



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
INSTITUTO METRÓPOLE DIGITAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

Análise baseada em biologia de sistemas
destaca processos alterados que afetam a
sobrevivência geral de pacientes com sarcoma de
Ewing

MATHEUS GIBEKE SIQUEIRA DALMOLIN

Natal-RN

Abril 2022

Matheus Gibeke Siqueira Dalmolin

Análise baseada em biologia de sistemas destaca
processos alterados que afetam a sobrevida geral de
pacientes com sarcoma de Ewing

Defesa de Mestrado apresentada ao Pro-
grama de Pós-Graduação em Bioinformática
da Universidade Federal do Rio Grande do
Norte.

Área de concentração:

Bioinformática

Linha de pesquisa:

Biologia de Sistemas

Orientadora

Dra. Marialva Sinigaglia

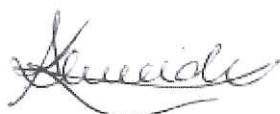
Natal-RN

Abril 2022

Dissertação de Mestrado sob o título *Análise baseada em biologia de sistemas destaca processos alterados que afetam a sobrevida geral de pacientes com sarcoma de Ewing* apresentada por Matheus Gibeke Siqueira Dalmolin e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.



Dra. Marialva Sinigaglia
Presidente
Instituto do Câncer Infantil
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Prof. Dra. Rita Maria Cunha de Almeida
Examinador interno
Instituto de Física
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Lauro José Gregianin
Examinador externo
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Natal-RN, 6 de Abril de 2022.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Dalmolin, Matheus Gibeke Siqueira.

Análise baseada em biologia de sistemas destaca processos alterados que afetam a sobrevida geral de pacientes com sarcoma de Ewing / Matheus Gibeke Siqueira Dalmolin. - Natal, RN, 2022, 2022.

55f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto Metr pole Digital, Programa de P s-Gradua o em Bioinform tica, Natal, RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Marialva Sinigaglia.

1. Sarcoma de Ewing - Disserta o. 2. Autofagia - Disserta o. 3. Resposta ao dano no DNA - Disserta o. I. Sinigaglia, Marialva. II. T tulo.

RN/UF/BCZM

CDU 616-006.6:004.4

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioinformática do Instituto do Câncer Infantil (ICI). O trabalho constitui tema de dissertação de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O trabalho teve apoio financeiro do CNPq, PRONON/Ministério da Saúde, Brasil (número 25000.202751/2016-65 to C.B.) e do Fundo de Pesquisa do Projeto Rafael Koff Acordi (Câncer Infantil).

Dedico este trabalho à todos os colaboradores do Instituto do Câncer Infantil, em especial aos voluntários.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na minha formação e na realização deste trabalho.

À minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos. Especialmente à minha mãe Tatiana que incansavelmente me dá todo o amor do mundo, meu pai Mauro que desde sempre me inspira como pessoa e minha irmã Alice que tanto amo. Agradeço ao meu tio Rodrigo que me apresentou a bioinformática e me motivou a ser cientista.

À minha orientadora Meg, por ter aberto as portas do laboratório e me ensinado muito ao longo destes anos.

Aos meus amigos que viram de perto toda a trajetória e sempre me ajudaram. Um agradecimento especial para o Gabriel, que além de amigo é um colega que sempre me ouviu e ajudou em todas as questões deste trabalho.

Ao Instituto do Câncer Infantil por ter apoiado o meu trabalho e fornecer todo o suporte necessário.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e a todos os seus professores que sempre proporcionaram um ensino de alta qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil — e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

Análise baseada em biologia de sistemas destaca processos alterados que afetam a sobrevida geral de pacientes com sarcoma de Ewing

Autor: Matheus Gibeke Siqueira Dalmolin

Orientadora: Dra. Marialva Sinigaglia

RESUMO

O Sarcoma de Ewing (SE) é uma doença altamente agressiva e a segunda neoplasia óssea pediátrica mais frequente. A marca registrada do SE é a presença do fator de transcrição aberrante EWSR1-FLI1 que impulsiona a reprogramação metabólica. Os procedimentos terapêuticos aumentaram parcialmente a sobrevida do SE, mas ainda apresentam alta toxicidade e causam morbidade significativa. Para sugerir estratégias terapêuticas mais eficientes, é necessário um entendimento mais abrangente das vias que impactam a sobrevivência do SE para o desenvolvimento de novos diagnósticos e estratégias terapêuticas. Aqui, identificamos diferenças no nível de transição entre pacientes com SE com sobreviventes de curto prazo (SCP) e sobreviventes de longo prazo (SLP) com base em dados transcricionais disponíveis em três conjuntos de dados públicos, aplicando a análise do transcriptograma. Três agrupamentos comuns diferencialmente expressos nas coortes analisadas foram identificados. Processos relacionados à resposta e reparo ao dano do DNA, resposta imune, apoptose e autofagia foram desregulados entre os grupos SCP e SLP. Além disso, o enriquecimento funcional dos genes comuns entre três clusters e regulons ES destacam o upregulation da via Hippo em pacientes SCP. Nossa análise sugere que diferentes processos podem estar orientando o desfecho de pacientes com SE de forma integrada e podem contribuir para a diversidade de fenótipos impulsionados pela flutuação da expressão de EWSR1-FLI1.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing, Autofagia, Resposta ao dano no DNA, Resposta imune, via Hippo.

Systems biology-based analysis highlights altered processes that impact overall survival of Ewing Sarcoma patients

Author: Matheus Gibeke Siqueira Dalmolin

Supervisor: Dra. Marialva Sinigaglia

ABSTRACT

Ewing's Sarcoma (ES) is a highly aggressive disease and the second most frequent pediatric bone neoplasm. The ES hallmark is the presence of the aberrant transcription factor EWSR1-FLI1 that drives metabolic reprogramming. Therapeutic procedures have partially increased ES survival rate, but still present high toxicity and cause significant morbidity. To suggest more efficient therapeutic strategies, a more comprehensive understanding of the pathways that impact ES survival for development of novel diagnostics and therapeutic strategies. Here, we identified differences at the transcriptional level between ES patients with short-term survivors (STS) and long-term survivors (LTS) based on transcriptional data available in three public datasets, applying the transcriptogram analysis. Three differentially expressed clusters common across the cohorts analyzed were identified. Processes related to DNA damage response and repair, immune response, apoptosis and autophagy were dysregulated between the STS and LTS groups. Furthermore, the functional enrichment of the common genes between three clusters and ES regulons highlight the upregulation of the Hippo pathway in STS patients. Our analysis suggests that different processes may be guiding the outcome of ES patients in an integrated way and may contribute to the diversity of phenotypes driven by the EWSR1-FLI1 expression fluctuation.

Keywords: Ewing's sarcoma, Autophagy, DNA damage response, Immune response, Hippo pathway

Lista de figuras

- 1 Diagrama esquemático das características comuns entre tumores com evidência de origem pré-natal. As características representadas são: um excesso proliferativo pré-natal no tecido de origem, uma mecanismo intrínseco para sobreviver ao ambiente hostil pós-natal precoce e um caminho acelerado para a instabilidade genômica. Adaptado de: (MARSHALL et al., 2014) p. 16

Sumário

1	Introdução	p. 12
1.1	Câncer	p. 12
1.2	Câncer infantil	p. 14
1.3	Sarcoma de Ewing	p. 16
1.4	Transcriptômica	p. 19
1.5	Transcriptograma	p. 20
1.6	Justificativa	p. 21
1.7	Objetivos	p. 21
1.7.1	Objetivo Geral	p. 21
1.7.2	Objetivos Específicos	p. 21
2	Capítulo I	p. 22
3	Discussão	p. 37
4	Conclusão	p. 44
	Referências	p. 45

1 Introdução

1.1 Câncer

Câncer é o nome genérico dado a um conjunto de doenças que podem afetar praticamente qualquer órgão ou tecido do corpo, caracterizando-se por células anormais de crescimento descontrolado. O tecido tumoral pode ser classificado em maligno, que possui o potencial para invadir ou se espalhar para outros órgãos do corpo, e benigno que não apresenta potencial de invasão. Os tumores malignos se espalham e invadem os tecidos próximos ou migram para lugares distantes do corpo para formar novos tumores, em um processo chamado de metástase. A metástase é uma das principais causas de morte por câncer (WHO, 2022a, 2022b; NIH, 2022). Em 2020 o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes, cerca de 15% do total de mortes em todo o mundo (FERLAY et al., 2021). O câncer exerce uma grande pressão em todos os níveis sociais, financeiros e emocionais. Essa pressão aumenta a cada ano e afeta principalmente os países de baixa e média renda, consequentemente afetando as taxas de sobrevivência dos pacientes que dependem de um sistema de saúde eficiente, com detecção precoce da doença e oferta de tratamentos de qualidade (WHO, 2022a).

