Após a ingestão, a vitamina A é armazenada como ésteres de retinil em células hepáticas. Retinol é reversivelmente oxidado por retinol desidrogenases para produzir retinal. Subsequentemente, retinal pode ser irreversivelmente oxidado em *all trans* ácido retinoico (ATRA) por retinal desidrogenases, e adicionalmente oxidado pelas enzimas do citocromo P450 (principalmente CYP26) no tecido hepático. Retinol tem cinco isoformas biologicamente ativas que incluem ATRA, 11-cis, 13-cis, 13-di-cis e 9-cis, sendo ATRA a forma fisiológica predominante e um retinoide endógeno com atividade biológica (Napoli JL, 1996; Achkar CC, *et al.* 1996; Buck J, *et al.* 1991). ATRA isomeriza em condições experimentais e fisiológicas. A forma *all-trans* retinol circula no sangue ligado a proteína sérica retinol (RBP). Dentro das células, *all-trans* retinol e seu produto de oxidação, *all-trans* retinal, estão associadas com diferentes isoformas de proteínas ligantes ao retinol celular (CRBP), enquanto ATRA liga-se intracelularmente em isoformas proteicas ligantes ao ácido retinoico (CRABP) (Bushue N, *et al.* 2010) (Figura 12).

Ácido retinoico (RA) regula a expressão gênica pela ligação ao seu receptor nuclear, que por sua vez ativa a transcrição de genes alvo *downstream*. Assim, os

retinoides exercem suas funções biológicas principalmente pela regulação da expressão gênica. Os retinoides apresentam duas classes distintas de receptores: receptores de ácido retinoico (RAR) e receptores x retinoides (RXR). Cada receptor contém três subtipos – α , β , e γ . RARs podem ser ativados tanto por ATRA quanto por 9-cis-RA, enquanto que os RXR são exclusivamente ativados por 9-cis-RA. No entanto, devido à conversão de ATRA em 9-cis-RA, a altas concentrações micromolares, ATRA pode ativar a transcrição gênica em células transfectadas com RXRs (Heyman RA, *et al.* 1992).

Os RXR podem formar homo e heterodímeros com outros receptores, sendo receptores promíscuos que formam heterodímeros com muitos tipos diferentes de receptores, os quais incluem receptores para os ácidos graxos e RA (RAR). Estes receptores ativados por seus ligantes regulam a transcrição de genes através da ligação a elementos responsivos ao ácido retinoico (RAREs) em regiões promotoras de genes responsivos (Bastien J, *et al.* 2004).

A expressão alterada dos receptores de RA está também associada com transformação maligna de tecidos animais ou células cultivadas. Além disso, retinoides suprimem carcinogênese em modelos animais com tumores na pele, em regiões orais, pulmão, mama, bexiga, ovário e próstata (Bukhari MH, *et al.* 2007; Wang Y, *et al.* 2009; Pisano C, *et al.* 2007; Shah RK, *et al.* 2001; Li Y, *et al.* 2008; Moon RC, *et al.* 1994; Liu B, *et al.* 2005).

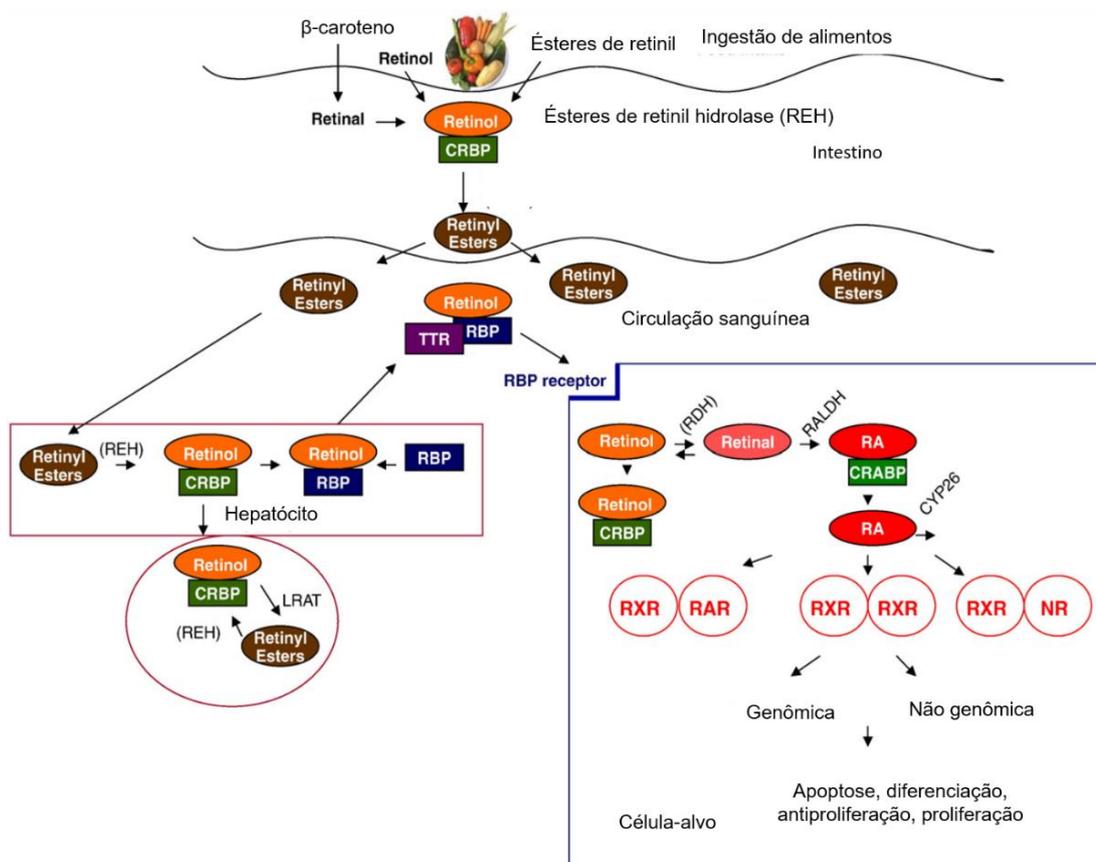


Figura 12: Vias de sinalização dos retinoides. Os retinoides absorvidos dos alimentos são convertidos em retinol e ligam-se a CRBP no intestino. Em seguida, o retinol é convertido em ésteres de retinil e entra na circulação sanguínea. O fígado tira os ésteres de retinil, que são convertidos em complexo retinol-RBP no hepatócito. No soro, o complexo retinol-RBP é ligado a transtirretina (TTR) em uma proporção de 1: 1 para evitar eliminação pelos rins e para assegurar que o retinol seja entregue à célula alvo. A captação de retinol pela célula alvo é mediada por uma proteína transmembrana, que é um receptor de RBP. Na célula alvo, retinol liga-se a CRBP ou é oxidado para retinaldeído pela desidrogenase de retinol (RDH) numa reação reversível. Em seguida, retinaldeído pode ser oxidado por retinaldeído desidrogenase (RALDH) para RA. Na célula alvo, RA liga-se a CRABP ou entra no núcleo e liga-se a receptores nucleares para regular a transcrição gênica. Alternativamente, RA pode mediar mecanismos de vias não genômicas e

regula a função celular. Os hepatócitos não apenas processam os retinoides, mas também são as células alvo. Além disso, os hepatócitos localizados próximos do local de armazenamento. Assim, a sinalização mediada pelo retinoide deve ter um profundo efeito na regulação de função e fenótipo dos hepatócitos. Adaptado: Bushue N (2010).

Na fase embrionária, os retinoides controlam a proliferação, migração e diferenciação de células progenitoras derivadas da crista neural e, no desenvolvimento de neurônios simpáticos, RA coopera com proteína morfogênica óssea-2 (BMP-2) para tornar células sensíveis a fatores neurotróficos, tais como fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e neurotrofina 3 (NT3) (Thang SH, *et al.* 2000; Wyatt S, *et al.* 1999). *In vitro*, os retinoides induzem parada do crescimento celular na fase G1 do ciclo celular e induzem diferenciação em linhagens celulares NB humanas (Westermarck UK, *et al.* 2011; Thiele CJ, *et al.* 1985).

Os retinoides também exercem efeito através de vias independentes de transcrição, o que pode ocorrer na presença ou ausência de receptores nucleares. Os retinoides mediados por RARs inibem AP-1 (regulador de proliferação celular) (Fanjul A, *et al.* 1994). RA também inibe a atividade de NFkB em ratos (Austena LM, *et al.* 2004). Mediado através RAR β , RA pode alterar o nível de Ca⁺⁺ intracelular e, assim, controla a ativação de PI3K em células neurais (Liao YP, *et al.* 2004; Chen N, *et al.* 2008; Masiá S, *et al.* 2007).

Além disso, os retinoides são amplamente utilizados para o tratamento de doenças dermatológicas e visuais. O seu efeito sobre a prevenção do câncer e tratamento tem recebido muita atenção, sendo propostos como potenciais agentes quimioterapêuticos e quimiopreventivos. Estudos epidemiológicos mostram que uma menor ingestão de vitamina A resulta em maior risco de desenvolver câncer, o que corrobora com as observações em animais deficientes em vitamina A (Sun SY, *et al.* 2002).

Retinoides induzem a diferenciação neuronal e a parada de crescimento celular em algumas linhagens celulares de NB (LA-N-5, LA-N-1, SMS-KCNR) (Sidell N, 1982; Thiele CJ, *et al.* 1985), mas têm pouco efeito sobre as outras (SK-N-AS, SH-EP) (Gaetano C, *et al.* 1991). O uso de agonistas seletivos ao receptor indica que tanto o RAR como o RXR são necessários para os efeitos máximos sobre o crescimento e diferenciação. O processo de diferenciação inclui elaboração de extensos processos neuríticos que são estrutura e eletrofisiologia semelhantes aos neurónios normais, diminuição de um número de proto-oncogenes N-myc, c-myb (Thiele CJ, *et al.* 1988; Guglielmi L, *et al.* 2014); mostrou-se que os genes B-myb e o aumento em TrkB e receptores RET e sua proteína cinase induzem neuritos em células NB (Kaplan DR, *et al.* 1993; D'Alessio A, *et al.* 1995; Shiohira H, *et al.* 2012).

ATRA é o retinoide natural mais abundante e usado para tratamento de linfoma, leucemia, melanoma, câncer de pulmão, câncer cervical, câncer renal, NB e glioblastoma (Bushue N, *et al.* 2010). O uso mais efetivo de ATRA em doenças humanas foi demonstrado no tratamento de uma leucemia rara, a leucemia promielocítica aguda (APL) (Bushue N, *et al.* 2010). Em um ensaio clínico randomizado, o uso de isotretinoína (13-cis-RA) após a consolidação da terapia mieloablativa em pacientes com NB reduziu o risco de recidiva entre aqueles que receberam o fármaco (Matthay KK, *et al.* 1999). Além disso, a isotretinoína faz parte da terapia padrão seguida por transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas e manutenção com 13-cis-RA para o tratamento de doença residual mínima, levando a uma taxa de sobrevivência livre de doença 3-anos (DFS) de cerca de 50% (Masetti R, 2012), e atualmente é usada em associação com Dinutuximab (anticorpo monoclonal), aprovado pelo FDA (Yu AL, *et al.* 2010).

A Fenretinida, um retinoide sintético que exerce a atividade antitumoral em modelos de NB, através da indução de apoptose, foi proposto como uma alternativa ou retinoide adicional para ser utilizado como alvo em células residuais que sobrevivem após quimioterapia intensiva (Wang H, *et al.* 2001; Garaventa A, *et al.* 2003).

Antes da terapia de diferenciação baseada em ácido retinoico para leucemia promielocítica aguda (APL), com a utilização de várias quimioterapias citotóxicas, as taxas de remissão tiveram uma progressiva melhora de 50 para 80%, dos quais apenas cerca de 35% sobreviveriam por mais tempo. No entanto, com a utilização de ácido retinoico e quimioterapia, mais de 90% dos pacientes recentemente diagnosticados com APL pôde conseguir uma remissão completa, e cerca de 75% pôde ser curada (Stone RM, *et al.* 1988; Kantarjian HM, *et al.* 1986; Cunningham I, *et al.* 1989; Tallman MS, *et al.* 1997; Tallman MS, *et al.* 2002; De Botton S, *et al.* 1998; Testi AM, *et al.* 2005; Fenaux P, *et al.* 2000; Mandelli F, *et al.* 1997; Sanz MA, *et al.* 1999).

HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que a modulação epigenética associada a tratamento com retinoides tenha maior eficácia do que monoterapia com cada classe desses agentes na inibição do crescimento de neuroblastoma.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de retinoides e moduladores epigenéticos em células de neuroblastoma humano *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação do efeito dos tratamentos com retinoides, HDACi e DNMTi, sobre a proliferação e viabilidade celular em células SH-SY5Y e SK-N-BE(2);
- Avaliação do ciclo celular após os tratamentos citados em células SH-SY5Y e SK-N-BE(2);
- Análise de marcadores de indiferenciação e diferenciação (β 3tubulina; bmi1, n-myc; p21;c-myc; histona H3, NeuN, ERK, Mecp2) na população de células SH-SY5Y e SK-N-BE(2) após os tratamentos de 72h;
- Avaliação da morfologia celular utilizando β 3tubulina após os tratamentos citados em células SH-SY5Y e SK-N-BE(2);
- Avaliação da acetilação de histona H3 após o tratamentos citados em células SH-SY5Y e SK-N-BE(2) por ELISA.

Capítulo I

Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells

Situação: Manuscrito publicado em 10/11/2016

Revista: Molecular Neurobiology



Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells

Viviane Rösner Almeida^{1,2} · Igor Araujo Vieira³ · Marienela Buendia^{1,2} · André Tesainer Brunetto⁴ · Lauro J. Gregianin^{5,6} · Algemir Lunardi Brunetto⁴ · Fábio Klant⁷ · Caroline Brunetto de Farias^{1,4} · Ana Lucia Abujamra⁸ · Patrícia Luciana da Costa Lopez^{9,10} · Rafael Roesler^{1,2}

Received: 17 June 2016 / Accepted: 23 October 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid childhood tumor accounting for around 15% of pediatric cancer deaths and most probably originates from a failure in the development of embryonic neural crest cells. Retinoids can inhibit the proliferation and stimulate differentiation of NB cells. In addition, epigenetic events involving changes in chromatin structure and DNA methylation can mediate the effects of retinoids; hence, the scope of this study is to investigate the use of retinoids and epigenetic drugs in NB cell lines. Here, we demonstrate that the combination of retinoid all trans-retinoic acid (ATRA) with inhibitors of either histone deacetylases (HDACs) or DNA methyltransferase is more effective in impairing the proliferation of human SH-SY5Y and SK-N-BE(2) NB cells than any drug given alone. Treatments also induced differential changes on the messenger RNA (mRNA) expression of retinoid receptor subtypes and reduced the protein content of c-Myc, the neuronal markers NeuN and β -3 tubulin, and the oncoprotein Bmi1.

These results suggest that the combination of retinoids with epigenetic modulators is more effective in reducing NB growth than treatment with single drugs.

Keywords Retinoid · Histone deacetylase · DNA methyltransferase · Cell proliferation · Cell differentiation · Neuroblastoma

Introduction

Neuroblastoma (NB) derives from embryonal neural crest cells that later give rise to the sympathetic nervous system. NB is the most common extracranial solid childhood tumor accounting for around 15% of pediatric cancer deaths. Children with high-risk NB have poor long-term survival despite intensive multimodal treatment, and the amplification of the MYCN oncogene, which occurs in about 22% of patients

✉ Rafael Roesler
rafael.roesler@pq.cnpq.br

- ¹ Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
- ² Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil
- ³ Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
- ⁴ Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS 90420-140, Brazil
- ⁵ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

- ⁶ Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
- ⁷ Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
- ⁸ Graduate Program in Biotechnology, Univates University Center, Lajeado, RS 95900-000, Brazil
- ⁹ Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
- ¹⁰ Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Published online: 10 November 2016

Springer

with NB, is strongly associated with poor prognosis. Current chemotherapy options limit dose intensification due to significant toxicity and have reached a plateau; therefore, novel rationale treatment strategies are urgently needed [1, 2].

Given that a failure in neural crest development is likely at the origin of NB, understanding normal neural crest differentiation and the effects of drugs influencing cellular differentiation may help to establish new therapeutic options [3]. Retinoids are vitamin A derivatives crucially involved in regulating the growth and differentiation of many embryonic and adult tissues. Alterations in gene expression induced by retinoids are mediated by nuclear retinoid receptors (retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR)), which are ligand-activated transcription factors that function as heterodimers [4]. Retinoids, including all trans-retinoic acid (ATRA) and 13-cis-retinoic acid (13-cis-RA), inhibit the proliferation and stimulate differentiation of NB cells [5, 6]. Currently, 13-cis-RA is an established component in the treatment of high-risk NB used in the maintenance phase of patients with minimal residual disease, after myeloablative therapy and in autologous hematopoietic stem cell transplantation [7, 8]. Yet, over half of the high-risk NB patients treated with this standard strategy including 13-cis-RA still relapse.

Retinoid receptors have significant interplay with epigenetic events including histone acetylation and DNA methylation. Histone deacetylases (HDACs) bind to several retinoic acid response elements in proximal promoters or enhancer regions of genes regulated by ATRA in stem cells [9]. Conversely, RARs activated by ATRA interact with protein components of the transcription complex that mediate the placement or removal of epigenetic marks on histones and DNA [10]. Also, the activation of the RET gene by retinoic acid can promote changes in chromatin and DNA methylation in NB cells [11]. These findings suggest that combination therapy with epigenetic modulators and retinoids could be more effective than either class of drugs alone [12]. In fact, RAR-deficient mouse embryonic fibroblasts showed enhanced sensitivity to HDAC inhibitors (HDACis), and combinations of retinoic acid and HDACis display increased retinoic acid signaling activation and antitumor effects in mouse models [13]. HDACis regulate the expression of retinoid receptors and act synergistically with retinoids to inhibit the growth of experimental NB [14–16]. Moreover, a study using expression-based screening, in which an HDACi was an enhancer to screen for compounds, identified ATRA as the best drug to enhance the effects of HDAC inhibition in promoting NB differentiation. Furthermore, the combination of ATRA and the HDACi suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) resulted in longer survival in a xenograft model of NB [17].

Abnormal DNA methylation in NB results in inactivation of tumor suppressor genes [18, 19]. DNA-demethylating drugs, including the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine (5-Aza), inhibit NB cell viability and restore

sensitivity to chemotherapy [20, 21]. In NB cells, changes in the methylation status of enhancer regions play a role in the transcriptional activation induced by retinoids [11], and epigenomic modifications mediated by a DNA methyltransferase can increase sensitivity to ATRA [22]. In addition, DNA demethylation events mediate the differentiating effects of ATRA in NB cells [23]. In this study, we aim to verify whether ATRA in combination with HDAC or DNA methyltransferase inhibition could induce enhanced effects on the proliferation and differentiation of human NB cells as this remains poorly characterized in previous reports.

Materials and Methods

Cell Culture

Human SH-SY5Y and SK-N-BE(2) NB cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Cells were maintained in tissue culture flasks at 37 °C with humidified atmosphere and 5% CO₂. The culture medium, which was changed every 2/3 days, was prepared with DMEM/ F12 (Gibco, Grand Island, USA), 1% penicillin and streptomycin (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), with the pH adjusted to 7.4.

Treatments and Cell Proliferation Assays

ATRA, the HDACi sodium butyrate (NaB), and the DNA methyltransferase inhibitor, 5-Aza, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The chosen doses were ATRA, 100 nM; NaB, 1 mM; and 5-Aza, 1 μM [24–26]. After being treated for 72 h, cells were trypsinized, centrifuged, and washed with PBS twice. Cells were then resuspended in a solution of 1 μl of propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) per milliliter of PBS and incubated on ice for 15 min prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem—Life-Thermo, USA), and the Attune® software was used for analysis.

