

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

**SINALIZAÇÃO POR NEUROTROFINAS EM CÉLULAS TRONCO TUMORAIS
COMO ALVO TERAPÊUTICO EM SARCOMA DE EWING**

Rafael Pereira dos Santos

Porto Alegre, abril de 2022

RAFAEL PEREIRA DOS SANTOS

**SINALIZAÇÃO POR NEUROTROFINAS EM CÉLULAS TRONCO TUMORAIS
COMO ALVO TERAPÊUTICO EM SARCOMA DE EWING**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Caroline Brunetto de Farias

Porto Alegre, abril de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Rafael
SINALIZAÇÃO POR NEUROTROFINAS EM CÉLULAS TRONCO
TUMORAIS COMO ALVO TERAPÊUTICO EM SARCOMA DE EWING /
Rafael Santos. -- 05/2022.
134 f.
Orientador: Rafael Roesler.

Coorientadora: Caroline Brunetto de Farias.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS,
05/2022.

1. Sarcoma de Ewing. 2. Resistência. 3. K252a. I.
Roesler, Rafael, orient. II. Brunetto de Farias,
Caroline, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Câncer e Neurobiologia no Centro de Pesquisas Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Instituto do Câncer Infantil (ICI) e do programa de fomento à pesquisa do Ministério da Saúde Projeto PRONON: DESVENDANDO A BIOLOGIA DO CÂNCER INFANTIL: IDENTIDADE CELULAR DO SARCOMA DE EWING E ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS - SIPAR/NUP 25000.202751/2016-65.

AGRADECIMENTOS

Chegar ao final de uma etapa tão importante como a conclusão do doutorado traz muitos sentimentos e lembranças. Ao pensar em tudo que passei para chegar até aqui, me faz lembrar das pessoas que eu preciso agradecer por tudo que são e fizeram por mim neste período.

Deus, eu te agradeço por ter aberto portas que eu não imaginava, e ter colocado pessoas fantásticas em meu caminho. Obrigado por ter me capacitado para chegar até aqui, obrigado pela fé que me sustentou sempre. Tu és Aquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo que pedimos ou pensamos. Obrigado Senhor!

Pai e mãe, obrigado pelos princípios que me ensinaram, e por me incentivar a estudar, mostrando desde cedo que isso deve ser prioridade na vida. Agradeço pelo apoio e por acreditarem em mim.

Gabi, da graduação até aqui tu está comigo. Casamos, Deus nos deu nossas 2 meninas, Rafaela e Helena, e em todos esses anos tu me amou incondicionalmente para eu chegar onde cheguei. Obrigado pela espera, pela ajuda, por tudo. Te amo!

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia. Tudo o que sei aprendi neste lugar, com os colegas de agora e todos os que já passaram, quantas experiências, aprendizados, conversas...foram tantos colegas queridos que se for citar nomes vai faltar espaço, mas dedico um agradecimento especial à Mari, chegamos praticamente juntos no Lab há mais de dez anos, e eu admiro muito a cientista e hoje coordenadora que tu és. Obrigado por toda ajuda, ensino e conversas ao longo desse tempo.

E agradeço imensamente à Carol Brunetto e o Prof. Rafael Roesler. Vocês são os melhores! Para mim será sempre uma honra dizer que vocês foram meus orientadores. Obrigado por tudo que me ensinaram. Carol, obrigado pela paciência, e por ter aberto as portas do laboratório, me dando todo suporte em tudo que precisei ao longo desses anos. Obrigado mesmo!

Sonhe e ouse sonhar. Você nunca irá além dos seus sonhos!

ÍNDICE

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA.....	03
AGRADECIMENTOS.....	04
LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 SARCOMA DE EWING.....	10
1.1.1 Epidemiologia e etiologia.....	12
1.1.2 Características moleculares.....	13
1.1.3 A biologia do sarcoma de Ewing.....	16
1.1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	17
1.1.5 Estadiamento e prognóstico.....	20
1.1.6 Metástase.....	20
1.1.7 Tratamento - quimioterapia de indução.....	22
1.1.8 Tratamento - doença metastática.....	24
1.1.9 Sarcoma de Ewing recidivante.....	25
1.2 RESISTÊNCIA.....	26
1.3 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS (CTTs).....	28
1.4 NEUROTROFINAS.....	31
1.4.1 Neurotrofinas e seus receptores.....	32
1.4.2 Sinalização das neurotrofinas.....	34
1.4.3 Eixo NGF/TrkA.....	36
1.4.4 EixoBANDF/TrkB.....	38
1.4.5 Neurotrofinas/P75NTR.....	38
1.4.6 Evidência do papel das neurotrofinas nas Células Tronco Tumorais.....	39
1.4.7 Sinalização de neurotrofinas em Células Tronco Tumorais.....	40
1.4.8 Neurotrofinas e Células Tronco Tumorais: oportunidades.....	42

2. OBJETIVOS.....	45
2.2 Objetivo geral.....	45
2.3 Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.2 Cultura celular.....	47
3.3 Migração (<i>scratch</i>).....	47
3.4 Formação de esferas tumorais.....	48
3.5 Tratamento.....	48
3.6 Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR.....	49
3.7 Avaliação das vias de sinalização pela Técnica de Western Blot.....	50
3.8 Análise estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.2 Tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas K252 aumenta EWS- FLI1.....	52
4.3 K252a diminui a capacidade migratória das células de SE.....	53
4.4 O tratamento com K252a diminui a contagem do número de esferas tumorais.....	55
4.5 K252a modifica a expressão de genes associados a pluripotência.....	57
4.6 Tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas diminui pERK.....	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. ARTIGO DE REVISÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

2DG: glicólise 2-desoxi-D-glicose.

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor* - do inglês).

BRCA1: proteína do câncer de mama tipo 1.

CITCs: células iniciadoras de tumor cerebral.

COG: Grupo de Oncologia Infantil dos EUA.

CTT: Célula Tronco Tumoral.

EMT: transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês)

ERK: quinases reguladas extracelularmente.

FISH: hibridização fluorescente *in situ*.

GPCR: receptores acoplados à proteína G.

JNK: quinase N-terminal c-Jun.

K252a: um pan-inibidor de Trks.

LDH: lactato desidrogenase.

NF-κB: fator nuclear-κb.

NGF: fator de crescimento do nervo (*nerve grow factor* - do inglês).

NT-3: neurotrofina 3.

NT-4/5: neurotrofina 4/5.

NTRKs, receptores neurotróficos de tirosina quinase.

NTs: Neurotrofinas.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PARP: poli (ADP-ribose) da polimerase.

PI3K: fosfatidilinositol quinase 3.

PI3K: fosfatidilinositol3-quinase.

PLC: fosfolipase C.

SE: Sarcoma de Ewing.

RESUMO

O sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico altamente agressivo, que afeta ossos e com menor frequência tecidos moles. Acomete, principalmente, crianças, adolescentes e adultos jovens. A principal característica do SE é uma translocação cromossomal que produz o gene fusionado EWS-FLI1, o qual é encontrado em 85% dos tumores de Ewing. Uma maior compreensão da identidade e origem celular é necessária para a identificação de marcadores e alvos terapêuticos. Neurotrofinas (NTs), são proteínas secretadas pelas células as quais regulam aspectos do desenvolvimento e função neuronal e em tecidos não neurais. Inclusive esses mesmos mecanismos são utilizados por tumores. O papel da inibição de neurotrofinas em SE já foi demonstrado, porém seu mecanismo permanece pouco compreendido. A progressão tumoral e resistência à quimioterapia pode significar uma maior resistência de células-tronco tumorais. Neste trabalho nós investigamos características celulares e moleculares, participação de neurotrofinas e de células tronco em linhagens celulares de SE com pan-inibidor de neurotrofinas K252a. Assim, as células da linhagem celular SK-ES-1 foram tratadas com K252a. A expressão de EWS-FLI1 teve um aumento significativo após o tratamento. Esferas tumorais da linhagem SK-ES-1 foram cultivadas e expostas à K252a. Após 72 horas de tratamento, verificou-se uma diminuição significativa do número e tamanho das esferas. Foi observado uma diminuição significativa em Prom1 após o tratamento com K252a, entretanto OCT4 teve expressão aumentada, sendo ambos marcadores de células tronco-tumoral. Esses resultados demonstram pela primeira vez que o K252a atua em nível molecular em células com capacidade tronco-tumoral. Investigamos mecanismos moleculares de vias de sinalização associados com diminuição do crescimento celular de SE. O tratamento com K252a diminuiu níveis de pERK, mas não os níveis totais de ERK1. Esses resultados reforçam que o pan-inibidor de neurotrofinas tem um potencial como nova alternativa para terapia alvo para SE.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing (SE); Neurotrofinas (NTs); Resistência; Células Tronco Tumorais (CTT); K252a.

ABSTRACT

Ewing's sarcoma (ES) is a highly aggressive pediatric tumor that affects bones and, less frequently, soft tissues. It mainly affects children, adolescents and young adults. The main feature of ES is a chromosomal translocation that produces the EWS-FLI1 fusion gene, which is found in 85% of Ewing tumors. A greater understanding of cellular identity and origin is necessary for the identification of therapeutic markers and targets. Neurotrophins (NTs) are proteins secreted by cells which regulate aspects of neuronal development and function and in non-neural tissues. Even these same mechanisms are used by tumors. The role of neurotrophin inhibition in ES has been demonstrated, but its mechanism remains poorly understood. Tumor progression and resistance to chemotherapy may increase resistance by tumor stem cells. In this work we investigated cellular and molecular characteristics, participation of neurotrophins and stem cells in ES cell lines with a pan-inhibitor of neurotrophins K252a. Thus, cells of the cell line SK-ES-1 were treated with K252a. EWS-FLI1 expression had a significant increase after treatment. Tumor spheres of the SK-ES-1 strain were cultured and exposed to K252a. After 72 hours of treatment, there was a significant decrease in the number and size of the spheres. A significant decrease in Prom1 was observed after treatment with K252a, however OCT4 had increased expression, which are both stemness markers. These results demonstrate for the first time that K252a acts at the molecular level in cells with stem-tumor capacity. We investigated molecular mechanisms of signaling pathways associated with decreased SE cell growth. K252a treatment decreased pERK levels but not total ERK1 levels. These results reinforce that the neurotrophin pan-inhibitor has a potential as a new alternative for targeted therapy for SE.

Keywords: Ewing's Sarcoma (ES); Neurotrophins (NTs); Resistance; Cancer Stem Cell (CSC); K252a.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SARCOMA DE EWING

O sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico altamente agressivo, caracterizado por pequenas células azuis arredondadas, que afeta ossos e, com menor frequência, tecidos moles. Nos ossos, ocorre predominantemente na pelve, fêmur, tíbia e costelas; já em tecidos moles atinge principalmente: parede torácica, músculo glúteo, cavidades pleurais e músculos cervicais (Gaspar et al., 2015). Sarcoma de Ewing acomete, principalmente, crianças, adolescentes e adultos jovens (Balamuth e Womer, 2010) e permanece sendo o segundo tumor ósseo mais comum em crianças, atingindo uma incidência anual de 3 casos por milhão de pessoas nos Estados Unidos (EUA), ficando atrás, somente, do osteossarcoma, e aproximadamente 1,5 casos por milhão de crianças e adultos jovens globalmente (Esiashvili et al., 2008). Desde que foi identificado em 1921 pelo patologista James Ewing, seu tratamento progrediu substancialmente (Ewing, 1921). Antes da introdução da quimioterapia, somente 10 % dos pacientes sobreviviam. Com os avanços na terapia multimodal, o que inclui quimioterapia neoadjuvante/adjuvante combinada com cirurgia e/ou radioterapia, a sobrevida em pacientes com doença localizada aumentou substancialmente, atingindo uma taxa de sobrevida em 5 anos de até 70 % nos melhores centros (Ross et al., 2013; Grier et al., 2003). Infelizmente, quase 20 % dos pacientes progridem para doença recorrente ou refratária, e ainda um terço dos pacientes já se apresenta com doença metastática no momento do diagnóstico, sendo essas características as mais importantes no que tange o

prognóstico. A sobrevida nesse cenário varia entre 10 % a 20 % (Balamuth e Womer, 2010).

O tratamento padrão para o SE consiste em um regime de tratamento multimodal, incluindo ressecção cirúrgica e/ou radioterapia local, bem como quimioterapia intensiva com múltiplos fármacos (Pappo e Dirksen, 2018). Idealmente, o diagnóstico e o tratamento do SE devem ser realizados em um centro de referência em sarcoma por uma equipe multidisciplinar que inclui radiologistas, patologistas, médicos radiologistas, cirurgiões ortopédicos e gerais, oncologistas pediátricos e enfermeiras especializadas (Grünewald et al. 2018).

Nosso grupo de pesquisas tem conduzido estudos avaliando regimes de tratamento adaptados, que consideram o maior volume tumoral e as peculiaridades das instituições sul-americanas (Brunetto et al., 2015).

A classificação de sarcomas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2013 definiu uniformemente como 'sarcoma de Ewing' (de Alava et al., 2013; Doyle, 2014) os tumores que são caracterizados por fusões gênicas FET – ETS patognomônicas (Watson, 2018; Sankar e Lessnick, 2011). A classificação da OMS também inclui o termo "sarcomas semelhantes a Ewing", colocando em desuso a descrição "tumores da família do Ewing". O sarcoma de Ewing é geneticamente bem caracterizado: suas principais mutações condutoras são translocações cromossômicas específicas que fundem um membro da família FET de proteínas (codificadas por FUS, EWSR1 e TAF15), que são proteínas de ligação a RNA envolvidas na transcrição e *splicing*, com diferentes membros da família ETS - mais comumente FLI1 (85% dos casos) (Delattre, 1992) - de fatores

de transcrição, que estão envolvidos na proliferação celular, diferenciação celular, controle do ciclo celular, angiogênese e apoptose, conforme aprofundaremos a seguir.

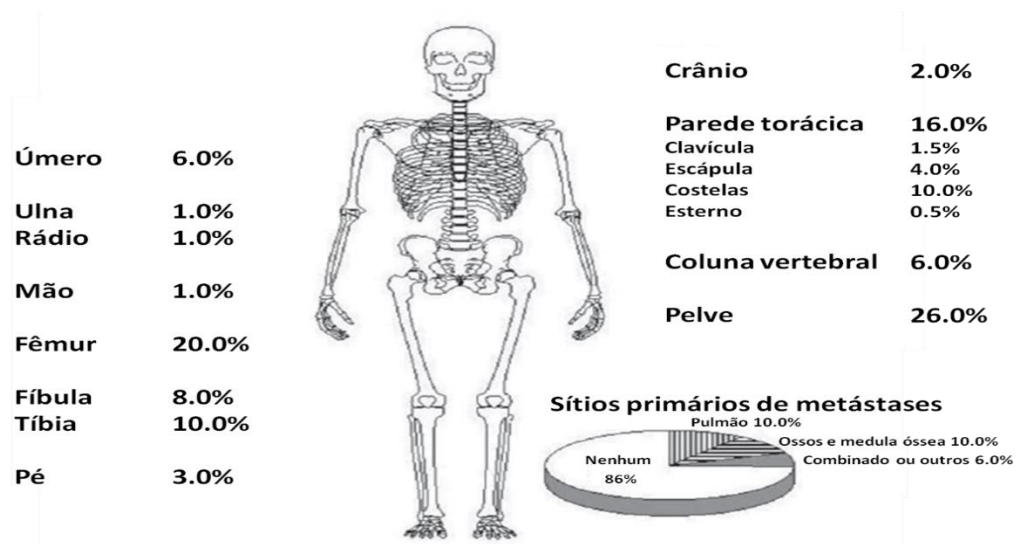


Figura 1: Principais sítios primários e metastáticos em SE. Fonte: adaptado de Bernstein et al., Oncologist 2006.

1.1.1 Epidemiologia e etiologia

No que tange aos aspectos demográficos, o sarcoma de Ewing afeta principalmente crianças e adultos jovens com um pico de incidência na idade de 15 anos; meninos e homens são ligeiramente mais afetados do que meninas e mulheres (proporção de sexo de 3: 2). O SE é predominantemente observado em populações de descendência europeia com uma estimativa de incidência de aproximadamente 1,5 casos por milhão de crianças e adultos jovens (Jawad et al., 2009). A incidência estimada em populações de asiáticos e de ascendência africana é substancialmente menor, com taxas anuais que variam entre 0,8 e 0,2

casos por milhão de crianças, respectivamente, implicando que as variantes genéticas específicas da Europa e a ancestralidade podem influenciar o risco para desenvolver o sarcoma de Ewing (Jawad et al., 2009; Fraumeni, 1970). Uma explicação para esse fato, portanto, seria uma redução do tamanho do íntron 6 do gene EWS, o qual fica em uma região próxima ao ponto de quebra da translocação, na população africana (Zucman-Rossie et al., 1997).

No Brasil, os tumores ósseos representam 6,0 % de todos os tumores da infância. Cerca de 700 crianças são diagnosticadas, a cada ano, com esses tipos de tumor, dos quais aproximadamente 400 são osteossarcomas e 200 são SE, sendo este o segundo tumor ósseo mais frequente em crianças e adolescentes (INCA, 2020).

A etiologia do sarcoma de Ewing permanece desconhecida. Apesar de a totalidade dos casos estarem relacionados a anormalidades genéticas, como as translocações, a maioria destes tumores, entretanto, parece surgir de maneira esporádica, uma vez que nenhuma ligação genética foi encontrada. Fatores de risco ambientais não foram identificados para SE (Randall et al., 2010), exceto para um único estudo de caso-controle nacional australiano que vinculou indivíduos que tiveram exposição a um ambiente de fazenda a um aumento na probabilidade de desenvolver sarcoma de Ewing (Valery et al., 2002).

Atualmente, os pacientes com doença localizada geralmente tem uma sobrevida global de 5 anos que variam entre 70 a 80 %, o que pode ser menor em pacientes que apresentam tumores pélvicos, grandes tumores e/ou regressão tumoral incompleta após quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante. Pacientes apresentando metástase no diagnóstico geralmente tem uma

sobrevida global significativamente menor, em torno de 30%, enquanto que pacientes com metástase pulmonar isolada têm uma sobrevida global de aproximadamente 50% (Gaspar et al., 2015). Até o momento não há nenhuma ferramenta estatística robusta disponível para estimar a expectativa de vida ou longevidade dos sobreviventes do sarcoma de Ewing.

1.1.2 Características moleculares

A principal característica do SE diz respeito a uma alteração genética específica deste tumor, caracterizada por uma translocação cromossomal. Todas as translocações envolvem o gene EWS (presente no cromossomo 22), o qual codifica uma proteína de ligação ao RNA, com fatores de transcrição da família ETS, sendo o mais comum o gene FLI1 (presente no cromossomo 11) (Antonescu, 2014). A translocação t (11; 22) (q24; q12) produz o gene fusionado EWS-FLI1, o qual é encontrado em 85% dos tumores de Ewing. A segunda translocação mais comum é a t (21;22) (q22;q12), responsável pela produção do gene EWS-EGR, presente em 5 a 10 % dos tumores. Outras translocações são raras e envolvem EWS-ETV1, EWS-FEV e EWS-EIAF, dentre outras anormalidades citogenéticas (Wang et al., 2007).

A maioria dos estudos funcionais mantém um enfoque maior na fusão mais frequente, EWS–FLI1. EWS–FLI1 codifica uma oncoproteína dominante que se liga ao DNA e atua como um fator de transcrição aberrante (May et al., 1993; Lessnick et al., 1995), regulando uma variedade de genes diferentes envolvidos na regulação do ciclo celular, migração celular, transdução de sinal, arquitetura da cromatina, atividade de telomerase e muitas outras funções

celulares. Um estudo recente mostrou que a transcrição do gene mediado por EWS-FLI1 leva à frequente formação de *loops* R, que são estruturas de três fitas composto por um híbrido DNA: RNA associado a um DNA de fita simples não molde. Esses *loops* R podem sensibilizar as células do sarcoma de Ewing a inibidores da poli (ADP-ribose) da polimerase (PARP), possivelmente via sequestro e inativação da proteína do câncer de mama tipo 1 (BRCA1) (Gorthi et al., 2018), que tem um papel central na reparação de danos no DNA.

O fator de transcrição aberrante que resulta da fusão, EWS-FLI1, altera o estado da cromatina para estabelecer um programa de expressão gênica que ativa oncogenes e reprime supressores tumorais (Riggi et al., 2014), atuando, conseqüentemente, como responsável pela carcinogênese, metástase e resistência tumoral (Toomey et al., 2010).

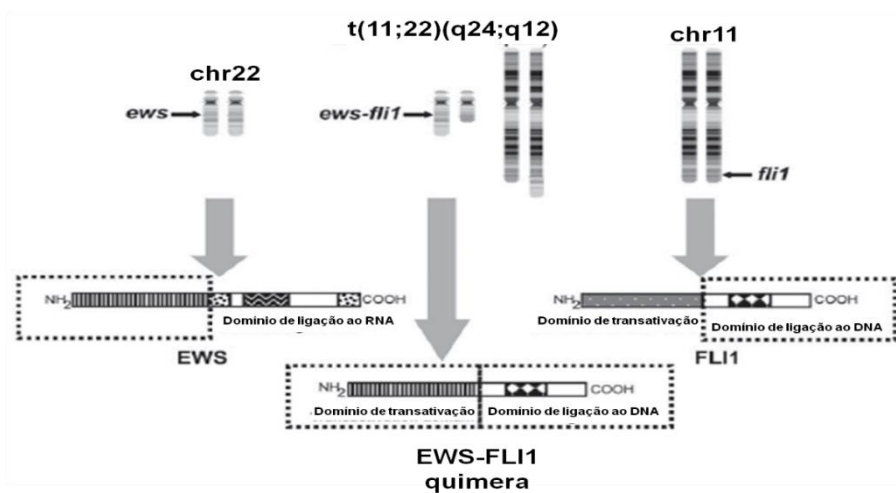


Figura 2: Principal translocação em sarcoma de Ewing resultando no gene fusionado EWS-FLI1 (85% dos casos). Fonte: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/11/5/503.long>.

1.1.3 A biologia do sarcoma de Ewing

Como discutido anteriormente, a principal característica do SE é a translocação que gera o transcrito de fusão EWS-FLI1. EWS é uma proteína ligante de RNA, enquanto que FLI1 é um fator de transcrição que afeta vários genes envolvidos em várias funções celulares críticas para o câncer, tais como apoptose e diferenciação (Sharrocks, 2001). A combinação entre EWS e outros genes resulta em outras patologias, porém a combinação entre EWS e ETS é específica para SE, ou seja, a fusão do gene ETS parece ser específica para esse tumor (Ordóñez et al., 2009).