Apesar da grande heterogeneidade entre os mais de 200 tipos de tumores existentes, Douglas Hanahan e Robert Weinberg originalmente propuseram seis características principais (denominadas de “hallmarks” em inglês), adquiridas pelas células humanas durante o processo de transformação neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Na verdade essas características, são capacidades cruciais que as células adquirem para a formação de tumores malignos, as quais são descritas abaixo:

- Sustentação da sinalização proliferativa; as células cancerosas desregulam os sinais de controle do ciclo de crescimento e divisão celular e sustentam a proliferação crônica;
- Evitar supressores de crescimento; as células cancerígenas para conseguir susten-

tar a sinalização proliferativa, adicionalmente, devem burlar sistemas que regulam negativamente a proliferação celular, muitos desses programas são regulados por genes supressores tumorais. A ativação de genes supressores do crescimento como por exemplo TP53, PTEN e RB depende de estímulos internos e/ou externos e podem levar a parada do ciclo celular ou indução de senescência e apoptose das células;

- Resistência à morte celular; as células tumorais desenvolvem várias estratégias para limitar ou burlar a morte celular;
- Permitir a imortalidade replicativa; as células cancerosas adquirem potencial replicativo ilimitado, diferente das células normais que passam apenas por um número limitado de ciclos sucessivos de crescimento e divisão celular;
- Indução e sustentação da angiogênese; durante o desenvolvimento tumoral a angiogênese é ativada induzindo a formação de novos vasos que irão auxiliar o crescimento neoplásico (suprimento de oxigênio e nutrientes);
- Capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metástase; esse processo compreende a invasão local seguida do intravasamento de células tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos, o trânsito dessas células tumorais através do sistema linfático e hematogênico, seguido pelo escape das células cancerígenas do lúmen dos vasos para o parênquima de tecidos distantes (processo chamado de extravasamento), após ocorre a formação de pequenos nódulos compostos por células tumorais (denominado de micrometástases), e por fim ocorre o processo denominado de colonização onde ocorre o crescimento desses pequenos nódulos em neoplasias macroscópicas clinicamente detectáveis (passo chamado de “colonização metastática”) (VALASTYAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Subjacente a essas marcas, Hanahan e Weinberg propuseram duas novas “características emergentes”; (i) reprogramação e (ii) evasão do sistema imune. Além disso, os autores elegeram duas “características habilitantes”; (i) instabilidade genômica e mutação (responsáveis por gerar a diversidade genética e acelerar sua aquisição) e (ii) promoção de inflamação pelo tumor (atua na contribuição para várias funções no processo tumorigênico) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas duas características habilitantes se referem aos mecanismos moleculares e celulares através dos quais as características são adquiridas.

Em uma revisão recente Hanahan (2022) elevou as características emergentes ao mesmo patamar das demais marcas e adicionou mais duas características funcionais emergentes e duas características habilitantes. As quatro características adicionadas foram:

- Desbloqueio de plasticidade fenotípica; as células sofrem um processo de diferenciação terminal na medida em que originam tecidos com funções homeostáticas. Essa diferenciação atingida pelas células, na maioria das vezes, é antiproliferativa e atua como uma barreira do estado proliferativo contínuo que é essencial para a neoplasia. Assim, o desbloqueio da plasticidade fenotípica para evitar ou escapar do estado de diferenciação terminal, é crítico no processo tumorigênico. Dentre as formas desse desbloqueio podemos citar a desdiferenciação de estados maduros para estados progenitores, diferenciação terminal bloqueada (a partir de células progenitoras) e a transdiferenciação em diferentes linhagens celulares;
- Células senescentes; embora as células senescentes sejam um mecanismo de proteção contra as neoplasias, evidências recentes têm demonstrado que, em certos contextos, elas podem atuar como estimuladoras do desenvolvimento do tumor e da progressão maligna;
- Reprogramação epigenética não mutacional; se refere às modificações na expressão gênica exclusivamente reguladas por fatores epigenéticos, como por exemplo a metilação gênica. A reprogramação epigenética não mutacional foi postulada como uma característica habilitante que serve para facilitar a aquisição de capacidades funcionais;
- Microbiomas polimórficos; trabalhos recentes identificaram microbiomas protetores e promotores de tumores, relacionados a algumas espécies de bactérias específicas. Os microbiomas polimórficos também foram postulados como uma característica habilitante.

Embora os hallmarks tenham provado o seu valor heurístico para a conceituação do câncer, os autores preveem que devam haver novas facetas das características elencadas que ainda não foram elucidadas. Além disso, os hallmarks são modulados por drivers oncogênicos canônicos, incluindo KRAS, MYC, NOTCH e TP53 Hobbs, Der e Rossman (2016), Meyer e Penn (2008), George et al. (2015), Oren e Rotter (2010).

1.2 Câncer infantil

O câncer infantil é raro quando comparado ao câncer de adulto, corresponde entre 1% e 4% de todos os tumores malignos nas diferentes populações humanas. A proporção dos tumores infantis varia entre as diferentes populações (DOYLE, 2014). A incidência é

de 1% nos países desenvolvidos e de 3 a até 10% nos países em desenvolvimento, onde a população infantil pode chegar a 50% do total. A sobrevida em 5 anos de crianças e adolescentes com diagnóstico de câncer é de aproximadamente 80% nos países de alta renda. Em países de baixa e média renda onde vivem aproximadamente 90% das crianças com câncer essas estimativas são muito piores com taxas variando de 5% a 60% (BHAKTA et al., 2019; RAMIREZ et al., 2018). No Brasil, estima-se que o número de casos novos de câncer pediátrico para cada ano do triênio 2020-2022, será de 8.460 novos casos (INCA, 2020b). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a sobrevida estimada para todas as neoplasias em crianças e adolescentes (de 0 a 19 anos) é em torno de 64%, sendo a primeira causa de morte por doença, superando as doenças infecciosas (INCA, 2020a). A terapia multimodal (quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia) aumentou as taxas de cura para o câncer infantil, mas isso teve um custo substancial em termos de efeitos colaterais agudos graves de longo prazo, bem como um consumo considerável de recursos destinados a saúde pediátrica (MARSHALL et al., 2014).

O câncer em crianças e adolescentes (entre 0 e 19 anos) se refere a um grande conjunto de doenças que apresentam características próprias, não somente de natureza histológicas, mas também relacionadas ao comportamento clínico (LITTLE, 1999). Tumores pediátricos são biologicamente e geneticamente diferentes dos tumores adultos (ADAMSON et al., 2014). Eles apresentam, em média, menos mutações somáticas que tumores adultos, e essas alterações ocorrem com alta frequência em genes que codificam proteínas envolvidas na regulação epigenética (DOWNING et al., 2012; HUETHER et al., 2014). Os tumores malignos cerebrais e do sistema nervoso somados a leucemias correspondem a 55% de todos os casos de câncer em crianças e adolescentes de 0 a 14 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

A origem do câncer pediátrico é um dos aspectos mais importantes a ser explorado e compreendido. Evidências recentes fortalecem as relações entre mutações condutoras e o seu desenvolvimento embrionário e pós-natal precoce. Marshall et al. (2014) propuseram um modelo para as neoplasias com evidência de origem pré-natal (neuroblastoma, leucemia mielóide - síndrome de down, leucemia linfoblástica aguda de linhagem B e meduloblastoma) (MARSHALL et al., 2014). Assim, aconteceria um primeiro evento que ocasiona um excesso proliferativo no tecido de origem ainda na fase pré-natal, após, um segundo evento que possibilita que a célula desenvolva um mecanismo intrínseco para sobreviver ao ambiente hostil da fase pós-natal inicial e um terceiro evento que altera as vias de instabilidade genômica (Fig. 1)(MARSHALL et al., 2014). Uma vez que a transição entre pré-câncer para câncer ocorre ainda na primeira infância, postula-se que algumas células pré-cancerosas possuam a capacidade de uma rápida progressão em direção à ins-

tabilidade genômica. Uma forma desse processo ocorrer de forma rápida é através de um processo de perda de função herdada da linhagem germinativa, ou seja, uma mutação em um alelo de um gene supressor de tumor. Outro processo proposto é a cromotripsia, em que um único evento catastrófico pode levar a um rearranjo genômico que afeta mais de um cromossomo, em vez da aquisição incremental de mutações oncogênicas únicas ao longo de décadas que ocorre normalmente em câncer de adulto (MARSHALL et al., 2014; STEPHENS et al., 2011). Outros fatores adicionais foram propostos por estarem envolvidos na rápida transformação maligna de células pré-cancerosas e incluem as propriedades de crescimento e auto-renovação, características inerentes a algumas células embrionárias.

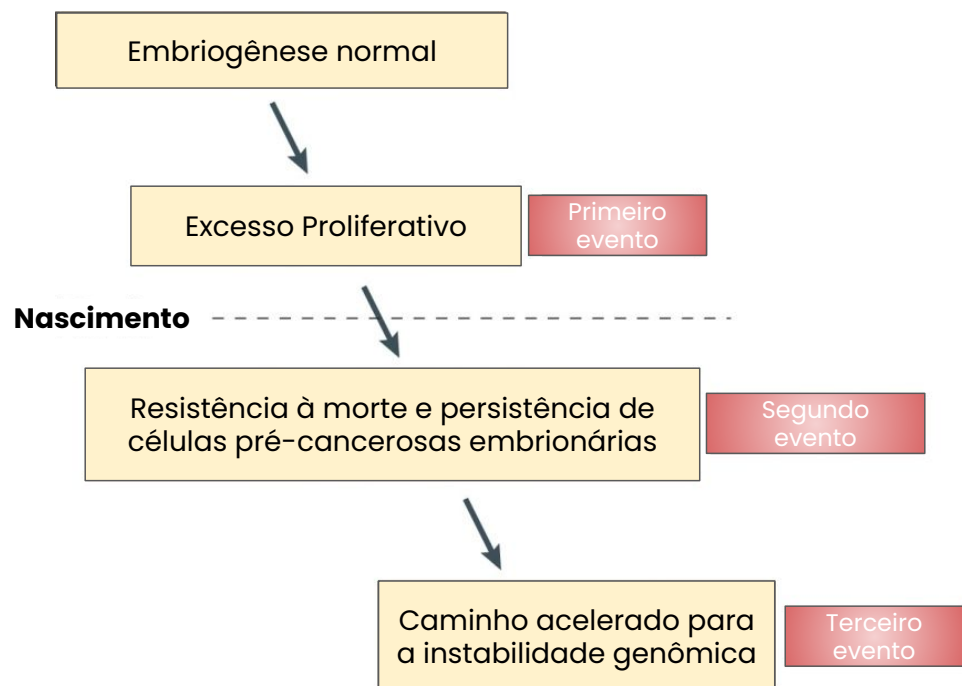


Figura 1: Diagrama esquemático das características comuns entre tumores com evidência de origem pré-natal. As características representadas são: um excesso proliferativo pré-natal no tecido de origem, uma mecanismo intrínseco para sobreviver ao ambiente hostil pós-natal precoce e um caminho acelerado para a instabilidade genômica. Adaptado de: (MARSHALL et al., 2014)

1.3 Sarcoma de Ewing

O sarcoma de Ewing (SE) é um tumor que acomete tanto os ossos como partes moles, afeta principalmente crianças, adolescentes e jovens adultos com aproximadamente 1,5

casos por milhão globalmente. Entre 20 e 25% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico, quase sempre resistentes à terapia intensiva (GASPAR et al., 2015). O padrão de tratamento para o sarcoma de Ewing consiste em um regime de tratamento multimodal incluindo ressecção cirúrgica e/ou radioterapia local, bem como quimioterapia multiagente intensa (PAPPO; DIRKSEN, 2018). Apesar de comprovada a eficácia para o tratamento da doença localizada, a sobrevida a longo prazo de pacientes com SE metastático ou que apresentam recaída ainda é inaceitavelmente baixa (GASPAR et al., 2015; STAHL et al., 2011).