The evaluation of cell proliferation used a population doubling level (PDL) assay where cells were treated in duplicates for 72 h, then trypsinized, and one third of the cells were separated for counting using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem—Life-Thermo, USA), and the Attune® software was used for analysis. Two thirds of the remaining cells were replated for 4 days before a new counting was carried out. PDL at each passage was calculated using the equation $PDL = (\log X_e - \log X_b) / \log 2$, where X_e is the cell number at the end of the incubation time and X_b is the cell number at the beginning of the incubation time, as described in the ATCC® Animal Cell Culture

Guide. Data is displayed as cumulative PDL, calculated as the sum of all previous PDLs [27].

Cell Cycle Analysis

For cell cycle analysis, cells were treated for 24 or 30 h, trypsinized, centrifuged, and washed with PBS twice. Then, cells were resuspended in 50 µg/ml PI (Sigma-Aldrich) and 0.1% Triton X-100 in a 0.1% sodium citrate solution, maintaining the ratio of 1×10^6 cells/ml PI solution. Cells were incubated on ice for 15 min prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem—Life-Thermo), and data was analyzed using software FlowJo V10.

Histone H3 Acetylation

Cells treated for 24 h with drugs alone or combined were lysed with a lysis solution buffer in accordance with the manufacturer's instructions (PathScan® Acetylated Histone H3 Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA Kit, Cell Signaling, Danvers, USA), and the plate was read for spectrophotometric determination.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

The messenger RNA (mRNA) expression of retinoid receptors was analyzed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from cells plated for 24 h using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), in accordance with the manufacturer's instructions, quantified in NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), treated with DNase (Promega, Madison, USA), and reverse-transcribed with SuperScript® III First-Strand Synthesis supermix (Thermo Fisher Scientific). RAR α , RAR β , RAR γ , and β -actin primers used for RT-PCR amplification were designed according to the corresponding GenBank and are shown in Table 1. The expression of β -actin was measured as an internal control. Experimental conditions were 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM for each primer, 0.2 dNTPs, 1.25 U GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, USA), and 2 µl complementary DNA (cDNA)

template. All assays were carried out in a total volume of 25 µl using 35 cycles for amplification that consisted of 2 min at 95 °C, denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 30 s at 58–60 °C depending on the primer, and extension at 72 °C for 45 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The products of RAR α , RAR β , RAR γ , and β -actin were electrophoresed through 2% agarose gels containing ethidium bromide and visualized with ultraviolet light. Fragment lengths were confirmed using a low DNA mass ladder. For each set of PCR reactions, a negative control was included.

Western Blot

Cells were lysed after 72 h of treatment with a lysis solution containing SDS, Tris, and EDTA, and protein was quantified using the Bradford protein assay (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, USA) and separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membrane and blocked with a blocking solution containing 10% non-fat dry milk in 1× TTBS. The membrane was incubated overnight with primary antibodies against c-Myc (1:500; Cell Signaling), n-Myc (1:500; Abcam, Cambridge, USA), extracellular regulated kinase (ERK, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), Bmi1 (1:1000; Cell Signaling), NeuN (1:500; Merck Millipore, Temecula, USA), and β -3 tubulin (1:750; Cell Signaling). Incubation of all primary antibodies was followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) for 2 h at 4 °C, and chemoluminescence was detected using ECL Western Blotting substrate (Pierce, Thermo Scientific) and analyzed using ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Membrane was stained with Coomassie blue for protein load control. Immunodetection and loading control were analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Immunofluorescence

Cells were treated for 72 h and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 1×, washed with PBS 1×, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS 1× for 20 min. Cells were then blocked

Table 1 Forward and reverse primers used for RT-PCR amplification

Gene	Primer sequences	PCR product size (bp)
hRAR β	Forward 5' GGT TTC ACT GGC TTG ACC AT 3'	198
	Reverse 5' GGC AAA GGT GAA CAC AAG GT 3'	
hRAR γ	Forward 5' AAC AAG GTG ACC AGG AAT CG 3'	182
	Reverse 5' TTG CTG ACC TTG GTG ATG AG 3'	
hRAR var. 1–3	Forward 5' GTG TCA CCG GGA CAA GAA CT 3'	175
	Reverse 5' CGT CAG CGT GTA GCT CTC AG 3'	
β -Actin	Forward 5' GAG ACC TTC AAC CCC AG 3'	190
	Reverse 5' GCT ACA GCT TCA CCA GCAG 3'	

with 0.2% Triton X-100 in PBS 1× with 1% bovine serum albumin (BSA) prior to incubation overnight at 4 °C with anti-β-3 tubulin with Alexa Fluor 488 conjugate, 1:1000 (Abcam, USA). After incubation with the primary antibody, cells were stained with nuclei staining solution (4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI), at 1 μl/ml of PBS 1×) for 30 min. Photographs were obtained using inverted fluorescence microscope EVOS® FLoid® Imaging Station (Thermo Fisher Scientific), and the images were analyzed using the software Image Pro Plus 6 (IPP6-Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

Statistics

Data are shown as mean ± standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests for multiple

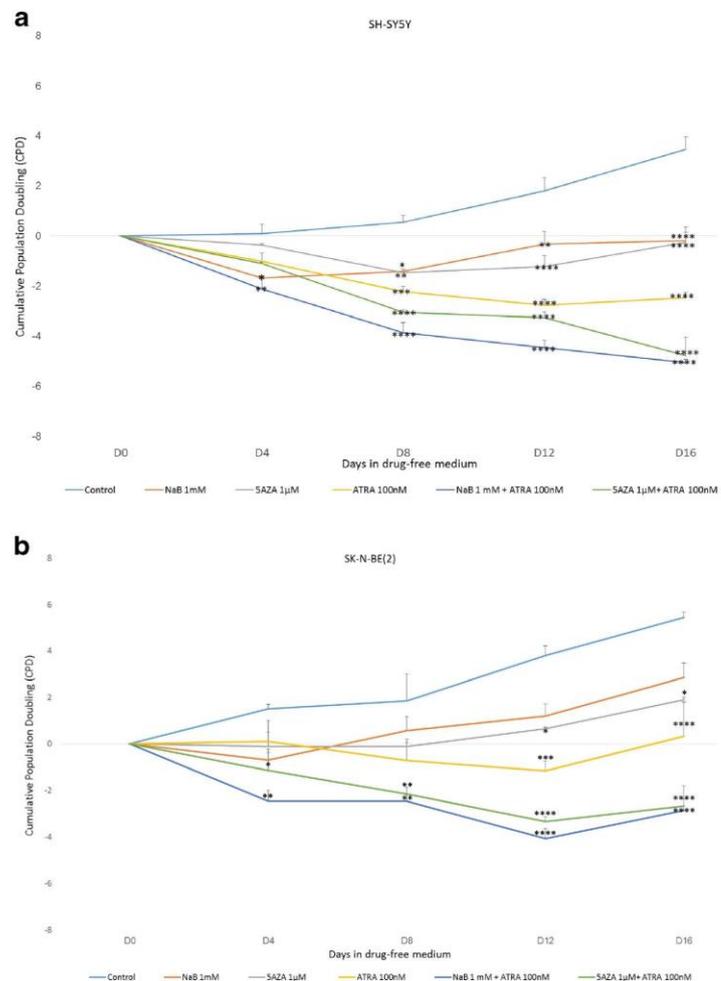
comparisons. Experiments were replicated at least three times; *p* values under 0.05 were considered significant. The GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, USA) was used for analyses.

Results

The HDACi NaB Enhances ATRA-Induced Effects on Cell Proliferation

All treatments significantly reduced the proliferation, assessed in a PDL assay, of both NB cell lines, except for NaB alone in SK-N-BE(2) cells (Fig. 1). Notably, by day 16, the combination of ATRA with either NaB or 5-Aza induced a consistently more pronounced effect than any drug given alone, except for the

Fig. 1 Combination treatments with a RAR and an HDACi or a DNA methyltransferase inhibitor show increased efficacy in halting the proliferation of human NB cells. **a** SH-SY5Y and **b** SK-N-BE(2) cells were treated with the different drugs alone or in combinations for 72 h, and proliferation was assessed in a PDL assay across 16 days as described in Materials and Methods section. Data are expressed as mean ± SEM; *N* = 3 independent experiments; **p* < 0.01; ***p* < 0.001; and ****p* < 0.0001 compared to control cells. There were also significant differences between cells treated with single drugs and those exposed to combination treatments (see Table 2 for additional comparisons)



comparison between ATRA alone and ATRA combined with 5-Aza in SK-N-BE(2) cells (Table 2). Overall, the results suggest that combining ATRA with either epigenetic modulator can increase treatment efficacy.

In order to evaluate a biochemical endpoint of the drug effects, histone H3 acetylation was measured by ELISA in a single experiment using a separated subset of cells treated for 24 h with the same drugs and combinations used for the PDL assay. NaB

alone induced increases of 68.04 and 34.17% in the levels of acetylated H3 in SH-SY5Y and SK-N-BE(2) cells, respectively. Notably, the increasing effect was pronouncedly higher when NaB was given in combination with other agents. The levels of acetylated H3, relative to controls taken as 100%, were 265.16% in SH-SY5Y cells and 155.37% in SK-N-BE(2) cells treated with NaB plus 5-Aza and 355.65% in SH-SY5Y cells and 163.25% in SK-N-BE(2) cells exposed to NaB plus ATRA (data not shown).

Overall, SH-SY5Y cells exposed to drug treatments during 24 h showed a significant increase in percentage of cells in the G0/G1 phase and reduced population of cells with a DNA content >4N in comparison with controls. Cells treated for 30 h with 5-Aza alone or ATRA combined with 5-Aza showed a similar accumulation in G0/G1 and reduced cell fraction in the G2/M phase (Fig. 2a).

In SK-N-BE(2) cells, treatment with NaB alone or combined with ATRA for 24 h resulted in an increase in the proportion of cells in G0/G1 and a reduction in >4N cells. A lower >4N cell population was also observed after treatment with ATRA plus 5-Aza. After 30 h of drug exposure, cells treated with any drug alone or in combination showed a reduction in >4N cells and an accumulation of cells in the G0/G1, except in cells treated with ATRA combined with NaB, in which there was an increase in the percentage of cells in G2/M and reduced >4N cell fraction (Fig. 2b).

Table 2 Direct comparisons of population doubling between cells treated with ATRA, NaB, and 5-Aza, alone or in combinations

Comparison	Statistical significance				
	D0	D4	D8	D12	D16
SH-SY5Y cells					
Control vs. NaB	Ns	*	*	**	†
Control vs. 5-Aza	Ns	Ns	**	†	†
Control vs. ATRA	Ns	Ns	***	†	†
Control vs. NaB + ATRA	Ns	**	†	†	†
Control vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	†	†	†
NaB vs. 5-Aza	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
NaB vs. ATRA	Ns	Ns	Ns	***	**
NaB vs. NaB + ATRA	Ns	Ns	***	†	†
NaB vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	†	†
5-Aza vs. ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	**
5-Aza vs. NaB + ATRA	Ns	*	**	†	†
5-Aza vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	**	†
ATRA vs. NaB + ATRA	Ns	Ns	Ns	*	***
ATRA vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	**
NaB + ATRA vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
SK-N-BE(2) cells					
Control vs. NaB	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Control vs. 5-Aza	Ns	Ns	Ns	*	*
Control vs. ATRA	Ns	Ns	Ns	***	†
Control vs. NaB + ATRA	Ns	**	**	†	†
Control vs. 5-Aza + ATRA	Ns	*	**	†	†
NaB vs. 5-Aza	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
NaB vs. ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
NaB vs. NaB + ATRA	Ns	Ns	*	†	†
NaB vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	***	†
5-Aza vs. ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
5-Aza vs. NaB + ATRA	Ns	Ns	Ns	***	***
5-Aza vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	**	***
ATRA vs. NaB + ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	*
ATRA vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
NaB + ATRA vs. 5-Aza + ATRA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

Cells were treated and tested for proliferation across 16 days as described in the text and Fig. 1. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests

D day

p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001; †*p* < 0.0001

RT-PCR Analysis of RAR mRNA Expression

Messenger RNA expression of all three types of RAR was detected in control cells as well as in cells exposed to the different drug treatments. There was an apparent increase in the levels of RARβ mRNA in cells treated with ATRA alone or combined with NaB in both cell lines and a reduction in RARβ mRNA in SH-SY5Y cells after treatment with 5-Aza alone or combined with ATRA (Fig. 3).

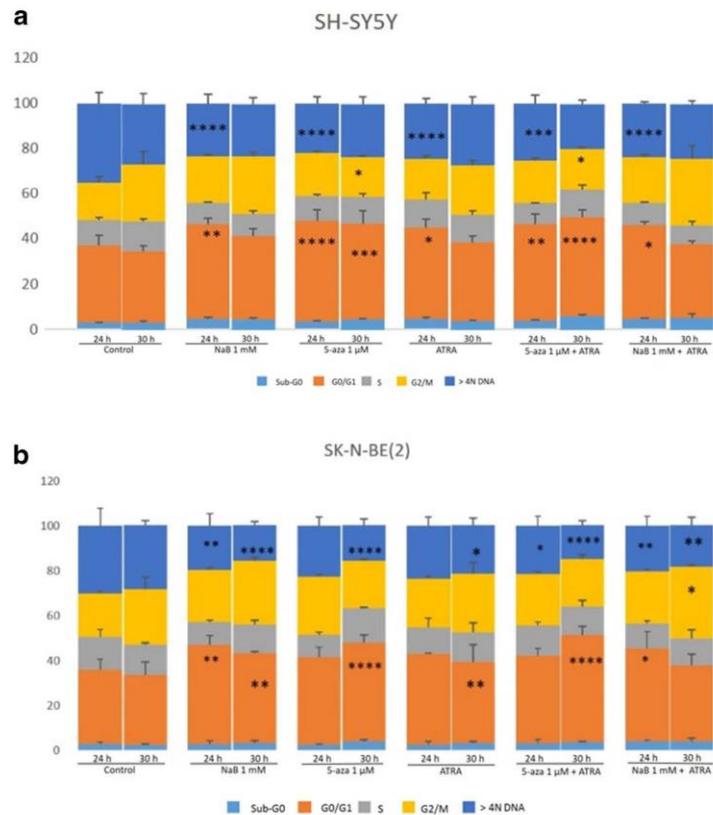
Reductions in c-Myc Content Induced by ATRA and Epigenetic Drugs

The c-Myc and n-Myc proteins and ERK signaling are involved in the oncogenesis and tumor aggressiveness in NB. We analyzed the protein content of these targets in the MYCN-amplified SK-N-BE(2) cell line. All drugs tested alone or in combinations tested led to a significant decrease in c-Myc content (Fig. 4a), whereas the levels of n-Myc (Fig. 4b) and ERK (Fig. 4c) were not significantly altered.

Drug-Induced Morphological Changes and Reductions in Differentiation and Stemness Marker Levels

Cells treated with ATRA alone or combined with either epigenetic drug showed a pattern of morphological alteration

Fig. 2 Cell cycle dynamics in human **a** SH-SY5Y and **b** SK-N-BE(2) NB cells treated with NaB, 5-Aza, and ATRA, alone or in combinations, for 24 or 30 h, as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm SEM percentage of cells in each phase of the cell cycle; $N = 3$ independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$ compared to control cells



toward more elongated cells, particularly more pronounced in SH-SY5Y cells. The presence of β -3 tubulin, a marker that

indicates both neural differentiation and tumor aggressiveness, was detected by immunofluorescence in the cytoplasm in all cell groups (Fig. 5a, b).

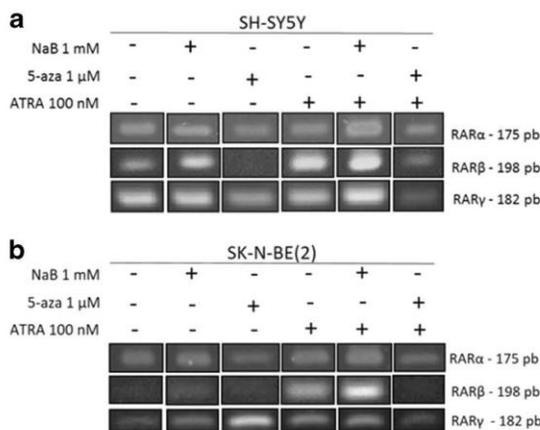


Fig. 3 Expression of mRNA for RAR α , RAR β , and RAR γ in human NB cells treated with NaB, 5-Aza, and ATRA, alone or in combinations. **a** SH-SY5Y and **b** SK-N-BE(2) cells were exposed to treatments for 72 h before analysis with RT-PCR as described in Materials and Methods section. An analysis representative of three independent experiments is shown

Protein levels of the Polycomb group family transcription repressor Bmi1, a regulator of differentiation and stemness in NB, were significantly reduced by NaB alone or combined with ATRA in both cell lines, as well as by ATRA combined with 5-Aza in SK-N-BE(2) cells (Fig. 5c, d). In this cell line, the same treatments also reduced the levels of the neuronal differentiation marker NeuN (Fig. 5d). Finally, in SH-SY5Y cells, all drug treatments reduced the levels of β -3 tubulin (Fig. 5c).

Discussion

Modifications in the chromatin state and DNA methylation mediate at least some of the effects of retinoids on NB cell proliferation and differentiation [11, 28]. A possible mechanism mediating DNA methylation changes induced by ATRA is the downregulation of DNA methyltransferases along with the upregulation of endogenous microRNAs [28]. Our study provides a direct comparison between treatments with ATRA

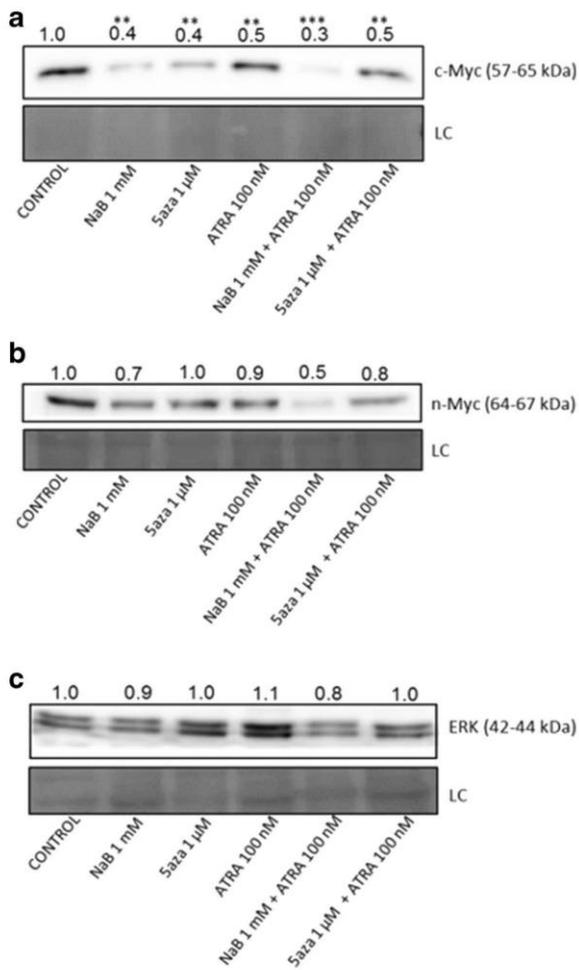


Fig. 4 Protein content of c-Myc, n-Myc, and ERK in human NB cells treated with NaB, 5-Aza, and ATRA, alone or in combinations. SK-N-BE(2) cells were exposed to treatments for 72 h before Western blot assays as described in Materials and Methods section. Results were quantified with ImageJ analysis. Bands representative of three independent experiments are shown. Values shown above the bands represent the ratio of protein content in each group related to control cells; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to controls. LC loading control

combined with a DNA methyltransferase inhibitor and ATRA combined with an HDACi on proliferation and molecular changes in NB cells. Overall, both combinations were more effective than single-drug treatments, either in MYCN-amplified SK-N-BE(2) and non-amplified SH-SY5Y [29] cells. Drug treatments also induced arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in most groups, and specific combinations differentially reduced the expression of retinoid receptor subtypes in the two cell lines. Interestingly, SK-N-BE(2) cells showed virtually no expression of RAR β under control conditions. Given that the RAR β gene is located on chromosome 3p, the lack of RAR β expression could be related to 3p

deletions, which have been associated with an aggressive tumor phenotype in NB [30]. Consistently with previous studies [31–33], higher RAR β mRNA levels were observed after treatment with ATRA alone or combined with NaB. Another noteworthy aspect of the results obtained with RT-PCR was the reduction in RAR β mRNA expression after treatment with 5-Aza alone or combined with ATRA. Higher expression of RAR β has been associated with good clinical outcome in NB patients, as well as with increased NB cell response to retinoids [34], suggesting a possible role for enhanced RAR β expression in the antiproliferative effects of ATRA. It is also important to point out that epigenetic changes including methylation have been associated with downregulation of RAR β in breast cancer [35].