Acredita-se que a fusão EWS-FLI1 seja a principal causa relacionada à origem do tumor, uma vez que esse é o transcrito mais comum (Arvand & Denny, 2001). A expressão de vários genes alvo responsáveis pela tumorigênese é alterada pela proteína fusionada EWS-FLI1, formada a partir da fusão da porção 5' do gene EWS com o segmento 3' de FLI1 (Toomey et al., 2010). Essa proteína atua tanto como ativador quanto repressor da transcrição gênica. A proteína quimérica aumenta a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, como, por exemplo, IGF1, NKX2, SOX2 e EZH2. Por outro lado, EWS-FLI1 suprime genes envolvidos em apoptose e parada de ciclo celular, como p21 e p57kip (Dauphinot et al., 2001; Nakatani et al., 2003; Richter et al., 2009). Análises por microarranjo de DNA revelaram que mais de 1000 genes são regulados pela proteína de fusão, 80% dos quais são reprimidos. Por essa razão, EWS-FLI1 é considerado um alvo potencial para a terapia alvo molecular e está sempre presente nas perspectivas de tratamento e nas discussões sobre a biologia do SE.

Há ainda vários eventos secundários relacionados à patogênese do SE, como mutações em p53, as quais estão relacionadas com o prognóstico da

doença (Toomey et al., 2010) e também atuação de miRNAs como responsáveis por efeitos modulatórios, como miRNA-145, o qual participa da tumorigênese e diferenciação em SE (Riggi et al., 2010).

Não existe um consenso definitivo sobre a possível origem do SE, entretanto existem várias evidências apontando para uma procedência neuroectodérmica (Cavazzana et al., 1987; O'regan et al., 1995; Von Levetzow et al., 2011), enquanto outros autores sugerem as células tronco mesenquimais como possível origem para esse tumor (Tirode et al., 2007; Riggi et al., 2008; Amaral et al., 2014). Em um trabalho publicado em 2009, Riggi e colaboradores (2009) tentaram solucionar esse embate entre as duas correntes, propondo que células de sarcoma de Ewing derivam de células tronco mesenquimais de origem neuroectodérmica capazes de manter a dupla plasticidade; fornecendo, conseqüentemente, uma lógica biológica convincente para a dualidade fenotípica apresentada por esses tumores.

O conhecimento destes precursores é importante na descrição da patogênese da doença e explorar a origem celular do SE é uma forma racional para pesquisar novos alvos terapêuticos..

1.1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial

Pacientes com sarcoma de Ewing podem apresentar doença localizada ou metástases clinicamente evidentes. A dor é o sintoma clínico mais comum, porém no início é frequentemente confundida com lesões resultantes de esportes ou atividades diárias (tais como tendinite, dores ou lesões musculares

ou osteomielite). Além disso, como a maioria dos pacientes afetados são crianças e adolescentes, os quais são fisicamente ativos, a dor, por consequência, muitas vezes é atribuída ao crescimento ósseo ou lesões físicas as quais são comuns nesta idade; levando, portanto, a erros e atrasos no diagnóstico (Widhe & Widhe, 2000). Em um número substancial de pacientes, a dor é seguida por uma massa palpável de tecido mole, que pode ser indiscernível por um longo tempo nos pacientes com tumores pélvicos, da parede torácica ou femorais. Há ainda alguns sintomas menos comuns, considerados 'sintomas B', inicialmente inespecíficos: febre moderada à elevada, suores noturnos e perda de apetite. O diagnóstico definitivo de SE deve ser feito (ou revisado) em um centro de referência de sarcoma. É comum o diagnóstico de SE ser tardio; a mediana de tempo para o mesmo é de 3 a 9 meses. No entanto, o tempo de diagnóstico não está associado ao resultado do tratamento em sarcoma de Ewing (Widhe & Widhe, 2000).

A partir da biópsia da lesão é feito o diagnóstico definitivo do SE. Atualmente não há marcadores de urina ou sangue disponíveis para o diagnóstico de rotina do sarcoma de Ewing. Dentre os achados laboratoriais, pode haver um moderado aumento de marcadores inflamatórios, como taxa de sedimentação eritrocitária, proteína C reativa e outras citocinas (Rutkowski et al., 2003; Nakamura et al., 2013). Outras anormalidades laboratoriais incluem presença de anemia, assim como aumento de marcadores de *turnover* ósseo, como lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina (Bacci et al., 2007). A LDH elevada é geralmente correlacionada com a carga tumoral e foi demonstrado estar associada a piores resultados (Pizzo et al., 2015).

Histologicamente, o tumor apresenta-se como camadas homogêneas e densas de pequenas células redondas e azuis, tendo o núcleo associado a uma cromatina fina e granular, apresentando grande proporção em relação ao citoplasma (Suh et al., 2002). O SE é histologicamente similar a outros tumores compostos por células azuis, como linfoma, leucemia, neuroblastoma, entre outros, tornando o diagnóstico mais difícil. Em vista desse problema, existem alternativas para a confirmação diagnóstica: a maioria das células de SE marca-se, por meio de imunohistoquímica, com o anticorpo anti-CD99. CD99 é uma glicoproteína de superfície celular codificada pelo gene MIC2 (Antonescu, 2014) e um relevante marcador diagnóstico para sarcoma de Ewing. Uma forte expressão de fusão membranosa de CD99 é evidente por imunohistoquímica em aproximadamente 95 % dos sarcomas de Ewing. A detecção imunohistoquímica de FLI1 é ainda mais específica para o sarcoma de Ewing do que o CD99. Expressão de caveolina 1 foi mostrada como sendo útil para diagnosticar sarcomas de Ewing negativos para a expressão de CD99 (Llombart-Bosch et al., 2009). Da mesma forma, a expressão da proteína homeobox NKX-2.2, outra proteína relacionada à patogênese do sarcoma de Ewing, é específica para este tumor (Machado et al., 2017).

Citogeneticamente, as translocações - características associadas ao SE - são determinadas por técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou RT-PCR. Todas as translocações envolvem o gene EWS com fatores de transcrição da família ETS, sendo o mais comum o gene FLI1 (Antonescu, 2014). Embora a presença destas translocações seja bastante sensível e específica para SE, é importante salientar que a combinação com EWS pode estar presente em outros tumores, portanto o consenso entre clínica, microscopia, imunohistoquímica e

características moleculares é indispensável para o estabelecimento do diagnóstico.

1.1.5 Estadiamento e prognóstico

O estágio clínico no diagnóstico é um dos principais preditores de sobrevivência. A determinação precisa da carga tumoral no diagnóstico é um fator crítico no planejamento do tratamento e na previsão de resultados, e os estudos de imagem são a ferramenta central para detecção de metástases. Ressonância magnética é o exame de imagem considerado padrão ouro e ajuda a demonstrar a extensão do tumor nos ossos e tecidos moles. Todos os pacientes devem, também, ser submetidos à tomografia computadorizada de mediastino e cintilografia óssea para identificação de metástases pulmonares e ósseas, respectivamente (Cote & Choy, 2013).

O prognóstico para pacientes que apresentam doença localizada melhorou consideravelmente desde que o tumor foi descrito, apresentando, hoje em dia, uma sobrevida de cerca de 70% em cinco anos (Bacci et al., 2007).

1.1.6 Metástase

A metástase é o fator prognóstico mais adverso no sarcoma de Ewing. O SE se espalha predominantemente por via sanguínea. Os locais metastáticos mais comuns são os pulmões, os ossos ou a medula óssea, enquanto outros locais são raros. Se por um lado o prognóstico para doença localizada melhorou,

o mesmo não pode ser dito para pacientes com doença metastática. Estes, que correspondem a 25 % dos casos iniciais de SE, tem índices de sobrevida significativamente piores em comparação aos que apresentam doença localizada (Subbiah et al., 2009). A localização das metástases está relacionada ao prognóstico dos pacientes. Assim, pacientes com implantes pulmonares apresentam uma sobrevida de 40 % em cinco anos, enquanto aqueles que apresentam envolvimento de ossos e medula óssea apresentam uma sobrevida de 10 % (Leavey et al., 2008).

No entanto, seus mecanismos subjacentes permanecem mal compreendidos, embora as vias que se correlacionam com a metástase foram identificadas através da comparação de linhagens celulares de tumor primário e metastático. Vários estudos apontam para os principais fatores metastáticos nesta doença, muitos dos quais parecem influenciar as vias adaptativas ao estresse. Por exemplo, ERBB4 é mais altamente expresso em linhagens metastáticas de SE e contribui para a ativação das vias fosfatidilinositol3-quinase (PI3K) – AKT e vias FAK87; ERBB4 também aumenta a capacidade invasiva do tumor (Mendoza-Naranjo et al., 2013).

Fatores de transcrição ou proteínas adicionais reguladas por EWS–FLI1 (como CAV1, EZH2, GPR64 (também conhecido como ADGRG2, NPY85, TRIP6 e CD99 (Lagares-Tena et al., 2016; Richter et al., 2009; Richter et al., 2013; Grünewald et al., 2013) também influenciam a migração, invasão e/ou colonização metastática em SE. Da mesma forma, aumentos nas espécies reativas de oxigênio e um fenótipo de estresse oxidativo foi associado a expressão da metaloredutase STEAP1 (um alvo de EWS–FLI1), aumentando a invasividade do sarcoma de Ewing (Grünewald et al., 2012).

Neste modelo, células com alta expressão de EWS–FLI1 (EWS–FLI1 [alto]) representam a maior população de sarcoma de Ewing e explicam seu fenômeno de proliferação. Essas células também apresentam alta propensão a adesão célula-célula. No entanto, células EWS–FLI1 [baixo] podem adquirir um fenótipo semelhante ao mesenquimal e metastizar (Chaturvedi et al., 2014; Franzetti et al., 2017; Pedersen et al., 2016). Na verdade, a troca de células EWS–FLI1 [baixa] em direção a um fenótipo de adesão célula-matriz, correlaciona-se com maior migração, invasão e metástase. Ativação de WNT/ β -catenina também promove a transição para um perfil celular metastático, com EWS–FLI1 [baixo].

Reunidos, esses dados demonstram o quanto o processo de metástase é desafiador no SE, dificultando a obtenção de índices melhores de cura e a importância de que novos estudos apontem caminhos que consigam diminuir a chance de surgimento de metástase neste tumor.

1.1.7 Tratamento - quimioterapia de indução

Pacientes com diagnóstico recente de sarcoma de Ewing são tratados com uma combinação de quimioterapia citotóxica multiagente e com medidas de controle local (cirurgia e/ou radioterapia). Quimioterapia de indução é administrada antes do tratamento local para reduzir o tamanho do tumor primário e diminuir a doença metastática porque a doença micrometastática é esperada em todos os pacientes. O ensaio EE99 (EuroEwing de 1999) usou um regime intensivo de quimioterapia de indução de múltiplas drogas contendo vincristina,

ifosfamida, doxorrubicina e etoposide (VIDE); este regime intenso foi tolerado pelos pacientes em intervalos de 21-28 dias (Juergens et al., 2006).

Pacientes localizados de alto risco (doença localizada, resposta histológica pobre e grandes tumores) nos Ensaios EE99 e EWING 2008 se beneficiaram mais após quimioterapia com bussulfano e melfalano em altas doses seguido por transplante hematopoiético autólogo de células-tronco (sobrevida livre de eventos em 3 anos de 67 %) do que de uma dose padrão de oito ciclos de vincristina, actinomicina D e quimioterapia de consolidação com ifosfamida (sobrevida livre de eventos em 3 anos de 53 %) (Whelan et al., 2016).

O Grupo de Oncologia Infantil dos EUA (COG) avaliou o valor da intensidade da dose comparando 3 semanas (denominado regime não comprimido) versus regimes de 2 semanas (comprimido) de vincristina, doxorrubicina e ciclofosfamida alternando com ifosfamida e etoposídeo. Sobrevida livre de eventos (EFS) de 5 anos foi significativamente melhor em pacientes que receberam o regime comprimido (73 % contra 65 %). Ensaios internacionais também avaliaram o valor de um tratamento complementar com ácido zoledrônico, um inibidor de osteólise e proliferação tumoral e invasão celular, em pacientes diagnosticados com doença localizada (Womer et al., 2012; Odri et al., 2010).

Devido a esses estudos clínicos, a terapia de primeira linha, atualmente consiste em terapia neoadjuvante, usualmente combinando entre 4 a 6 quimioterápicos entre vincristina (V), doxorrubicina (D), etoposídeo (E), ciclofosfamida (C), isofosfamida (I) e actinomicina-D (A). A combinação mais utilizada na Europa é VIDE/VAI, enquanto nos Estados Unidos é VDC/IE (Esmo,

2014). Esse tipo de tratamento, entretanto, não ataca especificamente os mecanismos patogênicos das células de SE; levando, conseqüentemente, a um aumento de resistência tumoral à quimioterapia convencional (Amaral et al., 2014).

1.1.8 Tratamento - doença metastática

Pacientes com sarcoma de Ewing metastático são tratados seguindo os regimes utilizados em pacientes com doença localizada ou em ensaios clínicos randomizados que buscam melhorar os resultados para este grupo de pacientes, já que o regime atual não é eficaz para pacientes com doença metastática que, até hoje, apresentam uma taxa de sobrevida extremamente baixa (Grier et al., 2003).

Para subverter esse baixo índice de cura em doença metastática, vários protocolos foram explorados, como intensificação de doses e transplante de medula óssea que, entretanto, apenas submeteram os pacientes à toxicidade e complicações decorrentes do tratamento, apresentando muito pouco benefício clínico (Kushiner & Meyers, 2001). O COG está investigando a adição de anticorpos monoclonais contra o receptor IGFI (IGF1R) à quimioterapia padrão (NCT02306161). Um estudo internacional também investigou o valor de adicionar quimioterapia de alta dose usando treosulfan e melfalano para VIDE e um regime de vincristina, dactinomicina e quimioterapia com ciclofosfamida. Além disso, um grupo brasileiro mostrou que a adição de compostos de platina para um regime de vincristina, doxorubicina e ciclofosfamida alternando com

ifosfamida e etoposídeo não tem valor em pacientes com SE de alto risco (Brunetto et al., 2015).

Para tentar melhorar os resultados em doença metastática, outros protocolos foram explorados, como intensificação de doses e transplante de medula óssea que, infelizmente, apresentaram pouquíssimo benefício clínico e apenas submeteram os pacientes à toxicidade e complicações decorrentes do tratamento (Kushner & Meyers, 2001).

1.1.9 Sarcoma de Ewing recidivante

A recidiva do sarcoma de Ewing atinge de 30 a 40 % dos pacientes e está associada a piores resultados; pacientes com recidiva dentro de 24 meses após o diagnóstico tem uma sobrevida em 5 anos de < 10% (Stahl et al., 2011). Fatores prognósticos favoráveis na recaída são: recaída local, idade mais jovem, recorrência pulmonar isolada e baixo nível de LDH. Além disso, um acompanhamento estruturado em que os pacientes são submetidos a exames de imagem de rotina permitem uma sobrevida global mais longa em pacientes recorrentes. Poucos ensaios clínicos sobre sarcoma de Ewing recidivante foram concluídos. A grande maioria das diferentes abordagens terapêuticas em recaídas de SE são obtidas a partir de análises retrospectivas (Stahl et al., 2011; Rasper et al., 2014; Heinemann et al., 2018).

O primeiro grande ensaio clínico (2015) iniciado pelo investigador no sarcoma de Ewing recidivante foi iniciado em um consórcio na Europa e compara regimes de quimioterapia padrão em termos de sobrevivência, segurança e

qualidade de vida. Em pacientes sem sintomas neurológicos graves, tratamento sistêmico mais esteróides pode ser usado para reduzir a carga tumoral.

1.2 RESISTÊNCIA

O aumento nas taxas de cura dos pacientes com sarcoma de Ewing tem sido objeto de interesse e esforço tanto por parte de equipes de tratamento multidisciplinar quanto de pesquisadores, sejam em estágio de pesquisa básica, pré-clínica ou clínica, em desvendar o motivo de não conseguir aumentar as taxas de sobrevida. Além dos desafios enfrentados na terapêutica dos pacientes com sarcoma de Ewing, como, por exemplo, recidiva da doença e metástases, a resistência ao tratamento certamente ocupa papel importante neste contexto. Há uma alta porcentagem de tumores que não respondem, seja à quimioterapia citotóxica, seja ao uso de terapia alvo. Além das características de pacientes nos diferentes centros, relacionados a diagnóstico e epidemiologia, há diversos mecanismos pelos quais o SE torna-se imune à quimioterapia, como a biologia do tumor, o envolvimento de células tronco tumorais (CTT), bombas de efluxo de fármacos, ativação de vias de proliferação celular, mecanismos epigenéticos, envolvimento do microambiente tumoral e ganho de novas mutações as quais permitem o tumor escapar da citotoxicidade farmacológica (Ahmed et al., 2014). Assim, a principal dificuldade enfrentada para melhorar os índices de cura é a resistência tumoral à terapia atual.

A heterogeneidade tumoral em SE é outro fator responsável pela resistência, a qual pode ser demonstrada tanto a nível histopatológico, imunofenotípico e molecular (Ahmed et al., 2014). Inibidores tumorais, sozinhos

ou combinados, são efetivos apenas para uma parte da população tumoral, sendo que as células não afetadas continuam proliferando (Fisher et al., 2013). Essa hipótese pode ser vista quando temos como alvo IGF-1R e mTOR, o que resulta em resposta completa em camundongos xenotranplantados, diferentemente do que ocorreu na prática clínica, possivelmente pela maior heterogeneidade tumoral desse tumor em humanos (Naing et al., 2012).

A identificação das principais vias moleculares ou subpopulações de células tumorais envolvidas nos processos de metástase e resistência terapêutica são fundamentais para desenvolver novas abordagens terapêuticas para pacientes com recorrência ou SE metastático. A pesquisa atual e os esforços terapêuticos têm focado em identificar e direcionar caminhos específicos, genes e proteínas que teriam um papel crucial no desenvolvimento de resistência terapêutica. É necessário que as futuras modalidades terapêuticas tenham como alvo não apenas as células tumorais localizadas, mas também, células tumorais residuais, seja na forma de células tumorais circulantes ou células-tronco tumorais. Nos últimos anos, um corpo crescente de evidências sugere que a persistência de células tronco tumorais (CTTs) podem ser parcialmente responsáveis pela radiorresistência, quimiorresistência e invasão e recorrência geral do tumor em muitos cânceres, incluindo sarcomas. São inúmeros os processos moleculares e celulares que estão envolvidos na resistência tumoral, e muitos são os esforços para compreender os mecanismos desses processos, bem como a proposição de alternativas para desbancar esses mecanismos (Suvà et al., 2009). CTT são mais resistentes à quimioterapia convencional, pois possuem mecanismos diferenciados que permitem sua sobrevivência.

1.3 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Dois modelos mutuamente não exclusivos foram propostos para explicar o desenvolvimento do tumor e a heterogeneidade intratumoral: o modelo estocástico e o modelo de células tronco cancerígenas. O modelo estocástico postula que é igualmente provável que cada célula dentro de um tumor seja a célula de origem. De acordo com este modelo, o câncer é gerado a partir de células que acumulam mutações genéticas. O modelo de células tronco tumorais postula que os cânceres surgem e são sustentados por uma subpopulação única de células que possuem propriedades semelhantes, as chamadas células iniciadoras de tumor ou Células Tronco Tumorais (CTTs).

As CTTs têm a capacidade de autorrenovação e diferenciação irrestrita, dando origem a células progenitoras e células com proliferação ilimitada e potencial tumorigênicas. O modelo de células tronco de câncer para tumores sólidos foi introduzido pela primeira vez no câncer de mama em 2003 pelo grupo de Clarke que identificou uma rara subpopulação com um fenótipo de população enriquecida com CTTs (Al-Hajj et al., 2003). Com base em estudos em outros tumores sólidos como cérebro, ovário e cólon, verificou-se constantemente que CTTs existem em baixas frequências dentro de um tumor e são capazes de recapitular a heterogeneidade dos tumores originais quando injetados em camundongos imunodeficientes (Singh et al., 2004; Curley et al., 2009; O'Brien et al., 2007). A relevância clínica das CTTs é ilustrada por descobertas que mostram que a assinatura de um gene semelhante a células tronco é preditiva

para o resultado do paciente em leucemia humana, câncer de mama e glioblastoma (Eppert et al., 2011; Liu et al., 2013).

Evidências crescentes indicam que o modelo estocástico e o modelo de células-tronco cancerosas não são mutuamente exclusivos e podem ser unificados pela plasticidade das células cancerígenas (Tang, 2012; Pece et al., 2010). Existe a hipótese de que o câncer pode originar-se da ativação oncogênica de uma CTT, o que pode dar origem a outras CTTs que acumulam modificações genéticas e epigenéticas necessárias para iniciação e progressão do tumor. Cada subclone tronco-tumoral, derivado da CTT inicial, tem a capacidade de auto-renovação e diferenciação para trânsito intermediário de progenitores e células mais diferenciadas. Um subconjunto desses progenitores seria capaz de uma conversão de bidirecionalidade entre estados não-tronco e tronco em resposta a estímulos do microambiente incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Plaks, 2015).

Vários estudos apontaram as propriedades que conferem resistência às células tronco tumorais em SE. A presença e atividade de múltiplos transportadores torna as CTTs uma população de células tumorais constitutivamente resistentes à terapia (Okugawa et al., 2013). Outros mecanismos de resistência das CTTs ao tratamento incluem um aumento na eficiência do ciclo celular, mediadores da transição epitélio-mesênquima, mecanismos anti-apoptóticos, maquinaria do reparo de DNA e conversa cruzada com células não tumorais dentro do microambiente tumoral que favorece a sobrevivência e expansão das células CTTs. Moduladores metabólicos também podem atingir células-tronco no sarcoma de Ewing, como o inibidor da glicólise 2-desoxi-D-glicose (2DG) e o inibidor da via respiratória mitocondrial metformina,

reduzindo a formação de tumoresferas e expressão de genes de células tronco OCT-4, Nanog, Sox-2, ALDH1A e c-Myc. O tratamento com 2DG também potencializa o efeito tanto da doxorubicina quanto do inibidor da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) talazoparib (BMN-673), em células ES resistentes a esses agentes (Tabassum et al., 2003). Além disso, diversas vias de proliferação celular identificadas em SE colaboram para a manutenção da carcinogênese, como MAPK/Erk e PI3K/mTOR/Akt (Hughes, 2009; Chandhanayinyong et al., 2012), as quais estão constantemente ativadas em células de SE, inclusive nas resistentes à terapia. É comumente observado que a proporção de células com um fenótipo tronco aumenta em tumores após rádio e quimioterapia, possivelmente a partir da plasticidade celular que, a partir do tratamento, induz células que não são tronco-tumorais a um estado “tipo-tronco”. As células tumorais também assumem um perfil tronco tumoral decorrente de mecanismos epigenéticos, que regulam o estado da cromatina e a metilação do DNA, modulando a plasticidade fenotípica a esse perfil (Chopin et al., 2016).