A classificação de sarcomas da OMS de 2013 definiu que diversos tumores, como por exemplo o Askin, que antes eram considerados como pertencentes à "família de sarcoma de Ewing", agora são considerados "sarcoma de Ewing" (DOYLE, 2013). O que caracteriza o sarcoma de Ewing são as fusões gênicas FET-ETS (WATSON et al., 2018; SANKAR; LESSNICK, 2011). A primeira descrição do sarcoma de Ewing foi em 1921 (EWING, 1972), e desde então a sua célula de origem ainda é motivo de debate (TOOMEY; SCHIFFMAN; LESSNICK, 2010; RAMACHANDRAN; RAJKUMAR; GOPISSETTY, 2021). Estudos anteriores identificaram certos tipos de células primárias como potencial célula de origem, permissivas para a expressão de EWSR1-FLI1, como células-tronco mesenquimais, crista neural, hematopoiéticas, musculares e células progenitoras osteocondrais (GORDON; MOTWANI; PELLMAN, 2016; RIGGI et al., 2008; LEVETZOW et al., 2011; TANAKA et al., 2014). A origem a partir de células neuroectodérmicas primitivas foi considerada (LIN; WANG; LOZANO, 2011), entretanto descobriu-se que as características neuroectodérmicas das células de SE são resultado da expressão de EWSR1-FLI1 e não baseadas na célula de origem (LIN; WANG; LOZANO, 2011; HU-LIESKOVAN et al., 2005). Considerando que os tumores de SE que se originam em tecidos moles são molecularmente indistinguíveis daqueles de origem óssea é provável que a célula de origem seja primitiva e multipotente e que pode originar o tumor em diferentes tecidos (RAMACHANDRAN; RAJKUMAR; GOPISSETTY, 2021). Atualmente vários artigos têm sugerido que as células tronco mesenquimais podem ser as células progenitoras do SE, uma vez que essas células são derivadas da medula óssea e a maioria dos casos de SE ocorrem nos ossos, o que a tornaria uma candidata viável a célula de origem (MISHRA et al., 2021).

As características moleculares do SE são bem definidas e influenciam diretamente no seu processo carcinogênico. Cerca de 85% dos casos de SE apresentam a fusão FET-ETS decorrente da translocação $t(11,22)(q24,q12)$ e originam a proteína fusionada EWS-FLI1 (provenientes da fusão dos genes *EWSR1* e *FLI1*, respectivamente). Entretanto, outras 7 combinações também são relatadas: em 10% dos casos há a $t(21,22)(q22,q12)$, que gera

a fusão EWSR1-ERG, e os casos remanescentes correspondem a translocações incomuns, como EWSR1-ETV1 e EWSR1-FEV (BROHL et al., 2014; TIRODE et al., 2014). A proteína EWS-FLI1 liga-se a repetições GGAA, especialmente em regiões de sequências potencializadoras (enhancers). A proteína quimérica é um fator de transcrição aberrante, que altera o perfil transcricional celular atuando na reprogramação do metabolismo do SE (TANNER et al., 2017) com consequências tumorigênicas (TANNER et al., 2017). A reprogramação transcricional induzida por EWSR1-FLI1 tem sido alvo de diversos estudos (HANCOCK; LESSNICK, 2008). Esse regulador mestre exerce seus efeitos oncogênicos influenciando muitos hallmarks do câncer, tais como: proliferação e crescimento (CIRONI et al., 2008), resistência à morte celular (LISSAT et al., 2015), imortalidade (DOUGLAS et al., 2008), angiogênese (KATURI et al., 2014), invasão e metástase (LISSAT et al., 2015) e evasão do sistema imune (PETERS et al., 2013).

Através de estudos de single-cell, foi demonstrado que o fenótipo da célula de SE é diretamente regulada pelos níveis de expressão da quimera EWSR1-FLI1 (GRÜNEWALD et al., 2018; FRANZETTI et al., 2017; CHATURVEDI et al., 2014) que pode flutuar entre diferentes estados de expressão: EWSR1-FLI1^{alto} e EWSR1-FLI1^{baixo}. A migração celular, necessária para a metástase, é facilitada no contexto de EWSR1-FLI1^{baixo}, entretanto, essas células apresentam níveis de proliferação muito baixos (FRANZETTI et al., 2017). De fato, células com níveis de expressão de EWSR1-FLI1^{alto} são caracterizadas pela alta proliferação celular, enquanto que as células com níveis de expressão de EWSR1-FLI1^{baixo}, apresentam uma elevada capacidade para migrar, invadir e metastizar. Além disso, a os níveis de expressão da quimera podem variar ao longo do tempo dentro da mesma célula de SE, assim a célula com níveis baixos de EWSR1-FLI1, após se estabelecer no novo sítio, pode elevar a expressão de EWSR1-FLI1 e proliferar (FRANZETTI et al., 2017).

Com relação às alterações transcricionais, foi demonstrado que EWSR1-FLI1 induz a expressão de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* (RIGGI et al., 2010)[20382729], também inibe os supressores tumorais clássicos pRB (HU et al., 2008) e p53 (LI et al., 2010), e desregula a sinalização Wnt/B-catenina (HAWKINS et al., 2020) em células-tronco mesenquimais pediátricas de humanos. EWSR1-FLI1, além de atuar na ativação e no controle da expressão de *SOX6* em células progenitoras osteocondrais (MARCHETTO et al., 2020). Em células progenitoras osteocondrais de camundongo expressando EWSR1-FLI1 humano, a quimera foi regulada em conjunto com *FOXQ1* e os oncogenes *TRIB1* e *NRG1* foram desregulados (SHIMIZU et al., 2018). Biópsias de tumores obtidos de pacientes de SE mostraram uma expressão aumentada de *SOX9*, que se acredita interromper a diferenciação de condrócitos (HOSSEINI et al., 2020). Além disso, EWSR1-FLI1 é conhecido por regular vários genes

(*NR0B1*, *DKK1*, *DAB1*, *CNTNAP2*, *cMYC*, *SOX2*, *CXCR4*, *NGFR*, *IGFBP* e *IGF1*) essenciais para manter a pluripotência do desenvolvimento embrionário ou funcionar como fatores de transcrição no desenvolvimento de vários tecidos (POTIKYAN et al., 2008).

Além da quimera EWSR1-FLI1, sete potenciais Reguladores Mestres (RMs) foram identificados em SE, são eles; *PAX7*, *RUNX3*, *ARNT2*, *CREB3L1*, *GLI3*, *MEF2C* e *PBX3* (RIBEIRO-DANTAS et al., 2021). Ribeiro-Dantas et al. (2021) identificaram que a atividade dos regulons *PAX7* e *RUNX3* estava associada a um bom prognóstico em SE, enquanto que a atividade dos regulons *ARNT2*, *CREB3L1*, *GLI3*, *MEF2C* e *PBX3* estava associada a um pior prognóstico. Além disso, os autores verificaram que a atividade regulatória de *PAX7* e *RUNX3* é antagônica aos outros RMs (*ARNT2*, *CREB3L1*, *GLI3*, *MEF2C* e *PBX3*), e foi sugerido que a quimera EWSR1-FLI1 poderia estar regulando a expressão de *PAX7* e *RUNX3* (RIBEIRO-DANTAS et al., 2021). Um artigo recente avaliou a imunexpressão de *PAX7* em 336 amostras de sarcoma de Ewing, e provou que a ausência de expressão de *PAX7* é um prognóstico ruim tanto para a sobrevida livre de progressão quanto para a sobrevida global (MACHADO et al., 2022).

1.4 Transcriptômica

A bioinformática é um dos mais novos campos de pesquisa biológica, e consiste em métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para o processamento e análise de dados biológicos. As enormes quantidades de dados gerados por novas tecnologias como sequenciamento genômico e chips de microarranjo (SCHENA et al., 1995) criaram uma demanda de novas análises e interpretação dos dados para alcançar a compreensão biológica e o progresso terapêutico (TAO et al., 2017).

Uma das técnicas mais difundidas para análises de transcriptômica em câncer é o microarranjo que consiste em um chip contendo sondas. As sondas são fragmentos de DNA que se hibridizam com RNAs específicos. Cada hibridização de um RNA com a sonda específica emite um sinal luminoso, pois as sondas possuem fluorescência dependente de hibridização. A quantidade de um determinado RNA em uma amostra é calculada pela intensidade luminosa da sua sonda. Os microarranjos apenas detectam a expressão de RNAs que tenham sondas específicas no chip. Além disso, a análise de dos dados apresenta alta variância, que pode resultar do ruído de medição ou variáveis de confusão que não foram explicitamente controladas (ALMEIDA; THOMAS; GLAZIER, 2021).