Activation of c-Myc, encoded by *c-MYC*, another member of the *MYC* family of genes, has been associated with the progression of non-*MYCN*-amplified stage 4 NB. Different NB subtypes show an inverse correlation of *MYCN* and *c-MYC* expression, possibly related to a repression of *MYCN* by c-Myc [36]. Similar to previous reports showing that retinoid-induced differentiation and inhibition of proliferation in NB cells is accompanied by a reduction in c-Myc levels [37, 38], we found that all drug treatments reduced c-Myc expression in the *MYCN*-amplified NB cell line. However, although a decrease in n-Myc has been reported to precede retinoic acid-induced cell cycle changes and differentiation in NB cells [5], the levels of n-Myc and ERK were not altered.

Bmi1 is a gene importantly involved in regulating the self-renewal of neural stem cells as well as NB cells [39, 40]. The Bmi1 protein is a member of the Polycomb group family of transcription repressors, which limits gene expression through chromatin modifications [41]. In NB, Bmi1 acts as an oncoprotein that directly mediates n-Myc influences on cell proliferation and differentiation: *MYCN* binds directly to the Bmi1 promoter and upregulates Bmi1 transcription, which leads to increased proliferation and colony formation and reduced differentiation in NB cells [29, 40, 42]. We found that NaB alone or combined with ATRA in both cell lines, as well as ATRA combined with 5-Aza in SK-N-BE(2) cells, reduced Bmi1 expression, suggesting a possible mechanism for the increased antiproliferative effect of ATRA when combined with epigenetic agents.

Unexpectedly, the same treatments also reduced the levels of neuronal markers (NeuN in SK-N-BE(2) cells and β -3 tubulin in SH-SY5Y cells). Increased β -3 tubulin has been associated with aggressiveness, resistance to chemotherapy, and poor clinical outcomes in solid tumors [43–46]. We have recently observed that the antitumor effects of inhibiting Trk neurotrophin receptors in Ewing sarcoma, a pediatric tumor of possible neuroectodermal origin, are accompanied by a reduction in β -3 tubulin expression [47]. Therefore, the decrease in β -3 tubulin observed in the present study might be related to drug-induced phenotypic alterations associated with reduced aggressiveness.

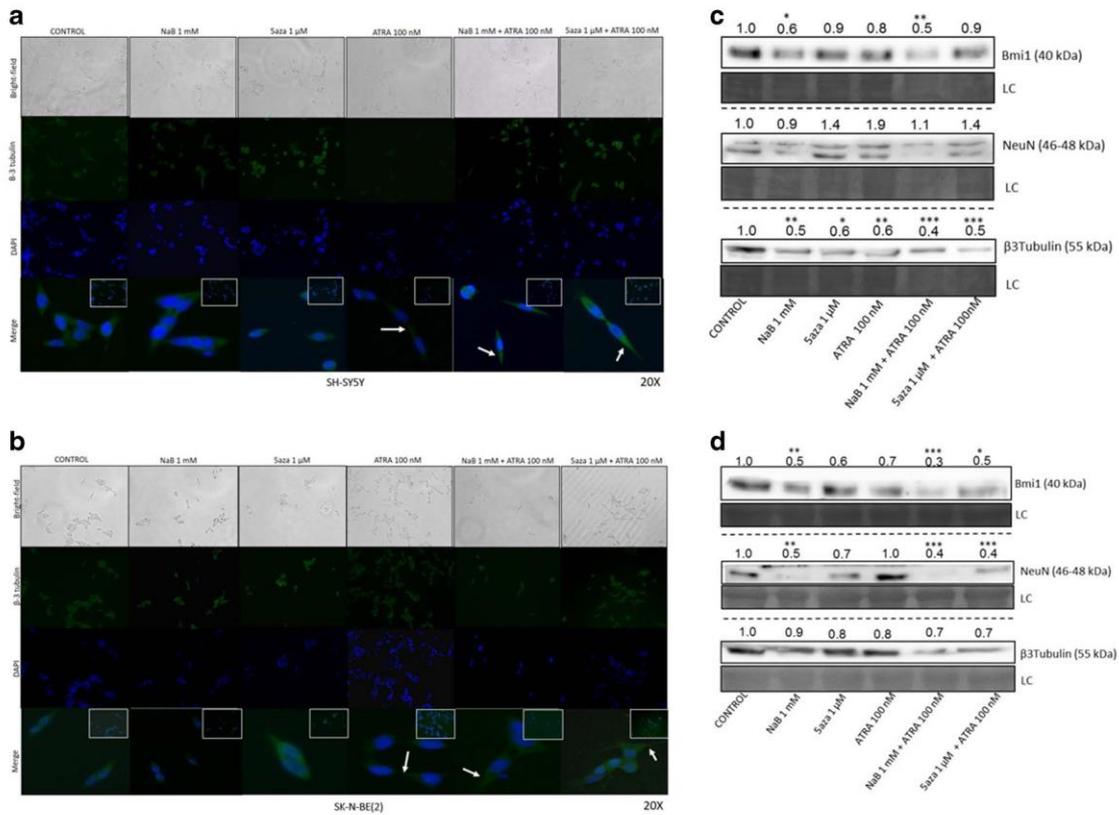


Fig. 5 Morphology and content of differentiation markers in human NB cells treated for 72 h with NaB, 5-Aza, and ATRA, alone or in combinations. **a, b** Cell morphology obtained with bright-field microscopy (upper lane) and with immunofluorescent microscopy showing β -3 tubulin (green), DAPI (blue), and overlay (bottom lane), in SH-SY5Y and SK-N-BE(2) cells, respectively (20 \times). **c, d** Western blot analysis of the

protein content of Bmi1, NeuN, and β -3 tubulin in SH-SY5Y and SK-N-BE(2) cells, respectively. Results were quantified with ImageJ analysis. Bands representative of three independent experiments are shown. Values shown above the bands represent the ratio of protein content in each group related to control cells; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to controls

Cellular heterogeneity within NB tumors might contribute to resistance to treatment. NB cells have been divided into three phenotypes: N-type, or neuroblastic cells, exhibit neuritic processes and express genes associated with neuronal differentiation; S-type cells grow adherent to the substrate and exhibit an epithelial cell-like morphology; and I-type cells show intermediate morphological features and expression patterns. I-type cells have a stem cell-like phenotype, are significantly more malignant in experimental models, and their presence in tumors might be related to poor prognosis [48–50]. SH-SY5Y cells show features of N-type cells, whereas different subclones presenting N, S, and I phenotypes have been derived from SK-N-BE(2) cells [49, 51]. The differences we observed in drug-induced alterations in the expression of neural differentiation markers between cell lines could be related to their distinct phenotypes before treatment. However, combinations of ATRA with epigenetic drugs were able to consistently reduce proliferation in both cell lines,

suggesting their potential effectiveness across diverse NB cell subtypes.

A recent study [52] used an integrative approach to analyze methylomes, transcriptomes, copy number variations, and chromatin modifications in NB samples. The findings indicate that DNA methylation patterns can identify subgroups of NB patients which are strongly associated with clinical variables and patient outcome. In addition, genome-wide expression data showed an enrichment of hypermethylated and downregulated genes in NB cell lines treated with the DNA-demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine and the HDACi trichostatin A (TSA), suggesting that treatments that combine epigenetic drugs targeting DNA methylation and HDACs can derepressed genetic programs silenced in NB.

In summary, our results provide early evidence that combined treatments of ATRA with HDAC or DNA methyltransferase inhibitors may be more effective in reducing NB growth than single-drug treatments, through mechanisms

possibly involving differential changes in the expression of retinoid receptors, and reductions in c-Myc, NeuN, β -3 tubulin, and Bmi 1, in different NB cell populations. Further studies are required to confirm and extend these findings in NB primary cultures and in vivo models.

Acknowledgments This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21 to C.B.F); the Rafael Koff Acordi Research Fund, Children's Cancer Institute (ICI); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

References

- Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203–216
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106–2120
- Ratner N, Brodeur GM, Dale RC, Schor NF (2016). The "neuro" of neuroblastoma: neurodevelopmental disorder. *Ann Neurol* 4: doi: 10.1002/ana.24659.
- Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328:1–16
- Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA (1985) Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313:404–446
- Nagai J, Yazawa T, Okudela K, Kigasawa H, Kitamura H, Osaka H (2004) Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Cancer Res* 64:7910–7917
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H et al (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's cancer group. N Engl J Med* 341:1165–1173
- Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, Gerbing RB, London WB et al (2009) Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 27:1007–1013
- Urvalek AM, Gudas LJ (2014) Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 289:19519–19530
- Gudas LJ (2013) Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. *Semin Cell Dev Biol* 24:701–705
- Angrisano T, Sacchetti S, Natale F, Cerrato A, Pero R, Keller S, Peluso S, Perillo B et al (2011) Chromatin and DNA methylation dynamics during retinoic acid-induced RET gene transcriptional activation in neuroblastoma cells. *Nucleic Acids Res* 39:1993–2006
- Cheung BB (2015) Combination therapies improve the anticancer activities of retinoids in neuroblastoma. *World J Clin Oncol* 6:212–215
- Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R (2007) A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17777–17782
- Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Heller G, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM et al (2001) The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res* 61:3591–3594
- De los Santos M, Zambrano A, Aranda A (2007) Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Cancer Ther* 2007 6(4):1425–1432
- De los Santos M, Zambrano A, Sánchez-Pacheco A, Aranda A (2007) Histone deacetylase inhibitors regulate retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma cells by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Mol Endocrinol* 21:2416–2426
- Hahn CK, Ross KN, Warrington IM, Mazitschek R, Kanegai CM, Wright RD, Kung AL, Golub TR et al (2008) Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9751–9756
- Tang XX, Robinson ME, Riceberg JS, Kim DY, Kung B, Titus TB, Hayashi S, Flake AW et al (2004) Favorable neuroblastoma genes and molecular therapeutics of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 10: 5837–5844
- Hoebeek J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, Vermeulen J, Yigit N, Hoyoux C, Laureys G et al (2009) Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* 273:336–346
- Qiu YY, Mirkin BL, Dwivedi RS (2005) Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells. *Cancer Detect Prev* 29:456–463
- Charlet J, Schneckeburger M, Brown KW, Diederich M (2012) DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol* 83:858–865
- Ostler KR, Yang Q, Looney TJ, Zhang L, Vasanthakumar A, Tian Y, Kocherginsky M, Raimondi SL et al (2012) Truncated DNMT3B isoform DNMT3B7 suppresses growth, induces differentiation, and alters DNA methylation in human neuroblastoma. *Cancer Res* 72:4714–4723
- Stallings RL, Foley NH, Bray IM, Das S, Buckley PG (2011) MicroRNA and DNA methylation alterations mediating retinoic acid induced neuroblastoma cell differentiation. *Semin Cancer Biol* 21:283–290
- Abujamra AL, Almeida VR, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R (2009) A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biol Int* 33:899–903
- Nör C, Sassi FA, de Farias CB, Schwartzmann G, Abujamra AL, Lenz G, Brunetto AL, Roesler R (2013) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol* 48:533–543
- Dos Santos MP, de Farias CB, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL (2014) In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: a paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma. *Oncol Rep* 31:955–968
- Menegotto PR, da Costa Lopez PL, Souza BK, de Farias CB, Filippichiela EC, Vieira IA, Schwartzmann G, Lenz G et al (2016) Gastrin-releasing peptide receptor knockdown induces senescence in glioblastoma cells. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-016-9696-6
- Das S, Foley N, Bryan K, Watters KM, Bray I, Murphy DM, Buckley PG, Stallings RL (2010) MicroRNA mediates DNA demethylation events triggered by retinoic acid during neuroblastoma cell differentiation. *Cancer Res* 70:7874–7881
- Huang R, Cheung NK, Vider J, Cheung IY, Gerald WL, Tickoo SK, Holland EC, Blasberg RG (2011) MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *FASEB J* 25:4138–4149
- Hoebeek J, Michels E, Menten B, Van Roy N, Eggert A, Schramm A, De Preter K, Yigit N et al (2007) High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21-p22 tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer* 120:533–538

31. Clagett-Dame M, Verhalen TJ, Biedler JL, Repa JJ (1993) Identification and characterization of all-trans-retinoic acid receptor transcripts and receptor protein in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 300:684–693
32. Marshall GM, Cheung B, Stacey KP, Norris MD, Haber M (1994) Regulation of retinoic acid receptor alpha expression in human neuroblastoma cell lines and tumor tissue. *Anticancer Res* 14: 437–441
33. Wuarin L, Chang B, Wada R, Sidell N (1994) Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor-alpha expression in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 56:840–845
34. Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM (1998) Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene* 17:751–759
35. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Müller HM, Amberger A, Zeschnick M, Widschwendter A, Abendstein B et al (2000) Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 92:826–832
36. Westermann F, Muth D, Benner A, Bauer T, Henrich KO, Oberthuer A, Brors B, Beissbarth T et al (2008) Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biol* 9:R150
37. Hammerling U, Bjelfman C, Pählman S (1987) Different regulation of N- and c-myc expression during phorbol ester-induced maturation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Oncogene* 2:73–77
38. Stio M, Celli A, Treves C (2001) Synergistic anti-proliferative effects of vitamin D derivatives and 9-cis retinoic acid in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:213–222
39. Molofsky AV, Pardo R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425:962–927
40. Cui H, Ma J, Ding J, Li T, Alam G, Ding HF (2006) Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of I-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner. *J Biol Chem* 281:34696–34704
41. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118:409–418
42. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y et al (2010) Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 29:2681–2690
43. Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ (2003) Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 55:77–96
44. Hetland TE, Hellesylt E, Florenes VA, Tropé C, Davidson B, Kærn J (2011) Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. *Hum Pathol* 42:1019–1026
45. Lebok P, Öztürk M, Heilenkötter U, Jaenicke F, Müller V, Paluchowski P, Geist S, Wilke C et al (2016) High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncol Lett* 11:1987–1994
46. Zhang HL, Ruan L, Zheng LM, Whyte D, Tzeng CM, Zhou XW (2012) Association between class III β -tubulin expression and response to paclitaxel/vinorelbine-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 77:9–15
47. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Filho MA, Souza BK, Rivero LF et al (2016) Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7:34860–34880
48. Ross RA, Biedler JL, Spengler BA (2003) A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 197:35–39
49. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA (2004) Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 6:838–845
50. Kamijo T (2012) Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatr Res* 71:511–515
51. Hanada M, Krajewski S, Tanaka S, Cazals-Hatem D, Spengler BA, Ross RA, Biedler JL, Reed JC (1993) Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 53:4978–4986
52. Henrich KO, Bender S, Saadati M, Dreidax D, Gartlgruber M, Shao C, Herrmann C, Wiesenfarth M et al (2016) Integrative genome-scale analysis identifies epigenetic mechanisms of transcriptional deregulation in unfavorable neuroblastomas. *Cancer Res* 76: 5523–5537

Capítulo II

Resultados adicionais

A seguir são apresentados resultados adicionais do presente estudo que não foram anexados no manuscrito.

Introdução

As células de NB, quando submetidas aos tratamentos após 30h, apresentaram diferentes fases do ciclo celular, por essa razão decidimos investigar a morfologia nuclear, já que alguns tratamentos reduziram a ploidia na população celular. A análise de morfometria nuclear (NMA) é uma técnica que fornece informações sobre as alterações celulares baseadas na morfometria nuclear (Filippi-Chiela EC, 2012). Alterações da morfologia nuclear e textura da cromatina são classicamente descritas por patologistas como critérios para a diferenciação de tecidos e tumores (Misteli T, 2005; Metze K, 2013).

Além disso, o presente estudo investigou a acetilação de histonas H3 após 24h de tratamento, visto que NaB é um inibidor das histonas desacetilases. A acetilação é controlada por duas famílias de enzimas: as histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas desacetilases (HDAC). O desequilíbrio da acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras contribui para a desregulação da expressão gênica e tem sido associado à carcinogênese e à progressão do câncer (Kouzarides T, 1999; Lehrmann H, *et al.* 2002). Tanto histonas acetiltransferases (HAT) quanto histonas desacetilases (HDAC) têm importante papel na regulação da expressão gênica através da modificação da cromatina (Roth SY, *et al.* 2001; Thiagalingam S, *et al.* 2003).

Materiais e Métodos

Análise Morfométrica Nuclear (NMA)

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1X, lavou-se com PBS 1X, e a solução de coloração de núcleos (4', 6-diamidino-2-fenilindol, DAPI - em 1 µl / ml de PBS e Triton X-100 a 0,1%) foi adicionada durante 30 minutos. As fotografias foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência invertido, e as imagens foram analisadas usando o programa Image Pro Plus 6.0 (IPP6-Media Cybernetics, EUA). Tamanho nuclear, esfericidade do núcleo, aspecto do núcleo da razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto, razão entre o maior e menor raio do núcleo, razão entre a área do núcleo e a área de sua caixa delimitadora inferida foram quantificados e agrupados como Índice de Irregularidade Nuclear (NII). Os núcleos foram classificados como normais (N), núcleos grandes e regulares (LR), núcleos grandes e irregulares (LI), núcleos com tamanho normal e irregulares (I), núcleos pequenos (S), núcleos pequenos e regulares (SR) e núcleos pequenos e irregulares (SI). Essa classificação possibilita delimitar o estado do núcleo nas seguintes etapas: apoptose, senescência e irregularidades nucleares como aquelas apresentadas por células em processo de catástrofe mitótica (Filippi-Chiela, *et al.* 2012).

Acetilação de histonas H3

As células foram tratadas com 1 mM de Nab; 5-Aza 1 µM; ATRA 100 nM; NAB 1 mM com 5-Aza 1 µM; NAB 1 mM com ATRA 100 nM. As células foram lisadas com uma solução de lise tampão, de acordo com as instruções do fabricante (PathScan® acetilado

Histona H3 Sandwich ELISA KIT, Cell Signaling, EUA). Após, a placa foi lida por determinação espectrofotométrica.