Células tronco tumorais em SE podem, assim como em outros tipos de tumor, apresentar resistência aumentada tanto a quimioterapia citotóxica quanto a terapias alvo, sendo, portanto, fundamentais para determinar a falha do tratamento. Em contraponto, evidências sugerem que as CTTs podem ser direcionadas para diminuir a resistência ao tratamento e restaurar a sensibilidade aos quimioterápicos em SE. De fato, vários estudos revelaram estratégias experimentais para reduzir a quimiorresistência em CTTs de SE.

A procura por elucidar os diferentes tipos de mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células é realmente desafiadora. Esse é um dos maiores problemas enfrentados pela prática clínica, principalmente devido à alta taxa de

recidiva tumoral. Os pacientes são tratados, retornando ao hospital, em alguns meses, com um tumor mais agressivo e resistente aos tratamentos. A predição de marcadores, um melhor entendimento de vias, receptores e outras moléculas envolvidas nesse processo, certamente são caminhos que, em pouco tempo, poderão gerar resultados importantíssimos, dentro de uma perspectiva de medicina personalizada, para ter resultados melhores tanto na terapêutica quanto no desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias inovadoras para pacientes com SE, destacando a importância de investigar a resistência nesta doença. Deve-se destacar, ainda, que existem outras moléculas e vias envolvidas no processo de resistência que necessitam de um maior entendimento. Entre esses outros mecanismos relacionados à resistência tumoral em SE já descritos, destaca-se a ação de neurotrofinas (NTs) e seus receptores (Trks) (Heinen et al., 2016).

1.4 NEUROTROFINAS

Os fatores neurotróficos, ou neurotrofinas (NTs) são proteínas que fazem parte de uma família de fatores de crescimento intimamente relacionados, que foram originalmente descritos no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico (Reichardt, 2006; Skaper et al., 2012). Embora extensivamente estudadas por seu papel em estimular a sobrevivência e a diferenciação dos neurônios, as neurotrofinas também exercem uma série de efeitos no controle da proliferação e migração celular em células não neuronais, inclusive no câncer (Skaper et al., 2012; Bradshaw et al., 2015).

Existem quatro NTs humanas conhecidas: o fator de crescimento neural (NGF – *nerve grow factor* do inglês), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *brain derived neurotrophic factor* do inglês), e os dois membros adicionais que foram descobertos mais tarde, a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Os transcritos de mRNA de neurotrofinas são primeiro traduzidos em proteínas precursoras conhecidas como as pró-neurotrofinas, as quais são então clivadas intracelularmente, por convertases de furina ou pró-hormônios, ou extracelularmente por proteases, como plasmina ou metaloproteinases de matriz (MMP-3 e MMP-7), gerando, assim, as neurotrofinas (Hempstead, 2014).

1.4.1 Neurotrofinas e seus receptores

Os efeitos biológicos das neurotrofinas são mediados por duas categorias de receptores de membrana celular: a família Trk de receptores de tirosina quinases (também chamados de NTRKs, receptores neurotróficos de tirosina quinase) e o receptor comum de neurotrofina p75NTR. Os receptores Trk incluem TrkA, TrkB e TrkC, cada um dos quais apresenta diferentes especificidades para neurotrofinas. O NGF liga-se preferencialmente ao TrkA, enquanto o BDNF e o NT-4/5 ligam-se ao TrkB. NT-3 liga principalmente TrkC, mas também TrkA e TrkB em menor grau (Klein et al., 1991; Squinto et al., 1991; Lamballe et al., 1991).

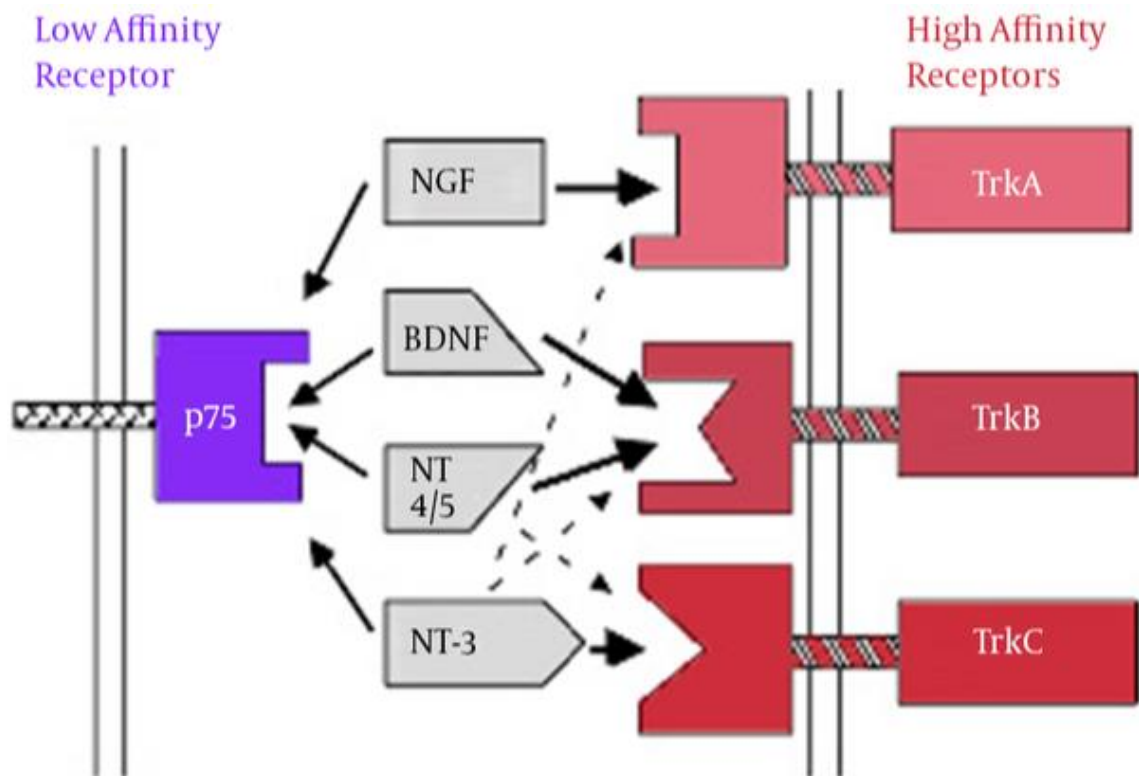


Figura 3: Neurotrofinas e seus receptores. (Ghanbarzadeh et al., 2016)

Em contrapartida, todas as pró-neurotrofinas e as neurotrofinas maduras ligam-se ao p75NTR com afinidade semelhante. Além disso, a proteína de membrana sortilina (Nykjaer et al., 2012), facilita a ligação de todas as pró-neurotrofinas aos receptores p75NTR e Trk (Skaper et al., 2012; Bradshaw et al., 2015). As NTs são moléculas altamente expressas em células de origem neural, exercendo inúmeras funções celulares. Uma vez que o estudo da ativação de Trks pelas NTs mostrou a estimulação da neuritogênese, sobrevivência e migração em neurônios normais (Yang et al., 2014), pesquisadores perceberam que esses mesmos mecanismos poderiam ser utilizados por tumores, a fim de sobreviverem a insultos citotóxicos, proliferarem e gerarem metástases (Okugawa et al., 2013). NTs e seus receptores surgem

como alvo interessante em SE, uma vez que se postula que as células deste tumor tenham origem neuronal (Demont et al., 2012; Lagadec et al., 2009).

1.4.2 Sinalização das neurotrofinas

Em termos de sinalização do receptor, os receptores Trk ativam e autofosforilam resíduos de tirosina em suas caudas intracelulares, desencadeando várias vias de sinalização a jusante que envolvem mediadores citoplasmáticos e enzimas, como quinases reguladas extracelularmente (ERK), fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) e fosfolipase C (PLC) (Khotskaya et al., 2017). Ativação das vias intracelulares de receptores Trk leva predominantemente à sobrevivência celular, proliferação e/ou diferenciação. A sinalização via p75NTR pode ter diversos efeitos celulares dependendo das proteínas ligadas ao receptor. Por exemplo, a ligação da neurotrofina ao p75NTR ativa a cascata de sinalização da quinase N-terminal c-Jun (JNK), que resulta na ativação de p53 e expressão de genes pró-apoptóticos como Bcl-2. Alternativamente, a ativação de p75NTR em conjunto com o membro do receptor do fator de necrose tumoral TRAF6 demonstrou promover a ativação a jusante da sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B), que principalmente promove a sobrevivência celular (Griffin et al., 2018). A complexidade da sinalização iniciada pelo receptor de neurotrofina está diretamente relacionada com a alta diversidade de funções controladas por pró-neurotrofinas/neurotrofinas dentro e fora do sistema nervoso, bem como em situações patológicas como a tumorigênese. A sinalização aberrante de TrkB/BDNF é reconhecida como um condutor e alvo potencial em tumores do trato gastrointestinal. Experimentos funcionais

demonstraram que o tratamento com BDNF promove a proliferação, invasão e migração de células tumorais em ambas as linhagens celulares de câncer gástrico e intestinal, bem como a disseminação de células tumorais em modelos de camundongos (Okugawa, et al., 2014).

A ligação de Trks por suas neurotrofinas preferidas ativa seu domínio quinase para desencadear vias de sinalização a jusante incluindo MAPK, PI3K e PLC-PKC. Além disso, os Trks podem ser ativados por vários receptores, incluindo receptores de esteróides, receptores acoplados à proteína G (GPCR) e CD44 (Tomellini et al., 2015). Por outro lado, P75NTR liga-se a neurotrofinas e pró-neurotrofinas com afinidade semelhante. Embora o P75NTR tenha a capacidade de sinalizar sozinho, muitas de suas funções dependem de sua interação com Trks e outros co-receptores. Por exemplo, a formação de um complexo P75NTR/Trk aumenta a afinidade de cada neurotrofina para o seu receptor Trk, provavelmente pela indução de mudanças conformacionais em sua estrutura intracelular e domínios extracelulares. Pró-BDNF inibe a apoptose de células de glioma e aumenta o crescimento celular através de receptores Trk, enquanto que a sinalização induzida pelo BDNF em contraste produz efeitos inibitórios no tumor, sugerindo que o equilíbrio entre pró-BDNF e BDNF maduro possa regular o crescimento das células. Em termos de direcionamento da sinalização neurotrófica em células cancerígenas, estudos mostraram que direcionar a sinalização de NGF via anticorpos bloqueadores anti-NGF ou anti-TrkA (Adriaenssens et al., 2008) causa inibição do crescimento tumoral, diminuição da metástase e aumento da apoptose em células cancerosas em xenoinxertos de camundongos com câncer de mama. Dados os diversos (co-)receptores descritos acima, o resultado geral da sinalização de neurotrofinas é

a consequência da integração de sinalização de receptores distintos. Isso leva a respostas celulares incluindo sobrevivência celular, apoptose, proliferação, diferenciação, migração e invasão, dependendo do tipo de célula e contexto celular.

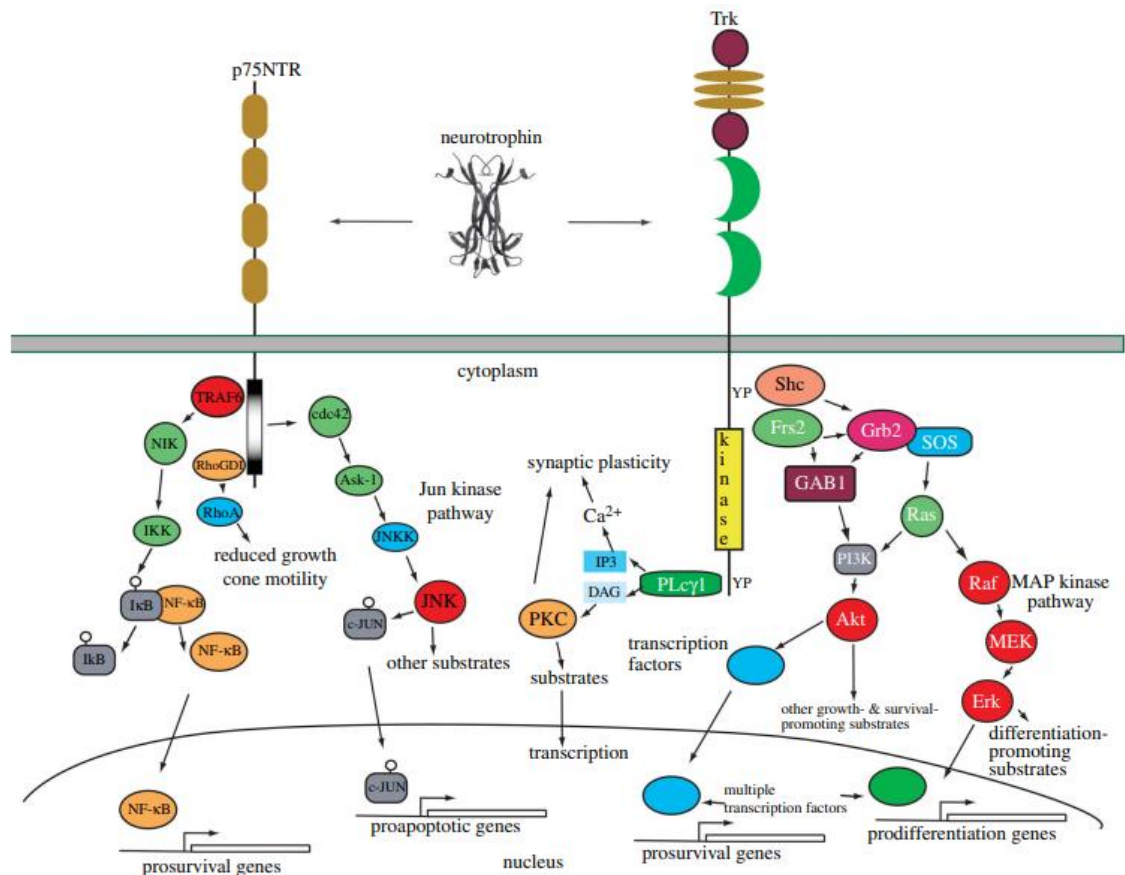


Figura 4: Via de sinalização de Neurotrofinas (Reichardt et al., 2006)

1.4.3 Eixo NGF/TrkA

A superexpressão de NGF e/ou TrkA foi correlacionada com invasão perineural em vários tipos de câncer, incluindo câncer pancreático, carcinoma de células escamosas e carcinoma adenoide cístico (Griffin et al., 2018). A forma ativa de TrkA (fosfo-TrkA) tem sido associada a pior evolução do paciente em

carcinomas de ovário e mama (Xiong et al., 2013), sugerindo o envolvimento do eixo NGF/TrkA na progressão tumoral. NGF exibe efeitos pró-tumorais em vários tipos de tumores incluindo câncer de pâncreas, ovário e mama (Xiong et al., 2013; Adriaenssens et al., 2008). NGF é superexpresso na maioria dos tipos de câncer de mama, e a inibição de NGF/TrkA reduz o crescimento tumoral em modelo de camundongo xenoenxerto, e a superexpressão de TrkA aumenta a resistência, invasão e metástase (Pundavela et al., 2014; Faulkner et al., 2016). Além de seu envolvimento na promoção da proliferação de células de câncer de mama, sobrevivência, migração e invasão, o NGF promove também angiogênese induzindo a expressão de fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformador beta (TGFb) (Yu et al., 2017; Brierley et al., 2013).

Em contraste com a maioria dos tumores sólidos, no neuroblastoma, NGF/TrkA pode exercer efeitos anti- ou pró-tumorais, dependendo da expressão das isoformas de TrkA: TrkAI ou TrkAIII. A superexpressão de TrkAI (deleção no éxon 9) foi correlacionada com melhor prognóstico no neuroblastoma (Sarabi et al., 2017; Vaishnavi et al., 2013). NGF inibe o crescimento celular e induz a diferenciação em linhagens de células de neuroblastoma que expressam altos níveis de TrkAI. Em contraste, TrkAIII (deleções nos éxons 6, 7 e 9) foi associado a pior prognóstico em neuroblastoma (Magnon et al., 2013; Zhao et al., 2014). TrkAIII atua também na sinalização constitutiva de PI3K/Akt/NF- κ B, além da interação com o centróssomo, promovendo amplificação de centróssomo e instabilidade genética (Saloman et al., 2016).

1.4.4 Eixo BDNF/TrkB

O eixo BDNF/TrkB está frequentemente associado a metástases e mau prognóstico em diferentes cânceres incluindo neuroblastoma e tumores de células não neuronais como cabeça e pescoço, pulmão, mama, estômago e cólon (Griffin et al., 2018). Por exemplo, níveis elevados de TrkB e BDNF são preditores de um prognóstico ruim no neuroblastoma e Tumor de Wilms (Hayakawa et al., 2017). Metástases hepáticas se desenvolvem mais rapidamente em tumores pancreáticos TrkB-positivos do que tumores TrkB-negativos (Demir et al., 2015). Aumento da expressão de BDNF em tumores primários está significativamente correlacionado com mau prognóstico em câncer. A co-expressão de BDNF e mRNA de TrkB está associada a metástases hepáticas e peritoneais em câncer colorretal. Bloqueio da sinalização BDNF/TrkB em diferentes linhagens de células cancerosas diminuiu significativamente a proliferação, migração e metástase in vitro e in vivo (Griffin et al., 2018). Além da ação direta sobre células tumorais, o BDNF também exibe uma forte propriedade angiogênica. O BDNF aumenta a expressão de HIF-1 α que por sua vez regula positivamente o VEGF e expressão de TrkB (Liebl et al., 2013; Schmidt, 2014).

1.4.5 Neurotrofinas/P75NTR

P75NTR, o receptor comum de neurotrofinas e pró-neurotrofinas, tem sido sugerido por atuar como um supressor tumoral em câncer gástrico, de bexiga e de próstata bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo apoptose. Na maioria dos outros tumores, incluindo melanoma, glioma, câncer de mama e

carcinoma de células escamosas, é proposto que P75NTR favorece o desenvolvimento do tumor (Faulkner et al., 2016; Griffin et al., 2018). Por exemplo, a sinalização NGF/P75NTR é conhecida por estar implicada na proliferação e migração de células de melanoma e foi associada ao aumento de metástases cerebrais. A expressão de P75NTR é observada em glioma de alto grau e está associada a mau prognóstico e risco de recorrência local de câncer bucal (Josephy-Hernandez et al., 2017; Lei et al., 2017). P75NTR está correlacionado com invasão perineural de câncer de pele. Mais recentemente, P75NTR foi relatado como um marcador de CTTs em melanoma, carcinomas de esôfago e hipofaringe (Xu et al., 2017).

1.4.6 Evidência do papel das neurotrofinas nas CTTs

As neurotrofinas têm sido relatadas para regular células tronco tumorais em vários tipos de câncer como glioma, neuroblastoma, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, melanoma e câncer de mama. As neurotrofinas podem induzir o enriquecimento de CTTs por meio de dois mecanismos principais: ação direta sobre CTTs ou ação indireta via transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês) (Chopin et al., 2016).

Forsyth et al. 2014 relataram que as neurotrofinas e seus receptores são detectadas em várias linhagens de células iniciadoras de tumor cerebral (CITCs). Além disso, NGF, BDNF e NT3 são capazes de estimular a proliferação de CITCs. Os autores mostraram ainda que o NGF estimula a proliferação destas através da clivagem de P75NTR. A plasticidade da célula cancerosa designa a capacidade de células cancerosas se interconverterem entre um estado de

células diferenciadas e indiferenciadas, através de um *continuum* de especificações de destino celular. Neste fenótipo, o deslocamento é modulado por sinais microambientais e interações que surgem no nicho tumoral. No microambiente, as NTs são encontradas para regular a plasticidade das células cancerígenas atuando em diferentes tipos de células. Particularmente, as neurotrofinas podem aumentar o *pool* de CTT: (1) estimulando a auto-renovação dessas células; (2) induzindo células epiteliais diferenciadas à transição epitélio-mesênquima (EMT) e a conversão de células cancerosas para CTTs. O NGF induz a expressão mediada por P75NTR dos fatores de transcrição de pluripotência SOX2, NANOG e MYC. O pró-NGF também aumenta a expressão de SOX2 em uma proteína independente de p75NTR. No carcinoma de pulmão, BDNF e TrkB aumentam a expressão de fatores de transcrição EMT mestres SLUG, TWIST e SNAIL. Nas células de câncer de mama, NGF aumenta a expressão dependente de p75NTR. Assim, através dos fatores de transcrição comuns, as neurotrofinas ativam redes de sinalização, permitindo a reprogramação de células de câncer epitelial diferenciadas para CTTs.

1.4.7 Sinalização de neurotrofinas em células tronco tumorais

O receptor P75NTR é capaz de induzir a ativação de AKT em células iniciadoras de tumor cerebral. A via Akt é necessária para o crescimento de CTTs no encéfalo (Gallia et al., 2009; Eyler et al., 2008). Assim, a ativação de Akt induzida por P75NTR pode ser o principal mecanismo de estimulação de neurotrofinas para a proliferação de CTTs. Usando outro conjunto de CTTs derivados de pacientes, Lawn et al., 2015 relataram que BDNF, NT3, TrkB, TrkC

e P75NTR são frequentemente expressos. Nessas células, BDNF e NT3 promovem crescimento através da ativação de receptores TrkB e TrkC e a ativação a jusante das vias ERK e Akt. Juntos, parece que neurotrofinas e seus receptores são amplamente expressos em CITCs para promover a proliferação, invasão e sobrevivência através de diferentes vias, incluindo ativação ERK e Akt bem como clivagem P75NTR.