1.5 Transcriptograma

Um dos grandes problemas de dados de expressão gênica obtidos por experimentos de microarranjos é o alto ruído da medida de expressão. O transcriptograma é um método baseado em biologia de sistemas desenvolvido para análise de dados de expressão para reduzir o erro desse tipo de dados (RYBARCZYK-FILHO et al., 2011). Essa metodologia utiliza dados de interação proteína-proteína (PPI) para identificar grupos gênicos alterados em estudos caso-controle e a ferramenta do software *The Transcriptogramer* está disponível no repositório público do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e possui um pacote em R disponível no *Bioconductor* (MORAIS; ALMEIDA; DALMOLIN, 2019).

A técnica do Transcriptograma (RYBARCZYK-FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2014) consiste em produzir perfis de expressão gênica a partir de medidas de expressão de genoma inteiro, tais como as obtidas por microarranjos ou RNA-Seq. Para isso, as informações de PPI são organizadas em uma dimensão através do algoritmo *Cost Function Method* (KUENTZER, 2014). Matrizes de adjacência são geradas e o custo de cada uma é calculado. Através de simulações de Monte Carlo o processo é repetido com o objetivo de encontrar a matriz de menor custo, pois, quanto menor o custo da matriz maior a proximidade entre proteínas interagentes. Por fim, é produzida uma lista ordenada de genes na qual a probabilidade de interação entre dois genes quaisquer decai exponencialmente com o aumento da distância entre suas posições.

Resumidamente, a expressão gênica é projetada sob a lista ordenada e uma janela deslizante, cujo raio pode ser regulado (capta a média de expressão de grupos gênicos funcionalmente associados). A janela atribui o valor médio de expressão obtido ao gene posicionado no seu centro e desloca-se para a próxima posição da lista. Através desta janela deslizante o ruído aleatório presente nos dados de expressão é diminuído (SILVA et al., 2014) permitindo assim, uma visão geral do metabolismo celular. O resultado deste método é um transcriptograma, onde é possível identificar os grupos gênicos funcionalmente relacionados que encontram-se alterados entre as diferentes condições analisadas (SILVA et al., 2014). Os transcriptogramas têm sido úteis na identificação de vias em uma variedade de grupos, como vírus (ALMEIDA; THOMAS; GLAZIER, 2021), fungos (FERRAREZE et al., 2017; RYBARCZYK-FILHO et al., 2011), planta (MIOTTO et al., 2019; CADAVID et al., 2020) e humanos (ALMEIDA et al., 2016; REIS et al., 2019; MORAIS; ALMEIDA; DALMOLIN, 2019).

1.6 Justificativa

O sarcoma de Ewing (SE) é uma doença altamente agressiva que afeta crianças e adultos jovens. A taxa de sobrevida aumentou consideravelmente nas últimas décadas, cerca de 70-80% dos pacientes com risco padrão e doença localizada sobrevivem. Esses índices de cura são resultado de um tratamento multimodal de elevada toxicidade que limita as taxas de sobrevivência e causa morbidade significativa. Além disso, pacientes com doença metastática e com recidiva possuem taxas de sobrevida inferiores a 30%. Portanto, é crucial identificar e obter uma compreensão completa das vias biológicas que afetam a sobrevida de pacientes com SE para o desenvolvimento de novos diagnósticos e estratégias terapêuticas.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

Analisar dados de expressão de amostras de sarcoma de Ewing com diferentes desfechos clínicos disponíveis em banco de dados públicos, com intuito de selecionar vias relacionadas com sobrevida de curto prazo em SE.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Analisar dados de expressão de amostras de SE utilizando o software The Transcriptogramer, comparando sobreviventes de curto prazo com longo prazo;
- Selecionar as vias diferencialmente expressas envolvidas nos dois desfechos;
- Identificar os genes comuns entre os picos diferencialmente expressos e os genes regulados pelos RMs (PAX7, RUNX3, ARNT2, ARNT2, CREB3L1, GLI3, MEF2C e PBX3) e realizar o enriquecimento funcional; as relações biológicas entre as diferentes vias encontradas no trabalho.

2 Capítulo I

Artigo: Systems biology-based analysis highlights altered processes that impact overall survival of Ewing Sarcoma patients.

Escrito por: Matheus Dalmolin, Maurício Gomes, Ricardo Ferreira, Caroline de Farias, André Brunetto, Mariane Jaeger, Rita Almeida, Rodrigo Dalmolin, and Marialva Sinigaglia.

Artigo submetido ao periódico *International Journal of Molecular Sciences*.

3 Discussão

O sarcoma de Ewing é caracterizado pela presença de uma proteína quimérica que funciona como um fator de transcrição aberrante, que altera o perfil transcricional celular atuando na reprogramação do metabolismo do SE com consequências tumorigênicas (TANNER et al., 2017). A reprogramação transcricional provocada pela quimera é modulada pela flutuação dos seu nível de expressão, o que desencadeia os diferentes fenótipos da célula de SE (GRÜNEWALD et al., 2018; FRANZETTI et al., 2017; CHATURVEDI et al., 2014; FRANZETTI et al., 2017). O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças entre os perfis transcricionais de pacientes com sarcoma de Ewing que sobreviveram por um curto período com aqueles que sobreviveram por um longo período. Além disso, descrever como as diferentes rotas metabólicas estão atuando para resultar num fenótipo mais letal da doença, que são potenciais alvos para novos estudos específicos e detalhados.

Os dados de câncer são cada vez mais abundantes, entretanto para tumores pediátricos há uma dificuldade de obter novos dados devido a raridade da maioria dessas doenças. O sarcoma de Ewing é um desses tumores raros, portanto a reanálise de dados públicos é uma estratégia para obter novos insights sobre a biologia da doença. Portanto, nesse trabalho investigamos dados públicos de SE sob uma perspectiva sistêmica usando o The Transcriptogramer (RYBARCZYK-FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2014; MORAIS; ALMEIDA; DALMOLIN, 2019). O método de Transcriptograma é capaz de quantificar as mudanças de expressão em todo o genoma reduz o ruído e melhora a relação sinal-ruído nas análises do transcriptoma, aumentando o poder dos testes estatísticos para identificar vias significativamente alteradas (SILVA et al., 2014), isso permite que ao analisar dados já publicados novos resultados sejam revelados. Obtemos Transcriptogramas relativos dividindo os valores do perfil do Transcriptograma dos sobreviventes a curto prazo em cada ponto na lista de genes ordenados pelo valor do perfil do Transcriptograma dos pacientes a longo prazo na mesma posição na lista. Isso permitiu uma visão global do metabolismo celular identificando conjuntos de genes funcionalmente associados à expressão alterada em pacientes com sobrevida de curto prazo quando comparados com sobrevida de longo prazo. Três

clusters diferencialmente expressos (C1, C2 e C3) foram identificados simultaneamente em três conjuntos de dados de SE avaliados.

O transcriptograma relativo entre sobreviventes de curto prazo e longo prazo apresentou três *clusters* diferencialmente expressos entre os dois grupos. Esses *clusters* são compostos de genes funcionalmente associados, pois são vizinhos dentro na lista ordenada de genes utilizada para gerar os transcriptogramas de raio 60, como explicado anteriormente. Dos *clusters* encontrados, um deles (C2) teve alta expressão, enquanto os outros dois (C1 e C3) tiveram baixa expressão nos sobreviventes de curto prazo em relação aos de longo prazo. Para cada um desses *clusters* diferencialmente expressos realizamos um enriquecimento funcional para identificar quais são os processos biológicos que podem explicar a diferença entre os grupos analisados.

O *cluster* C2 foi enriquecido com vias tipicamente desreguladas no câncer, como checkpoint, resposta ao dano do DNA (DDR), reparo de quebra de fita dupla do DNA, reparo recombinacional, mudança conformacional do DNA e destino celular. A DDR, também conhecida como resposta ao estresse genotóxico, é responsável por garantir a estabilidade do genoma das células e compreende uma rede de vias intrincadamente conectadas e reguladas que incluem controle de checkpoint, vias de reparo de DNA, controle de transcrição, splicing alternativo, apoptose, senescência e morte celular (GHOSAL; CHEN, 2013). No SE o EWSR1-FLI1 está presente em 85% dos casos e exerce um papel fundamental em processos regulatórios transcricionais, como é o caso de algumas vias encontradas no *cluster* C2, por exemplo, checkpoint, DDR, e essas vias, juntamente com o splicing alternativo, desencadeiam um aumento do estresse transcricional no SE (YUSTEIN; EWING, 2015). Em células de SE níveis elevados de marcadores de estresse replicativo como ATR, CHK1 e RPA2 foram identificados (GORTHI et al., 2018). Quando o estresse replicativo é elevado, o ATR fosforila CHK1, que é um regulador crítico da sobrevivência celular e da resposta à replicação prejudicada do DNA (NIETO-SOLER et al., 2016). A CHK1 atua para regular a parada do ciclo celular e é super expressa em SE, além de alguns estudos terem demonstrado a sensibilidade das células de SE aos inibidores de CHK1 (KOPPENHAFER et al., 2020; GOSS et al., 2017; KOPPENHAFER et al., 2018; LOWERY et al., 2019).