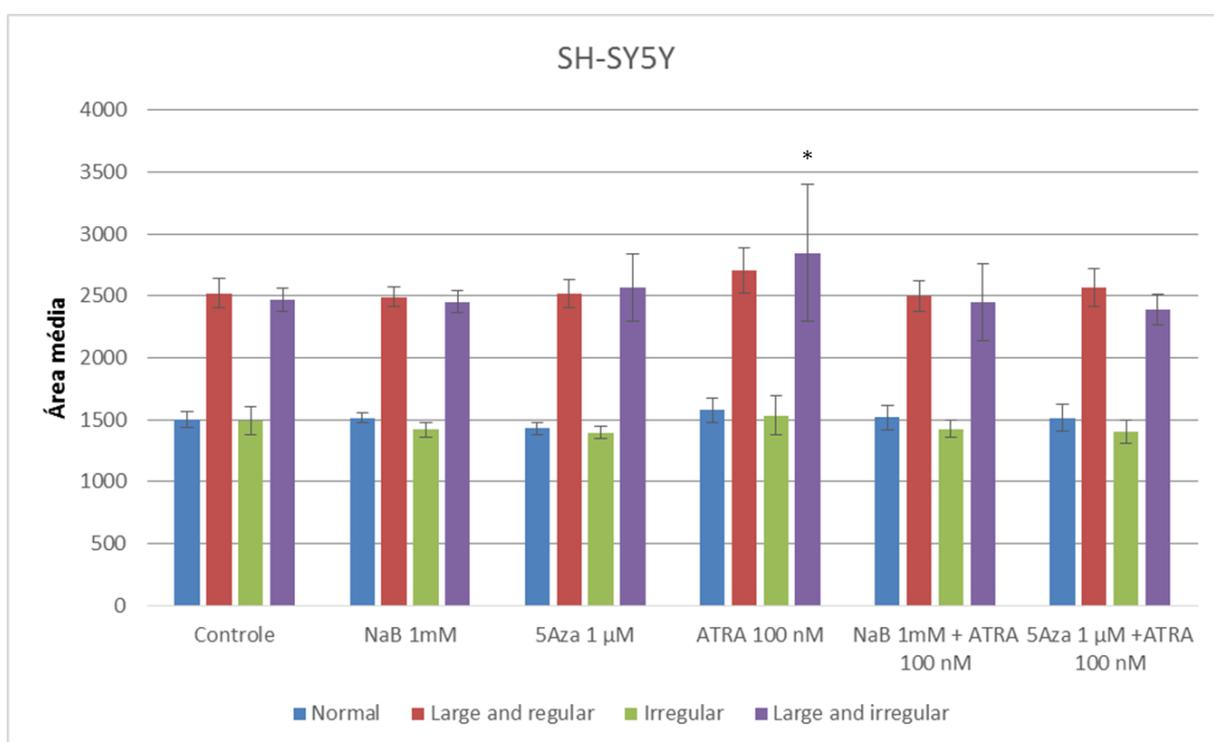
Os dados de NMA e Western Blot são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por análise de uma via de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas de pelo menos três experiências independentes para cada experimento. Os valores de P sob 0,05 foram considerados significativos. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

Resultados e Discussão

O NMA, em células SH-SY5Y, nos mostra que ocorre alteração da morfologia nuclear. Observou-se um aumento de percentagem de núcleos irregulares após tratamento com ATRA 100 nM (Fig. **1a**) em relação ao grupo de células controle, sugerindo que um número mais elevado de células entrou catástrofe mitótica ou outro dano nuclear. Observou-se também, em SK-N-BE (2), que as células tiveram um aumento significativo na área de núcleos normais no tratamento de ATRA 100 nM (Fig. **1b**), indicando que estas células, quando submetidas a ATRA, apresentam núcleos maiores que outros tratamentos, o que pode sugerir o início de um processo de senescência (Jung JK, *et al.* 2010). Senescência é um processo de parada irreversível na proliferação que ocorre em células expostas a situações de estresse, seja ele disparado por sinais endógenos ou induzido exogenamente (Kuilman T, *et al.* 2010). A senescência celular tem papel importante no envelhecimento celular e na perda de função tecidual nos organismos eucariotos ao longo da vida. Além disso, a indução de senescência após um estresse celular evita a proliferação de células potencialmente tumorais, o que torna este

mecanismo um dos principais supressores tumorais endógenos (Michaloglou C, *et al.* 2005; Vargas J, *et al.* 2012). Inibidores de cinase dependentes de ciclina, tais como p16, p21 e p27, são considerados como efetores de senescência celular (Bringold F, *et al.* 2000; Park SH, *et al.* 2011). Consistentemente, observou-se o aumento da expressão de p21 (Fig. 1c e 1d) corroborando com a indução de senescência celular pelo ATRA, o qual regula positivamente, pelo menos, um dos inibidores de cinase, p16, p21, e p27 (Zhu X, *et al.* 2014).

a



b

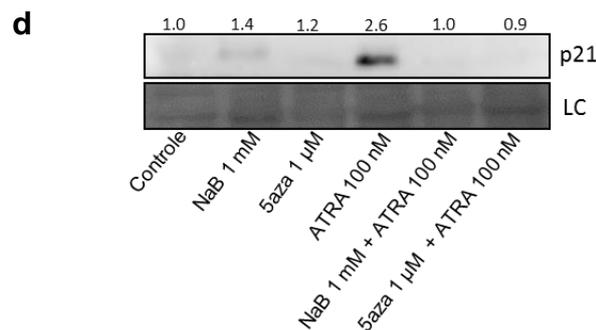
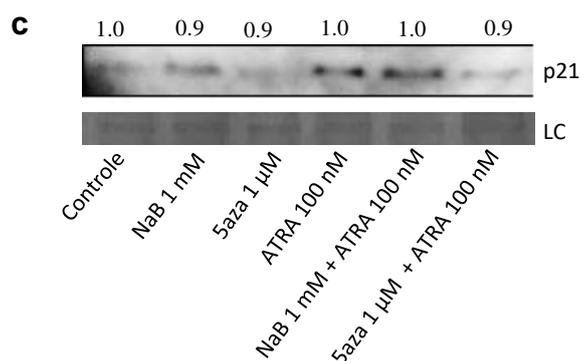
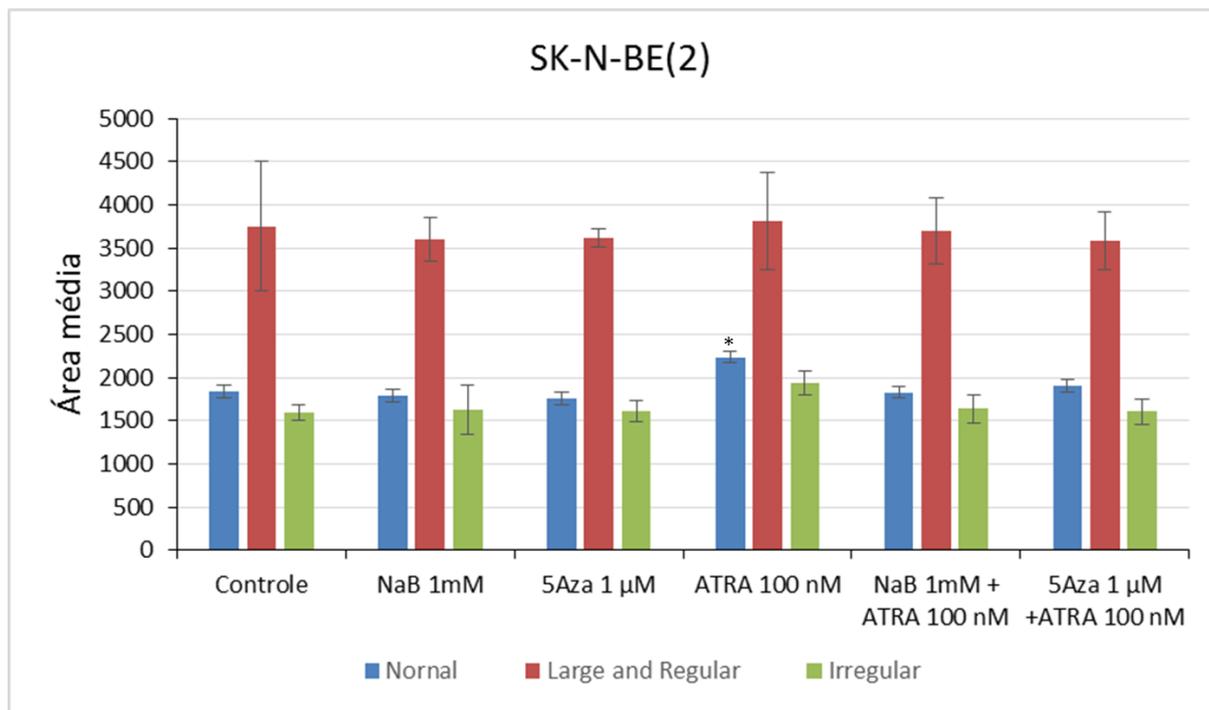


Figura 1. Análise morfométrica nuclear e expressão p21. **a,b** Após 30 h de tratamento, os núcleos foram analisados de acordo com a área nuclear e o índice de irregularidade nuclear (*N* normal, *LR* núcleos senescentes, *LI* núcleos grandes e irregulares, e *I* núcleos irregulares), em células SH-SY5Y e SK-N-BE (2). Média e desvio padrão. N = 3 experimentos independentes; * P <0,05, em comparação com células controle. **c, d** expressão representativa de p21 realizada 72 horas após o tratamento em células SH-SY5Y e SK-N-BE (2), respectivamente. A proteína p21 teve aumento de expressão no tratamento com ATRA 100 nM em células de SK-N-BE (2).

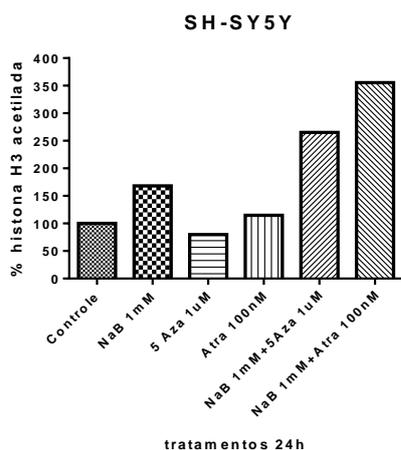
Para abordar a especificidade do modulador epigenético, as células de NB foram tratadas com NaB e foi realizado ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) da histona H3 acetilada.

Em ambas as linhagens celulares, após 24 h submetidas a diferentes tratamentos, apenas NaB 1 mM, NaB 1 mM com ATRA 100 nM e NaB 1 com 5-Aza 1 uM pareceram

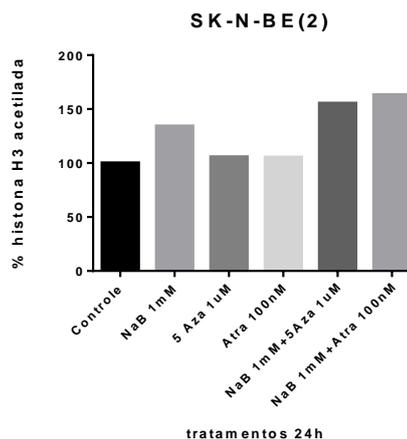
aumentar o nível proteico da histona H3 acetilada (Fig. **2a** e **2b**), o que nos mostra o efeito específico de NaB.

Além disso, investigamos também o nível da proteína histona H3 por Western Blot. Após 72h de tratamento, as proteínas foram extraídas. O tratamento combinado NaB 1 mM com ATRA 100 nM reduziu significativamente o nível da proteína histona H3 nas duas linhagens celulares em relação grupo de controle (Fig. **2c** e **2d**). Tanto 5-Aza como ATRA recrutam HATs (Marlétaz F, *et al.* 2006). Além disso, investigou-se a expressão de MECP2, uma proteína que se liga a dinucleotídeos CpG metilados e atua no silenciamento gênico, causando alterações na estrutura da cromatina por meio de interações com co-repressores, tais como histona desacetilases (Jones PL, *et al.* 1998). Os níveis de proteína de MECP2 correlacionam com baixa expressão em tratamentos NaB (Fig. **2c** e **2d**) porque NaB é HDACi, e a função de MECP2 é conectar-se a regiões metiladas; quando isso acontece, recruta HDAC, fazendo com que ocorra o silenciamento do gene (Pierce GB, *et al.* 1971).

a



b



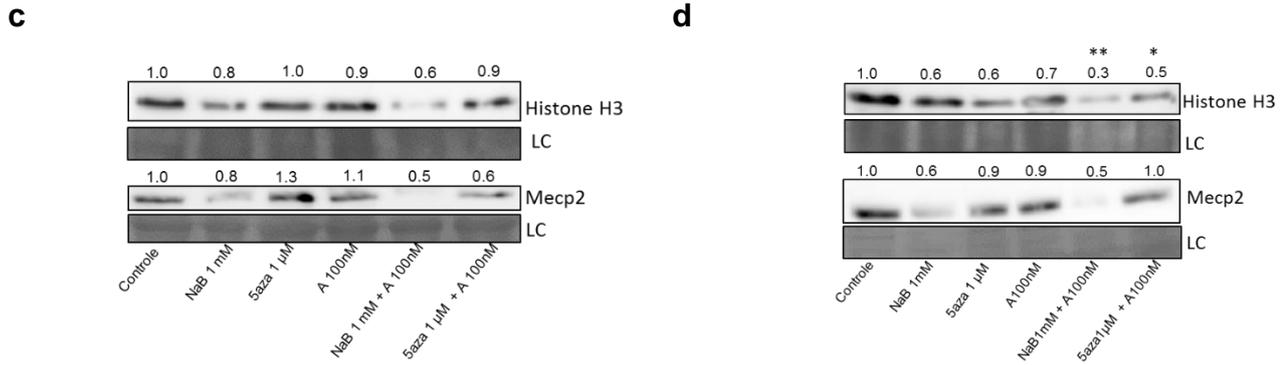


Figura 2. Efeitos após acetilação de histona H3. **a, b** gráfico representativo da acetilação de histona H3 em células SH-SY5Y e SK-N-BE(2), respectivamente. NaB 1 mM, NaB 1 mM com ATRA 100 nM e NaB 1 mM com 5-Aza 1 μ M parecem aumentar o nível da proteína histona H3 acetilada em ambas as linhagens celulares. **c, d** Western blot mostra os níveis de histona H3 e MeCP2; o tratamento de NaB diminuiu os níveis de expressão das proteínas em tratamentos combinados. Os valores mostrados acima das bandas representam a quantificação de proteínas em comparação com células controle. *Loading Control* (LC) é o controle para a quantidade de proteínas aplicada, como visto na membrana corada com azul de Coomassie. N = 3 experimentos independentes; * P <0,05, ** P <0,01, *** p <0,001 em comparação com células controle.

DISCUSSÃO

Os avanços no campo da epigenética em câncer levaram à percepção de que o empacotamento do genoma é potencialmente tão importante como o próprio genoma na regulação de processos celulares essenciais necessários para preservar a identidade e também a origem da doença. Uma compreensão mais profunda dos padrões dessas modificações epigenéticas e suas mudanças correspondentes no câncer permitiram a concepção de melhores estratégias de tratamento (Sharma S, *et al.* 2010; Kanherkar RR, *et al.* 2014).

Uma abordagem combinatória utilizando diferentes terapias epigenéticas aproxima-se da quimioterapia padrão apresentando uma significativa promessa para o sucesso do tratamento do câncer no futuro. Essas abordagens podem também ajudar na sensibilização das células tumorais, especialmente as células-tronco tumorais, que são refratárias à quimioterapia padrão. Uma maior compreensão e o desenvolvimento de drogas epigenéticas específicas podem ser a chave para a nossa capacidade de redefinir com êxito o epigenoma do câncer. (Sharma S, *et al.* 2010; Futscher BW, 2013).

A natureza reversível das modificações epigenéticas torna-se atraente para novos alvos terapêuticos antitumorais. Atualmente, um espectro de drogas epigenéticas estão em ensaios clínicos, incluindo inibidores de histona desacetilase, inibidores de histona desmetilase, inibidores de DNA metiltransferase e inibidores bromodomínio (Kazanets A, *et al.* 2016). Atualmente, o tratamento com drogas epigenéticas está implementado em ensaios clínicos de cânceres infantis (tabela 2). Em estudos anteriores, o tratamento de células de NB com SAHA, TSA, VPA mostrou redução na viabilidade e na proliferação celular (He W, *et al.* 2016).

Os efeitos colaterais dos HDACi são baixos quando comparados com quimioterapia citotóxica (Hainsworth JD, 2011). Infelizmente, a quimioterapia citotóxica deixa sobreviventes em longo prazo com uma variedade de problemas de saúde crônicos (Geenen MM, *et al.* 2007; Oeffinger KC, *et al.* 2006): diminui o estado de saúde, incluindo limitações (Bhatia S, *et al.* 2007; Hudson MM, *et al.* 2003; Ness KK, *et al.* 2005; Ness KK, *et al.* 2006), déficits de qualidade de vida e transtornos psicossociais (Schultz KA, *et al.* 2007; Speechley KN, *et al.* 2006; Zebrack BJ, *et al.* 2004; Zebrack BJ, *et al.* 2002), excesso de risco de mortalidade precoce (Mertens AC, 2007) desenvolvimento músculo-esquelética, maturação esquelética (Hudson MM, 2008).

Além disso, estudos pré-clínicos identificaram que o efeito antitumoral de HDACi pode ser aumentado quando combinado com retinoide e proporcionam uma base racional para a combinação destes dois compostos em estudos clínicos (Epping MT, *et al.* 2007; Epping MT, *et al.* 2009).

Assim, o tratamento com retinoides é amplamente utilizado em diversos tumores pediátricos. Em NB não é diferente: diversos estudos demonstraram efeitos sinérgicos quando há a combinação de HDACi e retinoides, sendo necessária para melhorar a atividade antitumoral (Kato Y, *et al.* 2007; Spiller SE, *et al.* 2008).

HDACi provocam alterações de acetilação no estado de cromatina e em outras proteínas não-histonas, resultando em alterações na expressão gênica, indução de apoptose, parada do ciclo celular, inibição da angiogénese e metástases (Ma X, *et al.* 2009; Rajendran P, *et al.* 2011). A hipermetilação do DNA tem sido frequentemente relatada em NB, a inativação de genes podem desempenhar um papel na quimiorresistência, como de genes supressores de tumores, incluindo INK4a p16 (p16) e

o receptor de ácido retinoico RAR β , que são silenciados por metilação do DNA (Merlo A, *et al.* 1995; Herman JG, *et al.* 1996; Cote S, *et al.* 1998); CASP8, um importante iniciador de apoptose (Teitz T, *et al.* 2000); RASSF1A (Hoebeeck J, *et al.* 2009), um regulador de parada de ciclo celular, parada da mitose e a apoptose (Donninger H, *et al.* 2007; Vos MD, *et al.* 2000). Os DNMTi, tais como 5-Azacitidina e decitabina, têm sido utilizados com sucesso para re-sensibilizar as células tumorais a drogas quimioterapêuticas (Chen G, *et al.* 2009; Li M, *et al.* 2009; Mirza S, *et al.* 2010; Shang D, *et al.* 2009; Schnekenburger M, *et al.* 2011). No estudo clínico de fase II, chamado DECIDER, que está em andamento, pacientes com mais de 60 anos com leucemia mieloide aguda, randomizados, receberam decitabina, ácido valpróico (VPA-HDACi), decitabina com VPA, decitabina com ATRA e decitabina em combinação com VPA e ATRA (Grishina O, *et al.* 2015).

No desenvolvimento desse trabalho, descobrimos que o tratamento combinado de NaB com ATRA e 5-Aza com ATRA apresentou uma significativa redução na proliferação celular em longo prazo, sugerindo que a associação de moduladores epigenéticos e moduladores retinoides em ambas as linhagens celulares de NB é eficiente. Além disso, no tratamento com o agente único, há uma redução na proliferação celular nos primeiros dias avaliados por CPD, porém eventualmente as células retomam o crescimento celular ao longo dos dias. Esse resultado é de extrema importância e nos mostra uma aproximação aos tempos utilizados em ensaios clínicos, dado que até então não há relatos *in vitro* em NB. Isso nos mostra que, mesmo após o tratamento de 72h, com a retirada dos agentes, seus efeitos antiproliferativos perduram por mais tempo.