Na linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y, a variante TrkAIII não responsiva a NGF promove a formação de esferas maiores e a expressão de marcadores incluindo Nanog, Nestin, SOX2 e CD117 através de sua atividade de tirosina (Ruggeri et al., 2014). A perda de P75NTR inibe a proliferação celular e a formação de tumores. Além disso, direcionamento de P75NTR com um anticorpo monoclonal reduz a ativação de Erk induzida por NGF, e ainda, o silenciamento de RNA P75NTR aboliu a capacidade de formação de esferas aprimorada com pró-NGF, indicando que a formação de esfera induzida por NGF/pró-NGF é mediada por P75NTR.

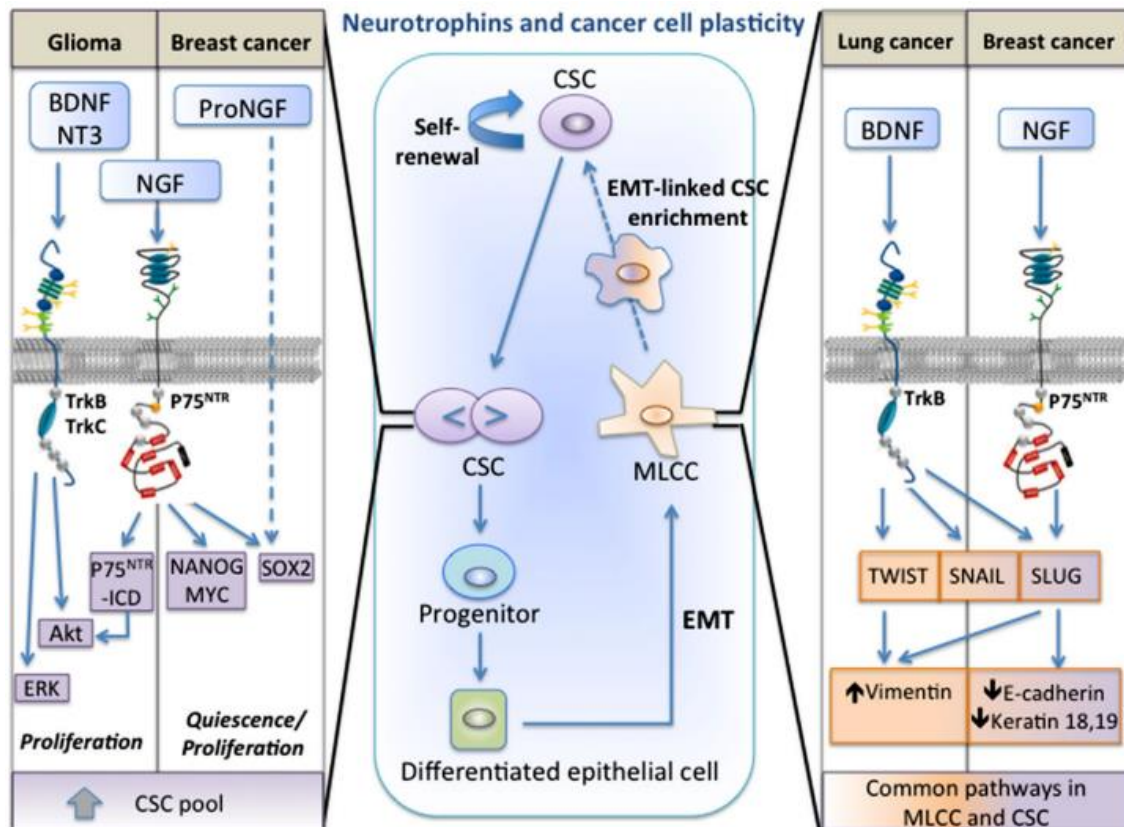


Figura 5: Sinalização de NTs em células tronco tumorais (Chopin et al., 2015).

1.4.8 Neurotrofinas e Células Tronco Tumorais: oportunidades

Já foram identificadas células tronco tumorais (CTT) em SE, as quais estão relacionadas à resistência (Suvà et al., 2009). Mesmo os pacientes de alto risco apresentam uma boa resposta inicial ao tratamento antes de recidivarem. Uma explicação seria a presença de células tronco resistentes à quimioterapia, uma vez que são capazes de gerar uma população de células tumorais diferenciadas a partir de um único clone (Bao et al., 2013). Esse fato torna-se extremamente importante no que diz respeito à terapia alvo para SE, uma vez que, cada vez mais, sabe-se que as CTT são responsáveis pela resistência ao tratamento em diversos tipos de tumores. CTT possuem mecanismos

diferenciados que permitem sua sobrevivência, como aumento da expressão da maquinaria de reparo do DNA, capacidade de permanecer em quiescência para resistir a drogas que afetam o ciclo celular, interrupção dos mecanismos que levam à apoptose, expressão de genes de resistência (Saini et al., 2010; Lathia et al., 2019). Um fármaco atuando diretamente na biologia tumoral, sendo capaz de não apenas antagonizar receptores importantes em células maduras, mas também atuar contra CTT, é necessário para se sobrepor aos mecanismos de resistência em SE.

A provável origem neuroectodérmica do SE abre um leque de possibilidades de novos alvos terapêuticos. Dentre eles, destacam-se as neurotrofinas, as quais possuem papel central na manutenção de populações neuronais, além de estarem implicadas na proliferação, angiogênese, metástase de um variado número de tumores (Brunetto de Farias et al., 2010; Lawn et al., 2015; De Farias et al., 2012). NTs e seus receptores surgem como alvo interessante em SE, uma vez que se postula que as células deste tumor tenham origem neuronal (Staege et al., 2004). Em vistas desse conhecimento, um relevante trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa demonstrou que NGF e BDNF, assim como seus receptores, TrkA e TrkB, respectivamente, são expressos em SE. A inibição desses receptores por K252a (um pan-inibidor de Trks), particularmente quando combinado a baixas doses de quimioterápicos, diminuiu a proliferação celular. Tal estudo, pela primeira vez, propôs que a inibição da via Trk surge como potencial terapêutico para SE (Heinen et al., 2016).

Assim, o papel da inibição de neurotrofinas em SE já foi demonstrado, porém seu mecanismo ainda permanece pouco compreendido. Um maior

entendimento sobre esses mecanismos, atuação em nível de célula tronco tumoral e atividades sobre vias de sinalização faz-se necessário, para aumentar a possibilidade de propor uma alternativa de tratamento, subvertendo os processos de resistência e minimizando a toxicidade das terapias convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar características celulares e moleculares, participação de neurotrofinas e de células-tronco em linhagens celulares de sarcoma de Ewing antes e após o tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas K252a.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar funcionalmente linhagens celulares e culturas enriquecidas de células tronco-tumorais (tumoresferas) em termos de capacidade de viabilidade, sobrevivência, proliferação e migração após o tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas, K252a;
- ✓ Avaliação de marcadores moleculares para correlacionar com participação no processo de metástase;
- ✓ Avaliar a expressão de possíveis alvos moleculares de vias de sinalização tais como JAK-STAT, P21, MAPK-ERK em linhagens celulares de sarcoma de Ewing, antes e após o tratamento.
- ✓ Mapeamento da expressão de marcadores (fusão gênica, marcadores mesenquimais, marcadores de células-tronco), antes e após o tratamento com K252a;

- ✓ Avaliação de marcadores moleculares de células tronco tumorais para correlacionar com processo de resistência;
- ✓ Verificar expressão de receptores de neurotrofinas em culturas enriquecidas de células tronco tumorais (tumoresferas), antes e após o tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas, K252a;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Foram utilizadas células humanas de SE da linhagem SK-ES-1 obtida do American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco-BTL, Carlsbad, CA, USA), contendo 0.1% de fungizone® (250 mg/kg; Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), 4 mg/ml gentamicina e soro fetal bovino a 10% (Gibco® by Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). As células foram cultivadas em incubadora umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Células em crescimento exponencial foram destacadas das placas com tripsina sem EDTA para transferência a frascos de cultura. As mesmas células foram expostas aos tratamentos de acordo com sua designação experimental (Dos Santos et al., 2014; Heinen et al., 2016).

3.2 Migração (*scratch*)

As células SK-ES-1 foram sedimentadas em placas de 24 poços, com densidade de 4×10^4 células por poço com meio de cultivo RPMI-1640 contendo suplementos e soro fetal bovino a 10%. As células foram cultivadas em incubadora umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, com as células aderidas realizou-se a ferida (*scratch*). Logo após, o meio de cultura foi trocado e o tratamento adicionado. As células foram expostas a K252a na dosagem de 100 nM e de 500 nM por 48 horas. Controles foram expostos a somente meio de cultura sem nenhum tipo de tratamento também por 48 horas. No momento do

scratch, foi feita captura de imagem, sendo este considerado o t=0. Após 24h e 48h também foi realizada captura de imagem nos mesmos locais do t=0 para verificar a migração das células (Cidre-Aranaz & Grünwald, 2021; Ashby et al., 2012; Kam et al., 2008).

3.3 Formação de esferas tumorais

Células foram dissociadas com tripsina-EDTA e plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^3 células/poço. As células foram cultivadas em meio de cultura indutor de esferas tumorais, DMEN-F12 (1:1), suplementadas com B27 (Gibco, Invitrogen, CA, USA), 20 ng/mL de EGF humano recombinante (Sigma-Aldrich, MO, USA), 20 ng/mL de fator humano inibidor de leucemia (Life Technologies, MO, USA), 10 UI/mL (5mg/mL) de heparina (Roche, Mannheim, Alemanha), e antibióticos de acordo como descrito por Leuchte e colegas. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias. Após 8 dias, as esferas tumorais foram dissociadas. A partir disso, as células foram novamente plaqueadas em placa com 96 poços em uma densidade de 1×10^3 células por poço, a fim de avaliar sua capacidade de renovação para esferas tumorais de SE e iniciar o tratamento (Souza et al., 2018).

3.4 Tratamento

Após obtenção das células tronco, as mesmas foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^3 células por poço. Após 72 horas de plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e o tratamento adicionado. As

células foram expostas a K252a na dosagem de 100 nM e de 500 nM por 96 horas. Controles foram expostos a somente meio de cultura sem nenhum tipo de tratamento por também 96 horas. Após o tempo de tratamento proposto, células foram analisadas em microscópio invertido (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) e foram tiradas 4 fotos por poço de tratamento, totalizando 4 campos por poço. As fotos foram analisadas pelo software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) para o cálculo do número das esferas (Heinen et al., 2016; Souza et al., 2018).

3.5 Análise da Expressão de mRNA por RT-qPCR

A expressão dos genes de interesse foi analisada por *Real-Time* PCR. O RNA total das células (linhagens celulares/tumoresferas) foi extraído antes e após os tratamentos utilizando PureLink R RNA Mini Kit (Life Technologies), conforme descrição do fabricante. Todos os passos do procedimento foram conduzidos sob condições livres de RNA para evitar contaminação. A concentração total do RNA (ng/ μ L) foi determinada na absorbância de 260 utilizando um NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Então, 50 ng de cada amostra foi convertida em cDNA usando o superscript TM III First-Strand Synthesis supermix (Invitrogen, São Paulo, Brasil) com um mix de random primers em volume final de 20 μ L. O cDNA obtido foi amplificado usando primers de β -actina e primers específicos objetos de interesse no trabalho (as sequências foram desenhadas de acordo com o Genbank). A expressão de β -actina foi medidas como controle interno. Para análise quantitativa, foi realizada a técnica de qPCR. As reações foram

realizadas em placa de 96 poços óptica, utilizando um termociclador Quant Studio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, a amplificação foi realizada em 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30s, anelamento a 60°C durante 40s e extensão a 72°C durante 40s. A amplificação foi seguida de uma análise de curva de melting para confirmar a especificidade do produto de PCR. Todas as reações contaram com controle negativo. Os resultados estão expressos como percentagem relativa à β -actina e foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Portich et al., 2017).

3.6 Avaliação das vias de sinalização pela Técnica de Western Blot

As células foram homogeneizadas e lisadas, utilizamos tampão contendo inibidores de proteases (Roche) e quantificadas utilizando método colorimétrico (Bradford, Bio-rad, CA, EUA). 20 μ L do lisado de proteínas totais foram separados em gel de eletroforese de poliacrilamida, e as proteínas analisadas pela técnica de Western Blot como previamente descrito. As membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos para os marcadores e para as principais proteínas das vias investigadas pelo estudo até o momento.(P21, Stat3, OCT 3/4, ERK, pERK), além da β -actina que foi usada como controle interno (Heinen et al., 2016; Souza et al., 2018). A incubação foi seguida pela adição de um anticorpo secundário conjugado com peroxidase apropriado (1:2000; Cell Signaling) por 2h à 4°C. Quimioluminescência foi detectada pelo ECL Western Blotting substrate (EMD Millipore, DE) e analisada por Image Quant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, UK). Os experimentos foram

realizados em triplicatas e a densidade das bandas foi analisada pelo software Image J (NIH).

3.7. Análise estatística

Todos os dados foram apresentados com médias \pm desvio-padrão das médias de 3 experimentos independentes. A diferença entre as médias entre o grupo controle e o grupo tratamento foi avaliada no teste T de Student ou por ANOVA de 1 via seguida por testes posthoc de Tukey e/ou Bonferroni. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 7. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas K252a aumenta EWS-FLI1

Tumores de sarcoma de Ewing apresentam heterogeneidade quanto ao EWS-FLI1, e baixos níveis do fator de transcrição podem levar a aumento das interações matriz célula-célula e alta capacidade de migração e/ou invasão, favorecendo, assim, a metástase (Grünewald et al., 2018). As células da linhagem celular SK-ES-1 em monocamada foram tratadas com K252a na dose de 100 nM escolhida de acordo com descrição prévia (Heinen et al., 2016). A expressão gênica de EWS-FLI1 teve um aumento significativo após o tratamento. Conforme dados preliminares, notamos que STAT3 demonstrou um discreto aumento na expressão, porém não estatisticamente significativo. Uma vez que já foi demonstrado que o inibidor de neurotrofinas diminui a viabilidade e crescimento das células de SE, o aumento de EWS-FLI1 pode indicar que o K252a também compromete o potencial da célula para formação de metástases, e pode ser um indicativo de que a inibição do crescimento tumoral ocorre por outro mecanismo. Ao diminuir a proliferação celular e aumentar a expressão de EWS-FLI1, o K252a pode, assim, ser apresentado como uma alternativa para tratamento, atacando mecanismo diferente dos fármacos citotóxicos já utilizados na clínica, aumentando, assim, a possibilidade de alcançar melhores índices de remissão na doença e, ainda, diminuir taxas de recidiva com metástases.

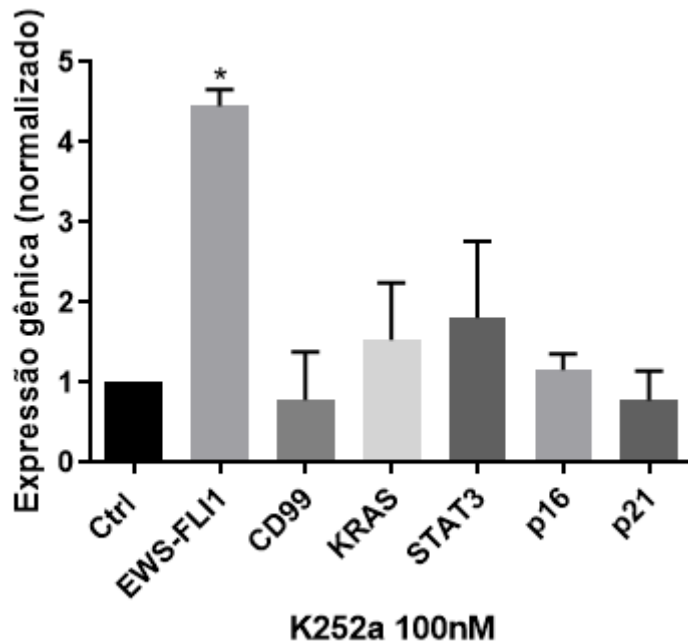


Figura 1. Linhagem celular SK-ES-1 seguida de tratamento com K252a 100 nM em meio RPMI 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram incubadas em frascos de cultivo celular de 25 mm³. Os pellets foram coletados após 48h de tratamento. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e representam 3 experimentos independentes. *P < 0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Tukey.

4.2 K252a diminui a capacidade migratória das células de SE

Aproximadamente 30% dos pacientes apresentam metástase no diagnóstico, ponto em que a resistência à terapia frequentemente leva à alta mortalidade. Além disso, mesmo os pacientes sem metástases evidentes geralmente apresentam micrometástases que apenas mais tarde irão se manifestar. A formação de metástases é um processo complexo, bem orquestrado, com várias etapas que envolve invasão, migração, extravasamento e crescimento do tumor na localização secundária. Contudo, em um ambiente de pesquisa, o estudo das metástases apresenta algumas limitações inerentes

aos modelos *in vitro* e *in vivo*. Assim, duas das principais características da metástase que geralmente são analisadas em estudos de sarcoma de Ewing *in vitro* são migração e invasão. Existem vários protocolos que podem nos ajudar a analisar as capacidades migratórias e invasivas de linhagens celulares (Stegg, 2016; Ashby & Zijlstra, 2012). Nós utilizamos um ensaio comumente usado na pesquisa em SE que é descrito como ensaio de cicatrização de feridas para determinação da capacidade migratória em células em monocamadas, com o objetivo de verificar se o pan-inibidor de neurotrofinas tem impacto na capacidade migratória das células de SE. Sedimentamos as células nas placas e 24 horas após realizamos a ferida conforme protocolo (Cidre-Aranaz & Grünewald, 2021), e imediatamente realizamos a coleta de imagens, as quais foram capturadas também nos tempos 24h e 48h, e verificamos que o K252a diminuiu a capacidade migratória da linhagem SK-ES-1 nas doses de 100nM e 500nM, conforme imagem representativa. Os gráficos foram normalizados comparando o tratamento ao controle.

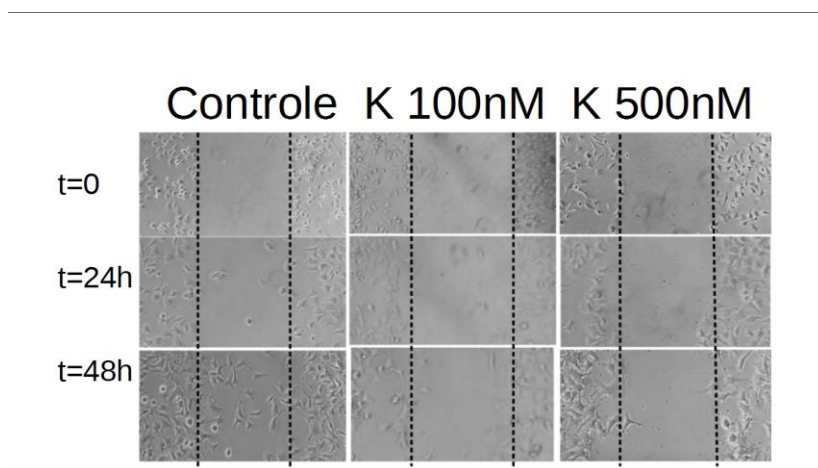


Figura 2. Linhagem celular SK-ES-1 seguida de tratamento com K252a 100 nM e 500 nM em meio RPMI 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células plaqueadas em placas de 24 poços. Após 1 dia, foi feita a ferida (*scratch*) e imediatamente realizado o tratamento bem como a coleta

de imagens referente ao tempo 0 (t=0). As imagens também foram coletadas nos tempos 24h e 48h. Gráfico normalizado do número de células com capacidade migratória.

4.3 O tratamento com K252a diminui a contagem do número de esferas tumorais

Para verificar o papel da inibição de neurotrofinas em CTT de SE, esferas tumorais da linhagem SK-ES-1 foram cultivadas e expostas ao pan-inibidor de Trks K252a. Após 72 horas de tratamento com as doses de 100 nM e 500 nM, verificou-se uma diminuição significativa na contagem do número de esferas (fig. 3 e fig. 4), além de uma clara diminuição do tamanho das esferas (fig. 4). O ensaio de formação de esferas tem sido amplamente utilizado na pesquisa pré-clínica como modelo de estudos de CTT (Pastrana et al., 2011), ressaltando a importância deste resultado.

A pluripotência de células de sarcoma de Ewing também parece estar relacionada com a progressão tumoral e resistência à quimioterapia, o que pode significar uma maior resistência de células tronco tumorais. Por exemplo, os efeitos antitumorais de agentes quimioterápicos como a doxorrubicina são menores em células tronco de sarcoma de Ewing positivas para CD133 e presentes em tumoresferas (Cornaz-Buros et al., 2014). Já foram identificadas células tronco tumorais em SE, as quais estão relacionadas à resistência (Suvà et al., 2009). Esse fato torna-se extremamente importante no que diz respeito à terapia alvo para SE, uma vez que, cada vez mais, sabe-se que as CTT são responsáveis pela resistência ao tratamento em diversos tipos de tumores. Um fármaco atuando diretamente na biologia tumoral, sendo capaz de não apenas

antagonizar receptores importantes em células maduras, mas também atuar contra CTT, é necessário para subverter os mecanismos de resistência em SE. O pan-inibidor de TRKs, K252a, apresenta-se como uma alternativa para esse fim, por demonstrar potencial para atuar a nível de células com capacidade tronco-tumoral.

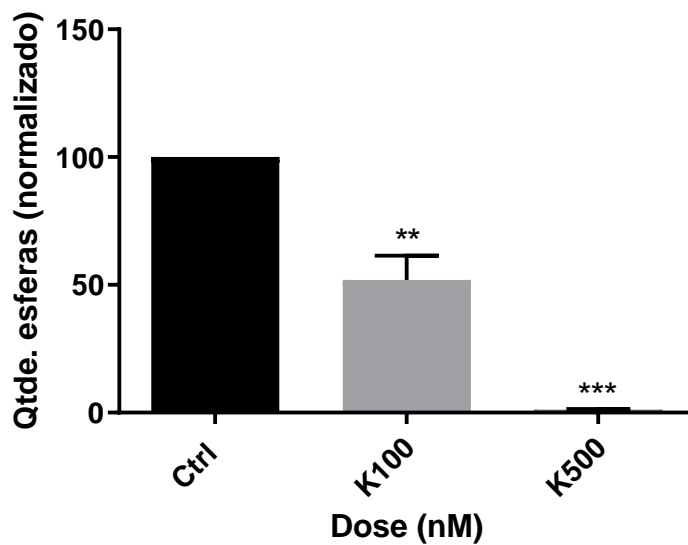


Figura 3. As células foram cultivadas conforme descrito em materiais e métodos e expostas a meio de cultura (grupo controle) ou expostas às doses de 100 nM e 500 nM de K252a por 72h. Após este tempo, o número de esferas de cada grupo foi avaliado utilizando o software ImageJ. Houve uma diminuição significativa do número de esferas nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e representam 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle, ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Bonferroni.