Os genes das vias de junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês "*Non-homologous end joining*") e de recombinação homóloga (HR) foram significativamente aumentados no sangue de pacientes com SE em comparação com sangue de doadores saudáveis (KYRIAZOGLU et al., 2019) e o reparo de DNA de bases mal pareadas ou *mismatch repair* foi associado a um pior prognóstico e a uma chance aumentada de metástase em

SE (LI et al., 2019). O gene *POLDIP2* que atua na replicação/reparo do DNA, tolerância a danos no DNA e reorganização do citoesqueleto (GUILLIAM et al., 2016; BROWN et al., 2014) foi regulado positivamente em células de SE resistentes à quimioterapia (HORBACH et al., 2018). Além disso, EWSR1-FLI1 induz danos no DNA e mantém a expressão de *PARP1* através de um feedback positivo (BRENNER et al., 2012) e a combinação de inibidores de PARP com radioterapia intensifica o dano ao DNA e aumenta a apoptose e a morte celular de forma dependente de EWSR1-FLI1 (LEE et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que EWSR1-FLI1 impulsiona a transcrição global, causando acúmulo de *R-loops* (GORTHI et al., 2018) e a retenção de *BRCA1* em complexos de transcrição parados associados a *R-loops*, atuaria na prevenção da HR (GORTHI et al., 2018). Por outro lado, a HR pode ser restaurada através da depleção da proteína *TP53BP1* apesar da presença de EWSR1-FLI1 e conferir resistência à quimioterapia às células de SE (GORTHI et al., 2018). Além disso, *EWSR1* é capaz de restaurar a função *BRCA1* e também inibir o acúmulo de *R-loop* (GORTHI et al., 2018). Embora o SE seja reconhecido por não apresentar instabilidade genômica (LAWRENCE et al., 2013), os tumores que sobrevivem ao tratamento são instáveis. A partir desta evidência Gorthi e Bishop (2018) sugeriram um “efeito teto” para a tolerância ao dano do SE. Em nossa análise, os pacientes com sobrevida de curto prazo mostraram um maior estresse transcricional e um aumento no reparo de danos ao DNA. Essas diferenças podem estar relacionadas com a inter-relação entre as variações dos níveis de expressão de EWSR1-FLI1 e as vias relacionadas à DDR.

A fim de direcionar nossos resultados para genes que sabidamente estão sendo regulados por RMs que têm impacto na sobrevida de pacientes de SE, filtramos os genes de cada um dos *clusters* com os genes que são regulados por pelo menos um dos sete RMs de SE identificados recentemente (RIBEIRO-DANTAS et al., 2021). O enriquecimento funcional dos genes comuns entre o cluster C2 e os regulons de SE (*PAX7*, *RUNX3*, *ARNT2*, *CREB3L1*, *GLI3*, *MEF2C* e *PBX3* (RIBEIRO-DANTAS et al., 2021)), recuperaram vias que incluem comprometimento do destino neuronal, via de sinalização Hippo, desregulação transcricional no câncer, comprometimento do destino celular e outros envolvidos na diferenciação de Células-tronco hematopoiéticas e regulação da migração de células epiteliais. As vias relacionadas ao destino celular podem conferir um estado mais agressivo ao tumor, uma vez que os sinais para o destino celular também podem conduzir ao estado indiferenciado (LYTLE; BARBER; REYA, 2018). Além disso, o EWSR1-FLI1 atua na promoção da diferenciação celular pela regulação positiva de genes como *EZH2* (RICHTER et al., 2009) e *SOX2* (RIGGI et al., 2010). A regulação aberrante da via Hippo foi observada em vários tumores (WANG et al., 2018) e está associada a características que incluem a indução de

hiperproliferação, destino celular, *stemness*, invasão celular e metástase, bem como um papel na manutenção de células cancerígenas e mecanismos de resistência à quimioterapia (CALSES et al., 2019).

Recentemente, foi demonstrado que os transdutores finais da via Hippo YAP1/TAZ são regulados positivamente em amostras primárias de SE humanos e foram associados à progressão da doença e pior prognóstico (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ et al., 2020). Além disso, foi demonstrado que a atividade de transcrição YAP1/TAZ tem uma correlação inversa com a assinatura transcricional EWSR1-FLI1 sugerindo que YAP1/TAZ pode substituir o perfil transcricional induzido pela quimera contribuindo para a heterogeneidade fenotípica regulada pela flutuação da expressão EWSR1-FLI1 (EWSR1-FLI1^{alto} e EWSR1-FLI1^{baixo}) permitindo que células de SE individuais passem do estado proliferativo para estados de migração (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ et al., 2020; FRANZETTI et al., 2017). Níveis elevados de TAZ foram detectados no estado migratório (EWSR1-FLI1^{baixo}) e estão relacionados ao mau prognóstico em pacientes com SE (BIERBAUMER et al., 2021). Ainda, YAP1-TAZ contribui para a agressividade tumoral induzindo proliferação aberrante, sobrevivência e angiogênese (WANG et al., 2020; BOOPATHY; HONG, 2019; VARELAS, 2014) e endossa vários atributos nas células tumorais, incluindo destino celular e *stemness*, duas vias reguladas positivamente em pacientes com sobrevida de curto prazo (STS). A regulação positiva da via Hippo em pacientes com sobrevivência de curto prazo pode estar diretamente relacionada à flutuação da atividade de EWSR1-FLI1 e, conseqüentemente, com a ativação e desativação dessa via. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ et al., 2020; FRANZETTI et al., 2017; DEEL et al., 2015; BIERBAUMER et al., 2021) e enfatizam a importância da desregulação da via Hippo na sobrevida dos pacientes com SE.

Dois *clusters* (C1 e C3) foram regulados negativamente e enriquecidos individualmente. O C1 foi o menor *cluster* encontrado e seu enriquecimento identificou um processo principal, a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Quando enriquecemos apenas genes que estão na rede de dos RMs do SE, a GPI continua sendo a principal via enriquecida, demonstrando sua relevância para a doença. Vários genes estão envolvidos na maquinaria responsável por ancorar pelo menos 150 proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI-APs) à camada extracelular da membrana celular (KINOSHITA, 2020). GPI-APs executam uma série de funções biológicas importantes também variam, incluindo enzimas hidrolíticas, receptores, moléculas de adesão, inibidores de protease, reguladores do complemento e príons (KINOSHITA, 2020). Devido a generalidade desta via biológica são necessários estudos específicos para identificar quais são as conseqüências da baixa ativi-

dade da biossíntese de GPI-APs nas células de SE.

O *cluster* C3 foi o maior *cluster* e também apresentou a maior diversidade de processos biológicos. Vias importantes para a resposta tumoral são reguladas negativamente em pacientes com sobrevida de curto prazo, incluindo regulação do processo catabólico proteossomal, processamento e apresentação de antígenos, ubiquitinação (proteína e histona), nedilação e denedilação, regulação da resposta imune inata, regulação da via de sinalização apoptótica e autofagia. A proteína de fusão EWSR1-FLI1 atua diminuindo a expressão de genes pró-apoptóticos incluindo TGFB2, p21 e IGFBP3 (HAHM et al., 1999; NAKATANI et al., 2003; PRIEUR et al., 2004). Ubiquitinação e nedilação são processos relacionados à modulação dinâmica e modificação pós-traducional de proteínas, que marca proteínas para degradação via proteassoma (MANSOUR, 2018; ZOU; ZHANG, 2021). Na via de apresentação de antígenos de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I), proteínas celulares, incluindo as proteínas mutantes em células cancerosas e as proteínas derivadas de vírus nas células infectadas, são clivadas pela via ubiquitina-proteassoma em fragmentos de oligopeptídeos que são apresentados às células T pelo MHC (LEONE et al., 2013).

Um mecanismo pelo qual os cânceres podem escapar do controle imunológico é a maquinaria de apresentação de antígenos do MHC classe I. O SE pertence a uma classe de tumores denominados “tumores frios” caracterizados pela presença de um pouco de infiltrado imune e/ou inflamatório (CASEY; LIN; CHEUNG, 2019). As moléculas de MHC classe I são reguladas negativamente nas células do SE e a expressão diminuída ou negativa do MHC classe I foi correlacionada com baixa sobrevivência (YABE et al., 2011). Além disso, altos níveis de células T CD8+ infiltrantes de tumor foram associados a uma melhor sobrevida global em pacientes com SE (BERGHUIS et al., 2011). Além disso, HLA classe I foi consistentemente ausente nas metástases pulmonares e uma propensão relacionada à diminuição da expressão e progressão da doença foi observada em amostras de SE longitudinalmente (BERGHUIS et al., 2009). Stahl et al. (2019) correlacionaram o aumento dos níveis de neutrófilos e macrófagos M2 com mau prognóstico em SE, enquanto a alta frequência de células T e células NK está associada a uma sobrevida longa. Além disso, a análise da imunidade do microambiente tumoral de SE em relação a expressão de genes de célula-tronco mostrou uma correlação entre HIF1 e alta abundância de macrófagos e neutrófilos e diminuição de células T (STAHL et al., 2019). Tudo isso está de acordo com os achados no *cluster* C2, onde genes relacionados com célula-tronco estão regulados positivamente, e também com o *cluster* C3 que apresenta as vias de processamento de antígenos e a maquinaria de apresentação de antígenos reguladas negativamente em pacientes com

sobrevida de curto prazo.

Por fim, a autofagia foi o processo que se destacou por reunir o maior número de vias enriquecidas no *cluster* C3, além de também aparecer no enriquecimento de genes que são alvos dos RMs de SE. A autofagia é o processo de degradação e reciclagem celular que é altamente conservado em eucariotos (YANG; KLIONSKY, 2010). O papel da autofagia no câncer é controverso, dinâmico e relacionado, em parte, ao tipo e estágio do tumor (ELLIOTT, 1986). Nos estágios iniciais da tumorigênese, os níveis de nutrientes disponíveis para o tumor são suficientes, de modo que a autofagia atua como uma resposta citotóxica e coopera com a apoptose, suprimindo o desenvolvimento tumoral. No entanto, à medida que o tumor se desenvolve, os níveis de nutrientes tornam-se insuficientes e a autofagia torna-se uma importante fonte de nutrientes para manter as células tumorais, de modo que a autofagia em estágios avançados do câncer contribui para o escape imunológico, metástase e resistência à quimioterapia (CHAVEZ-DOMINGUEZ et al., 2020). O impacto da autofagia no SE também é controverso. Em SE vários estudos associaram a autofagia como um modelo protetor (LU et al., 2017; YE et al., 2018; LU et al., 2019), enquanto outros trabalhos identificaram a autofagia como um mecanismo pró-apoptótico e um possível alvo para o tratamento de pacientes com SE (LORIN et al., 2009). Os principais estudos clínicos envolvendo autofagia em SE mostraram que tanto as estratégias de inibição quanto de indução de autofagia estão sendo usadas (KOUSTAS et al., 2021).