NB constitutivamente expressa RAR α ; RAR β RAR γ e RXR, embora os níveis de RAR β sejam reduzidos em comparação com RAR α e RAR γ (Li C, *et al.* 1994). O tratamento com concentrações nanomolares de retinoides é suficiente para aumentar a

expressão RAR β e induzir a extensão de neuritos (filamentos celulares); no entanto, concentrações micromolares são necessárias para inibir significativamente o crescimento celular sob condições de cultivo convencionais (Matsumoto K, *et al.* 1995). A expressão de RAR β é frequentemente reduzida em muitos tecidos neoplásicos quando comparados com as células normais, incluindo o câncer de pulmão de células não pequenas, carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, câncer de mama e NB (Cheung B, *et al.* 1996; Castillo, *et al.* 1997; Picard E, *et al.* 1999).

Os receptores nucleares do ácido retinoico foram analisados por RT-PCR; após 24 horas de tratamento, apenas o RAR β parece ter uma expressão diferenciada em células SK-N-BE(2). Essas células são classificadas em subtipo 2A, que frequentemente apresentam deleção cromossômica 3p do receptor RAR β . A presença dessa deleção pode desempenhar um papel crucial no fenótipo tumoral agressivo (Hoebeeck J, *et al.* 2007), por isso a baixa expressão em células controle de SK-N-BE (2). Nos tratamentos com ATRA e a combinação de NaB com ATRA, houve aumento da expressão, o que sugere sua ativação como gene supressor tumoral, confirmando a redução significativa de proliferação celular no início do CPD. A alta expressão RAR β tem sido associada com bom resultado clínico em NB, e estudos têm mostrado que o aumento da expressão desse gene, através de transfecção, aumenta a capacidade de resposta em algumas linhagens celulares de NB a ácidos retinoicos (Cheung NK, *et al.* 1998). Além disso, avaliou-se a expressão de algumas proteínas relacionadas a vias de proliferação celular, diferenciação e indiferenciação. Em células tumorais, a síntese de proteínas está fortemente elevada, devido à ativação de oncogenes promover a expressão de proteínas mutantes e / ou a expressão de proteínas em excesso durante a tumorigênese e a progressão tumoral (Chang I, *et al.* 2016; Hetz C, *et al.* 2013).

MYCN é a proteína mais descrita em células de NB, pertence à família de genes *myc*, *c-myc*, *mycn* e *mycl*, envolvidos também na biologia de muitos tipos de câncer. Eles codificam proteínas com zíper de leucina – estrutura hélice-volta-hélice que é encontrada como heterodímeros com sua proteína obrigatória, MAX (Adhikary S, *et al.* 2005). O heterodímero MYC-MAX liga-se a locais centrais de ligação consenso do DNA, conduzindo à ativação da transcrição de genes alvo. O aumento de atividade dos fatores de transcrição MYC contribui para a proliferação celular, inibição da diferenciação, crescimento celular, angiogênese, redução da adesão celular, metástase e instabilidade genômica (Adhikary S, *et al.* 2005; Prochownik EV, *et al.* 2007). Em contraste, fatores de transcrição MYC, incluindo *n-Myc*, também sensibilizam as células para a apoptose, uma função que deve inibir a formação de tumores e que poderia também estar envolvida na regressão de tumores espontâneos (Fulda S, *et al.* 1999). Um subconjunto de NB com cópia única MYCN (não amplificado) apresenta regressão espontânea tumoral, característica frequente em NB. Notavelmente, MYCN desempenha um papel fundamental em vias de sinalização celular envolvidas em proliferação, tais como PI3K / AKT / mTOR ou MAPK / ERK (Boon K, *et al.* 2001). Nas linhagens de NB utilizadas, observamos uma reduzida expressão proteica de *n-Myc*; em tratamentos combinados, não foi significativa, mas parece sugerir que esta baixa expressão reitera o efeito antiproliferativo visto em ensaios de proliferação celular.

Nessa mesma família de proteínas, *c-Myc*, um proto-oncogene que codifica um fator de transcrição, desempenha um papel crucial em diversos processos biológicos, tais como proliferação celular, crescimento celular, apoptose, metabolismo, aderência, síntese de proteínas, replicação do DNA e a angiogênese (Dang CV, *et al.* 2006; Oster SK, *et al.* 2002; Secombe J, *et al.* 2004). Aqui, nós mostramos uma redução significativa

na expressão em todos os tratamentos em células SK-N-BE(2). É consistente com evidências anteriores que mostram que a diferenciação induzida por retinoide e inibição da proliferação em células NB é acompanhada por uma redução nos níveis de c-Myc (Hammerling U, *et al.* 1987; Stio M, *et al.* 2001). Notavelmente constatamos esses dados nas alterações morfológicas celulares e na análise de CPD.

ERK, participa da via de sinalização que pode ser ativada por mitógenos e citocinas para estimular a proliferação celular (Fulda S, 2009). Ativações aberrantes das vias PI3K e ERK são observadas em vários tipos de câncer, e, portanto, eles são alvos importantes para a terapia antitumoral (Hölzel, *et al.* 2010; Caino MC, *et al.* 2009). Estudos relatam que PI3K/AKT e ERK regulam a diferenciação celular induzida por ácido retinoico em células de NB (Qiao J, *et al.* 2012). Os dados encontrados nos mostram baixa expressão de MYCN e ERK em tratamentos combinados e com o agente único NaB; embora não significativa, parecem corroborar com relatos anteriores em que a diminuição de MYCN precede as alterações de ciclo celular e a diferenciação induzidas por ácido retinoico em NB (Thiele CJ, *et al.* 1985).

A modulação do ciclo celular também contribui para a resistência à quimioterapia. As cinases dependentes de ciclina (CDKs), as controladoras do ciclo celular, são alvos terapêuticos. Ao longo dos últimos anos novas terapias têm como base inibir as CDKs. A expressão de CDKs muitas vezes é alterada em tumores e/ou sua inibição pode induzir apoptose (Dickson MA, *et al.* 2009). Por isso, observamos que o ciclo celular apresenta um acúmulo maior da população de células nas fases G0 / G1 em grupos tratados, sugerindo efeito antiproliferativo.

Reduzir perfil de indiferenciação do tumor pode ser uma alternativa de redução da malignidade. Na maioria dos casos, um único gene marcador não pode ser usado para a

diferenciação (Frumm SM, *et al.* 2013). Uma variedade de agentes, incluindo retinoides, inibidores da histona desacetilase (HDACi), agonistas de PPAR γ e outros, atualmente em uso para uma variedade de doenças malignas, conforme tem se mostrado, induzem a diferenciação em tumores sólidos, incluindo NB (Katsetos CD, *et al.* 2003). Diferenciação celular inclui também modificação morfológica(ref); nesse caso, observamos a formação de neuritos, vistos mais proeminente em células SH-SY5Y (tipo N), nos tratamentos ATRA, NaB com ATRA e 5aza com ATRA. Uma diversidade de proteínas é usada como marcadores para neurônios maduros, como exemplo β -III tubulina, proteína neurônio-específica usada como marcador de diferenciação, antiproliferação, agressividade, resistência à quimioterapia e resultados clínicos desfavoráveis em tumores sólidos (Ochiai H, *et al.* 2010; Katsetos CD, *et al.* 2003; Hetland TE, *et al.* 2011; Lebok P, *et al.* 2016). Em células SK-N-BE(2) apresentaram uma redução do conteúdo de outro marcador neuronal, NeuN, particularmente expresso em neurônios maduros (Mullen RJ, *et al.* 1992; Graser S, *et al.* 2015). As diferenças nas alterações induzidas pelas drogas na expressão de marcadores de diferenciação de células neuronais entre as linhagens celulares pode estar relacionada com seus fenótipos diferentes antes do tratamento.

Investigamos também a expressão da proteína Bmi1, um membro do grupo proteínas *polycomb* (PcG). As proteínas PcG formam complexos multiproteicos atuando como repressores transcricionais (Nowak K, *et al.* 2006) e são reguladores evolutivamente conservados epigeneticamente (Schwartz YB, *et al.* 2007; Simon JA, *et al.* 2009; Sparmann A, *et al.* 2006). Estas proteínas também regulam a proliferação e diferenciação celular por meio do silenciamento epigenético de importantes genes reguladores de crescimento (Sparmann A, *et al.* 2006; Martinez AM, *et al.* 2006). Há cada vez mais evidências de que um desbalanço na expressão dessas proteínas PcG contribui para o

desenvolvimento tumoral. A expressão aberrante de proteínas PcG, em particular Bmi1, está associada a várias malignidades humanas.

Entre os fatores conhecidos que regulam a expressão de Bmi1, estão E2F e c-Myc (Guney, *et al.* 2006; Jiang G, *et al.* 2007). Em NB, MYCNliga-se diretamente ao promotor Bmi1 e induz sua transcrição. A expressão de Bmi1 em células de NB resulta na *upregulation* de vias de proliferação celular e de formação de colônias (Ochiai H, *et al.* 2010). Por estar envolvido em epigenética, avaliamos o papel dos HDACi na expressão de Bmi1. Em linhagens celulares de câncer de mama, o tratamento com NaB reduziu a expressão gênica de Bmi1 (Bommi PV, *et al.* 2010). Diante disso, observamos a redução da expressão proteica de Bmi1 após os tratamentos com NaB, NaB combinado com ATRA e 5-Aza com ATRA em ambas linhagens celulares de NB. Esse resultado nos mostra um efeito antiproliferativo muito mais acentuado em tratamentos combinados dos moduladores epigenéticos e ATRA.

Sendo assim, este trabalho mostra que, após tratamento prolongado, a associação de moduladores epigenéticos e de diferenciação permite investigar vias antiproliferativas importantes que devem ser exploradas para ajudar a resistência terapêutica.

Apesar dos avanços no diagnóstico, NB ainda permanece um tumor com grande variabilidade clínica, sendo responsável por um alto índice de mortalidade dentre os cânceres infantis. Diferentes tratamentos são realizados para melhorar a sobrevida dos pacientes, e a epigenética vem se tornando aliada para o combate de NB, apresentando bons resultados. É importante salientar que a melhoria dos tratamentos deve estar associada com menos efeitos colaterais ao paciente durante e após os tratamentos.

Tabela 2. Os ensaios clínicos com drogas epigenéticas em tumores sólidos. A marca de drogas e epigenética alvo juntamente com a fase clínica e resultado do julgamento são fornecidos. CR = Resposta completa; PR = resposta parcial; DP = doença estável. Adaptado: Ramachandran S (2015).

Droga	Alvo da droga	Ensaio clínicos	Terapia combinada	Câncer	Resultado	Referência
Vorinostat	HDAC	Fase II	Monoterapia	Mama recidiva ou refratário, colorretal, câncer <i>de</i> pulmão de células não pequenas, câncer de mama metastático, câncer de ovário refratário-platina ou carcinoma peritoneal primário.	Toxicidades observadas, incluindo grau 3. Nenhuma resposta observada.	Vansteenkiste J, 2008; Luu TH, 2008; Modesitt SC, 2008; Blumenschein, GR, 2008
		Fase II	Carboplatina e paclitaxel	câncer <i>de</i> pulmão de células não pequenas estágio avançado	Resposta confirmada de 34 % versus 12,5 % com placebo (p=0,02)	Ramalingam SS, 2010
Romidepsina	HDAC I / II	Fase II	Monoterapia	Câncer metastático renal	1 CR e 1 PR em 29 pacientes avaliados, taxa de resposta global 7 %	Stadler WW, 2006
		Fase II	Monoterapia	Câncer de pulmão, câncer colorretal, câncer próstata após remoção, câncer de pulmão de pequenas células	Sem resposta objetiva ou resposta mínima observada	Schrump DS, 2008; Whitehead RP, 2009; Molife LR, 2010; Otterson GA, 2010
Belinostat	HDAC	Fase II		Tumores sólidos	Ensaio de monoterapia sem muito sucesso, mas em combinação com a quimioterapia (paclitaxel e carboplatina) mostrou benefícios	Molife LR, 2011
		Fase II		Carcinoma do timo	Sem resposta objetiva	Giaccone G, 2011
Panobinostat	HDAC	Fase II		Carcinoma renal refratário	Sem resposta objetiva	Hainsworth JD, 2011
		Fase II	<i>Bortezomib</i>	Câncer pancreático avançado	Sem resposta objetiva	Wang H, 2012
Entinostat	HDAC I/ III	Fase II		Melanoma metastático	Sem resposta objetiva	Hauschild A, 2008
		Fase II	<i>Erlotinib</i>	Câncer de pulmão de células não pequenas avançado	Sem resposta objetiva	Witta SE, 2012

		Fase I/II	5-Azacitidina	Câncer de pulmão de células não pequenas metastático	1 CR e 1 PR, 4 de 19 pacientes tiveram resposta objetiva para tratamentos futuros	Juergens RA, 2011
Ácido valproico	HDAC I / IIa	Fase II	Hidralazina e quimioterapia	Carcinomas	4 PR e 8 SD de 15 pacientes avaliados	Candelaria M, 2007
		Fase III	Hidralazina e cisplatina-topotecano	Câncer cervical avançado	Melhor resposta objetiva observada com a combinação terapêutica	Coronel J, 2011
5-Azacitidina	DNMT	Fase I	<i>Erlotinib</i>	Tumores sólidos	Recomendado programa de dose para fase II	Bauman J, 2012
		Fase IIb-IIa	Monoterapia	Epitélio do ovário	1 CR , 3 PR e 10 SD em 29 pacientes avaliados	Fu S, 2011
Decitabina	DNMT	Fase I	Carboplatina	Tumores sólidos	Recomendado programa de dose para fase II	Appleton K, 2007
		Fase II	Cisplatina	carcinoma de células escamosas cervicais	38,1 % PR; 23, 8 % SD; significativas toxicidades observadas incluindo grau III e IV de neutropenia	Pohlmann, P, 2002

CONCLUSÕES

- Os tratamentos combinados de NaB e ATRA, 5-Aza e ATRA apresentam efeito antiproliferativo significativo em relação a tratamentos com agentes únicos.
- Todos os tratamentos induzem alteração do ciclo celular. Em células SH-SY5Y, as alterações são encontradas após tratamento de 24h, e, em células SK-N-BE(2), são encontradas após 30h de tratamento.
- O receptor de ácido retinoico ($RAR\beta$) apresenta diferente expressão frente aos tratamentos após 24h.
- A atividade da histona acetilada H3 é maior em tratamentos combinados com NaB (dados mostrados em anexo).
- A expressão proteica de c-Myc é significativamente reduzida após 72h em todos os tratamentos.
- A expressão de Bmi1 é reduzida significativamente nos tratamentos de NaB e NaB combinado com ATRA, importante marcador de autorrenovação e diferenciação.
- Os tratamentos combinados induzem alterações morfológicas nas duas linhagens celulares com extensão de neuritos, marcados por β 3-tubulina no citoplasma.
- Células SK-N-BE(2) e SH-SY5Y apresentam diferentes fenótipos, o que pode explicar as variações nos resultados na análise de marcadores de diferenciação e indiferenciação.

- O tratamento 5-Aza combinado com ATRA parece modular diferentes vias relacionadas com a diferenciação e indiferenciação celular, podendo ser um alvo promissor.
- Os tratamentos com ATRA na análise de NMA nos mostram uma tendência inicial ao estado de senescência em células SK-N-BE(2), assim, em células SH-SY5Y, apresentam uma tendência inicial a eventos de catástrofe mitótica ou outro dano nuclear sujeitos ao mesmo tratamento (dados mostrados em anexo).

PERSPECTIVAS

- Avaliação da proliferação celular dos tratamentos de NaB, 5-Aza e ATRA e suas combinações na proliferação celular em células de NB humano de cultivo primário;
- Avaliação de efeito crônico de NaB, 5-Aza e ATRA e suas combinações em ensaios de sobrevivência celular, como o ensaio clonogênico;
- Avaliação de proliferação celular, *in vivo*, dos tratamentos com NaB, 5-Aza e ATRA e suas combinações;
- Conclusão das análises de atividade de histona H3 acetilada, através de ensaio ELISA em ambas as linhagens celulares;
- Avaliação de atividade de outras classes de HDACs, através de ensaio ELISA em ambas as linhagens celulares;
- Avaliação da expressão dos receptores de ácido retinoico, RAR e RXR através de PCR em tempo real e / ou microscopia confocal;
- Avaliação da expressão proteica de marcadores de diferenciação e indiferenciação nos tratamentos de NaB, 5-Aza e ATRA e suas combinações no 16º dia (final do CPD) por microscopia confocal de fluorescência.
- Avaliação de amostras de pacientes quanto à expressão proteica de marcadores de diferenciação e indiferenciação, a fim de correlacionar os dados com prognóstico e recidiva do tumor.

REFERÊNCIAS

- Abujamra AL, Almeida VR, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R (2009). A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biol Int* **33(8)**: 899-903.
- Achkar CC, Derguini F, Blumberg B, Langston A, Levin AA, Speck J, Evans RM, Bolado J Jr, Nakanishi K, Buck J, Gudas LJ (1996). 4-Oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **(93)**: 4879–4884.
- Adhikary S, Eilers M (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6(8)**: 635-45
- Alokail MS, Alenad AM (2015). DNA Methylation, A Concise Review of Molecular Pathology of Breast Cancer, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.). *InTech*. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/a-concise-review-of-molecular-pathology-of-breast-cancer/dna-methylation>>. Acesso em: 23 de março de 2016.
- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson AD, Maris JM (2009). International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* **(100)**: 1471-1482.
- American Cancer Society (2015). Atlanta, GA. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002287-pdf.pdf>>. Acesso em: 05 de mar. de 2016.
- Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, Reade S, Jadayel D, Tang A, Bellenger K, Mackay L, Setanoians A, Schätzlein A, Twelves C, Kaye SB, Brown R (2007). Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol* **25(29)**: 4603-9.
- Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, Kogner P, Cummins C, Neumann HP, Voutilainen R, Dahia P, Eng C, Maher ER, Latif F (2001). RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene* **(20)**: 7573–7577.
- Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM; Children's Oncology Group (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* **(353)**: 2243-53.
- Austena LM, Carlsen H, Ertesvag A, Alexander G, Blomhoff HK, Blomhoff R (2004). Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging. *FASEB J* **18(11)**: 1255-7.
- Bachetti T, Di Paolo D, Di Lascio S, Mirisola V, Brignole C, Bellotti M, Caffa I, Ferraris C, Fiore M, Fornasari D, Chiarle R, Borghini S, Pfeffer U, Ponzoni M, Ceccherini I, Perri P (2010). PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a

functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS One* **5(10)**: pii:e13108.

Bandyopadhyay D, Mishra A, Medrano EE (2004). Overexpression of histone deacetylase 1 confers resistance to sodium butyrate-mediated apoptosis in melanoma cells through a p53-mediated pathway. *Cancer Res* **(64)**: 7706–7710.

Barbieri E, De Preter K, Capasso M, Chen Z, Hsu DM, Tonini GP, Lefever S, Hicks J, Versteeg R, Pession A, Speleman F, Kim ES, Shohet JM (2014). Histone chaperone CHAF1A inhibits differentiation and promotes aggressive neuroblastoma. *Cancer Res* **(74)**: 765–774.

Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **(66)**: 1654–1661.

Bastien J, Rochette-Egly C (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **(328)**: 1–16.

Batora NV, Sturm D, Jones DT, Kool M, Pfister SM, Northcott PA (2014). Transitioning from genotypes to epigenotypes: why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience* **(264)**: 171–185.