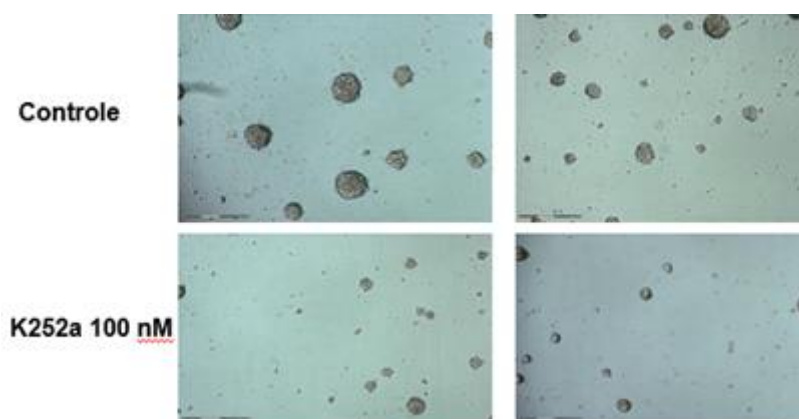


Figura 4. Imagens representativas das esferas tumorais pertencentes ao grupo controle e ao grupo tratamento.

4.4 K252a modifica a expressão de genes associados a pluripotência

Alguns trabalhos avaliaram a expressão de *stem cell markers* correlacionando com sobrevida e prognóstico em pacientes com diferentes tipos de sarcomas. Zambo e colaboradores verificaram por imunohistoquímica que níveis aumentados de Nestina indicaram pior prognóstico em pacientes com sarcoma de Ewing, e alta expressão de CD133 (Prom1) está associado a uma menor sobrevida em pacientes com rhabdomiosarcoma (Zambo et al., 2016). Em nosso trabalho, após 72 horas de tratamento com K252a na dose de 100 nM, as células das esferas tumorais da linhagem SK-ES-1, após dissociação, foram coletadas e analisadas por qPCR. Verificamos a expressão gênica de marcadores relevantes, relacionados à biologia tumoral e sobrevivência no SE. Diferentemente das células em monocamadas, nenhum primer teve diferença significativa na sua expressão (dados não mostrados), apenas o CD99 demonstrou leve aumento na expressão pós tratamento, porém não foi

estatisticamente significativo. Da mesma forma, avaliamos a expressão dos receptores de neurotrofinas TrkA e TrkB nas esferas tumorais, antes e após o tratamento com K252a, entretanto o tratamento não afetou a expressão dos receptores.

A seguir analisamos os genes de interesse relacionados a vias de células tronco tumorais. Foi observado uma diminuição estatisticamente significativa em Prom1 (CD133) após o tratamento com K252a 100 nM, entretanto OCT4, que também é um *stemness marker* teve expressão aumentada após o tratamento. Esse dado tem relevância uma vez que algumas subpopulações de células de pacientes exibem diferentes concentrações do *stem cell marker* CD133. Esses resultados demonstram pela primeira vez que o pan-inibidor de neurotrofinas K252a atua em nível molecular em células com capacidade tronco tumoral.

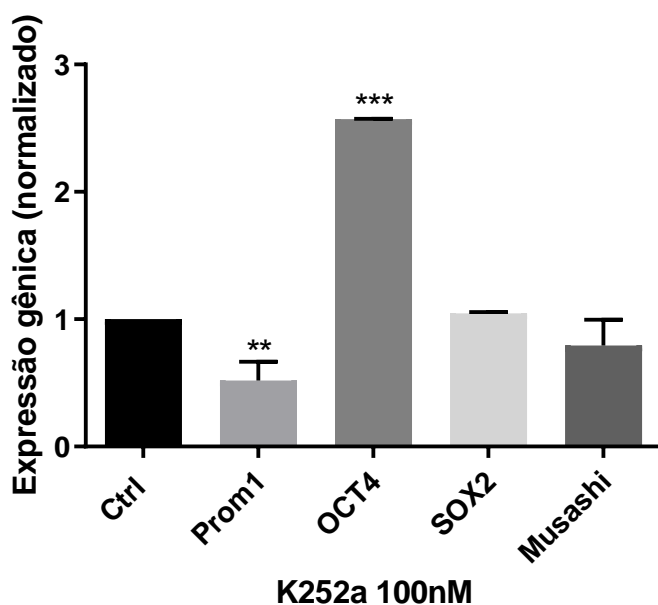


Figura 5. Cultivadas conforme descrito em materiais e métodos, as células foram expostas a meio de cultura (grupo controle) ou expostas à dose de 100 nM de K252a por 72h. Após, os pellets foram coletados para posterior análise por qPCR. Os dados são apresentados como

média \pm desvio padrão e representam 3 experimentos independentes. *P < 0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Tukey.

4.5 Tratamento com pan-inibidor de neurotrofinas diminui pERK

A fim de confirmar os achados em expressão gênica e avaliar vias de sinalização importantes e relevantes em Sarcoma de Ewing, nós investigamos mecanismos moleculares associados com diminuição do crescimento celular de células em monocamada SE no tratamento com K252a. Nós observamos diminuição nos níveis de proteínas de pERK (phosphorylated extracellular-regulated kinase, do inglês), mas não nos níveis totais de ERK1. Esse resultado dá suporte para a possibilidade de que a sinalização mediada pela via ERK está envolvida nos efeitos inibitórios de K252a em células de SE.

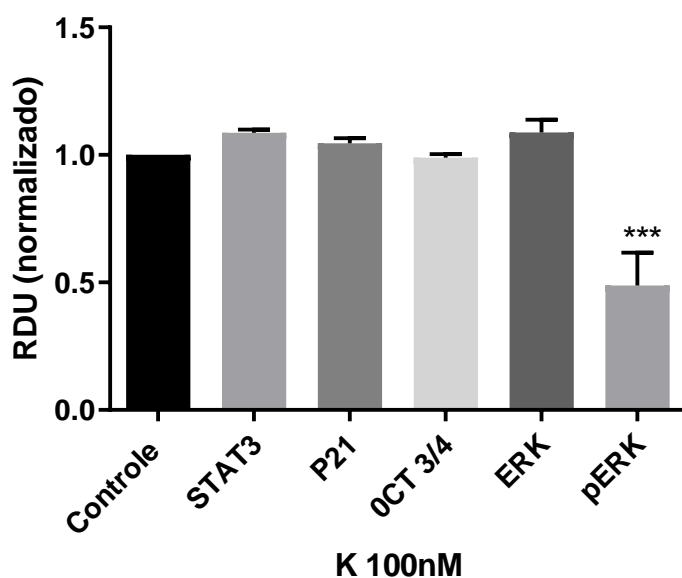


Figura 7. Análise de proteínas por Western Blot de STAT3, P21, OCT 3/4, ERK e pERK. Experimento conduzido conforme descrição em Materiais e Métodos. A análise RDU (Relative

Densitometric Unit, do inglês) foi normalizada pela β -actina. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e representam 3 experimentos independentes. *P < 0,05 comparado ao grupo controle, ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

O transcrito de fusão EWS-FLI1 tem importância fundamental no sarcoma de Ewing, tanto na biologia tumoral quanto na tumorigenicidade. Ele atua regulando uma grande variedade de genes, alterando o estado da cromatina para estabelecer um programa de expressão gênica que ativa oncogenes e reprime supressores tumorais (Riggi et al., 2014). Atua, conseqüentemente, como responsável pela carcinogênese, metástase e resistência tumoral. Várias proteínas e transcritos adicionais são regulados por EWSR1-FLI1 (como CAV1, EZH2, GPR64, NPY85, TRIP6 e CD99, por exemplo) e também influenciam a migração, invasão e/ou colonização metastática em SE. Da mesma forma, aumentos nas espécies reativas de oxigênio e um fenótipo de estresse oxidativo foram associados a expressão da metaloredutase STEAP1 (um alvo transcricional de EWS-FLI1), aumentando a invasividade do sarcoma (Lagares-Tena et al., 2016; Richter et al., 2009; Richter et al., 2013; Grünwald et al., 2013). Embora considerado um tumor mesenquimal, um processo semelhante a uma transição epitelial para mesenquimal foi relatado como ocorrendo no sarcoma de Ewing e pode ser um dos mecanismos críticos de condução de metástases (Sannino et al., 2017). Neste modelo, células com alta expressão de EWS-FLI1 representam a população principal de SE e é responsável pelo seu fenótipo de proliferação. Essas células também apresentam alta propensão à adesão célula-célula. No entanto, populações de células com EWS-FLI1 baixo podem adquirir um fenótipo semelhante ao mesenquimal e maior potencial para metastizar (Franzetti et al., 2017). De fato, células com EWS-FLI1 tendem a um

fenótipo de adesão célula-matriz, que correlaciona-se com maior migração, invasão e metástase.

Neste trabalho mostramos que células tratadas com o K252a (um pan-inibidor dos receptores Trk de neurotrofinas) aumentam expressão gênica de EWS-FLI1, que é o gene fusionado característico dos tumores de Ewing e atua como fator de transcrição. Esse aumento pode ter uma relevância extremamente significativa pois, conforme dito anteriormente, níveis diminuídos de EWS-FLI1 estão relacionados com maior potencial para apresentar um fenótipo de metástase, invasão e migração. Logo, o fármaco pode estar atuando como um inibidor do potencial de invasão e metastático do tumor, concomitantemente diminuindo a proliferação celular. Este é o primeiro trabalho que demonstra um inibidor de neurotrofinas alterando o nível de expressão de EWS-FLI1 em células de SE.

As metástases evidentes ao diagnóstico estão associadas a um prognóstico desfavorável no sarcoma de Ewing, mas os pacientes sem metástases evidentes frequentemente apresentam doença micro metastática na apresentação da doença. Isso sugere que o potencial metastático do sarcoma de Ewing existe em um estágio inicial durante o desenvolvimento do tumor. Chaturvedi e colaboradores exploraram se o evento causado pela expressão do fator de transcrição oncogênico derivado de translocação, incitante no sarcoma de Ewing, EWS-FLI1, modula diretamente as características das células tumorais que suportam a metástase, como a adesão celular, a citoarquitetura e a migração celular. Foi usada uma abordagem baseada em RNAi em linhagens celulares de sarcoma de Ewing derivadas de pacientes. Embora a hipótese inicial era de que EWS-FLI1 poderia induzir características metastáticas clássicas,

como aumento da adesão celular, migração e invasão (semelhante aos fenótipos observados quando malignidades epiteliais sofrem uma transição epitelial para mesenquimal durante o processo de metástase), surpreendentemente, foi verificado o oposto. Assim, a expressão do transcrito de fusão inibiu a adesão de células isoladas em cultura e preveniu a adesão em um ensaio de pulmão de camundongo *in vivo*. A migração celular foi inibida de forma semelhante pela expressão de EWS-FLI1. Além disso, a expressão do fator de transcrição causou uma perda marcante de fibras de estresse de actina organizadas e aderências focais e uma perda concomitante de disseminação celular, sugerindo que EWS-FLI1 interrompe o fenótipo mesenquimal das células tumorais. Esses dados trouxeram um novo paradigma para a disseminação e metástase de tumores derivados do mesênquima: esses tumores podem se disseminar por meio de um modelo "passivo/estocástico" em vez de uma transição do tipo epitelial para mesenquimal "ativa". No caso do sarcoma de Ewing, parece que a perda de adesão celular necessária para promover a disseminação de células tumorais pode ser induzida pelo próprio oncogene EWS-FLI1, em vez de por meio de um acúmulo de mutações graduais (Chopin et al., 2015; Grünewald et al., 2015). Nós realizamos tratamento da linhagem de SE, SK-ES-1, com K252a para avaliar seu potencial frente a capacidade migratória dessas células. O inibidor de neurotrofinas diminuiu consideravelmente a migração das células, demonstrando um potencial para atingir essa capacidade tumoral que é tão crítica para a manutenção do tumor, demonstrando um potencial para ser considerado na terapêutica, podendo ser usado em combinação com os fármacos já utilizados na clínica, para tentar diminuir a possibilidade de formação de metástases. Uma vez que demonstramos que esse tratamento aumenta a

expressão de EWS-FLI1, e que já foi relatado que o aumento na expressão do fator de transcrição está relacionado à inibição da migração, nossos resultados dão suporte à ideia de que o K252a pode inibir a migração através do aumento da expressão do EWS-FLI1.

A primeira linha de tratamento em SE para doença localizada consiste, há anos, em quimioterapia neoadjuvante. O tratamento baseado em agentes citotóxicos não ataca especificamente os mecanismos patogênicos das células de SE; levando, conseqüentemente, a um aumento de resistência tumoral à quimioterapia convencional. Outra preocupação relevante, principalmente quando falamos de crianças, adolescentes e adultos jovens com SE, é a toxicidade relacionada à quimioterapia. Essas terapias são administradas nas doses máximas toleradas pelo paciente e, mesmo atingindo a cura, inúmeros são os problemas que irão surgir em decorrência da exposição a esses fármacos (Livshits et al., 2014; Rosen et al., 2013). Em consequência disso, aumentar a taxa de cura requer uma abordagem biologicamente plausível, utilizando, por exemplo, terapia de alvo molecular, a fim de aumentar a efetividade do tratamento sem aumentar os efeitos adversos (Subbiah V & Kurzrock, 2012). Por isso, avaliamos marcadores relevantes na sobrevivência e proliferação do sarcoma de Ewing, como, por exemplo, CD-99, que é um biomarcador dessa patologia, envolvido em processos biológicos cruciais, tais como migração celular, morte celular e diferenciação (De Feo et al., 2019). Tem sido demonstrado que Jak1-Stat3 tem participação importante na tumorigênese, proliferação e crescimento tumoral, por isso avaliamos sua expressão pós-tratamento. E ainda o P21 é um regulador do ciclo celular, e estudos de terapia

alvo molecular em sarcoma de Ewing já demonstraram modificar a expressão desses reguladores (Peter, 2017; Thomaz et al., 2019; Ren et al., 2016).

Receptores tropomiosina quinase foram inicialmente descritos como uma família de receptores de fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento neuronal. Tem sido demonstrado, desde então, que eles influenciam o desenvolvimento e função neuronal em diversos aspectos, incluindo diferenciação, crescimento e plasticidade sináptica (Ceni et al., 2014). Por serem fatores de crescimento relacionados à sobrevivência neuronal, postulou-se que tumores poderiam utilizar dos mesmos mecanismos para sua manutenção. Diversos trabalhos têm demonstrado o papel de neurotrofinas e seus receptores nos diversos tipos de câncer, incluindo atuação na angiogênese, no microambiente tumoral, metástases, resistência e, até mesmo, atuando com um fator responsável pelo crescimento de CTT (Garrido et al., 2019; Triaca et al., 2019; Heinen et al., 2016); essas evidências apontam, conseqüentemente, que as neurotrofinas surgem como uma nova alternativa a ser explorada para o tratamento tumoral. Em trabalho prévio, nosso grupo de pesquisa mostrou, pela primeira vez, que Trks possuem influência na proliferação e sobrevivência celular, além de serem capazes de subverter mecanismos de resistência tumoral quando inibidos, principalmente em células tumorais resistentes à quimioterapia convencional em SE (Heinen et al., 2016). Sabemos, porém, que uma droga a fim de se tornar efetiva, necessita atuar contra os vários mecanismos de resistência tumoral, dentre eles, ser efetivo contra células tronco tumorais. Assim sendo, avaliamos o papel da inibição de neurotrofinas em CTT de SE, induzindo a formação de esferas tumorais da linhagem SK-ES-1 e tratando com o pan-inibidor de Trks K252a. Após 72 horas de tratamento com as doses de 100 nM

e 500 nM, verificou-se uma diminuição significativa do número de esferas, além de uma clara diminuição do tamanho das esferas. Este é o primeiro trabalho que demonstra a inibição de cultura enriquecida de células tronco tumorais de sarcoma de Ewing com inibidor de neurotrofinas. Esse resultado reafirma o potencial de uso de inibidores de Trks na terapêutica. pois alguns fármacos usados na clínica tem potencial de toxicidade para células aderentes em cultura, porém não exibem o mesmo resultado em cultura de CTT, como é o exemplo da doxorubicina (Cornaz-Buros et al., 2014).

Avaliar marcadores celulares no que tange à biologia do tumor, bem como vias de sinalização são de extrema importância para um entendimento maior da doença, bem como a análise desses biomarcadores após tratamento para buscar elucidar possíveis mecanismos de ação de novos fármacos e terapias alvo. Igualmente importante, desvendar os mecanismos de resistência às terapias correntes também deve ser objeto de estudo. O ensaio de formação de esferas é uma plataforma para estudo de CTT altamente difundida, e que também ocupa fundamental importância para o estudo de novas terapias.

Células tronco tumorais são células cancerosas que se auto-renovam, responsáveis pela expansão da massa maligna em um processo dinâmico que molda o microambiente tumoral. Uma outra particularidade das CTTs é que elas podem subverter a vigilância imunológica dos pacientes, resultando em tumores tipicamente agressivos com mau prognóstico. As neurotrofinas tem participação nas vias de sinalização de tumores, como o NGF e seu receptor, TrkA, que atua na iniciação e progressão tumorais. Por outro lado, uma via ativa de NGF foi recentemente comprovada como crítica para o controle da inflamação oncogênica e na promoção da resposta imune contra o câncer, identificando

possíveis efeitos pró-tumorais da terapia inibitória de NGF/TrkA. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no controle do crescimento tumoral e imunoeedição é essencial para identificar novas intervenções preditivas e prognósticas e para projetar terapias mais eficazes. A modulação fina e oportuna do crescimento do tumor impulsionado pelas CTTs e da ativação dos linfonodos periféricos pelo sistema imunológico possivelmente abrirá o caminho para a medicina de precisão na terapia neurotrófica e poderá melhorar o prognóstico do paciente em cânceres dependentes e independentes de TrkA (Triaca et al., 2019). Nos últimos anos, o FDA aprovou o uso de inibidores farmacológicos de receptores pan-TRK em pacientes com cânceres positivos para fusão de TRKs, o que destaca ainda mais a relevância dos nossos resultados.

Os sarcomas representam um grupo clínico e biologicamente diverso de tumores malignos do tecido conjuntivo. Apesar da terapia convencional agressiva, uma grande proporção de pacientes com sarcoma apresenta recorrência da doença, o que acaba resultando em mortalidade. A presença da população de células tronco tumorais foi proposta como responsável por respostas refratárias às quimioterapias atuais, bem como subjacente à base para metástases e recidiva da doença. A presença de CTT foi sugerida em uma variedade de malignidades hematológicas e sólidas, e mais recentemente em sarcomas. Com base em nosso conhecimento atual da biologia de células-tronco normais e evidências obtidas a partir do estudo de tumores hematopoiéticos e sólidos malignos, os pesquisadores identificaram marcadores de superfície celular candidatos (CD133, CD117, Stro-1), marcadores bioquímicos (atividade de aldeído desidrogenase) e características citológicas (*side population* e

formação de colônias esféricas) que podem identificar CTTs de sarcomas. Igualmente importante à inibição do crescimento das esferas, é preciso avaliar os genes associados à pluripotência em células com capacidade tronco tumoral para demonstrar a efetividade do fármaco nessas células e elucidar o possível mecanismo de ação ou alvo molecular nessas populações. Nós avaliamos a expressão de reguladores transcricionais de pluripotência e constatamos a diminuição significativa de expressão de Prom 1 (CD133), um importante marcador de células tronco e relacionado a pior prognóstico em sarcomas (Filemon, 2013; Zambo et al., 2016), demonstrando a efetividade de K252a em comprometer a função desse gene em sarcoma de Ewing. Entretanto, o nível de OCT4 aumentou após o tratamento, sendo este também um marcador tronco tumoral (Souza et al., 2018), podendo ser uma resposta compensatória dessas células, buscando a manutenção de suas características de crescimento e resistência ao tratamento.

Em se tratando da sobrevivência e proliferação em células tronco tumorais, já foi demonstrado que as neurotrofinas são responsáveis pela ativação de vias de sinalização nessas células. NGF, BDNF e NT3 representam vias de sobrevivência e proliferação celular em CTT de glioma, melanoma, câncer de mama e carcinoma de cabeça e pescoço, ativando as vias Ras-MAPK e o receptor de fator de crescimento de fibroblasto (Chopin et al., 2016). A ativação de BDNF/TrkB e NT3/TrkC também tem sido relacionada à sobrevivência de CTT em glioma através do acionamento das vias AKT e ERK (Lawn et al., 2015), e nosso grupo de pesquisas já demonstrou que inibidores de HDAC (histona deacetilases) inibem componentes de vias de sinalização relacionados a proliferação e sobrevivência em SE (Souza et al., 2018). Nós

avaliamos a via de sinalização MAPK-ERK e demonstramos que a exposição de células SK-ES-1 de sarcoma de Ewing à K252a diminui níveis protéicos de pERK. Uma vez que as neurotrofinas são conhecidas por mediar a sobrevivência neuronal via ativação de ERK, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e fosfolipase C γ (PLC- γ) (Ceni et al., 2014), os resultados são consistentes com a possibilidade de que a inibição da atividade global de TRKs afeta a sobrevivência em células de SE. Esses resultados suportam a possibilidade de que a redução na ativação de ERK pode estar envolvido no efeito antiproliferativo de inibidor de neurotrofinas em SE.

Em se tratando de SE, CTT já foram identificadas e caracterizadas como responsáveis por propriedades de iniciação tumoral e habilidade de quimiorresistência (Suvà et al., 2009). A formação de esferas (tumoresferas) em culturas de células cancerosas é amplamente utilizada como plataforma para a expansão de células-tronco cancerígenas. Foi demonstrado também que esferas tumorais apresentam elevados níveis de TrkB quando comparados a células crescendo em monocamada, sugerindo um possível aumento da via de sinalização das neurotrofinas em CTT de SE. Neste trabalho, ficou claro que a inibição de Trks pelo pan-inibidor K252a reduz a formação de esferas tumorais, indicando que é capaz de atingir células-tronco de SE, e diminui biomarcadores e vias de sinalização importantes, indicando que essa pode ser uma estratégia para subverter mais um mecanismo de resistência tumoral em SE, que é a presença de CTT; surgindo, conseqüentemente, como um potencial agente para o tratamento desse tipo de tumor. Nós também evidenciamos que o tratamento com K252a diminui a capacidade migratória das células de SE, além de aumentar a expressão de EWS-FLI1, demonstrando que este pode ser um

mecanismo pelo qual o K252a inibe o crescimento tumoral podendo também diminuir o potencial metastático desse câncer. Nossos resultados colocam o inibidor de neurotrofinas como um potencial tratamento para ser desenvolvido em fases pré-clínicas *in vivo* a fim de testar seu potencial para ser considerado para ensaios clínicos no futuro para o sarcoma de Ewing bem como outros tipos de sarcomas.