A superexpressão de EWSR1-FLI1 induz a ativação positiva da via de autofagia em células de SE (LU et al., 2017). Além disso, análises de expressão de célula única (single-cell) sugerem uma interação entre a expressão de EWSR1-FLI1, hipóxia, apoptose, autofagia e mitofagia (AYNAUD et al., 2020). Recentemente, foi demonstrado que a supressão da expressão oncogênica de EWSR1-FLI1 induz alterações dependentes do tempo levando as células de SE a um estado dormente, com subpopulações com dinâmicas diferentes (KHOOGAR et al., 2022). Após o knockdown de EWSR1-FLI1 e a sua reativação, as células de subpopulações que reentram no ciclo proliferativo mostraram características semelhantes a células tronco, enquanto subpopulações de células que permanecem inativas por longos períodos de tempo parecem ser mantidas vivas por autofagia e têm maior motilidade (KHOOGAR et al., 2022). Em nossa análise a autofagia está diminuída em pacientes com sobrevivência de curto prazo, porém sabe-se que a autofagia tem um papel diferente em diferentes estágios de desenvolvimento do tumor (ELLIOTT, 1986; LORIN et al., 2009; LU et al., 2017) e está relacionada com os níveis de flutuação de EWSR1-FLI1 (KHOOGAR et al., 2022; AYNAUD et al., 2020). Portanto, é fundamental dissecar o papel da autofagia e sua relação com a flutuação de EWSR1-FLI1 em diferentes estágios de desenvolvimento

do tumor e sua inter-relação com outras vias identificadas neste trabalho. Nossa análise sugere que diferentes processos podem estar orientando o desfecho de pacientes com SE de forma integrada e podem contribuir para a diversidade de fenótipos impulsionados pela flutuação da expressão de EWSR1-FLI1.

4 Conclusão

Os resultados deste trabalho contribuem para a melhor compreensão do perfil transcricional do sarcoma de Ewing (SE). Transcriptograma Relativo apontou as principais diferenças no nível funcional entre grupos de pacientes de SE com sobrevida de curto prazo com sobrevida de longo prazo. Esses resultados trazem informações que contribuem para a compreensão do panorama geral dos diferentes processos que estão envolvidos nos diferentes fenótipos e desfechos do SE, servindo de base para novas abordagens de estudos integrados. Autofagia, apoptose e vias do sistema imunológico são relativamente menos expressas, enquanto as vias de reparo de danos ao DNA, DDR, hippo e destino celular são mais expressas em pacientes de vida curta em comparação com pacientes de vida longa. Esses processos estão relacionados à sobrevida dos pacientes com SE e podem estar relacionados à interação entre a flutuação da expressão de EWSR1-FLI1 e as vias desreguladas detectadas neste trabalho. Portanto, novos estudos devem considerar os diferentes fenômenos aqui apresentados de forma integrada.

Referências

- ADAMSON, P. C. et al. Drug discovery in paediatric oncology: roadblocks to progress. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2014 11:12, Nature Publishing Group, v. 11, p. 732–739, 9 2014. ISSN 1759-4782. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2014.149>>.
- ALMEIDA, R. M. D. et al. Transcriptome analysis reveals manifold mechanisms of cyst development in adpkd. *Human genomics*, Hum Genomics, v. 10, p. 1–24, 11 2016. ISSN 1479-7364. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27871310/>>.
- ALMEIDA, R. M. de; THOMAS, G. L.; GLAZIER, J. A. Transcriptogram analysis reveals relationship between viral titer and gene sets responses during corona-virus infection. *bioRxiv : the preprint server for biology*, bioRxiv, 2021. ISSN 2692-8205. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32587961/>>.
- AYNAUD, M. M. et al. Transcriptional programs define intratumoral heterogeneity of ewing sarcoma at single-cell resolution. *Cell reports*, Cell Rep, v. 30, p. 1767–1779.e6, 2 2020. ISSN 2211-1247. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32049009/>>.
- BERGHUIS, D. et al. Reduced human leukocyte antigen expression in advanced-stage ewing sarcoma: implications for immune recognition. *The Journal of pathology*, J Pathol, v. 218, p. 222–231, 6 2009. ISSN 1096-9896. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19274709/>>.
- BERGHUIS, D. et al. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the ewing sarcoma microenvironment determine cd8(+) t-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *The Journal of pathology*, J Pathol, v. 223, p. 347–357, 2 2011. ISSN 1096-9896. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21171080/>>.
- BHAKTA, N. et al. Childhood cancer burden: a review of global estimates. *The Lancet. Oncology*, Lancet Oncol, v. 20, p. e42–e53, 1 2019. ISSN 1474-5488. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30614477/>>.
- BIERBAUMER, L. et al. Yap/taz inhibition reduces metastatic potential of ewing sarcoma cells. *Oncogenesis*, Oncogenesis, v. 10, 1 2021. ISSN 2157-9024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33419969/>>.
- BOOPATHY, G. T. K.; HONG, W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*, v. 7, p. 49, 2019.
- BRENNER, J. C. et al. Parp-1 inhibition as a targeted strategy to treat ewing’s sarcoma. *Cancer research*, Cancer Res, v. 72, p. 1608–1613, 4 2012. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22287547/>>.

- BROHL, A. S. et al. The genomic landscape of the ewing sarcoma family of tumors reveals recurrent stag2 mutation. *PLoS genetics*, PLoS Genet, v. 10, 2014. ISSN 1553-7404. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25010205/>>.
- BROWN, D. I. et al. Poldip2 knockout results in perinatal lethality, reduced cellular growth and increased autophagy of mouse embryonic fibroblasts. *PloS one*, PLoS One, v. 9, 5 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24797518/>>.
- CADAVID, I. C. et al. Transcriptional analyses of two soybean cultivars under salt stress. *Molecular biology reports*, Mol Biol Rep, v. 47, p. 2871–2888, 4 2020. ISSN 1573-4978. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32227253/>>.
- CALSES, P. C. et al. Hippo pathway in cancer: Aberrant regulation and therapeutic opportunities. *Trends in cancer*, Trends Cancer, v. 5, p. 297–307, 5 2019. ISSN 2405-8025. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174842/>>.
- CASEY, D. L.; LIN, T. Y.; CHEUNG, N. K. V. Exploiting signaling pathways and immune targets beyond the standard of care for ewing sarcoma. *Frontiers in oncology*, Front Oncol, v. 9, 2019. ISSN 2234-943X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31275859/>>.
- CHATURVEDI, A. et al. Molecular dissection of the mechanism by which ewsfli expression compromises actin cytoskeletal integrity and cell adhesion in ewing sarcoma. *Molecular biology of the cell*, Mol Biol Cell, v. 25, p. 2695–2709, 9 2014. ISSN 1939-4586. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057021/>>.
- CHAVEZ-DOMINGUEZ, R. et al. The double-edge sword of autophagy in cancer: From tumor suppression to pro-tumor activity. *Frontiers in oncology*, Front Oncol, v. 10, 10 2020. ISSN 2234-943X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33117715/>>.
- CIRONI, L. et al. Igf1 is a common target gene of ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 3, p. e2634, 7 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002634>>.
- DEEL, M. D. et al. A review: Molecular aberrations within hippo signaling in bone and soft-tissue sarcomas. *Frontiers in oncology*, Front Oncol, v. 5, 2015. ISSN 2234-943X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389076/>>.
- DOUGLAS, D. et al. Bmi-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of cdkn2a repression. *Cancer Research*, American Association for Cancer Research, v. 68, p. 6507–6515, 8 2008. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/16/6507/540800/BMI-1-Promotes-Ewing-Sarcoma-Tumorigenicity>>.
- DOWNING, J. R. et al. The pediatric cancer genome project. *Nature genetics*, Nat Genet, v. 44, p. 619–622, 6 2012. ISSN 1546-1718. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22641210/>>.

DOYLE, L. A. Sarcoma classification: an update based on the 2013 world health organization classification of tumors of soft tissue and bone. *Cancer*, *Cancer*, v. 120, p. 1763–1774, 6 2014. ISSN 1097-0142. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24648013/>>.

ELLIOTT, D. Continuous visual information may be important after all: a failure to replicate Thomson (1983). *J Exp Psychol Hum Percept Perform*, v. 12, n. 3, p. 388–391, Aug 1986.

EWING, J. Classics in oncology. diffuse endothelioma of bone. james ewing. proceedings of the new york pathological society, 1921. *CA: a cancer journal for clinicians*, *CA Cancer J Clin*, v. 22, p. 95–98, 3 1972. ISSN 0007-9235. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4622125/>>.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, *Int J Cancer*, v. 149, p. 778–789, 8 2021. ISSN 1097-0215. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33818764/>>.

FERRAREZE, P. A. G. et al. Transcriptional analysis allows genome reannotation and reveals that *Cryptococcus gattii* undergoes nutrient restriction during infection. *Microorganisms*, *Microorganisms*, v. 5, 9 2017. ISSN 2076-2607. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28832534/>>.

FRANZETTI, G. A. et al. Cell-to-cell heterogeneity of *ewsr1-fli1* activity determines proliferation/migration choices in ewing sarcoma cells. *Oncogene*, *Oncogene*, v. 36, p. 3505–3514, 6 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28135250/>>.

GASPAR, N. et al. Ewing sarcoma: Current management and future approaches through collaboration. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *J Clin Oncol*, v. 33, p. 3036–3046, 9 2015. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26304893/>>.

GEORGE, J. et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, *Nature*, v. 524, p. 47–53, 8 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168399/>>.