Bauman J, Verschraegen C, Belinsky S, Muller C, Rutledge T, Fekrazad M, Ravindranathan M, Lee SJ, Jones D (2012). A phase I study of 5-Azacytidine and erlotinib in advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **69(2)**: 547-54.

Bender CM, Gonzalzo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA (1999). Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol Cell Biol* **(19)**: 6690–8.

Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L (2012). The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenetics* **(4)**: 4.

Bettters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundstrom E, Garcia-Castro MI (2010). Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol* **(344)**: 578–592.

Bhatia S, Francisco L, Carter A, et al (2007). Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors: report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* **(110)**: 3784–92.

Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**:6-21.

Bird A (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* **447(7143)**: 396–398.

Blumenschein GR Jr, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, Lu C, Kumar AJ, Ricker JL, Chiao JH, Chen C, Frankel SR (2008). Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Investig New Drugs* **26(1)**: 81-7.

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006). Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **(5)**: 769–784.

Bommi PV, Dimri M, Sahasrabudde AA, Khandekar J, Dimri GP (2010). The polycomb group protein BMI1 is a transcriptional target of HDAC inhibitors. *Cell Cycle* **9(13)**: 2663-73.

Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R (2010). Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat Chem Biol* **6(3)**: 238–243.

Brevini TA, Pennarossa G, Manzoni EF, Gandolfi CE, Zenobi A, Gandolfi F (2016). The quest for an effective and safe personalized cell therapy using epigenetic tools. *Clin Epigenetics* **16**;8:119.

Brodeur GM (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **(3)**: 203–216.

Brodeur GM, Look AT, Shimada H, Hamilton VM, Maris JM, Hann HW, Leclerc JM, Bernstein M, Brisson LC, Brossard J, Lemieux B, Tuchman M, Woods WG (2001). Biological aspects of neuroblastomas identified by mass screening in Quebec. *Medical and Pediatric Oncology* **(36)**: 157–159.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **(11)**: 1466–1477

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984). Amplification of MYCN in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **(224)**: 1121-4.

Brodeur GM, Bagatell R (2014). Mechanisms_of_neuroblastoma_regression. *Nat Rev Clin Oncol*. 11(12):704-13.

Buck J, Derguini F, Levi E, Nakanishi K, Hammerling U (1991). Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-retro-retinol. *Science* **(254)**: 1654–1656.

Bukhari MH, Qureshi SS, Niazi S, Asef M, Naheed M, Khan SA, Chaudhry NA, Tayyab M, Hasan M (2007). Chemotherapeutic/chemopreventive role of retinoids in chemically induced skin carcinogenesis in albino mice. *Int J Dermatol* **(46)**: 1160–1165.

Bushue N, Wan YJ (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **62(13)**: 1285-98.

Butler Tjaden NE, Trainor PA (2013). The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res* **(162)**: 1–15.

Caino MC, Meshki J, Kazanietz MG (2009). Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis* **14(4)**: 392–408.

Candelaria M, Gallardo-Rincón D, Arce C, Cetina L, Aguilar-Ponce JL, Arrieta O, González-Fierro A, Chávez-Blanco A, de la Cruz-Hernández E, Camargo MF, Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Pérez-Plasencia C, Taja-Chayeb L, Wegman-Ostrosky T, Revilla-Vazquez A, Dueñas-González A (2007). A phase II study of epigenetic therapy

with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* **18(9)**: 1529-38.

Candido EP, Reeves R, Davie JR (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **(14)**: 105–113.

Carén H, Fransson S, Ejeskär K, Kogner P, Martinsson T (2007). Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. *Br J Cancer* **(97)**: 1416-24.

Cartum J. (2012). Neuroblastoma: o enigmático tumor da infância. *Ped Mod* **(48)**: 8

Castillo L, Milano G, Santini J, Demard F, Pierrefite V (1997). Analysis of retinoic acid receptor beta expression in normal and malignant laryngeal mucosa by a sensitive and routine applicable reverse transcription-polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay method. *Clin Cancer Res* **3(11)**: 2137–42.

Challis GB, Stam HJ (1990). The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol* **(29)**: 545–550.

Chang I, Wang CY (2016). Inhibition of HDAC6 Enhances Bortezomib-induced Apoptosis in HNSCC by Reducing Autophagy. *J Biol Chem* pii: jbc.M116.717793.

Charlet J, Schnekenburger M, Brown KW, Diederich M (2012). DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol* **(83)**: 858–865.

Chen G, Wang Y, Huang H, Lin F, Wu D, Sun A, Chang H, Feng Y (2009). Combination of DNA methylation inhibitor 5-Azacytidine and arsenic trioxide has synergistic activity in myeloma. *Eur J Haematol* **82(3)**: 176–83.

Chen HP, Zhao YT, Zhao TC (2015). Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression (Histone deacetylases in cancer). *Crit Rev Oncog* **20(1-2)**: 35–47.

Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL (1991). Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **(30)**: 11018–25.

Chen N, Onisko B, Napoli JL (2008). The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* **(283)**: 20841– 20847.

Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **(455)**: 971–974.

Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Reichert U, Norris MD, Haber M, Stewart BW, Marshall GM (1996). Retinoic acid receptors beta and gamma distinguish retinoid signals for growth inhibition and neuriteogenesis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229(1)**: 349-54.

Cheung NK, Dyer MA (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **(13)**: 397-411.

Cheung NK, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, Heguy A, Pappo AS, Federico S, Dalton J, Cheung IY, Ding L, Fulton R, Wang J, Chen X, Becksfort J, Wu J, Billups CA, Ellison D, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Dyer MA; St Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project (2012). Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* **(307)**: 1062–1071.

Cheung NK, Kushner BH, Cheung IY, Kramer K, Canete A, Gerald W, Bonilla MA, Finn R, Yeh SJ, Larson SM (1998). Anti-G(D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol* **16(9)**: 3053-60.

Cheung NV, Heller G (1991). Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **(9)**: 1050–8.

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, and Ross RA (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* **(49)**: 219–225.

Conte M, Parodi S, De Bernardi B, Milanaccio C, Mazzocco K, Angelini P, Viscardi E, Di Cataldo A, Luksch R, Haupt R (2006). Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer* **(106)**: 1409–1417.

Coronel J, Cetina L, Pacheco I, Trejo-Becerril C, González-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Arias-Bofill D, Candelaria M, Vidal S, Dueñas-González A (2011). A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med Oncol* **(28)**: S540-6.

Cote S, Sinnott D, Momparler RL (1998). Demethylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* **(9)**: 743–750

Cruz FD, Matushansky I (2012). Solid tumor differentiation therapy - is it possible? *Oncotarget* **3(5)**: 559-67.

Cunningham I, Gee TS, Reich LM, Kempin SJ, Naval AN, Clarkson BD (1989). Acute promyelocytic leukemia: treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* **73(5)**: 1116-1122.

D'Alessio A, De Vita G, Cali G, Nitsch L, Fusco A, Vecchio G, Santelli G, Santoro M, de Franciscis V (1995). Expression of the RET oncogene induces differentiation of SK-N-BE neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* **(6)**: 1387- 1394.

Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* **(16)**: 253–264.

Davidoff AM (2012). Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery* **(21)**: 2-14.

De Botton S, Dombret H, Sanz M, Miguel JS, Caillot D, Zittoun R, Gardembas M, Stamatoulas A, Condé E, Guerci A, Gardin C, Geiser K, Makhoul DC, Reman O, de la Serna J, Lefrere F, Chomienne C, Chastang C, Degos L, Fenaux P (1998). Incidence, clinical

features, and outcome of all trans-retinoic acid syndrome in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* **92(8)**: 2712-2718.

Decock A, Ongenaert M, Vandesomepele J, Speleman F (2011). Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings. *Epigenetics* **(6)**: 962–970.

Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, Blacher S, Verdin E, Foidart JM, Nusgens BV, Castronovo V (2002). Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* **(21)**: 427-436.

Dickson MA, Schwartz GK (2009). Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol* **16(2)**: 36–43.

Di Lascio S, Bachetti T, Saba E, Ceccherini I, Benfante R, Fornasari D (2013). Transcriptional dysregulation and impairment of PHOX2B auto-regulatory mechanism induced by polyalanine expansion mutations associated with congenital central hypoventilation syndrome. *Neurobiol Dis* **(50)**: 187–200.

Diesch J, Zwick A, Garz A-K, Palau A, Buschbeck M, Götze KS (2016). A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clinical Epigenetics* **(8)**: 71.

Donninger H, Vos MD, Clark GJ (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* **(120)**: 3163–72.

Downing JR, Wilson RK, Zhang J, Mardis ER, Pui CH, Ding L, Ley TJ, Evans WE (2012). *Nat Genet* **44(6)**:619-22.

Dupin E, Calloni G, Real C, Gonçalves-Trentin A, Le Douarin NM (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol* **(330)**: 521–529.

Epping MT, Meijer LA, Bos JL, Bernards R (2009). UNC45A confers resistance to histone deacetylase inhibitors and retinoic acid. *Mol Cancer Res* **7(11)**: 1861-70.

Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R (2007). A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(45)**: 17777-82.

Esteller M (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **(8)**: 286–98.

Everson TC (1964). Spontaneous regression of cancer. *Ann N Y Acad Sci* **(114)**: 721–735.

Everson TC, Cole WH (1956). Spontaneous Regression of Cancer: Preliminary Report. *Ann Surg* **144(3)**: 366–380.

Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, Graupner G, Lu XP, Pfahl M (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* **372(6501)**: 107-11.

Feinberg AP (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* **(14)**: 427–432.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* **(7)**: 21–33.

Feinberg AP, Tycko B (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **(4)**: 143–153.

Fenaux P, Chevret S, Guerci A, Fegueux N, Dombret H, Thomas X, Sanz M, Link H, Maloisel F, Gardin C, Bordessoule D, Stoppa AM, Sadoun A, Muus P, Wandt H, Mineur P, Whittaker JA, Fey M, Daniel MT, Castaigne S, Degos L (2000). Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL group. *Leukemia* **14(8)**: 1371-1377.

Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* **(23)**: 9418–9427.

Fontaine-Perus JC, Chanconie M, Le Douarin NM (1982). Differentiation of peptidergic neurones in quail-chick chimaeric embryos. *Cell Differ* **(11)**: 183–193.

Frumm SM, Fan ZP, Ross KN, Duvall JR, Gupta S, VerPlank L, Suh BC, Holson E, Wagner FF, Smith WB, Paranal RM, Bassil CF, Qi J, Roti G, Kung AL, Bradner JE, Tolliday N, Stegmaier K. (2013). Selective HDAC1/HDAC2 Inhibitors Induce Neuroblastoma Differentiation. *Chem Biol* **20(5)**: 713–725.

Fu S, Hu W, Iyer R, Kavanagh JJ, Coleman RL, Levenback CF, Sood AK, Wolf JK, Gershenson DM, Markman M, Hennessy BT, Kurzrock R, Bast RC Jr (2011). Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, inpatients with platinum-resistant or platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *Cancer* **117(8)**: 1661-9.

Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM (2008). CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **(100)**: 940-9.

Fulda S (2009). The PI3K/Akt/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr Cancer Drug Targets* **(9)**: 729–737.

Fulda S, Lutz W, Schwab M, Debatin KM (1999). MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene* **18(7)**: 1479-86.

Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S (2002). FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* **(62)**: 4916–4921.

Futscher BW (2013). Epigenetic Changes During Cell Transformation. *Adv Exp Med Biol* **(754)**: 179–194

Gaetano C, Matsumoto K, Thiele CJ (1991). Retinoic acid negatively regulates p34cdc2 expression during human neuroblastoma differentiation. *Cell Growth Differ* **(2)**: 487-493.

Gao RN, Levy IG, Woods WG, Coombs BA, Gaudette LA, Hill GB (1997). Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers. *Cancer Causes and Control* **(8)**: 745–754.

Garaventa A, Luksch R, Biasotti S, Severi G, Pizzitola MR, Viscardi E, Prete A, Mastrangelo S, Podda M, Haupt R, De Bernardi B (2003). A phase II study of topotecan with vincristine and doxorubicin in children with recurrent/refractory neuroblastoma. *Cancer* **(98)**: 2488–94.

Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF (2005). Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem* **(280)**: 556–563.

Garvin JH Jr, Lack EE, Berenberg W, Frantz CN (1984). Ganglioneuroma presenting with differentiated skeletal metastases Report of a case. *Cancer* **(54)**: 357–360.

Geenen MM, Cardous-Ubbink MC, Kremer LC, et al (2007). Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* **(297)**: 2705–15.

George RE, Sanda T, Hanna M, Fröhling S, Luther W 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulya S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **(455)**: 975–8.

Giaccone G, Rajan A, Berman A, Kelly RJ, Szabo E, Lopez-Chavez A, Trepel J, Lee MJ, Cao L, Espinoza-Delgado I, Spittler J, Loehrer PJ Sr (2011). Phase II study of belinostat in patients with recurrent or refractory advanced thymic epithelial tumors. *J Clin Oncol* **(29)**: 2052-2059.

Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausies T, Karp JE, Rudek MA, Zhao M, Smith BD, Manning J, Jiemjit A, Dover G, Mays A, Zwiebel J, Murgo A, Weng LJ, Herman JG (2006). Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* **(66)**: 6361–9.

Graser S, Mentrup B, Schneider D, Klein-Hitpass L, Jakob F, Hofmann C (2015). Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases the expression of neurogenic differentiation markers in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Bone* **(79)**: 150-61.

Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V (2010). Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **(136)**: 1415–1421.

Griffiths EA, Gore SD (2008). DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* **45(1)**: 23-30.

Grishina O, Schmoor C, Döhner K, Hackanson B, Lubrich B, May AM, Cieslik C, Müller MJ, Lübbert M (2015). DECIDER: prospective randomized multicenter phase II trial of low-dose decitabine (DAC) administered alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) and all-trans retinoic acid (ATRA) in patients >60 years with acute myeloid leukemia who are ineligible for induction chemotherapy. *BMC Cancer* **(15)**: 430.

Guglielmi L, Cinnella C, Nardella M, Maresca G, Valentini A, Mercanti D, Felsani A, D'Agnano I (2014). MYCN gene expression is required for the onset of the differentiation programme in neuroblastoma cells. *Cell Death Dis* **(5)**: e1081.

Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM (1999). Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* **(18)**: 4948-57.

Haas D, Ablin AR, Miller C, Zoger S, Matthay KK (1988). Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment. *Cancer* **(62)**: 818–825.

Hainsworth JD, Infante JR, Spigel DR, Arrowsmith ER, Boccia RV, Burris HA (2011). A phase II trial of panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of patients with refractory metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Invest* **(29)**: 451-455.

Hammerling U, Bjelfman C, Pålman S (1987). Different regulation of N- and c-myc expression during phorbol ester-induced maturation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Oncogene* **(2)**: 73-77.

Hauschild A, Trefzer U, Garbe C, Kaehler KC, Ugurel S, Kiecker F, Eigentler T, Krissel H, Schott A, Schadendorf D (2008). Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. *Melanoma Res.* **18(4)**: 274-8.

Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T (2010). Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *Int J Cancer* **(127)**: 1332–1346.

Hayat MA (2012). Neuroblastoma. *Pediatric Cancer* Vol. 1.

He W, Wu Y, Tang X, Xia Y, He G, Min Z, Li C, Xiong S, Shi Z, Lu Y, Yuan Z (2016). HDAC inhibitors suppress c-Jun/Fra-1-mediated proliferation through transcriptionally downregulating MKK7 and Raf1 in neuroblastoma cells. *Oncotarget* **7(6)**: 6727-47.

Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB (1996). Hypermethylation- associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* **56(4)**: 722-7.

Hetland TE, Hellesylt E, Flørenes VA, Tropé C, Davidson B, Kærn J (2011). Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. *Hum Pathol* **(42)**: 1019–1026.

Hetz, C, Chevet, E, Harding, H (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* **(12)**: 703-719.

Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **(68)**: 397–406.

Hoebbeck J, Michels E, Menten B, Van Roy N, Eggert A, Schramm A, De Preter K, Yigit N, De Smet E, De Paepe A, Laureys G, Vandesompele J, Speleman F (2007). High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21- p22

tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer* **(120)**: 533-538.

Hoebeeck J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, Vermeulen J, Yigit N, Hoyoux C, Laureys G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2009). Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* **273(2)**: 336-46.

Hoehner JC, Olsen L, Sandstedt B, Kaplan DR, Pahlman S (1995). Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. *Am J Pathol* **(147)**: 102–113.

Hölzel M, Huang S, Koster J, Ora I, Lakeman A, Caron H, Nijkamp W, Xie J, Callens T, Asgharzadeh S, Seeger RC, Messiaen L, Versteeg R, Bernards R (2010). NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell* **142(2)**: 218–29.

Hudson MM (2008). Survivors of childhood cancer: coming of age. *Hematol Oncol Clin North Am* **22(2)**:211-31.

Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y, Hobbie W, Chen H, Gurney JG, Yeazel M, Recklitis CJ, Marina N, Robison LR, Oeffinger KC (2003). Childhood Cancer Survivor Study Investigators Health status of adult long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *JAMA* **(290)**: 1583–92.

Hudson MM, Link MP, Simone JV (2014). Milestones in the Curability of Pediatric Cancers. *J Clin Oncol* **32(23)**:2391-7.

Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, Ma J, Edmonson MN, Hedlund EK, Rusch MC, Shurtleff SA, Mulder HL, Boggs K, Vadordaria B, Cheng J, Yergeau D, Song G, Becksfort J, Lemmon G, Weber C, Cai Z, Dang J, Walsh M, Gedman AL, Faber Z, Easton J, Gruber T, Kriwacki RW, Partridge JF, Ding L, Wilson RK, Mardis ER, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Baker SJ, Zambetti G, Ellison DW, Zhang J, Downing JR (2014).

The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun.***5**:3630.

Instituto Nacional do Câncer (2015). Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em 03 de mar. de 2016.

Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **(455)**: 967–70.

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* **293(5532)**: 1074–1080.

Jiang G, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* **(81)**: 10914-23.

Jones P, Steinkühler C (2008). From natural products to small molecule ketone histone deacetylase inhibitors: development of new class specific agents. *Curr Pharm Des* **(14)**: 545–561.

Jones PA, Laird PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **(21)**: 163–167.

Jones PA, Taylor SM (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **(20)**: 85–93.

Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, Lee B, Tsai S, Delgado IE, Rudek MA, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Brock MV, Rudin CM (2011). Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* **1(7)**: 598-607.

Kamijo T (2012). Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatr Res* **(71)**: 511-515.

Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A (2006). Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatric Blood and Cancer* **(46)**: 285–291.

Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **(2)**: 49.

Mertens AC (2007). Cause of mortality in 5-year survivors of childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer* **(48)**: 723–6.

Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, Estey EH, McCredie KB, Smith TL, Dalton WT Jr, Cork A, Trujillo JM, Freireich EJ (1986). Acute promyelocytic leukemia. M.D. Anderson Hospital experience. *Am J Med* **80(5)**: 789- 797.

Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. *Neuron* **(11)**: 321-331.

Kato Y, Salumbides BC, Wang XF, Qian DZ, Williams S, Wei Y, Sanni TB, Atadja P, Pili R (2007). Antitumor effect of the histone deacetylase inhibitor LAQ824 in combination with 13-cis-retinoic acid in human malignant melanoma. *Mol Cancer Ther* **6(1)**: 70-81.

Kato K, Kuhara A, Yoneda T, Inoue T, Takao T, Ohgami T, Dan L, Kuboyama A, Kusunoki S, Takeda S, Wake N (2011). Sodium butyrate inhibits the self-renewal capacity of endometrial tumor side-population cells by inducing a DNA damage response. *Mol Cancer Ther* **10(8)**: 1430-9.

Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ (2003). Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* **(55)**: 77–96.