6. ARTIGO DE REVISÃO

Situação: manuscrito submetido, tendo passado pelo escrutínio inicial com sucesso, atualmente sendo revisado por pares.

Current Stem Cell Research & Therapy

REVIEW ARTICLE

Cancer stem cells and chemoresistance in Ewing sarcoma

----- Forwarded message -----

De: **Current Stem Cell Research & Therapy** <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Date: sex., 21 de jan. de 2022 às 22:16

Subject: Submission Acknowledgement | BMS-CSCRT-2022-13

To: <rafaelroesler@hcpa.edu.br>

Cc: <cscrt@benthamscience.net>, <ayeshahussain@benthamscience.net>

Reference#: BMS-CSCRT-2022-13

Submission Title: Cancer stem cells and chemoresistance in Ewing sarcoma

Dear Dr. Roesler,

Thank you for your submission to "Current Stem Cell Research & Therapy(CSCRT)". It will be sent to the Editor-in-Chief for his initial provisional approval. Once this is obtained it will be passed on to our Author Support Services department (BASS), for an initial assessment of the manuscript. BASS is a specialized department that helps authors and editors to make sure that the manuscript becomes ready for submission into the peer-review process. The manuscript is being processed on the clear understanding that it contains original work that has neither been published earlier nor has it been simultaneously been submitted for publications elsewhere. In case this is not so, then kindly let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **Cross Check's iThenticate** software to check for similarities between the submitted and already published material to minimize any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science Ethical Guidelines for Publication, all manuscripts are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed on the Journal's website.

Articles which are well referenced (100 or more references) may have high chances of acceptance by referees and they are likely to attract a greater number of citations. The recommended number of references as per norm (<https://clarivate.com/essays/impact-factor/>) for Review Articles is approximately 100 or more, for Research Articles 75 or more, for Mini Reviews 75 or more & for Letter Articles 50 or more.

In case of any doubt or conflict please contact us.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager to whom all correspondence may kindly be addressed:

Name: James J. Yoo
Affiliation: Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem
Country: USA
Email: jyoo@wakehealth.edu

REVIEW ARTICLE

Cancer stem cells and chemoresistance in Ewing sarcoma

Rafael Pereira dos Santos ^{1,2}, Lauro Gregianin ^{1,3,4}, André T. Brunetto ^{1,5},
Mariane da Cunha Jaeger ^{1,5}, Algemir Lunardi Brunetto ^{1,5}, Caroline Brunetto
de Farias ^{1,5}, Rafael Roesler ^{1,2,*}

¹*Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;* ²*Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;* ³*Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;* ⁴*Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;* ⁵*Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Address correspondence to this author at Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite,

500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre,RS, Brazil. Telephone: +5551 33083183; fax: +5551 33083121; rafaelroesler@hcpa.edu.br

Running title: Stem cells in Ewing sarcoma

Word count:

Number of words in the Abstract:	188
Number of words in the main text:	3,362
Number of tables:	3
Number of figures:	1
Number of references:	98

Abstract: Resistance to chemotherapy poses a major challenge for cancer treatment. Reactivation of a stem cell program resembling that seen in embryonic development can lead cancer cells to acquire a stem-cell phenotype characterized by expression of stemness genes, pluripotency, high self-renewal ability, and tumor-initiating capability. These cancer stem cells (CSCs) are usually resistant to anticancer drugs and are likely involved in treatment failure in many cancer types. Ewing sarcoma (ES), a pediatric cancer type likely arising from either human mesenchymal stem cells (hMSCs) or neural crest stem cells (hNCSCs), represents a prototypical tumor type originating from a single oncogenic

genetic event, namely a chromosomal translocation that leads to fusions between the EWS RNA Binding Protein 1 (*EWSRI*) gene and a ETS family gene, most frequently *FLI-1*, resulting in the EWS-FLI1 protein which acts as an aberrant transcription factor. Despite advances in treatment, survival prognostic remains poor for patients with refractory or recurrent disease. Here, we review the increasing evidence indicating that ES tumors contain a CSC subpopulation that plays a role in resistance to drug treatment, and current experimental strategies that successfully counteract chemoresistance mediated by CSCs in ES.

Keywords: Ewing sarcoma, sarcoma, pediatric cancer, chemoresistance, cancer stem cell, stem cell.

OUTLOOK

1. EMBRYONAL AND STEM CELL ORIGINS OF EWING SARCOMA

1.1. Childhood Cancers as Developmental Diseases

1.2. Cells of Origin in Ewing Sarcoma

2. CANCER STEM CELLS IN ES

2.1. The Cancer Stem Cell Model

2.2. ES Stem Cells

3. CHEMORESISTANCE AND ES CSCS

3.1. Targeting ES CSCs to Counteract Resistance to Treatment

3.2. Treatment Resistance in the Clinical Setting

4. CONCLUSION

LIST OF ABBREVIATIONS

CONSENT FOR PUBLICATION

FUNDING

CONFLICT OF INTEREST

ACKNOWLEDGEMENTS

REFERENCES

1. EMBRYONAL AND STEM CELL ORIGINS OF EWING SARCOMA

1.1. Childhood Cancers as Developmental Diseases

Pediatric cancers are increasingly seen as originating from tumorigenic mutations that may occur during the prenatal period. Tumor initiation and progression seem to

hijack biological mechanisms and features of normal development. Embryonic development gives rise to the many differentiated cell types and specialized tissues from a single pluripotent stem cell, through a very sophisticated and finely regulated biological processes. Disruptions in one or more of these processes are currently proposed to be one of the bases of carcinogenesis in children. Cancer cells may arise directly from embryonic or stem cells, or from more differentiated cells that acquire embryonal features favoring proliferation, survival, stemness, and resistance to apoptosis. Formation of a bulk of “stem-like” cells that display a persistence of embryonic properties and can eventually originate and drive cancer may be facilitated by abnormalities in epigenetic programming and signaling by growth factors [1, 2].

1.2. Cells of Origin in Ewing Sarcoma

Ewing sarcoma (ES) is a pediatric cancer type characterized by harboring a specific genetic alteration in which a chromosomal translocation results in fusions between the EWS RNA Binding Protein 1 (*EWSRI*) gene and one among several ETS family genes, most frequently *FLI-1*, which occurs in about 85% of cases. The resulting EWS-FLI1 protein functions as an aberrant transcription factor that induces a reprogramming of gene expression, epigenetic machinery, and cell signaling, all of which can in turn determine tumorigenic transformation. Thus, ES is the prototypical tumor type that can be initiated by a single original oncogenic genetic event [3, 4]. ES is an aggressive type of cancer with a highly metastatic phenotype that can occur either in bone or soft tissues in children and adolescents. Despite considerable advances in multimodal therapy over recent years, patients with the disease still have a poor prognosis. Current survival

rates are around 70-80% for patients with standard-risk and localized disease and ~30% for patients with metastatic disease. Standard treatment comprises local surgery plus radiotherapy and chemotherapy, which induce long-lasting adverse effects and an important loss of quality of life in survivors [5-7].

The cell of origin in ES remains uncertain. Given that the chromosomal translocation resulting in expression of EWS-FLI-1 is usually the primary genetic event originating ES, non-tumor cells susceptible to transformation by EWS-FLI-1 likely exist at least in some tissues. Consistent evidence points to human mesenchymal stem cells (hMSCs) as ES cells of origin. Although several other human cell types are not able to proliferate or survive upon EWS-FLI-1 expression, in bone marrow-derived human mesenchymal progenitor cells experimentally induced expression of EWS-FLI-1 is sufficient to induce malignant transformation and generate tumors displaying features of ES, including a small round cell morphology, expression of markers β -III tubulin, NSE and CD99, and changes in expression of EWS-FLI-1 target genes [8]. EWS-FLI-1 in hMSCs also results in an ES-like gene expression profile without inhibition of cell survival or proliferation [9]. EWS-FLI-1 expression in primary hMSCs derived from a patient with ES is tolerated by these cells and results in ES oncogenesis, with the cells becoming capable of inducing tumor growth and metastasis in mouse xenografts [10]. Loss of *Stag2* cooperates with EWS-FLI-1 to generate ES tumors from murine mesenchymal stem cells [11]. The homeobox protein NKX2-2 is among the EWS-FLI-1 targets mediating the loss of non-tumor mesenchymal features and oncogenic transformation [12].

Other evidence strongly supports a neuroectodermal or neural origin of ES. Expression of neural markers can be found in at least some subsets of ES tumors, either at diagnosis or after treatment [13 - 15]. The pattern of gene expression in ES, obtained

from DNA microarray analyses, reveals a high similarity between ES and fetal and neuronal tissues and has suggested that a neural crest-derived progenitor at the transition to mesenchymal and endothelial differentiation can be transformed in ES tumors [16]. ES cells show potential for neural differentiation indicated by morphological changes and increased expression of neural markers. Treatment with the pro-differentiating agents cAMP or phorbol 12-myristate 13-acetate induces pronounced morphologic and cytologic changes consistent with neural differentiation, including elongate processes with varicosities revealed by phase-contrast microscopy, and filaments, microtubules, and uraniffin-positive dense core granules seen by electron microscopy. Neural markers neurone-specific-enolase (NSE), neurofilament triplet proteins (NFTP), and cholinesterase, which are absent or detectable at very low levels in untreated cells, show high expression after treatment, suggesting a neural origin of ES and a relationship between ES and peripheral neural tumors [17]. A neural origin is further supported by another early immunohistochemical study comparing expression of neural markers NSE, HNK-1, and NFTP with expression of mesenchymal cell surface antigens common leucocytes Leu M1, Leu M2, and Leu M3 in ES primary tumors and their corresponding cell lines [18]. Evidence from experiments measuring markers in neuroblastoma x ES somatic cell hybrids suggests that EWS/FLI-1 expression leads to loss of markers of a potential neural crest precursor cell of origin, resulting in a less differentiated and more proliferative state [19]. Inhibition of Notch signaling, which regulates the differentiation of neuroectodermal cells during embryonic development, results in a neural-like phenotype in xenografted ES tumors [20]. Knocking down the expression of CD99 in human ES cells reduces tumorigenesis and metastatic potential both *in vitro* and in immunodeficient mice, in addition to inducing neurite outgrowth and expression of neural differentiation markers β -III tubulin and H-neurofilament, likely through a mechanism

involving the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. Importantly, there is an inverse correlation between neural differentiation and oncogenic transformation [21]. Silencing CD99 can reestablish a neural differentiation program in ES cells [22], and delivery of exosomes from CD99-silenced cells induces neural differentiation in recipient ES cells, partially through microRNA (miRNA)-34a-mediated inhibition of Notch and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling. [22, 23].

Ectopic expression of EWS-FLI1 is tolerated in undifferentiated human neural crest stem cells (hNCSCs) as well as in their neuro-mesenchymal stem cell (hNC-MSC) progeny and leads to changes in expression of EWS-FLI1 target genes, as well as of genes that are markers of hNCSCs, showing that ES initiation can be modeled through EWS-FLI1 expression in hNCSCs [24]. One preferential EWS-FLI1 target gene is FEZ family zinc finger protein 1 (FEZF1), which acts as a transcriptional repressor regulating neural cell identity. FEZF1 knockdown inhibits ES cell proliferation and survival and changes the expression of neural-specific genes, consistently with the neural phenotype observed in ES cells and tumors [25]. Further supporting a neuroectodermal origin, leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5), a cell surface receptor, stem cell marker, and putative oncogene in ES, is also found in hNCSCs [26]. RE1-silencing transcription factor (REST), a neuronal repressor gene that regulates neural stem cell (NSC) differentiation, is highly expressed in both ES cell lines and tumors from patients. Overexpression of EWS-FLI-1 is associated with increased REST expression in hNCSCs, whereas EWS-FLI-1 inhibition induced by small interfering RNA decreases REST expression while also promoting apoptosis in human ES cells and reducing experimental ES tumor growth [27]. Histone deacetylase (HDAC) inhibition by sodium butyrate (NaB) in human ES cells reduces expression of EWS-FLI1 and of genes associated with cell

survival and pluripotency, while inducing the expression of the differentiation neuronal marker β -III tubulin, suggesting an epigenetic component associated with chromatin state in regulating neural differentiation in ES [28]. Together, these findings are strongly consistent with the possibility that ES can display features of an NSC or neural phenotype, undergo neural differentiation, and arise from hNCSCs, thus a neuroectodermal origin is likely for at least part of ES tumors.

2. CANCER STEM CELLS IN ES

2.1. The Cancer Stem Cell Model

Stem cells are key players in tissue development, renewal and plasticity. In cancer, reactivation of a “stemness” program characteristic of embryonic development can allow tumor cells to acquire a stem cell-like phenotype, characterized by pluripotency and high self-renewal and tumorigenic capacities. This led to the concept of cancer stem cells (CSCs) (also called “cancer-initiating cells”, among other names), which posits that tumors are complex and hierarchically organized tissues with cellular heterogeneity, and, within this cellular hierarchy, CSCs constitute a subset of cells capable of initiating a

tumor and populating it with all its comprising heterogenous cell subtypes during progression [29 - 32]. Cells that could be defined as CSCs were identified in acute myeloid leukaemia [33 - 35], and then in breast, brain, colorectal, and many other types of solid cancers [36 – 39]. CSCs are operationally defined mostly by their ability to initiate tumors when xenografted into recipient mice, in addition to other features such as expression of specific surface markers and the formation of tumorspheres in cell cultures [29 – 33, 37] (**Fig. 1**).

Fig. (1) should be inserted here

2.2. ES Stem Cells

Putative CSCs in ES were first identified in cell lines [40] and soon afterwards in surgically removed tumors from patients. A subpopulation of cells isolated from freshly dissociated ES tumors expresses the stem cell marker CD133. These cells are also sufficient to initiate tumors when xenografted into nonobese diabetic (NOD)/severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Experiments using serial transplantation of either CD133⁺ and CD133⁻ cells derived from primary xenografts confirm *in vivo* self-renewal properties shown by an ability to generate tumors in secondary and tertiary xenotransplantations, whereas CD133⁻ cells fail to initiate tumors. CD133⁺ ES cells show high expression of stem cell marker genes *OCT4* and *NANOG*, capacity to form

tumorspheres, and hMSC plasticity indicated by their potential to differentiate into mesenchymal cell lineages [41]. CSCs seem to constitute around 3% to 15% of most ES primary tumors and are able to retain stemness when cultured as tumorspheres under low attachment conditions in serum-free medium. It was subsequently shown that EWS-FLI-1 can induce expression of the embryonic stem cell genes *OCT4*, *SOX2*, and *NANOG* in pediatric, but not adult, hMSCs. ES CSCs have been shown to constitute a side population displaying higher colony forming capability, higher differentiation potential, and distinctive morphology, that share a relatively small set of stemness genes with bone marrow-derived hMSCs [42]. Pediatric hMSCs harboring EWS-FLI-1 generate an ES stem cell-like subpopulation, as a result of EWS-FLI-1 acting in combination with miRNA-145 on their shared target gene *SOX2*. Thus, EWS-FLI-1 is capable of acting as a single oncogenic event to reprogram ES cells to display a CSC phenotype [43]. ES CSCs show reversible repression of *TARBP2*, a regulator of maturation of miRNAs, further supporting an altered miRNA repertoire in ES [44, 45]. MiRNA-145 also inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) by targeting stemness through a reduction of expression of stem cell markers *SOX2*, *KLF4* and *OCT4* in ES cells [45].

Expansion of ES CSC-enriched tumorspheres can be inhibited by some pharmacological strategies. The fluoroquinolone antimicrobial enoxacin increases *TARBP2* binding to miRNAs and reverses both alterations in ES cell miRNA repertoire and their stem cell phenotype. Enoxacin alone or combined with doxorubicin-based standard-of-care therapy targets CSCs and inhibits tumor growth in ES xenografted into mice [46]. Viability of putative ES CSCs in tumorsphere cultures is reduced by cytotoxic chemotherapeutics doxorubicin, vincristine, or etoposide, as well as by inhibition of neurotrophin tropomyosin receptor kinase (Trk) receptors [47], or by epigenetic modulation by an HDAC inhibitor [28].

3. CHEMORESISTANCE AND ES CSCS

The ability to resist in a hostile environment is one of the defining features of CSCs, and includes resistance to cytotoxic chemotherapy, which poses a major challenge for the success of cancer treatment. The presence and activity of multiple drug resistance transporters makes CSCs a population of constitutively drug-resistant tumor cells [48]. Other mechanisms of CSC resistance to treatment include an increase in cell cycling efficiency, EMT, activity of anti-apoptotic mechanisms, DNA repair, and cross-talking with non-tumor cells within the tumor microenvironment that favors CSC cell survival and expansion [49]. It is commonly observed that the proportion of cells with a CSC phenotype increases in tumors after radio- and chemotherapy. This might result from either CSCs being more resistant to treatment than non-CSCs, thus being selected by treatment, or from cellular plasticity leading non-CSCs to be induced into a CSC-like state by chemotherapy [50]. The dynamic ability of shifting to a CSC-like phenotype and back to a non-CSC state, which is key in providing protection against radiation and chemotherapy, is regulated by a range of biochemical signals and interactions with different cell types within the tumor microenvironment [51]. Epigenetic mechanisms related to regulation of chromatin state and DNA methylation are among the crucial molecular processes underlying phenotypic plasticity leading to stem cell-like features in tumor cells [52].

ES CSCs obtained from primary ES tumors and grown as tumorspheres display increased resistance against doxorubicin when compared to non-CSC bulk tumor ES cells

[46]. Resistance to doxorubicin and etoposide is also observed in a subset of ES cells from cell line cultures and xenografts that show high expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH), high sphere-forming activity, tumor-initiating capability, and enrichment of stem cell genes *BMI*, *OCT-4*, and *NANOG* [53]. Tumorspheres from HTB166 ES cells displaying high self-renewal ability and expression of the stem cell genes *NANOG*, *OCT3/4*, and *SOX2*, as well as DNA repair enzyme genes *MLH1* and *MSH2*, show strong resistance to doxorubicin and cisplatin [54]. A side population of CSCs, representing 1.2% of the total cell population, isolated from SK-ES-1 ES cell cultures, showing capacity to regenerate both CSC and non-CSC ES cells and high clonogenicity and invasive capacity, also displays resistance to doxorubicin and cisplatin, accompanied by upregulation of the ATP binding cassette protein (ABC) transporters [55]. Expression of the stem cell marker CD133 defines a chemoresistant subpopulation of STA-ET-8.2 ES cells that can give rise to a more chemosensitive and less tumorigenic CD133- progeny [56]. Experimental developmental reprogramming of the metastatic ES cell line CHLA-10 to a meta-stable embryonic stem-like state with phenotypic features similar to those found in previously established induced pluripotent stem (iPS) cells resulted in ES-iPS cells with pronounced drug resistant features, including resistance to compounds targeting ESW/FLI1 or the MAPK/ERK, mammalian target of rapamycin (mTOR), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathways [57]. These findings indicate that, as in other tumor types, CSCs in ES can show increased resistance to both cytotoxic chemotherapy and targeted agents, and thus CSCs may be key in determining treatment failure [58]. **Table (1)** summarizes the current evidence for a role of CSCs in resistance to cytotoxic chemotherapy and molecularly-targeted therapy in ES.

Table (1) should be inserted here

3.1. Targeting ES CSCs to Counteract Resistance to Treatment

The evidence reviewed above suggests that CSCs can be targeted to decrease resistance to treatment and restore sensitivity to chemotherapeutics in ES. In fact, several studies have revealed experimental strategies to reduce chemoresistance in ES CSCs. The fluoroquinolone antimicrobial enoxacin, either alone or combined with doxorubicin, is effective in reducing tumor growth in ES xenografts from primary tumors containing CD133+ ES CSCs resistant to doxorubicin [46]. In ES CSCs characterized by high ALDH expression, resistance to doxorubicin can be overcome by treatment with the ATP binding cassette transport protein inhibitor verapamil, and these cells are also sensitive to the small molecule inhibitor YK-4-279, which targets EWS-FLI1 by blocking its interaction with RNA helicase A [53]. In HTB166 ES cells from tumorspheres that display stem cell features and enrichment of stemness genes, caffeine, possibly acting in this setting as a DNA repair inhibitor, can restore sensitivity to doxorubicin and cisplatin, suggesting that the drug resistance may be related to enhanced DNA repair capability [54]. In ES-iPS cells generated from CHLA-10 cells reprogrammed for pluripotency, re-differentiation restores sensitivity to ERK1/2, mTORC1, and PI3K inhibitors [57]. Metabolic modulators that target bioenergetic processes, such as the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2DG) and the mitochondrial respiratory pathway inhibitor metformin, may preferentially target ES CSCs, reducing tumorsphere formation and expression of stem

cell genes *OCT-4*, *Nanog*, *Sox-2*, *ALDH1A*, and *c-Myc*. Treatment with 2DG also significantly potentiates the effect of both doxorubicin as well as of a targeted agent, the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor talazoparib (BMN-673), in ES cells resistant to these agents [59]. The small molecule inhibitor of the oncogenic RNA helicase DDX3, RK-33, overcomes resistance to doxorubicin and etoposide in ES CSCs with high ALDH expression, while sparing non-malignant cells [60]. **Table (2)** summarizes experimental strategies to reduce CSC-mediated chemoresistance in ES.

Table (2) should be inserted here

3.2. Treatment Resistance in the Clinical Setting

As seen above, the emerging role of CSC-enriched tumorspheres in cancer development, progression, relapse and resistance to chemotherapy remains to be fully understood, and the possible synergistic actions of chemotherapy combined with targeted agents in ES are currently under clinical investigation, particularly for the treatment of refractory disease, where chemoresistance likely mediates therapy failure. A variety of targeted therapies, including the inhibitors of the insulin-like growth factor receptor (IGFR) and PI3K/AKT signaling axis, angiogenesis inhibitors, inhibitors of the MET/MAPK/ERK pathways and DNA repair system, alone or in combination with cytotoxic chemotherapeutics have been

evaluated. Unfortunately, most studies have failed to improve robust clinical endpoints. IGF1R type 1 (IGF1R) inhibitors looked promising in early trials, although they have failed to show consistent clinical benefit when given either alone or in combination with mTOR inhibitors, even when patients were selected on the basis of candidate predictive biomarkers. Modest response rates have been shown with the angiogenesis inhibitors regorafenib and the MET tyrosine kinase inhibitor cabozantinib, and further developments are underway to optimize the best approach. In addition, PARP inhibition has failed as monotherapy and combination regimens with chemotherapy are ongoing to improve outcomes [61-67].