GHOSAL, G.; CHEN, J. Dna damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Translational cancer research*, *NIH Public Access*, v. 2, p. 107, 6 2013. ISSN 22196803. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25111111/>> <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779140/>> <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779140/?report=abstract>> <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779140/>>.

GORDON, D. J.; MOTWANI, M.; PELLMAN, D. Modeling the initiation of ewing sarcoma tumorigenesis in differentiating human embryonic stem cells. *Oncogene*, *Oncogene*, v. 35, p. 3092–3102, 6 2016. ISSN 1476-5594. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26455317/>>.

GORTHI, A.; BISHOP, A. J. Ewing sarcoma fusion oncogene: At the crossroads of transcription and dna damage response. *Molecular Cellular Oncology*, *Molecular Cellular Oncology*, Taylor Francis, v. 5, p. 1465014, 7 2018. ISSN 23723556. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/>> <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6149845/>> <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6149845/>>.

- GORTHI, A. et al. Ews-fli1 increases transcription to cause r-loops and block brca1 repair in ewing sarcoma. *Nature*, Nature, v. 555, p. 387–391, 3 2018. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29513652/>>.
- GOSS, K. L. et al. Inhibition of chk1 sensitizes ewing sarcoma cells to the ribonucleotide reductase inhibitor gemcitabine. *Oncotarget*, Oncotarget, v. 8, p. 87016–87032, 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152060/>>.
- GRÜNEWALD, T. G. et al. Ewing sarcoma. *Nature reviews. Disease primers*, Nat Rev Dis Primers, v. 4, 12 2018. ISSN 2056-676X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29977059/>>.
- GUILLIAM, T. A. et al. Poldip2 interacts with human primpol and enhances its dna polymerase activities. *Nucleic acids research*, Nucleic Acids Res, v. 44, p. 3317–3329, 3 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26984527/>>.
- HAHM, K. B. et al. Repression of the gene encoding the tgf-beta type ii receptor is a major target of the ews-fli1 oncoprotein. *Nature genetics*, Nat Genet, v. 23, p. 222–227, 10 1999. ISSN 1061-4036. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508522/>>.
- HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensionshallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, American Association for Cancer Research, v. 12, p. 31–46, 1 2022. ISSN 2159-8274. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>>.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, Elsevier, v. 144, p. 646–674, 3 2011. ISSN 00928674. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
<<http://www.cell.com/article/S0092867411001279/abstract>
<[https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(11\)00127-9](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(11)00127-9)>.
- HANCOCK, J. D.; LESSNICK, S. L. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core ews-fli gene expression signature. <https://doi.org/10.4161/cc.7.2.5229>, Taylor Francis, v. 7, p. 250–256, 1 2008. ISSN 15514005. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.7.2.5229>>.
- HAWKINS, A. G. et al. Wnt/-catenin-activated ewing sarcoma cells promote the angiogenic switch. *JCI insight*, JCI Insight, v. 5, 7 2020. ISSN 2379-3708. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544094/>>.
- HOBBS, G. A.; DER, C. J.; ROSSMAN, K. L. Ras isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science*, J Cell Sci, v. 129, p. 1287–1292, 4 2016. ISSN 1477-9137. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26985062/>>.
- HORBACH, L. et al. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in ewing sarcoma cells. *Molecular and clinical oncology*, Mol Clin Oncol, v. 8, 4 2018. ISSN 2049-9450. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29844902/>>.
- HOSSEINI, A. et al. The local and circulating sox9 as a potential biomarker for the diagnosis of primary bone cancer. *Journal of bone oncology*, J Bone Oncol, v. 23, 8 2020. ISSN 2212-1366. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32551218/>>.

HU, H. M. et al. Ews/fli1 suppresses retinoblastoma protein function and senescence in ewing's sarcoma cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, J Orthop Res, v. 26, p. 886–893, 6 2008. ISSN 1554-527X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18271016/>>.

HU-LIESKOVAN, S. et al. Ews-fli1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of ewing's family of tumors. *Cancer research*, Cancer Res, v. 65, p. 4633–4644, 6 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15930281/>>.

HUETHER, R. et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nature communications*, Nat Commun, v. 5, 4 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24710217/>>.

INCA. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer*. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>.

INCA. *Incidência, mortalidade e Morbidade Hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e Adultos Jovens no Brasil*. Dec 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/incidencia-mortalidade-e-morbidade-hospitalar-por-cancer-em-criancas-adolescentes>>.

KATURI, V. et al. Wt1 regulates angiogenesis in ewing sarcoma. *Oncotarget*, Impact Journals LLC, v. 5, p. 2436–2449, 2014. ISSN 19492553.

KHOOGAR, R. et al. Single-cell rna profiling identifies diverse cellular responses to ewsr1/fli1 downregulation in ewing sarcoma cells. *Cellular oncology (Dordrecht)*, Cell Oncol (Dordr), v. 45, 2022. ISSN 2211-3436. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34997546/>>.

KINOSHITA, T. Biosynthesis and biology of mammalian gpi-anchored proteins. *Open Biology*, The Royal Society, v. 10, 3 2020. ISSN 20462441. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsob.190290>>.

KOPPENHAFER, S. L. et al. mtorc1/2 and protein translation regulate levels of chk1 and the sensitivity to chk1 inhibitors in ewing sarcoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, Mol Cancer Ther, v. 17, p. 2676–2688, 12 2018. ISSN 1538-8514. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30282812/>>.

KOPPENHAFER, S. L. et al. Inhibition of the atr-chk1 pathway in ewing sarcoma cells causes dna damage and apoptosis via the cdk2-mediated degradation of rrm2. *Molecular cancer research : MCR*, Mol Cancer Res, v. 18, p. 91–104, 2020. ISSN 1557-3125. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31649026/>>.

KOUSTAS, E. et al. The controversial role of autophagy in ewing sarcoma pathogenesis-current treatment options. *Biomolecules*, Biomolecules, v. 11, p. 1–12, 3 2021. ISSN 2218-273X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33652741/>>.

KUENTZER, F. A.

Otimização e análise de algoritmos de ordenamento de redes proteicas., 2014. Disponível em: <<https://repositorio.pucrio.br/dspace/handle/10923/6663>>.

- KYRIAZOGLU, A. et al. Expression analysis of nhej and hr genes in ewing sarcomas: Indications of dsb repair dysfunction. *Annals of Oncology*, Elsevier, v. 30, p. v706, 10 2019. ISSN 0923-7534. Disponível em: <<http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419603480/fulltext>
<<http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419603480/abstract>
<[https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)60348-0/abstract](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)60348-0/abstract)>.
- LAWRENCE, M. S. et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, Nature, v. 499, p. 214–218, 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770567/>>.
- LEE, H. J. et al. Combining PARP-1 inhibition and radiation in Ewing sarcoma results in lethal DNA damage. *Mol Cancer Ther*, v. 12, n. 11, p. 2591–2600, Nov 2013.
- LEONE, P. et al. Mhc class i antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, J Natl Cancer Inst, v. 105, p. 1172–1187, 8 2013. ISSN 1460-2105. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23852952/>>.
- LEVETZOW, C. von et al. Modeling initiation of ewing sarcoma in human neural crest cells. *PloS one*, PLoS One, v. 6, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21559395/>>.
- LI, G. et al. Identification of key genes and pathways in ewing’s sarcoma patients associated with metastasis and poor prognosis. *OncoTargets and therapy*, Onco Targets Ther, v. 12, p. 4153–4165, 2019. ISSN 1178-6930. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31213834/>>.
- LI, Y. et al. Inhibition of the transcriptional function of p53 by ews-flil1 chimeric protein in ewing family tumors. *Cancer letters*, Cancer Lett, v. 294, p. 57–65, 8 2010. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20153576/>>.
- LIN, P. P.; WANG, Y.; LOZANO, G. Mesenchymal stem cells and the origin of ewing’s sarcoma. *Sarcoma*, Sarcoma, v. 2011, 2011. ISSN 1369-1643. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20953407/>>.
- LISSAT, A. et al. Il6 secreted by ewing sarcoma tumor microenvironment confers anti-apoptotic and cell-disseminating paracrine responses in ewing sarcoma cells. *BMC Cancer*, BioMed Central Ltd., v. 15, p. 1–11, 7 2015. ISSN 14712407. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1564-7>>.
- LITTLE, J. *Epidemiology of childhood cancer*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1999. (International Agency for Research on Cancer Scientific Publications).
- LORIN, S. et al. c-jun nh2-terminal kinase activation is essential for dram-dependent induction of autophagy and apoptosis in 2-methoxyestradiol-treated ewing sarcoma cells. *Cancer research*, Cancer Res, v. 69, p. 6924–6931, 9 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19706754/>>.

LOWERY, C. D. et al. Broad spectrum activity of the checkpoint kinase 1 inhibitor prexasertib as a single agent or chemopotentiator across a range of preclinical pediatric tumor models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Clin Cancer Res, v. 25, p. 2278–2289, 4 2019. ISSN 1557-3265. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30563935/>>.

LU, Q. et al. Ews-fli1 positively regulates autophagy by increasing atg4b expression in ewing sarcoma cells. *International journal of molecular medicine*, Int J Mol Med, v. 40, p. 1217–1225, 10 2017. ISSN 1791-244X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28902354/>>.

LU, Q. et al. Trim3 negatively regulates autophagy through promoting degradation of beclin1 in ewing sarcoma cells. *OncoTargets and therapy*, Onco Targets Ther, v. 12, p. 11587–11595, 2019. ISSN 1178-6930. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32021240/>>.

LYTLE, N. K.; BARBER, A. G.; REYA, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature reviews. Cancer*, Nat Rev Cancer, v. 18, p. 669–680, 11 2018. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30228301/>>.

MACHADO, I. et al. Does pax7 and nkx2.2 immunoreactivity in ewing sarcoma have prognostic significance? *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, Virchows Arch, 2022. ISSN 1432-2307. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34985580/>>.