Kazanets A, Shorstova T, Hilmi K, Marques M, Witcher M (2016). Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim Biophys Acta* **(2)**: 275-88.

- Kazantsev AG, Thompson LM (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* **(7)**: 854-868.
- Kerbel RS, Kobayashi H, Graham CH (1994). Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? *J Cell Biochem* **(56)**: 37–47.
- Kim YZ (2014). Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res Treat* **2(1)**: 7-21.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128(4)**: 693–705.
- Kushner BH, LaQuaglia MP, Bonilla MA, Lindsley K, Rosenfield N, Yeh S, Eddy J, Gerald WL, Heller G, Cheung NK (1994). Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *J Clin Oncol* **(12)**: 2607–13.
- Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L, Martínez-López W (2008). Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutat Res* **(658)**: 191–214.
- Lallier TE, Bronner-Fraser M (1988). A spatial and temporal analysis of dorsal root and sympathetic ganglion formation in the avian embryo. *Dev Biol* **(127)**: 99–112.
- Längler A, Christaras A, Abshagen K, Krauth K, Hero B, Berthold F (2002). Topotecan in the treatment of refractory neuroblastoma and other malignant tumors in childhood — a phase-II study. *Klin Padiatr* **(214)**: 153–6.
- Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, Durai V, Lowe WL Jr (2013). Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl Res* **(161)**: 131–140.
- Le Douarin N, Kalcheim C (1999). The Neural Crest. Cambridge University Press. No. 36: 445pp.
- Lebok P, Öztürk M, Heilenkötter U, Jaenicke F, Müller V, Paluchowski P, Geist S, Wilke C, Burandt E, Lebeau A, Wilczak W, Krech T, Simon R, Sauter G, Quaas A. (2016). High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncol Lett* **(11)**: 1987–1994.
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**:301–13.
- Li C, Einhorn P, Reynolds C (1994). Expression of retinoic acid receptors α , β and γ in human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res* **(385)**: 221-227.
- Li M, Balch C, Montgomery JS, Jeong M, Chung JH, Yan P, Huang TH, Kim S, Nephew KP (2009). Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *BMC Med Genomics* **(2)**: 34.
- Li Y, Zhang Y, Hill J, Kim HT, Shen Q, Bissonnette RP, Lamph WW, Brown PH (2008). The retinoid, bexarotene, prevents the development of premalignant lesions in MMTV-erbB2 mice. *Br J Cancer* **(98)**: 1380–1388.

Li Z, Zhang Y, Tong Y, Tong J, Thiele CJ (2015). Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **16(3)**: 477-83.

Liang D, Kong X, Sang N (2006). Effects of histone deacetylase inhibitors on HIF-1. *Cell Cycle* **(5)**: 2430-2435.

Liao YP, Ho SY, Liou JC (2004). Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J Cell Sci* **(117)**: 2917–2924.

Lissa D, Robles AI (2016). Methylation analyses in liquid biopsy. *Transl Lung Cancer Res* **5(5)**:492-504.

Liu B, Lee KW, Li H, Ma L, Lin GL, Chandraratna RA, Cohen P (2005). Combination therapy of insulin-like growth factor binding protein-3 and retinoid X receptor ligands synergize on prostate cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **(11)**: 4851–4856.

Liu H, Li S, Wang X, Zhu J, Wei Y, Wang Y, Wen Y, Wang L, Huang Y, Zhang B, Shang S, Zhang Y (2016). DNA methylation dynamics: identification and functional annotation. *Brief Funct Genomics* 1–15.

London WB, Frantz CN, Campbell LA, Seeger RC, Brumback BA, Cohn SL, Matthay KK, Castleberry RP, Diller L (2010). Phase II randomized comparison of topotecan plus cyclophosphamide vs. topotecan alone in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* **28(24)**: 3808-15.

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL (2005). Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **(23)**: 6459–65.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA (1984). Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* **(311)**: 231-5.

Louis CU, Shohet JM (2015). Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu Rev Med* **(66)**: 49–63.

Louis M, Rosato RR, Brault L, Osbild S, Battaglia E, Yang XH, Grant S, Bagrel D (2004). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. *Int J Oncol* **(25)**: 1701–1711.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **(389)**: 251–260.

Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith DD, Doroshow JH, Wong C, Aparicio A, Gandara DR, Somlo G (2008). A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res* **14(21)**: 7138-42.

Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB (2009). Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* **(69)**: 1911–1934.

Mandelli F, Diverio D, Avisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, Brocchia G, Cerri R, Falda M, Fioritoni G, Leoni F, Liso V, Petti MC, Rodeghiero F, Saglio G, Vegna ML, Visani G, Jehn U, Willemze R, Muus P, Pelicci PG, Biondi A, Lo Coco F (1997). Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood* **90(3)**: 1014- 1021.

Maris JM (2010). Recent Advances in Neuroblastoma. *N Engl J Med* **362(23)**: 2202–2211.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007). Neuroblastoma. *Lancet* **(369)**: 2106-2120.

Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S (2002). Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12–13. *Cancer Res* **(62)**: 6651–6658.

Maris JM, Weiss MJ, Guo C, Gerbing RB, Stram DO, White PS, Hogarty MD, Sulman EP, Thompson PM, Lukens JN, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM (2000). Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **(18)**: 1888-99.

Maris JM, Matthay KK (1999). Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* **17(7)**:2264–2279.

Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG, Weiss WA (2014). The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* **14(4)**: 277-89.

Martinez AM, Cavalli G (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* **5(11)**: 1189-97.

Martinsson T, Sjöberg RM, Hallstensson K, Nordling M, Hedborg F, Kogner P (1997). Delimitation of a critical tumour suppressor region at distal 1p in neuroblastoma tumours. *Eur J Cancer* **(33)**: 1997-2001.

Masetti R, Biagi C, Zama D, Vendemini F, Martoni A, Morello W, Gasperini P, Pession A (2012). Retinoids in pediatric onco-hematology: the model of acute promyelocytic leukemia and neuroblastoma. *Adv Ther* **29(9)**: 747-762.

Matsumoto K, Wada R, Yamashiro J, Kaplan D, Thiele C (1995). Expression of Brain-derived growth factor and p145 TrkB affects survival, differentiation and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **(55)**: 1798-1806.

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**:766–70.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995). 5 'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1(7)**: 686–692.

Mertens AC (2007). Cause of mortality in 5-year survivors of childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer* **(48)**: 723–6.

Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005). Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol Biol Cell* **(16)**: 4623–4635.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**:553–60.

Minuti G, D'Incecco A, Landi L, Cappuzzo F (2014). Protein kinase inhibitors to treat non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*. **15(9)**:1203-13

Mirza S, Sharma G, Pandya P, Ralhan R (2010). Demethylating agent 5-Aza-2-deoxycytidine enhances susceptibility of breast cancer cells to anticancer agents. *Mol Cell Biochem* **342(1-2)**: 101–9.

Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP; Gynecologic Oncology Group (2008). A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **109(2)**: 182-6.

Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, Hamdi M, van Nes J, Westerman BA, van Arkel J, Ebus ME, Haneveld F, Lakeman A, Schild L, Molenaar P, Stroeken P, van Noesel MM, Ora I, Santo EE, Caron HN, Westerhout EM, Versteeg R (2012). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* **(483)**: 589–593.

Molife LR, Attard G, Fong PC, Karavasilis V, Reid AH, Patterson S, Riggs CE Jr, Higano C, Stadler WM, McCulloch W, Dearnaley D, Parker C, de Bono JS (2010). Phase II, two-stage, single-arm trial of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) romidepsin in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Ann Oncol* **21(1)**: 109-13.

Molife LR, de Bono JS (2011). Belinostat: clinical applications in solid tumors and lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* **(20)**: 1723–1732.

Moon RC, Kelloff GJ, Detrisac CJ, Steele VE, Thomas CF, Sigman CC (1994). Chemoprevention of OH-BBN-induced bladder cancer in mice by oltipraz, alone and in combination with 4-HPR and DFMO. *Anticancer Res* **(14)**: 5–11.

Morales AV, Barbas JA, Nieto MA (2005). How to become neural crest: from segregation to delamination. *Semin Cell Dev Biol* **(16)**: 655–662.

Mossé YP, Diskin SJ, Wasserman N, Rinaldi K, Attiyeh EF, Cole K, Jagannathan J, Bhambhani K, Winter C, Maris JM (2007). Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* **(46)**: 936–949.

Mossé YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM (2004). Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* **(75)**: 727–730.

Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **(455)**: 930–935.

Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **20(3)**: 3898-941.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116(1)**: 201-11.

Muller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, Winzer KJ, Dietel M, Weichert W, Denkert C (2013). Differential Expression of Histone Deacetylases HDAC1, 2 and 3 in Human Breast Cancer-Overexpression of HDAC2 and HDAC3 is Associated with Clinicopathological Indicators of Disease Progression. *BMC Cancer* **(13)**: 215.

Mund C, Brueckner B, Lyko F (2006). Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* **(1)**: 7–13.

Mund C, Hackanson B, Stresemann C, Lübbert M, Lyko F (2005). Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-20-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res* **(65)**: 7086–90.

Napoli JL (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* **(80)**: S52–62.

National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER Database. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov>>. Acesso em: 15 de jan. 2016.

National Institutes of Health [homepage]. Bethesda, MD. National Cancer Institute 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/childhood-cancers>>. Acesso em: 05 de mar. 2016.

Ness KK, Mertens AC, Hudson MM, et al (2005). Limitations on physical performance and daily activities among long-term survivors of childhood cancer. *Ann Intern Med* **(143)**: 639–47.

Ness KK, Wall MM, Oakes JM, et al (2006). Physical performance limitations and participation restrictions among cancer survivors: a population-based study. *Ann Epidemiol* **(16)**: 197–205.

Newmark HL, Lupton JR, Young CW (1994). Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* **(78)**: 1–5.

Nör C, Sassi FA, de Farias CB, Schwartzmann G, Abujamra AL, Lenz G, Brunetto AL, Roesler R (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.

Nowak K, Kerl K, Fehr D, Kramps C, Gessner C, Killmer K, Samans B, Berwanger B, Christiansen H, Lutz W (2006). BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res* **34(6)**: 1745-54.

Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T (2010). Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* **29(18)**: 2681-90.

Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al (2006). Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* **(355)**: 1572–82.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ (2002). The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res* **(84)**: 81–154.

Otterson GA, Hodgson L, Pang H, Vokes EE; Cancer and Leukemia Group B (2010). Phase II study of the histone deacetylase inhibitor Romidepsin in relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30304). *J Thorac Oncol* **5(10)**: 1644-8.

Papac RJ (1998). Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* **(12)**: 571–578.

Park JR, Bagatell R, London WB, Maris JM, Cohn SL, Matthey KK, Hogarty M; COG Neuroblastoma Committee (2013). Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **(60)**: 985–993.

Park JR, Eggert A, Caron H (2010). Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* **(24)**: 65-86.

Park JR, Stewart CF, London WB, Santana VM, Shaw PJ, Cohn SL, Matthey KK (2006). A topotecan containing induction regimen for treatment of high risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* **24(18S)**: 9013.

Pei D, Luther W, Wang W, Paw BH, Stewart RA, George RE (2013). Distinct neuroblastoma-associated alterations of PHOX2B impair sympathetic neuronal differentiation in zebrafish models. *PLoS Genet* **(9)**: e1003533.

Picard E, Seguin C, Monhoven N, Rochette-Egly C, Siat J, Borrelly J, Martinet Y, Martinet N, Vignaud JM (1999) Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91(12)**: 1059–66.

Pierce GB (1983). The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. *Am J Pathol* **113(1)**: 117-124.

Pierce GB, Wallace C (1971). Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* **31(2)**: 127-134.

Pisano C, Vesci L, Foderà R, Ferrara FF, Rossi C, De Cesare M, Zuco V, Pratesi G, Supino R, Zunino F (2007). Antitumor activity of the combination of synthetic retinoid ST1926 and cisplatin in ovarian carcinoma models. *Ann Oncol* **(18)**: 1500–1505.

Plantaz D, Mohapatra G, Matthey KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG (1997). Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* **(150)**: 81-9.

Pohlmann P, DiLeone LP, Cancellà AI, Caldas AP, Dal Lago L, Campos O Jr, Monego E, Rivoire W, Schwartzmann G (2002). Phase II trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA hypomethylating agent, in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Oncol* **25(5)**: 496-501.

Pouteau E, Nguyen P, Ballèvre O, Krempf M (2003). Production rates and metabolism of short-chain fatty acids in the colon and whole body using stable isotopes. *Proc Nutr Soc* **(62)**: 87–93.

Poyet C, Jentsch B, Hermanns T, Schweckendiek D, Seifert HH, Schmidpeter M, Sulser T, Moch H, Wild PJ, Kristiansen G (2014). Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer. *BMC Clin Pathol* **(14)**: 10.

Prochownik EV, Li Y (2007). The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* **6(9)**: 1024-9.

Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* **(217)**: 133–139.

Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A, Kim J, Lawrence MS, Lichtenstein L, McKenna A, Pedamallu CS, Ramos AH, Shefler E, Sivachenko A, Sougnez C, Stewart C, Ally A, Birol I, Chiu R, Corbett RD, Hirst M, Jackman SD, Kamoh B, Khodabakshi AH, Krzywinski M, Lo A, Moore RA, Mungall KL, Qian J, Tam A, Thiessen N, Zhao Y, Cole KA, Diamond M, Diskin SJ, Mosse YP, Wood AC, Ji L, Sposto R, Badgett T, London WB, Moyer Y, Gastier-Foster JM, Smith MA, Guidry Auvil JM, Gerhard DS, Hogarty MD, Jones SJ, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Seeger RC, Khan J, Marra MA, Meyerson M, Maris JM (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **(45)**: 279–284.

Qiao J, Paul P, Lee S, Qiao L, Josifi E, Tiao JR, Chung DH (2012). PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **424(3)**: 421-6.

Rajendran P, Ho E, Williams DE, Dashwood RH (2011). Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetics* **3(1)**: 4.

Ramachandran S, Ient J, Göttgens EL, Krieg AJ, Hammond EM (2015). Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia. *Genes (Basel)* **6(4)**: 935-56.

Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, Argiris AE, Koczywas M, Gitlitz B, Thomas S, Espinoza-Delgado I, Vokes EE, Gandara DR, Belani CP (2010). Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **(28)**: 56–62.

Rettig WJ, Spengler BA, Garin-Chesa P, Old LJ, Biedler JL (1987). Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. *Cancer Res* **(47)**: 1383–1389.

Ross RA, Biedler JL, Spengler BA (2003). A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* **(197)**: 35-39.

Ross RA, Spengler BA, Dome`nech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* **(6)**: 449–456.

Roy Choudhury S, Karmakar S, Banik NL, Ray SK. (2012). Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. *J Oncol* 782020.

Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-Azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* **(81)**: 6993–7.

Santos-Rosa H, Caldas C (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **(41)**: 2381–2402.

Sanz MA, Martín G, Rayón C, Esteve J, González M, Díaz-Mediavilla J, Bolufer P, Barragán E, Terol MJ, González JD, Colomer D, Chillón C, Rivas C, Gómez T, Ribera JM, Bornstein R, Román J, Calasanz MJ, Arias J, Alvarez C, Ramos F, Debén G (1999). A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. *Blood* **94(9)**: 3015- 3021.

Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, Blackford A, Parmigiani G, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hogarty MD (2013). Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet* **(45)**: 12–17.

Schilling FH, Berthold F, Erttmann R, Michaelis J, Spix C, Sander J, Schwarz K, Treuner J (2000). Population-based and controlled study to evaluate neuroblastoma screening at one year of age in Germany: interim results. *Medical and Pediatric Oncology* **(35)**: 701–704.

Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O (2014). Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer* **(135)**: 2249–2261.

Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Speleman F, Noguera R, Tonini GP, Fischer M, Ambros I, Monclair T, Matthay KK, Ambros P, Cohn SL, Pearson AD (2012). Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer* **(107)**: 1418–1422.

Schnekenburger M, Grandjette C, Ghelfi J, Karius T, Foliguet B, Dicato M, Diederich M (2011). Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-Azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy. *Biochem Pharmacol* **81(3)**: 364–78.

Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Kruchin E, Wright JJ, Rosing DR, Sparreboom A, Figg WD, Steinberg SM (2008). Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin. *Clin Cancer Res* **14(1)**: 188-98.

Schultz KA, Ness KK, Whitton J, et al (2007). Behavioral and social outcomes in adolescent survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* **(25)**: 3649–56.

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F (2003). Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* **(4)**: 472-80.

Schwartz YB, Pirrotta V (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **(8)**: 9-22.

Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007). An Acetylation Site in the Middle Domain of Hsp90 Regulates Chaperone Function. *Mol Cell* **(25)**: 151–159.

Sealy L, Chalkley R (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **(14)**: 115–121.

Secombe J, Pierce SB, Eisenman RN (2004). Myc: a weapon of mass destruction. *Cell* **(117)**: 153–156.

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985). Association of multiple copies of the MYC Noncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* **(313)**: 1111-6.

Shah RK, Valdez TA, Wang Z, Shapshay SM (2001). Pulsed-dye laser and retinoic acid delay progression of oral squamous cell carcinoma: a murine model. *Laryngoscope* **(111)**: 1203–1208.

Shang D, Liu Y, Liu Q, Zhang F, Feng L, Lv W, Tian Y (2009). Synergy of 5-Aza-20-deoxycytidine (DAC) and paclitaxel in both androgen-dependent and –independent prostate cancer cell lines. *Cancer Lett* **278(1)**: 82–7.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31(1)**: 27–36.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999). Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* **(86)**: 349–363.

Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, and Matthay KK (2001). International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors. *Cancer* **(92)**: 2451–2461.

Shiohira H, Kitaoka A, Enjoji M, Uno T, Nakashima M (2012). Am80 induces neuronal differentiation via increased tropomyosin-related kinase B expression in a human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Biomed Res* **33(5)**: 291-7.

Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin MA, Brugières L, Feunteun J, Hartmann O, Bonaïti-Pellié C (2004). Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer* **(42)**: 99–105.

Schulte JH, Lindner S, Bohrer A, Maurer J, De Preter K, Lefever S, Heukamp L, Schulte S, Molenaar J, Versteeg R, Thor T, Künkele A, Vandesompele J, Speleman F, Schorle

H, Eggert A, Schramm A (2013). MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. *Oncogene* **(32)**: 1059–1065.

Sidell N (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **(68)**: 589–96.

Simon JA, Kingston RE (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* **(10)**: 697-708.

Singh RP, Shiue K, Schomberg D, Zhou FC (2009). Cellular Epigenetic Modifications of Neural Stem Cell Differentiation. *Cell Transplant* **18(10)**: 1197–1211.

Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL (2014). Declining Childhood and Adolescent Cancer Mortality. *Cancer* **120(16)**: 2497–2506.

Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, Cortes J, Wierda WG, Ouzounian S, Quezada A, Pierce S, Estey EH, Issa JP, Kantarjian HM, Garcia-Manero G (2007). Safety and clinical activity of the combination of 5-Azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **(110)**: 2302–8.

Sorm F, Piskala A, Cihák A, Veselý J (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **(20)**: 202–3.

Sparmann A, van Lohuizen M (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **(6)**: 846-56.

Speechley KN, Barrera M, Shaw AK, et al (2006). Health-related quality of life among child and adolescent survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol* **(24)**: 2536–43.

Spiller SE, Ditzler SH, Pullar BJ, Olson JM (2008). Response of preclinical medulloblastoma models to combination therapy with 13-cis retinoic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Neurooncol* **87(2)**: 133-41.

Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova-Foucher E (2006). Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978–1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* **(42)**: 2081–2091.

Stadler WM, Margolin K, Ferber S, McCulloch W, Thompson JA (2006). A phase II study of desipeptide in refractory metastatic renal cell cancer. *Clin Genitourin Cancer* **5(1)**: 57-60.