The most common somatic mutations found in ES such as *STAG2*, *CDKN2A*, and *TP53*, are not very straightforwardly druggable, and unfortunately mutations that have led to the successful development of target medications for other cancer types are less common in ES [68]. Therefore, the chance of detecting a molecular change in ES that will have an impact on selecting effective therapy remains experimental. Several clinical trials are underway searching for different approaches including epigenetic regulators, ETS inhibitors, cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 inhibitors, immunotherapy, ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) inhibitors, LSD-1 inhibitors, MET, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and Trk inhibitors. **Table (3)** lists ongoing clinical studies enrolling refractory ES patients to evaluate potentially better treatment regimens.

Table (3) should be inserted here

4. CONCLUSION

Advances in chemotherapeutic regimens and multimodal therapy have allowed significant improvements in the treatment of patients with ES over the years [5-7, 69-71]. However, survival remains poor in about 20% of patients that have refractory or recurrent disease, as well as in the high proportion of patients presenting with metastatic disease at diagnosis [72], making the development of novel therapy alternatives urgently needed. Resistance to chemotherapy poses a particularly significant challenge for the treatment of primary or recurrent refractory ES, and mechanisms underlying chemoresistance, including resistance-associated genes, drug transporters, compensatory biochemical pathways, regulation by miRNAs, and interactions with the tumor microenvironment, have been investigated [73-78]. Experimental molecularly-targeted strategies to improve treatment and counteract chemoresistance in ES have included testing compounds that act directly on EWS-FLI1 [53, 79-81], or on targets secondary to EWS-FLI1-induced transformation that are more easily druggable, including tyrosine kinases receptors or their downstream intracellular protein kinase pathways [47, 80-87], epigenetic processes [4, 28, 88-90], and angiogenesis [91]. As discussed above, accumulating evidence indicates that a subpopulation of CSCs is part of ES tumors [41-45, 92]. In the experimental setting, these CSCs cells can be enriched through tumorsphere expansion in ES cell cultures [28, 41, 42, 46, 54, 59], although it should be noted that tumorsphere formation under serum-free conditions has not always successfully resulted in ES cells with a CSC phenotype [93]. As with other tumor types, CSCs in ES constitute a selective cell population to be targeted by novel therapeutic strategies, including those focused on

counteracting drug resistance [30, 46, 56, 58, 94-96]. Although ES is characterized by a relatively quiet genome and a single defining genetic aberration (*EWS-FLII*), the increasingly evident cellular plasticity and molecular heterogeneity within individual tumors [92, 97, 98] makes ES a biologically complex disease that poses a challenge for the development of effective novel treatments. Research must keep on characterizing the underlying mechanisms of CSC-mediated resistance and investigating potential targeted strategies to counteract it, given that the key role it plays in limiting current cure rates.

LIST OF ABBREVIATIONS

2DG	=	2-deoxy-D-glucose
AKT	=	Protein kinase B
ALDH	=	Aldehyde dehydrogenase
CDK	=	Cyclin-dependent kinases
CSC	=	Cancer stem cell
EGF	=	Epidermal growth factor
EMT	=	Epithelial-mesenchymal transition
ERK	=	Extracellular signal-regulated kinase
ES	=	Ewing sarcoma

<i>EWSR1</i>	=	EWS RNA Binding Protein 1
FEZF1	=	FEZ family zinc finger protein 1
HDAC	=	Histone deacetylase
hMSC	=	Human mesenchymal stem cell
hNC-MSC	=	Human neuro-mesenchymal stem cell
hNCSC	=	Human neural crest stem cell
IGF1R	=	Insulin-like growth factor receptor type 1
IGFR	=	Insulin-like growth factor receptor
iPS	=	Induced pluripotent stem cell
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
miRNA	=	MicroRNA
mTOR	=	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	=	Mammalian target of rapamycin complex 1
MTS	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaB	=	Sodium butyrate
NF-κB	=	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFTP	=	Neurofilament triplet proteins
NOD	=	Nonobese diabetic
NSC	=	Neural stem cell
NSE	=	Neurone-specific-enolase
PARP	=	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGFR	=	Platelet-derived growth factor receptor
	PI3K	= Phosphoinositide 3-kinase
	REST	= RE1-silencing transcription factor
	SCID	= Severe combined immunodeficiency
	Trk	= Tropomyosin receptor kinase

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This work was supported by the Children’s Cancer Institute (ICI); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.202751/2016-65); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 305647/2019-9 to R.R.); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE-HCPA).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

None declared.

REFERENCES

- [1] Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res* 2012; 18(10): 2768-79.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1921.

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

doi: 10.1038/nrc3679.

- [3] Chaturvedi A, Hoffman LM, Welm AL, Lessnick SL, Beckerle MC. The EWS/FLI oncogene drives changes in cellular morphology, adhesion, and migration in Ewing sarcoma. *Genes Cancer* 2012; 3(2): 102-16.
doi: 10.1177/1947601912457024.
- [4] Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM, Rheinbay E, Boulay G, Suvà ML, Rossetti NE, Boonseng WE, Oksuz O, Cook EB, Formey A, Patel A, Gymrek M, Thapar V, Deshpande V, Ting DT, Hornicek FJ, Nielsen GP, Stamenkovic I, Aryee MJ, Bernstein BE, Rivera MN. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2014; 26(5): 668-81.
doi: 10.1016/j.ccell.2014.10.004.
- [5] Eaton BR, Claude L, Indelicato DJ, Vatner R, Yeh B, Schwarz R, Laack N. Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2021; 68 Suppl 2: e28355.
doi: 10.1002/pbc.28355.
- [6] Grünewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Álava E, Kovar H, Sorensen PH, Delattre O, Dirksen U. Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4(1):5.
doi: 10.1038/s41572-018-0003-x.
- [7] Riggi N, Suvà ML, Stamenkovic I. Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 2021; 384(2): 154-64. doi: 10.1056/NEJMra2028910.
- [8] Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 2005; 65(24): 11459-68.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1696.

- [9] Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; 68(7): 2176-85.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1761.
- [10] Sole A, Grossetête S, Heintzé M, Babin L, Zaïdi S, Revy P, Renouf B, De Cian A, Giovannangeli C, Pierre-Eugène C, Janoueix-Lerosey I, Couronné L, Kaltenbach S, Tomishima M, Jasin M, Grünewald TGP, Delattre O, Surdez D, Brunet E. Unraveling Ewing sarcoma tumorigenesis originating from patient-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2021; 81(19): 4994-5006.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3837.
- [11] El Beaino M, Liu J, Wasylshen AR, Pourebrahim R, Migut A, Bessellieu BJ, Huang K, Lin PP. Loss of Stag2 cooperates with EWS-FLI1 to transform murine Mesenchymal stem cells. *BMC Cancer* 2020; 20(1): 3.
doi: 10.1186/s12885-019-6465-8.
- [12] Fadul J, Bell R, Hoffman LM, Beckerle MC, Engel ME, Lessnick SL. EWS/FLI utilizes NKX2-2 to repress mesenchymal features of Ewing sarcoma. *Genes Cancer* 2015; 6(3-4): 129-43.
doi: 10.18632/genesandcancer.57.
- [13] Collini P, Mezzelani A, Modena P, Dagrada P, Tamborini E, Luksch R, Gronchi A, Navarria P, Sozzi G, Pilotti S. Evidence of neural differentiation in a case of post-therapy primitive neuroectodermal tumor/Ewing sarcoma of bone. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(8):1161-6.
doi: 10.1097/00000478-200308000-00016.
- [14] Franchi A, Pasquinelli G, Cenacchi G, Della Rocca C, Gambini C, Bisceglia M, Martinelli GN, Santucci M. Immunohistochemical and ultrastructural investigation of neural differentiation in Ewing sarcoma/PNET of bone and soft tissues. *Ultrastruct Pathol* 2001; 25(3): 219-25.

- [15] Weissferdt A, Kalhor N, Moran CA. Ewing sarcoma with extensive neural differentiation: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of three cases. *Am J Clin Pathol* 2015; 143(5): 659-64. doi: 10.1309/AJCPFHFX07JFCRGU.
- [16] Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 2004; 64(22): 8213-21.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-4059.
- [17] Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 1987; 127(3): 507-18.
- [18] Lizard-Nacol S, Lizard G, Justrabo E, Turc-Carel C. Immunologic characterization of Ewing's sarcoma using mesenchymal and neural markers. *Am J Pathol* 1989; 135(5): 847-55.
- [19] Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2004; 64(4): 1266-77.
doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3274.
- [20] Baliko F, Bright T, Poon R, Cohen B, Egan SE, Alman BA. Inhibition of notch signaling induces neural differentiation in Ewing sarcoma. *Am J Pathol* 2007; 170(5): 1686-94.
doi: 10.2353/ajpath.2007.060971.
- [21] Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120(3): 668-80.
doi: 10.1172/JCI36667.

- [22] Ventura S, Aryee DN, Felicetti F, De Feo A, Mancarella C, Manara MC, Picci P, Colombo MP, Kovar H, Carè A, Scotlandi K. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF- κ B signaling. *Oncogene* 2016; 35(30): 3944-54. doi: 10.1038/onc.2015.463.
- [23] De Feo A, Sciandra M, Ferracin M, Felicetti F, Astolfi A, Pignochino Y, Picci P, Carè A, Scotlandi K. Exosomes from CD99-deprived Ewing sarcoma cells reverse tumor malignancy by inhibiting cell migration and promoting neural differentiation. *Cell Death Dis* 2019; 10(7): 471.
doi: 10.1038/s41419-019-1675-1.
- [24] von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, Hsu JH, Lawlor ER. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One* 2011; 6(4): e19305.
doi: 10.1371/journal.pone.0019305.
- [25] García-García L, Fernández-Tabanera E, Cervera ST, Melero-Fernández de Mera RM, Josa S, González-González L, Rodríguez-Martín C, Grünewald TGP, Alonso J. The transcription factor FEZF1, a direct target of EWSR1-FLI1 in Ewing sarcoma cells, regulates the expression of neural-specific genes. *Cancers (Basel)* 2021; 13(22): 5668.
doi: 10.3390/cancers13225668.
- [26] Scannell CA, Pedersen EA, Mosher JT, Krook MA, Nicholls LA, Wilky BA, Loeb DM, Lawlor ER. LGR5 is expressed by Ewing sarcoma and potentiates Wnt/ β -catenin signaling. *Front Oncol* 2013; 3:81.
doi: 10.3389/fonc.2013.00081.
- [27] Zhou Z, Yu L, Kleinerman ES. EWS-FLI-1 regulates the neuronal repressor gene REST, which controls Ewing sarcoma growth and vascular morphology. *Cancer* 2014; 120(4): 579-88.
doi: 10.1002/cncr.28555.

- [28] Souza BK, da Costa Lopez PL, Menegotto PR, Vieira IA, Kersting N, Abujamra AL, Brunetto AT, Brunetto AL, Gregianin L, de Farias CB, Thiele CJ, Roesler R. Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma. *Mol Neurobiol* 2018; 55(9): 7242-58.
doi: 10.1007/s12035-018-0874-6.
- [29] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; 17(3): 313-9.
doi: 10.1038/nm.2304. PMID: 21386835.
- [30] Ebben JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Kuo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(6): 621-32.
doi: 10.1517/14712598.2010.485186.
- [31] Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 275-91.
doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- [32] Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501(7467): 328-37.
doi: 10.1038/nature12624.
- [33] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730-7.
doi: 10.1038/nm0797-730.
- [34] Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 738-43.
doi: 10.1038/ni1080.

- [35] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464): 645-8.
- doi: 10.1038/367645a0.
- [36] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7): 3983-8.
- doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- [37] Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer* 2010; 103(4): 439-45.
- doi: 10.1038/sj.bjc.6605821.
- [38] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445(7123): 111-5.
- doi: 10.1038/nature05384.
- [39] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821-8.
- [40] Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, Hayashi Y. Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. *J Pediatr Surg* 2007; 42(12): 2040-5.
- doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.08.026.
- [41] Suvà ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, Suvà D, Clément V, Provero P, Cironi L, Osterheld MC, Guillou L, Stamenkovic I. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1776-81.
- doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2242.

- [42] Hotfilder M, Mallela N, Seggewiß J, Dirksen U, Korsching E. Defining a characteristic gene expression set responsible for cancer stem cell-like features in a sub-population of Ewing sarcoma cells CADO-ES1. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12): 3908.
doi: 10.3390/ijms19123908.
- [43] Riggi N, Suvà ML, De Vito C, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Cironi L, Janiszewska M, Petricevic T, Suvà D, Tercier S, Joseph JM, Guillou L, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* 2010; 24(9): 916-32.
doi: 10.1101/gad.1899710.
- [44] De Vito C, Riggi N, Cornaz S, Suvà ML, Baumer K, Provero P, Stamenkovic I. A. TARBP2-dependent miRNA expression profile underlies cancer stem cell properties and provides candidate therapeutic reagents in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2012; 21(6): 807-21.
doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.023.
- [45] Guzel Tanoglu E, Ozturk S. miR-145 suppresses epithelial-mesenchymal transition by targeting stem cells in Ewing sarcoma cells. *Bratisl Lek Listy* 2021; 122(1): 71-7.
doi: 10.4149/BLL_2021_009.
- [46] Cornaz-Buros S, Riggi N, DeVito C, Sarre A, Letovanec I, Provero P, Stamenkovic I. Targeting cancer stem-like cells as an approach to defeating cellular heterogeneity in Ewing sarcoma. *Cancer Res* 2014; 74(22): 6610-22.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1106.
- [47] Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, Souza BK, Rivero LF, Becker RG, Gregianin LJ, Brunetto AL, Brunetto AT, de Farias CB, Roesler R. Trk inhibition reduces cell proliferation and

- potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 2016; 7(23): 34860-80.
- doi: 10.18632/oncotarget.8992.
- [48] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(8): 872-7.
- doi: 10.1177/0091270005276905.
- [49] Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci* 2019; 234: 116781.
- doi: 10.1016/j.lfs.2019.116781.
- [50] Doherty MR, Smigiel JM, Junk DJ, Jackson MW. Cancer stem cell plasticity drives therapeutic resistance. *Cancers (Basel)* 2016; 8(1): 8.
- doi: 10.3390/cancers8010008.
- [51] Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells* 2015; 7(1): 27-36.
- doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.27.
- [52] Das PK, Pillai S, Rakib MA, Khanam JA, Gopalan V, Lam AKY, Islam F. Plasticity of cancer stem cell: origin and role in disease progression and therapy resistance. *Stem Cell Rev Rep* 2020; 16(2): 397-412.
- doi: 10.1007/s12015-019-09942-y.
- [53] Awad O, Yustein JT, Shah P, Gul N, Katuri V, O'Neill A, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Loeb DM. High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS One* 2010; 5(11): e13943.
- doi: 10.1371/journal.pone.0013943.

- [54] Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol* 2009; 34(5): 1381-6.
doi: 10.3892/ijo_00000265.
- [55] Yang M, Zhang R, Yan M, Ye Z, Liang W, Luo Z. Detection and characterization of side population in Ewing's sarcoma SK-ES-1 cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1): 1062-6.
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.020.
- [56] Jiang X, Gwye Y, Russell D, Cao C, Douglas D, Hung L, Kovar H, Triche TJ, Lawlor ER. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer* 2010; 10:116.
doi: 10.1186/1471-2407-10-116.
- [57] Moore JB 4th, Loeb DM, Hong KU, Sorensen PH, Triche TJ, Lee DW, Barbato MI, Arceci RJ. Epigenetic reprogramming and re-differentiation of a Ewing sarcoma cell line. *Front Cell Dev Biol* 2015; 3:15.
doi: 10.3389/fcell.2015.00015.
- [58] Honoki K. Do stem-like cells play a role in drug resistance of sarcomas? *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10(2): 261-70.
doi: 10.1586/era.09.184.
- [59] Dasgupta A, Trucco M, Rainusso N, Bernardi RJ, Shuck R, Kurenbekova L, Loeb DM, Yustein JT. Metabolic modulation of Ewing sarcoma cells inhibits tumor growth and stem cell properties. *Oncotarget*. 2017; 8(44): 77292-308.
doi: 10.18632/oncotarget.20467.
- [60] Wilky BA, Kim C, McCarty G, Montgomery EA, Kammers K, DeVine LR, Cole RN, Raman V, Loeb DM. RNA helicase DDX3: a novel therapeutic target in Ewing sarcoma. *Oncogene* 2016; 35(20): 2574-83.

doi: 10.1038/onc.2015.336.

[61] Attia S, Bolejack V, Ganjoo KN, George S, Agulnik M, Rushing DA, Loggers ET, Livingston MB, Wright JA, Chawla SP, Okuno SH, Reinke DK, Riedel RF, Davis LE, Ryan CW, Maki RG. A phase II trial of regorafenib (REGO) in patients (pts) with advanced Ewing sarcoma and related tumors (EWS) of soft tissue and bone: SARC024 trial results. *J Clin Oncol* 2017; 35(15_suppl): 11005.

[62] Choy E, Butrynski JE, Harmon DC, Morgan JA, George S, Wagner AJ, D'Adamo D, Cote GM, Flamand Y, Benes CH, Haber DA, Baselga JM, Demetri GD. Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy. *BMC Cancer* 2014; 14: 813.

doi: 10.1186/1471-2407-14-813.

[63] Fleuren ED, Roeffen MH, Leenders WP, Flucke UE, Vlenterie M, Schreuder HW, Boerman OC, van der Graaf WT, Versleijen-Jonkers YM. Expression and clinical relevance of MET and ALK in Ewing sarcomas. *Int J Cancer* 2013; 133(2): 427-36.

doi: 10.1002/ijc.28047.

[64] Italiano A, Mir O, Mathoulin-Pelissier S, Penel N, Piperno-Neumann S, Bompas E, Chevreau C, Duffaud F, Entz-Werlé N, Saada E, Ray-Coquard I, Lervat C, Gaspar N, Marec-Berard P, Pacquement H, Wright J, Toulmonde M, Bessede A, Crombe A (...) Blay JY. Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): A multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020; 21(3): 446-455.

doi: 10.1016/S1470-2045(19)30825-3.

[65] Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, Reid JM, Schmechel S, Voss SD, Cho SY, Chen HX, Krailo MD, Adamson PC, Blaney SM. Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012; 30(3): 256-62.

doi: 10.1200/JCO.2011.37.4355.

- [66] Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong DS, Anderson P, Benjamin RS, Ludwig J, Chen HX, Doyle LA, Kurzrock R. Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res* 2012; 18(9): 2625-31.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0061.

- [67] Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A, Krailo MD, Weigel B, DuBois SG, Doyle LA, Chen H, Blaney SM. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(3): 440-4.

doi: 10.1002/pbc.25334.

- [68] Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, Zhang Z, Lapouble E, Grossetête-Lalami S, Rusch M, Reynaud S, Rio-Frio T, Hedlund E, Wu G, Chen X, Pierron G, Oberlin O, Zaidi S, Lemmon G, Gupta P (...) St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project and the International Cancer Genome Consortium. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov* 2014; 4(11): 1342-53.

doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0622.

- [69] Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS, Macedo CD, Boldrini E, Costa C, Almeida MT, Kirst D, Rodriguez-Galindo C, Pereira WV, Watanabe FM, Pizza M, Benites E, Morais V, Gadelha A, Nakasato A, Abujamra AL, Gregianin LJ; Brazilian Collaborative On behalf of the Brazilian Collaborative Study Group of Ewing Family of Tumors EWING1 and the Brazilian Society of Pediatric Oncology SOBOPE. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(10): 1747-53.

doi: 10.1002/pbc.25562.

- [70] Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Bérard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. Ewing sarcoma: current management and future approaches through collaboration. *J Clin Oncol* 2015; 33(27): 3036-46.

doi: 10.1200/JCO.2014.59.5256.

- [71] Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003; 348(8): 694-701.

doi: 10.1056/NEJMoa020890.

- [72] Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30(6): 425-30.

doi: 10.1097/MPH.0b013e31816e22f3.

- [73] Chen Y, Hesla AC, Lin Y, Ghaderi M, Liu M, Yang C, Zhang Y, Tsagkozis P, Larsson O, Haglund F. Transcriptome profiling of Ewing sarcomas - treatment resistance pathways and IGF-dependency. *Mol Oncol* 2020; 14(5): 1101-17.

doi: 10.1002/1878-0261.12655.

- [74] Horbach L, Sinigaglia M, Da Silva CA, Olguins DB, Gregianin LJ, Brunetto AL, Brunetto AT, Roesler R, De Farias CB. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Mol Clin Oncol* 2018; 8(6): 719-24.

doi: 10.3892/mco.2018.1608.

- [75] Iida K, Fukushi J, Matsumoto Y, Oda Y, Takahashi Y, Fujiwara T, Fujiwara-Okada Y, Hatano M, Nabashima A, Kamura S, Iwamoto Y. miR-125b develops chemoresistance in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 21.
doi: 10.1186/1475-2867-13-21.
- [76] Ribeiro-Dantas MDC, Oliveira Imparato D, Dalmolin MGS, de Farias CB, Brunetto AT, da Cunha Jaeger M, Roesler R, Sinigaglia M, Siqueira Dalmolin RJ. Reverse engineering of Ewing sarcoma regulatory network uncovers PAX7 and RUNX3 as master regulators associated with good prognosis. *Cancers (Basel)* 2021; 13(8): 1860.
doi: 10.3390/cancers13081860.
- [77] Santoro M, Menegaz BA, Lamhamedi-Cherradi SE, Molina ER, Wu D, Priebe W, Ludwig JA, Mikos AG. Modeling stroma-induced drug resistance in a tissue-engineered tumor model of Ewing sarcoma. *Tissue Eng Part A* 2017; 23(1-2): 80-9.
doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0369.
- [78] Serra M, Hattinger CM, Pasello M, Casotti C, Fantoni L, Riganti C, Manara MC. Impact of ABC transporters in osteosarcoma and Ewing's sarcoma: which are involved in chemoresistance and which are not? *Cells* 2021; 10(9): 2461.
doi: 10.3390/cells10092461.
- [79] Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, Abaan OD, Chou TH, Dakshanamurthy S, Brown ML, Uren A, Toretsky JA. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* 2009; 15(7): 750-6.
doi: 10.1038/nm.1983.
- [80] Pishas KI, Lessnick SL. Recent advances in targeted therapy for Ewing sarcoma. *F1000Res* 2016; 5: F1000 Faculty Rev-2077.

doi: 10.12688/f1000research.8631.1.