MANSOUR, M. A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. *The international journal of biochemistry cell biology*, Int J Biochem Cell Biol, v. 101, p. 80–93, 8 2018. ISSN 1878-5875. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29864543/>>.

MARCHETTO, A. et al. Oncogenic hijacking of a developmental transcription factor evokes vulnerability toward oxidative stress in ewing sarcoma. *Nature communications*, Nat Commun, v. 11, 12 2020. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32415069/>>.

MARSHALL, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews Cancer 2014 14:4*, Nature Publishing Group, v. 14, p. 277–289, 3 2014. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc3679>>.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with myc. *Nature reviews. Cancer*, Nat Rev Cancer, v. 8, p. 976–990, 12 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029958/>>.

MIOTTO, Y. E. et al. Identification of root transcriptional responses to shoot illumination in arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, Plant Mol Biol, v. 101, p. 487–498, 11 2019. ISSN 1573-5028. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31560104/>>.

MISHRA, M. N. et al. Pathogenesis of ewing sarcoma: Existing and emerging trends. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, Elsevier, v. 2, p. 100008, 10 2021. ISSN 2667-3940.

- MORAIS, D. A.; ALMEIDA, R. M.; DALMOLIN, R. J. Transcriptogramer: an r/bioconductor package for transcriptional analysis based on protein-protein interaction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, Bioinformatics, v. 35, p. 2875–2876, 8 2019. ISSN 1367-4811. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30624611/>>.
- NAKATANI, F. et al. Identification of p21waf1/cip1 as a direct target of ewsfli1 oncogenic fusion protein. *The Journal of biological chemistry*, J Biol Chem, v. 278, p. 15105–15115, 4 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12560328/>>.
- NIETO-SOLER, M. et al. Efficacy of atr inhibitors as single agents in ewing sarcoma. *Oncotarget*, Oncotarget, v. 7, p. 58759–58767, 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27577084/>>.
- NIH. *What is cancer?* 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>.
- OREN, M.; ROTTER, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 2, 2010. ISSN 1943-0264. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182618/>>.
- PAPPO, A. S.; DIRKSEN, U. Rhabdomyosarcoma, ewing sarcoma, and other round cell sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, J Clin Oncol, v. 36, p. 168–179, 1 2018. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29220292/>>.
- PETERS, H. L. et al. Amyloid precursor-like protein 2 suppresses irradiation-induced apoptosis in ewing sarcoma cells and is elevated in immune-evasive ewing sarcoma cells. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.25183>, Taylor Francis, v. 14, p. 752–760, 8 2013. ISSN 15384047. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.25183>>.
- POTIKYAN, G. et al. Genetically defined ewsfli1 model system suggests mesenchymal origin of ewing's family tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, Lab Invest, v. 88, p. 1291–1302, 12 2008. ISSN 1530-0307. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18838963/>>.
- PRIEUR, A. et al. Ews/fli-1 silencing and gene profiling of ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and cellular biology*, Mol Cell Biol, v. 24, p. 7275–7283, 8 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282325/>>.
- RAMACHANDRAN, B.; RAJKUMAR, T.; GOPISETTY, G. Challenges in modeling ewsfli1-driven transgenic mouse model for ewing sarcoma. *American Journal of Translational Research*, e-Century Publishing Corporation, v. 13, p. 12181, 2021. ISSN 1943-8141. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348661172/>> / <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8661172/>> / <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348661172/>?report=abstract
- RAMIREZ, O. et al. Implementing a childhood cancer outcomes surveillance system within a population-based cancer registry. *Journal of Global Oncology*, American Society of Clinical Oncology, v. 4, p. 1–11, 3 2018. ISSN 23789506. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3223468/>> / <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223468/>> / <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3223468/>?report=abstract

- REIS, C. F. et al. Systems biology-based analysis indicates global transcriptional impairment in lead-treated human neural progenitor cells. *Frontiers in genetics*, Front Genet, v. 10, 9 2019. ISSN 1664-8021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31552095/>>.
- RIBEIRO-DANTAS, M. da C. et al. Reverse engineering of ewing sarcoma regulatory network uncovers pax7 and runx3 as master regulators associated with good prognosis. *Cancers*, Cancers (Basel), v. 13, 4 2021. ISSN 2072-6694. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33924679/>>.
- RICHTER, G. H. et al. Ezh2 is a mediator of ews/fli1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, p. 5324–5329, 3 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19289832/>>.
- RIGGI, N. et al. Ews-fli-1 expression triggers a ewing’s sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer research*, Cancer Res, v. 68, p. 2176–2185, 4 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18381423/>>.
- RIGGI, N. et al. Ews-fli-1 modulates mirna145 and sox2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes development*, Genes Dev, v. 24, p. 916–932, 5 2010. ISSN 1549-5477. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20382729/>>.
- RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, P. et al. Hippo pathway effectors yap1/taz induce an ews–fli1-opposing gene signature and associate with disease progression in ewing sarcoma. *The Journal of Pathology*, John Wiley Sons, Ltd, v. 250, p. 374–386, 4 2020. ISSN 1096-9896. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.5379>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.5379>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.5379>>.
- RYBARCZYK-FILHO, J. L. et al. Towards a genome-wide transcriptogram: the saccharomyces cerevisiae case. *Nucleic acids research*, Nucleic Acids Res, v. 39, p. 3005–3016, 4 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21169199/>>.
- SANKAR, S.; LESSNICK, S. L. Promiscuous partnerships in ewing’s sarcoma. *Cancer genetics*, Cancer Genet, v. 204, p. 351–365, 7 2011. ISSN 2210-7762. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21872822/>>.
- SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science (New York, N.Y.)*, Science, v. 270, p. 467–470, 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7569999/>>.
- SHIMIZU, R. et al. Ews-fli1 regulates a transcriptional program in cooperation with foxq1 in mouse ewing sarcoma. *Cancer science*, Cancer Sci, v. 109, p. 2907–2918, 9 2018. ISSN 1349-7006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29945296/>>.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, American Cancer Society, v. 68, p. 7–30, 1 2018. ISSN 1542-4863.

- SILVA, S. R. da et al. Reproducibility enhancement and differential expression of non pre-defined functional gene sets in human genome. *BMC genomics*, BMC Genomics, v. 15, 12 2014. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25539829/>>.
- STAHL, D. et al. Prognostic profiling of the immune cell microenvironment in ewing's sarcoma family of tumors. *Oncoimmunology*, Oncoimmunology, v. 8, 2019. ISSN 2162-4011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31741777/>>.
- STAHL, M. et al. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with ewing sarcoma. *Pediatric blood cancer*, Pediatr Blood Cancer, v. 57, p. 549–553, 10 2011. ISSN 1545-5017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21442722/>>.
- STEPHENS, P. J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, Cell, v. 144, p. 27–40, 1 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215367/>>.
- TANAKA, M. et al. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *The Journal of clinical investigation*, J Clin Invest, v. 124, p. 3061–3074, 7 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24911143/>>.
- TANNER, J. M. et al. Ews/fli is a master regulator of metabolic reprogramming in ewing sarcoma. *Molecular cancer research : MCR*, Mol Cancer Res, v. 15, p. 1517–1530, 11 2017. ISSN 1557-3125. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720588/>>.
- TAO, Z. et al. Microarray bioinformatics in cancer-a review. 2017. ISSN 2241-6293.
- TIRODE, F. et al. Genomic landscape of ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of stag2 and tp53 mutations. *Cancer discovery*, Cancer Discov, v. 4, p. 1342–1353, 11 2014. ISSN 2159-8290. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25223734/>>.
- TOOMEY, E. C.; SCHIFFMAN, J. D.; LESSNICK, S. L. Recent advances in the molecular pathogenesis of ewing's sarcoma. *Oncogene*, Oncogene, v. 29, p. 4504–4516, 8 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20543858/>>.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, Elsevier, v. 147, p. 275–292, 10 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867411010853/fulltext>
<<http://www.cell.com/article/S0092867411010853/abstract>
<[https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(11\)01085-3](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(11)01085-3)>.
- VARELAS, X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*, v. 141, n. 8, p. 1614–1626, Apr 2014.
- WANG, S. et al. The Crosstalk Between Hippo-YAP Pathway and Innate Immunity. *Front Immunol*, v. 11, p. 323, 2020.
- WANG, Y. et al. Comprehensive molecular characterization of the hippo signaling pathway in cancer. *Cell reports*, Cell Rep, v. 25, p. 1304–1317.e5, 10 2018. ISSN 2211-1247. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30380420/>>.

WATSON, S. et al. Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *The Journal of pathology*, J Pathol, v. 245, p. 29–40, 5 2018. ISSN 1096-9896. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29431183/>>.

WHO. *Cancer*. World Health Organization, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/cancertab=tab1>>.

WHO. *Cancer*. World Health Organization, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.

YABE, H. et al. Prognostic significance of hla class i expression in ewing's sarcoma family of tumors. *Journal of surgical oncology*, J Surg Oncol, v. 103, p. 380–385, 4 2011. ISSN 1096-9098. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21400519/>>.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, Curr Opin Cell Biol, v. 22, p. 124–131, 4 2010. ISSN 1879-0410. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20034776/>>.

YE, C. et al. Beclin-1 knockdown decreases proliferation, invasion and migration of ewing sarcoma sk-es-1 cells via inhibition of mmp-9. *Oncology letters*, Oncol Lett, v. 15, p. 3221–3225, 3 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29435061/>>.

YUSTEIN, J. T.; EWING, F. D. V. Ews-fli1 regulates genotoxic stress response in ewing. In: . [S.l.: s.n.], 2015.

ZOU, T.; ZHANG, J. Diverse and pivotal roles of neddylation in metabolism and immunity. *The FEBS journal*, FEBS J, v. 288, p. 3884–3912, 7 2021. ISSN 1742-4658. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33025631/>>.