Stio M, Celli A, Treves C (2001). Synergistic anti-proliferative effects of vitamin D derivatives and 9-cis retinoic acid in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **(77)**: 213-222.

Stone RM, Maguire M, Goldberg MA, Antin JH, Rosenthal DS, Mayer RJ (1988). Complete remission in acute promyelocytic leukemia despite persistence of abnormal bone marrow promyelocytes during induction therapy: experience in 34 patients. *Blood* **71(3)**: 690-696.

Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* **(123)**: 8–13.

Sun SY, Lotan R (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* **41(1)**: 41-55.

Takayama H, Suzuki T, Mugishima H, Fujisawa T, Ookuni M, Schwab M, Gehring M, Nakamura Y, Sugimura T, Terada M (1992). Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene* **(7)**: 1185-9.

Takita J, Yang HW, Bessho F, Hanada R, Yamamoto K, Kidd V, Teitz T, Wei T, Hayashi Y (2000). Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma. *Med Pediatr Oncol* **(35)**: 541–543.

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH (1997). All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* **337(15)**: 1021-1028.

Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, Ogden A, Weinstein H, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH (2002). All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* **100(13)**: 4298-4302.

Teillet MA, Kalcheim C, Le Douarin NM (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev Biol* **(120)**: 329–347.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6(5)**: 529-35.

Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, Moleti ML, Giona F, Vignetti M, Menna G, Locatelli F, Pession A, Barisone E, De Rossi G, Diverio D, Micalizzi C, Aricò M, Basso G, Foa R, Mandelli F (2005). GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood* **106(2)**: 447-453.

Thang SH, Kobayashi M, Matsuoka I (2000). Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor responsiveness in developing rat sympathetic neurons by retinoic acid and bone morphogenetic protein-2. *J Neurosci* **(20)**: 2917–2925.

Theissen J, Oberthuer A, Hombach A, Volland R, Hertwig F, Fischer M, Spitz R, Zapatka M, Brors B, Ortmann M, Simon T, Hero B, Berthold F (2014). Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **(53)**: 639-49.

Thiele CJ, Israel MA (1988). Regulation of MYCN expression is a critical event controlling the ability of human neuroblasts to differentiate. *Exp Cell Biol* **(56)**: 321-333.

Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA (1985). Decreased expression of MYCN precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **(313)**: 404–6.

Thomas LR, Wang Q, Grieb BC, Phan J, Foshage AM, Sun Q, Olejniczak ET, Clark T, Dey S, Lorey S, Alicie B, Howard GC, Cawthon B, Ess KC, Eischen CM, Zhao Z, Fesik SW, Tansey WP (2015). Interaction with WDR5 promotes target gene recognition and tumorigenesis by MYC. *Mol Cell* **58(3)**:440-52.

Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frébourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J (2004). Germ-line mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* **(74)**: 761–4.

Ulivi P, Zoli W, Capelli L, Chiadini E, Calistri D, Amadori D (2013). Target therapy in NSCLC patients: Relevant clinical agents and tumour molecular characterisation. *Mol Clin Oncol* **(1)**: 575–581.

Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, Chen C, Ricker JL, Randolph SS, Schöffski P (2008). Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. *Investig New Drugs* **(26)**: 483–488.

Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG (2003). Class II Histone Deacetylases: Versatile Regulators. *Trends Genet* **(19)**: 286–293.

Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ (2000). Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem* **275(46)**: 35669–72.

Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA (2004). Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* **6(6)**: 838-845.

Wang H, Cao Q, Dudek AZ (2012). Phase II study of panobinostat and bortezomib in patients with pancreatic cancer progressing on gemcitabine-based therapy. *Anticancer Res* **(32)**: 1027-31.

Wang H, Maurer BJ, Reynolds CP, Cabot MC (2001). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide elevates ceramide in neuroblastoma cell lines by coordinate activation of serine palmitoyltransferase and ceramide synthase. *Cancer Res* **61(13)**: 5102-5.

Wang M, Zhou C, Sun Q, Cai R, Li Y, Wang D, Gong L (2013). ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Exp Mol Pathol* **(95)**:124–130

Wang Y, Wen W, Yi Y, Zhang Z, Lubet RA, You M (2009). Preventive effects of bexarotene and budesonide in a genetically engineered mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **(2)**: 1059–1064.

Wang W, Zhong Q, Teng L, et al (2013). Mutations that disrupt PHOXB interaction with the neuronal calcium sensor HPCAL1 impede cellular differentiation in neuroblastoma. *Oncogene* **33(25)**:3316-24.

Wang M, Zhou C, Cai R, Li Y, Gong L. (2013). Copy number gain of MYCN gene is a recurrent genetic aberration and favorable prognostic factor in Chinese pediatric neuroblastoma patients. *Diagn Pathol* **8**:5.

Weichert W (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett* **(280)**: 168–176.

Westermarck UK, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson MA (2011). The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* **(21)**: 256–266.

Weston JA (1963). A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev Biol* **(6)**: 279–310.

Whitehead RP, Rankin C, Hoff PM, Gold PJ, Billingsley KG, Chapman RA, Wong L, Ward JH, Abbruzzese JL, Blanke CD (2009). Phase II trial of romidepsin (NSC-630176) in previously treated colorectal cancer patients with advanced disease: a Southwest Oncology Group study (S0336). *Invest New Drugs* **27(5)**: 469-75.

Wilson TR, Longley DB, Johnston PG (2006). Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol* **17(Suppl. 10)**:x315–24.

Witta SE, Jotte RM, Konduri K, Neubauer MA, Spira AI, Ruxer RL, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Hirsch FR (2012). Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small cell lungcancer who progressed on prior chemotherapy. *J Clin Oncol* **30(18)**: 2248-55.

Wolever TM, Josse RG, Leiter LA, Chiasson JL (1997). Time of day and glucose tolerance status affect serum short-chain fatty concentrations in humans. *Metabolism* **(46)**: 805–811.

Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286(5439)**: 481-6.

Wyatt S, Andres R, Rohrer H, Davies AM (1999). Regulation of neurotrophin receptor expression by retinoic acid in mouse sympathetic neuroblasts. *J Neurosci* **(19)**: 1062–1071.

Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP (2006). DNA methylation changes after 5-Aza-20-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* **(66)**: 5495– 503.

Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, London WB, Cohn SL (2007). Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* **13(11)**: 3191-7.

Yang XJ, Seto E (2008). The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases: from Bacteria and Yeast to Mice and Men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **(9)**: 206–218.

Yoo CB, Jones PA (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5(1)**: 37-50.

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM; Children's Oncology Group (2010). Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* **363(14)**: 1324–34.

Zebrack BJ, Gurney JG, Oeffinger K, et al (2004). Psychological outcomes in long-term survivors of childhood brain cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* **(22)**: 999–1006.

Zebrack BJ, Zeltzer LK, Whitton J, et al (2002). Psychological outcomes in long-term survivors of childhood leukemia, Hodgkin's disease, and non-Hodgkin's lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatrics* **(110)**: 42–52.

Zebrack BJ, Zevon MA, Turk N, et al (2007). Psychological distress in long-term survivors of solid tumors diagnosed in childhood: a report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer* **(49)**: 47–51.

Referências do anexo

- Bringold F, Serrano M (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* **35(3)**: 317-29.
- Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* **7(8)**: e42522.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19(2)**: 187-91.
- Jung JK, Park SH, Jang KL (2010). Hepatitis B virus X protein overcomes the growth-inhibitory potential of retinoic acid by downregulating retinoic acid receptor-beta2 expression via DNA methylation. *J Gen Virol* **(91)**: 493–500.
- Kouzarides T (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9(1)**: 40-48.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* **24(22)**: 2463-79.
- Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* **(86)**: 41-65.
- Marlétaz F, Holland LZ, Laudet V, Schubert M (2006). Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci* **2(2)**: 38–47.
- Metze K (2013). Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* **(13)**: 719–735.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436(7051)**:720-4.
- Misteli T (2005). Concepts in nuclear architecture. *Bioessays* **(27)**: 477–487.
- Park SH, Lim JS, Jang KL (2011). All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* **310(2)**: 232-9.
- Pierce GB, Wallace C (1971). Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* **31(2)**: 127–134.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **(70)**: 81-120.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **(983)**: 84-100.

Vargas J, Feltes BC, Poloni Jde F, Lenz G, Bonatto D (2012). Senescence; an endogenous anticancer mechanism. *Front Biosci (Landmark Ed)* **(17)**: 2616-43.

Wilson TR, Longley DB, Johnston PG (2006). Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol*; **17(Suppl. 10)**:x315–24.

Zhu X, Wetta H (2014). Genetics and Epigenetics in Tumorigenesis: Acting Separately or Linked? *Austin J Clin Med.***1(4)**: 1016.

Anexo -
Curriculum Vitae

Viviane Rösner de Almeida

Novembro/2016

Viviane Rösner de Almeida

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Viviane Rösner de Almeida

Endereço eletrônico

E-mail para contato : vivianera@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Efeitos da associação entre ácido retinóico, quimioterápicos e moduladores epigenéticos em células de neuroblastoma.
Orientador: Rafael Roesler
- 2009 - 2011** Mestrado em Medicina: Ciências Médicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Influência do bloqueio do receptor do peptídeo liberador de gastrina em combinação com inibição de histona deacetilase sobre a proliferação de células de neuroblastoma, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Rafael Roesler
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
-

Formação complementar

- 2016 – 2016** Extensão universitária em Biologia e Genética Forense. (Carga horária: 10h).
Instituto Galeno, IG, Brasil
- 2016 - 2016** Extensão universitária em Transcriptograma: Ferramenta de Análise de Expressão Gênica de Genoma. (Carga horária: 8h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Curso de Sequenciamento de Nova Geração. (Carga horária: 12h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Cell culture as alternative model for animal exper. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Identificação Humana pelo DNA: Genética Forense. (Carga horária: 44h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em II Simpósio de Microbiologia Aplicada. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2008 - 2008	Curso de curta duração em Capacitação de Tutoria e Educação a Distância. (Carga horária: 60h). Serviço Social da Indústria, SESI, Brasil
2008 - 2008	Desenvolvimento de Habilidades e Competências. . (Carga horária: 5h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Curso sobre Arthropoda. (Carga horária: 45h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em II Curso de Extensão sobre células-tronco. (Carga horária: 15h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Biologia Molecular, Genética e Biotecnologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Boas Práticas de Laboratório II. (Carga horária: 20h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Microscopia e Microanálises MEV. (Carga horária: 6h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Curso em Bioética. (Carga horária: 23h). Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Porto Alegre, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Insetos: Coleta e Identificação. (Carga horária: 20h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em I Curso de Manipulação Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Terapia Celular e Manipulação Genética. (Carga horária: 9h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Fronteiras de Biologia Celular. (Carga horária: 9h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2011 - Atual	Vínculo: Doutorado PPGBCM , Enquadramento funcional: Aluna de doutorado PPGBCM, Regime: Parcial
2009 - 2011	Vínculo: Mestrado em Ciências Médicas , Enquadramento funcional: Mestre em Medicina: Ciências Médicas, Regime: Parcial
2005 - 2008	Vínculo: Bolsista CNPQ , Enquadramento funcional: iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Colégio Anchieta - RS - ANCHIETA

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professora Ciências e Biologia , Carga horária: 38, Regime: Parcial

3. Instituto Educacional Definitivo - DEFINITIVO

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professora Ensino Técnico , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Outras informações:
Disciplinas ministradas Microbiologia e Patologia I

4. Faculdade Dom Bosco Porto Alegre - FDBPA

Vínculo institucional

2005 - 2007 Vínculo: Estagiária laboratórios , Enquadramento funcional: estagiária colégio e faculdade Dom Bosco , Carga horária: 20, Regime: Parcial

5. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Outro(estagiária) , Enquadramento funcional: aluna iniciação científica , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

07/2004 - 07/2005 Estágio, Faculdade de Biociências, Departamento de Biologia
Estágio:
Estagiária em Laboratório de Entomologia

Prêmios e títulos

2008 Troféu São Marcelino Champagnat, PUCRS

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; VIEIRA, I. A.; BUENDIA, M.; BRUNETTO, A. T.; GREGIANIN, L.; BRUNETTO, A. L.; KLAMT, F.; Farias, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; LOPEZ, Patrícia. L. C.; Rafael Roesler

Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells. *Molecular Neurobiology*. , v.53, p.1 - , 2016.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

2. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; BRUNETTO, A. L.; Gilberto; Rafael Roesler; ABUJAMRA, A. L. De-mystifying the Epigenetic Free for All: Pharmacophore Modeling for Epigenetic Cancer Therapy. *Pharmaceutica Analytica Acta*. , v.02, p.1 - 5, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

3. Goulart, B.K.; de Lima, M. N. M; Farias, C. B; Reolon, G. K; **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; João; Kapczinski, F.; Nadja; Rafael Roesler

Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels.. *Neuroscience.* , v.167, p.969 - 973, 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

4. ABUJAMRA, A. L.; **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; BRUNETTO, A. L.; Gilberto; Rafael Roesler
A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biology International.* , v.33, p.899 - 903, 2009.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

5. Rafael Roesler; Tatiana Luft; Silvia; Caroline; **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; João; Nadja; Ivan; Gilberto

Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus.. *Neuropharmacology.* , v.51, p.350 - 357, 2006.

Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Vários

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; Goulart, B.K.; de Lima, M. N. M; Reolon, G. K; Farias, C. B; Stertz, L; Fries, G.R; Kapczinski, F.; Nadja; Rafael Roesler

Administração sistêmica de cetamina prejudica a consolidação da memória de reconhecimento e reduz os níveis de BDNF no hipocampo de ratos. In: 4º Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções, 3º Simpósio Brasileiro de Doenças Neurodegenerativas, Fórum de Discussão em Psicofarmacologia, 2º Encontro de Neuropsiquiatria Geriátrica, 2º Congresso Sul Brasileiro de Sono, 2008, Bento Gonçalves.

4º CBCCE. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**; CORSEUIL, E.

Espécies de Notodontidae (Lepidoptera, Noctuoidea) ocorrentes no RS In: I Encontro sobre Lepidoptera Neotropicais, 2005, Campinas.

I ELEN. , 2005.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Produção técnica

Trabalhos técnicos

1. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**

Estágio revisão de conhecimentos na disciplina Histologia Médica I - UFRGS, 2005

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**

Monitoria na disciplina de Instrumentação à Biologia, 2005

Referências adicionais : Brasil/Português.

3. **ALMEIDA, Viviane Rösner de**

Monitoria na disciplina de Morfologia Humana, 2005

Referências adicionais : Brasil/Português.

Educação e Popularização de C&T

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **35ª Semana Científica do HCPA**, 2015. (Outra)
A associação de ácido retinóico e moduladores epigenéticos em células de neuroblastoma.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **35ª Semana Científica do HCPA**, 2015. (Outra)
A associação de ácido retinóico e moduladores epigenéticos em células de neuroblastoma.
2. **A curadoria como estratégia de trabalho do professor autor**, 2015. (Seminário)
3. **GE Day**, 2015. (Encontro)
4. **Fronteiras do Conhecimento em Oncologia**, 2014. (Encontro)
5. **The Best of Asco**, 2014. (Simpósio)
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Congresso da Sociedade Brasileira Biologia Celular**, 2014. (Congresso)
EFFECTS OF RETINOIC ACID, CHEMOTHERAPICS AND EPIGENETIC MODULATORS IN NEUROBLASTOMA CELLS.
7. **Design Thinking para Educadores**, 2013. (Outra)
8. **I Encontro sobre Excelência Médica**, 2012. (Encontro)
Membro da Comissão organizadora.
9. **The Best of Asco**, 2012. (Simpósio)
10. **11º Congresso do Ensino Privado Gaúcho**, 2011. (Congresso)
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Congresso Franco-Brasileiro de Oncologia**, 2010. (Congresso)
O canabidiol reduz a viabilidade celular em linhagem de neuroblastoma.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**, 2010. (Congresso)
O canabidiol reduz a viabilidade celular em linhagem de neuroblastoma.
13. **Simpósio sobre Terapias Inovadoras**, 2009. (Simpósio)
14. **The Best of ASCO 2009**, 2009. (Congresso)
15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 2008. (Encontro)
O inibidor de desacetilase de histona, butirato de sódio, previne o efeito estimulador do bloqueio de GRPR sobre a proliferação de células de neuroblastoma.
16. **II Seminário de Administração Hospitalar**, 2008. (Seminário)
17. **The Best of ASCO 2008**, 2008. (Encontro)
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**, 2008. (Congresso)

O inibidor de desacetilase de histona, butirato de sódio, previne o efeito proliferativo do antagonista do GRP-R em células de neuroblastoma.

19. **ASCO - Congresso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica**, 2007. (Congresso)
20. **Neuroproteção e Produtos Naturais**, 2007. (Simpósio)
21. **II Semana Acadêmica Interdisciplinar-" De olho no mundo da Ciência"**, 2006. (Encontro)
22. **Jornada Internacional de doenças cérebro-vasculares**, 2006. (Outra)
23. Apresentação Oral no(a) **XVIII Salão de Iniciação Científica UFRGS**, 2006. (Outra)
Bombesina previne prejuízo da memória em ratos tratados com a proteína beta-amilóide(25-35).
24. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Encontro sobre Lepidoptera Neotropicais**, 2005. (Encontro)
Espécies de Notodontidae(Lepidoptera, Noctuoidea) ocorrentes no RS.
25. **I Semana Acadêmica Interdisciplinar- Faculd. Biociências, Farmácia e Química**, 2005. (Encontro)
26. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2005. (Congresso)
27. **" Ciclo de Palestras sobre Transgênicos"**, 2004. (Outra)
Curso de Extensão.
28. **Aula inaugural " Entendendo a Profissão"**, 2004. (Outra)
Aula inaugural .
29. **II Congresso Brasileiro de Agrobiodiversidade, V Seminário Internacional sobre Agroecologia e VI Seminário Estadual sobre Agroecologia**, 2004. (Congresso)
30. **III Semana Acadêmica de Biologia**, 2004. (Outra)
Semana Acadêmica de Biologia.
31. **Projeto Nova- Biologia**, 2004. (Seminário)
Ciclo de Seminários PET/BIOLOGIA/PUCRS.

Organização de evento

1. CARLINI, C. R. R. S.; GUERRA, A. S; SOUZA, A. F. D.; RITT, A. B. B; TICHOTA, D.M.; LOPES, F.C.; KIPPER, F. C.; GIESEL, G. M.; DEBARBA, J. A.; POL FACHIN, L.; COSTA, L. L.; LEDUR, P. F.; MEIRA, S. M. M.; GONCHOROSKI, T.; BROLL, V.; **ALMEIDA, Viviane Rösner de VII Curso de Férias PPGBCM - Alimentos**, 2012. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. GREGIANIN, L.; **ALMEIDA, Viviane Rösner de**
Participação em banca de Matheus Loureiro da Silva Cruz. **Avaliação da expressão de Toll-like receptors nas leucemias pediátricas**, 2015
(Biomedicina) Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. 16ª Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão, 2015

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

Áreas do conhecimento : Biotecnologia

Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação como avaliadora de trabalhos apresentados na modalidade oral pelos cursos técnicos e superior.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	4
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	2
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	5
Apresentações de trabalhos (Outra).....	1

Produção técnica

Trabalhos técnicos (outra).....	3
---------------------------------	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	9
Participações em eventos (seminário).....	3
Participações em eventos (simpósio).....	4
Participações em eventos (encontro).....	8
Participações em eventos (outra).....	7
Organização de evento (outro).....	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1
Participação em banca de comissões julgadoras (outra).....	1

Outras informações relevantes

- 1 Primeiro lugar de coeficiente de Rendimento entre os 10 formados do período de 2008/I