- [81] Subbiah V, Anderson P. Targeted therapy of Ewing's sarcoma. *Sarcoma*. 2011; 2011: 686985.

doi: 10.1155/2011/686985.

- [82] Amin HM, Morani AC, Daw NC, Lamhamedi-Cherradi SE, Subbiah V, Menegaz BA, Vishwamitra D, Eskandari G, George B, Benjamin RS, Patel S, Song J, Lazar AJ, Wang WL, Kurzrock R, Pappo A, Anderson PM, Schwartz GK, Araujo D, Cuglievan B, Ratan R, McCall D, Mohiuddin S, Livingston JA, Molina ER, Naing A, Ludwig JA. IGF-1R/mTOR targeted therapy for Ewing sarcoma: a meta-analysis of five IGF-1R-related trials matched to proteomic and radiologic predictive biomarkers. *Cancers (Basel)* 2020; 12(7): 1768.

doi: 10.3390/cancers12071768.

- [83] Jin W. The role of tyrosine kinases as a critical prognostic parameter and its targeted therapies in Ewing sarcoma. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 613.

doi: 10.3389/fcell.2020.00613.

- [84] Kersting N, Kunzler Souza B, Araujo Vieira I, Pereira Dos Santos R, Brufatto Olguins D, Gregianin LJ, Tesainer Brunetto A, Lunardi Brunetto A, Roesler R, Brunetto de Farias C, Schwartsmann G. Epidermal growth factor receptor regulation of Ewing sarcoma cell function. *Oncology* 2018; 94(6): 383-93.

doi: 10.1159/000487143.

- [85] Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S, Benjamin R, Eckhardt SG, Eid JE, Greig G, Habben K, McCarthy CD, Gore L. A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(8): 2458-65.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3220.

- [86] Lamhamedi-Cherradi SE, Menegaz BA, Ramamoorthy V, Vishwamitra D, Wang Y, Maywald RL, Buford AS, Fokt I, Skora S, Wang J, Naing A, Lazar AJ, Rohren EM, Daw NC, Subbiah V, Benjamin RS, Ratan R, Priebe W, Mikos AG, Amin HM, Ludwig JA. IGF-1R and mTOR blockade: novel resistance mechanisms and synergistic drug combinations for Ewing sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108(12): djw182.
doi: 10.1093/jnci/djw182.
- [87] Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, Okuno SH, Schuetze SM, Paccagnella ML, Batzel GN, Yin D, Pritchard-Jones K, Judson I, Worden FP, Gualberto A, Scurr M, de Bono JS, Haluska P. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 129-35.
doi: 10.1016/S1470-2045(09)70354-7.
- [88] Ma Y, Baltezor M, Rajewski L, Crow J, Samuel G, Staggs VS, Chastain KM, Toretsky JA, Weir SJ, Godwin AK. Targeted inhibition of histone deacetylase leads to suppression of Ewing sarcoma tumor growth through an unappreciated EWS-FLI1/HDAC3/HSP90 signaling axis. *J Mol Med (Berl)* 2019; 97(7): 957-72.
doi: 10.1007/s00109-019-01782-0.
- [89] Nacev BA, Jones KB, Intlekofer AM, Yu JSE, Allis CD, Tap WD, Ladanyi M, Nielsen TO. The epigenomics of sarcoma. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(10): 608-23.
doi: 10.1038/s41568-020-0288-4.
- [90] Sheffield NC, Pierron G, Klughammer J, Datlinger P, Schönegger A, Schuster M, Hadler J, Surdez D, Guillemot D, Lapouble E, Freneaux P, Champigneulle J, Bouvier R, Walder D, Ambros IM, Hutter C, Sorz E, Amaral AT, de Álava E, Schallmoser K, Strunk D, Rinner B, Liegl-Atzwanger B, Huppertz B, Leithner A, de Pinieux G, Terrier P, Laurence V, Michon J, Ladenstein R, Holter W,

Windhager R, Dirksen U, Ambros PF, Delattre O, Kovar H, Bock C, Tomazou EM. DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat Med* 2017; 23(3): 386-95.

doi: 10.1038/nm.4273.

- [91] Dalal S, Berry AM, Cullinane CJ, Mangham DC, Grimer R, Lewis IJ, Johnston C, Laurence V, Burchill SA. Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res* 2005; 11(6): 2364-78.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1201.

- [92] Hatina J, Kripnerova M, Houfkova K, Pesta M, Kuncova J, Sana J, Slaby O, Rodríguez R. Sarcoma stem cell heterogeneity *Adv Exp Med Biol* 2019; 1123: 95-118.

doi: 10.1007/978-3-030-11096-3_7.

- [93] Leuchte K, Altvater B, Hoffschlag S, Potratz J, Meltzer J, Clemens D, Luecke A, Harges J, Dirksen U, Juergens H, Kailayangiri S, Rossig C. Anchorage-independent growth of Ewing sarcoma cells under serum-free conditions is not associated with stem-cell like phenotype and function. *Oncol Rep* 2014; 32(2): 845-52.

doi: 10.3892/or.2014.3269.

- [94] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010; 120(1): 41-50.

doi: 10.1172/JCI41004.

- [95] Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 2007; 21(14): 3777-85.

doi: 10.1096/fj.07-8560rev.

- [96] Todorova R. Ewing's sarcoma cancer stem cell targeted therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014; 9(1): 46-62.

doi: 10.2174/1574888x08666131203123125.

- [97] Aynaud MM, Mirabeau O, Gruel N, Grossetête S, Boeva V, Durand S, Surdez D, Saulnier O, Zaïdi S, Gribkova S, Fouché A, Kairov U, Raynal V, Tirode F, Grünewald TGP, Bohec M, Baulande S, Janoueix-Lerosey I, Vert JP, Barillot E, Delattre O, Zinovyev A. Transcriptional programs define intratumoral heterogeneity of Ewing sarcoma at single-cell resolution. *Cell Rep* 2020; 30(6): 1767-79.e6.

doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.049.

- [98] Salguero-Aranda C, Amaral AT, Olmedo-Pelayo J, Diaz-Martin J, Álava E. Breakthrough technologies reshape the Ewing sarcoma molecular landscape. *Cells* 2020; 9(4): 804.

doi: 10.3390/cells9040804.

Table (1). Evidence for a role of CSCs in resistance to cytotoxic chemotherapy and targeted therapy in ES.

Experimental model	Main findings	Reference
ES cells from primary tumors grown as tumorspheres	Increased resistance to doxorubicin when compared to non-CSC bulk tumor ES cells in experiments measuring cell proliferation with an MTT assay	[46]

Subpopulations of cells from TC71, A4357, MHH-ES, and SK-ES-1 cell cultures displaying high ALDH expression, stem cell properties, and enrichment of stem cell genes	Increased resistance to doxorubicin and etoposide in a cell counting assay	[53]
HTB166 ES cells from tumorspheres, displaying stem cell features and enrichment of stem cell genes	Marked resistance to doxorubicin and cisplatin in a cell viability assay using MTS colorimetric assay	[54]
Side population of cells isolated from SK-ES-1 ES cultures displaying high self-renewal, clonogenicity, and invasiveness	Resistance to doxorubicin and cisplatin measured by an MTT assay accompanied by upregulation of ABC transporters	[55]
CD133+ subpopulation of STA-ET-8.2 ES cells	Increased resistance to doxorubicin, etoposide and vincristine alone or in combination in assays measuring cell viability by cell counting	[56]
CHLA-10 metastatic ES cells reprogrammed for pluripotency induction to generate cells with an iPS phenotype (ES-iPS cells)	Increased resistance to resistance to EWS/FLI1 inhibitors YK-4-279 and mithramycin, as well as to ERK1/2 inhibitor U-0126, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibitor rapamycin, and PI3K inhibitor LY294002, in experiments measuring cell viability assay with an MTT assay	[57]

ABBREVIATIONS: ABC, ATP binding cassette protein; ALDH, aldehyde dehydrogenase; CSC, cancer stem cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ES, Ewing sarcoma; iPS, induced pluripotent stem cell; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-

2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PI3K, phosphoinositide 3-kinase.

Table (2). Strategies to counteract CSC-mediated chemoresistance in ES.

Experimental model	Main findings	Reference
ES xenografts from primary tumors containing CD133+ ES CSCs resistant to doxorubicin	Reduction of tumor growth in ES xenografts from primary tumors containing CD133+ ES CSCs resistant to doxorubicin, by the fluoroquinolone antimicrobial enoxacin either alone or combined with doxorubicin	[46]
Chemoresistant ES CSC subpopulations from ES cell line cultures displaying high ALDH expression	Effective reduction of resistance to doxorubicin by treatment with the ABC inhibitor verapamil	[53]
Chemoresistant ES cells displaying stem cell features and enrichment of stem cell genes, obtained from HTB166 tumorspheres,	Caffeine, likely acting as a DNA repair inhibitor, resensitizes ES CSCs to doxorubicin and cisplatin, and caffeine, a DNA repair inhibitor, enhanced the efficacy of those drugs, suggesting that the drug resistance in sarcosphere cells was partly related to the efficient DNA repair ability.	[54]
CHLA-10 metastatic ES cells reprogrammed for pluripotency to generate cells with an iPS phenotype (ES-iPS cells)	Re-differentiation restores sensitivity to ERK1/2 inhibitor U-0126, mTORC1 inhibitor rapamycin, and PI3K inhibitor LY294002	[57]

Tumorspheres from ES MHH and TC71 cells	Treatment with 2DG impairs tumorsphere formation and also potentiates the effect of both doxorubicin and of a targeted agent, the PARP inhibitor talazoparib (BMN-673), in MHH ES cells resistant to these agents	[59]
ES CSCs with high ALDH expression from MHH-ES and TC71 ES cell cultures	Reduction of resistance to doxorubicin and etoposide in ES CSCs with high ALDH expression, but not in non-malignant cells, by treatment with the small molecule DDX3 inhibitor RK-33	[60]

ABBREVIATIONS: 2DG, 2-deoxy-D-glucose; ABC, ATP binding cassette protein; ALDH, aldehyde dehydrogenase; CSC, cancer stem cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ES, Ewing sarcoma; iPS, induced pluripotent stem cell; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase.

Table (3). Selected ongoing clinical studies investigating drug treatments including patients with of refractory ES.

Study title	Conditions	Interventions	URL
TK216 in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma	Ewing sarcoma	TK216	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02657005

<p>Cabozantinib with topotecan-cyclophosphamide</p>	<p>Relapsed sarcoma Ewing Refractory sarcoma Ewing Relapsed osteosarcoma Refractory osteosarcoma</p>	<p>Cabozantinib Topotecan Cyclophosphamide Myeloid growth factor</p>	<p>https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04661852</p>
<p>Clinical Trial of SP-2577 (seclidemstat) in patients With relapsed or refractory Ewing or Ewing-related sarcomas</p>	<p>Ewing sarcoma Myxoid liposarcoma Sarcoma, soft tissue Desmoplastic small round cell tumor Extraskeletal myxoid chondrosarcoma Angiomatoid fibrous histiocytoma Clear cell sarcoma Primary pulmonary myxoid sarcoma Myoepithelial tumor Sclerosing epithelioid fibrosarcoma Fibromyxoid tumor</p>	<p>Seclidemstat Cyclophosphamide Topotecan</p>	<p>https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03600649</p>
<p>Nab-paclitaxel and gemcitabine for recurrent/refr</p>	<p>Osteosarcoma Ewing sarcoma rhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma</p>	<p>nab-Paclitaxel Gemcitabine</p>	<p>https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02945800</p>

actory sarcoma			
Dose escalation study of CLR 131 in children, adolescents, and young adults with relapsed or refractory malignant tumors including but not limited to neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, Ewings sarcoma, and osteosarcoma	Pediatric solid tumor Pediatric lymphoma Pediatric brain tumor Difuse intrinsic pontine glioma Neuroblastoma Ewing sarcoma Rhabdomyosarcoma Osteosarcoma	Drug: CLR 131	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03478462
Study of palbociclib combined with chemotherapy In pediatric patients with recurrent/refractory solid tumors	Ewing sarcoma Solid tumors Rhabdoid tumor Rhabdomyosarcoma Neuroblastoma Medulloblastoma Diffuse intrinsic pontine glioma	Palbociclib Temozolomide Irinotecan Topotecan Cyclophosphamide	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03709680

<p>Elimusertib for the treatment of relapsed or refractory solid tumors</p>	<p>Recurrent alveolar rhabdomyosarcoma</p> <p>Recurrent Ewing sarcoma</p> <p>Recurrent lymphoma</p> <p>Recurrent malignant solid neoplasm</p> <p>Refractory alveolar rhabdomyosarcoma</p> <p>Refractory Ewing sarcoma</p> <p>Refractory lymphoma</p> <p>Refractory malignant solid neoplasm</p>	<p>Elimusertib</p>	<p>https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05071209</p>
---	---	--------------------	--

<p>Tegavivint for the treatment of recurrent or refractory solid tumors, including lymphomas and desmoid tumors</p>	<p>Colorectal carcinoma Endometrial carcinoma Melanoma Neuroblastoma Ovarian carcinoma Pancreatic ductal adenocarcinoma Recurrent desmoid fibromatosis Recurrent Ewing sarcoma Recurrent hepatoblastoma Recurrent hepatocellular carcinoma Recurrent malignant solid neoplasm Recurrent non-Hodgkin lymphoma Recurrent osteosarcoma Refractory desmoid fibromatosis Refractory Ewing sarcoma Refractory hepatoblastoma Refractory hepatocellular carcinoma</p>	<p>Tegavivin</p>	<p>https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04851119</p>
---	--	------------------	--

	<p>Refractory malignant solid neoplasm</p> <p>Refractory non-Hodgkin lymphoma</p> <p>Refractory osteosarcoma</p> <p>Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas</p> <p>Wilms tumor</p>		
--	---	--	--

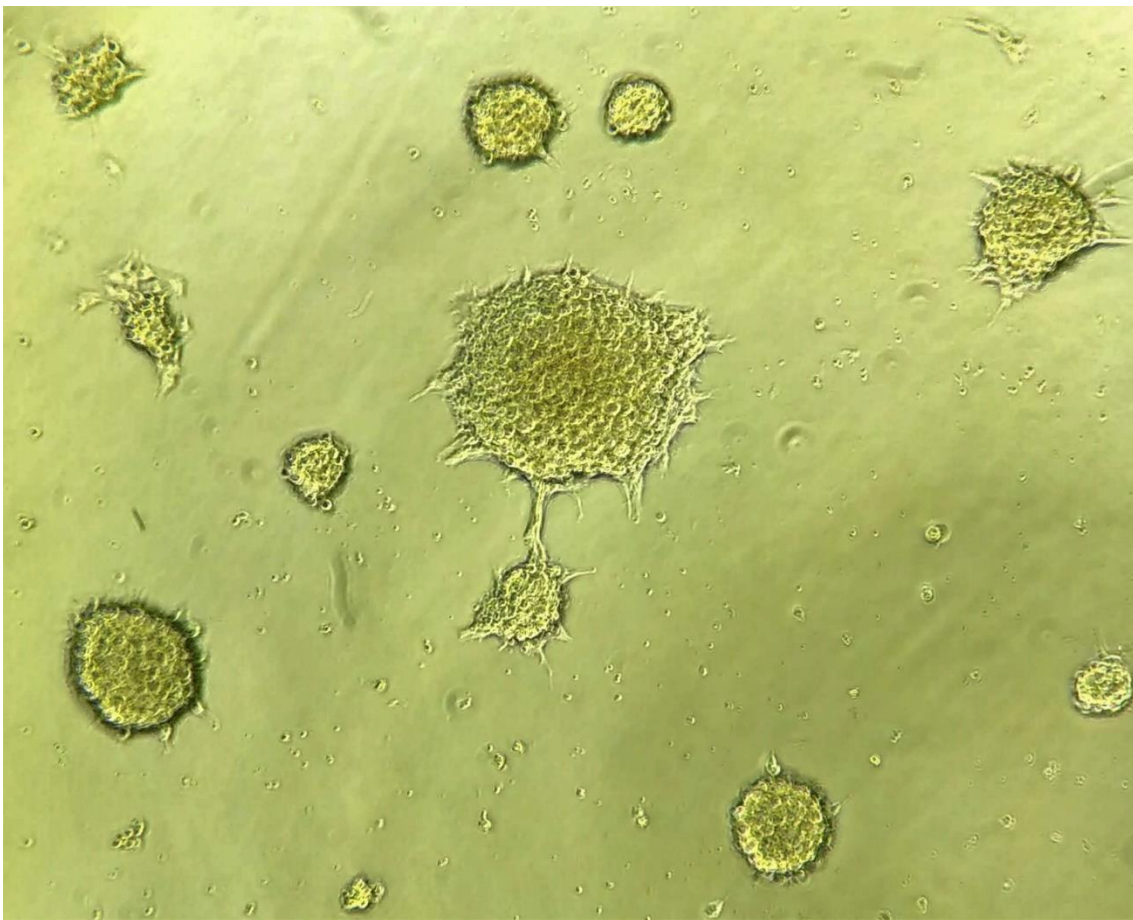
Vorinostat in combination with chemotherapy in relapsed/refractory solid tumors and CNS malignancies	Ewing sarcoma Rhabdomyosarcoma Wilms tumor Neuroblastoma Hepatoblastoma Germ cell tumor	Vorinostat	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04308330
--	--	------------	---

LEGEND FOR FIGURE 1

Fig. (1). ES CSCs enriched through tumorsphere expansion. SK-ES-1 human ES cells obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) were grown in RPMI- 1640 medium (Gibco-BTL, Carlsbad, CA, USA), containing 0.1% fungizone® (250 mg/kg; Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 4 mg/ml gentamicin and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco® by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Brazil). Cells were cultured at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO₂. Cells were dissociated with trypsin-EDTA into single cell suspension and seeded at 2×10^3 cells/well in 24-well plates. The cells were then cultured in a serum-free tumorsphere (TS)-inducing medium, containing DMEM-F12 (1:1) supplemented with 2% B27 supplement (Gibco, Invitrogen, CA, USA), 20 ng/ml recombinant human epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich, MO, USA), 20 ng/ml human leukemia inhibitor factor (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies), 10 IU/mL (5 mg/ml) heparin (Roche, Mannheim,

Germany) and antibiotics as previously described [28, 85]. The media was changed every 4 days. After 8 days, tumorspheres were dissociated with a non-enzymatic solution containing 1 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl, and re-plated in a 96-well plate with the same tumorsphere-inducing medium at a density of 1×10^3 cells per well, for evaluation of self-renewal capacity through secondary ES tumorsphere formation. Tumorspheres with at least 80 μ m were analyzed and quantified by inverted phase microscopy (Leica Microsystems, Mannheim Germany). The image illustrates the microscopic appearance (20 X magnification) of ES tumorspheres.

FIG. (1)



7. REFERÊNCIAS

1. Adriaenssens E, Vanhecke E, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer, *Cancer Res* 68(2) (2008) 346-51.
2. Al-Hajj M, Wicha MS, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3983–3988. doi:10.1073/pnas. 0530291100. (2003)
3. Amaral AT, Manara MC, et al. Characterization of human mesenchymal stem cells from ewing sarcoma patients. Pathogenetic implications. *PLoS One*, 9(2), 2014.
4. Antonescu C. Round cell sarcomas beyond Ewing: emerging entities. *Histopathology*. 2014; 64(1):26–37.
5. Ashby WJ, Zijlstra A. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integr Biol (Camb)* 4(11):1338–1350. (2016).
6. Bacci G, Balladelli A, et al. Ewing's sarcoma family tumours. Differences in clinicopathological characteristics at presentation between localised and metastatic tumours. *J Bone Joint Surg Br*, 89(9):1229–1233, 2007.
7. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol*. 2010; 11:184–192.
8. Bao B, Ahmad A, et al. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol*, 14(14):25, 2013.
9. Bedetti B et al. Local control in Ewing sarcoma of the chest wall: results of the EURO-EWING 99 trial. *Ann. Surg. Oncol*. 22, 2853–2859 (2015).
10. Boulay G et al. Cancer-specific retargeting of BAF complexes by a prion-like domain. *Cell* 171, 163–178 (2017).
11. Bradshaw RA, Pundavela J, et al. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling, *Adv Biol Regul* 58 (2015) 16-27.
12. Brierley GV, Priebe IK, et al. Serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are decreased in colorectal cancer patients, *Cancer Biomark* 13(2) (2013) 67-73.

13. Brohl AS et al. The genomic landscape of the Ewing sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLOS Genet.* 10, e1004475 (2014).
14. Brunetto AL et al. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatr. Blood Cancer* 62, 1747–1753 (2015).
15. Brunetto AL, Castillo LA, et al. Brazilian Collaborative On behalf of the Brazilian Collaborative Study Group of Ewing Family of Tumors EWING1 and the Brazilian Society of Pediatric Oncology SOBOPE. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 1747-1753.
16. Brunetto de Farias, Rosemberg DB, et al. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology.* 79(5-6):430-9, 2010.
17. Cavazzana AO, Miser JS, et al. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol*, 127:507–518, 1987.
18. Ceni C, Unsain N, et al. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220:193–221.
19. Chandhanayingyong C, Kym Y, et al. MAPK/ERK signaling in osteosarcomas, Ewing sarcomas and chondrosarcomas: therapeutic implications and future directions. *Sarcoma*, 2012:404810, 2012.
20. Chaturvedi A et al. Molecular dissection of the mechanism by which EWS/FLI expression compromises actin cytoskeletal integrity and cell adhesion in Ewing sarcoma. *Mol. Biol. Cell* 25, 2695–2709 (2014).
21. Chopin V, Lagadec, C, et al. Neurotrophin signaling in cancer stem cells *Cell. Mol. Life Sci.* 2016
22. Cidre-Aranaz F & Grünwald TGP. Ewing Sarcoma: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* 2226. 2021.
23. Cornaz-Buros S, Riggi N, et al. *Cancer Res.* 2014 Nov 15;74(22):6610-22. Epub 2014 Sep 26.
24. Cote GM & Choy E. Update in treatment and targets in Ewing sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 27(5):1007–19, 2013.

25. Crompton BD et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov.* 4, 1326–1341 (2014).
26. Curley MD, Therrien VA, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 27:2875–2883. (2009).
27. Dauphinot L, De Oliveira C, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*, 20(25):3258–3265, 2001.
28. de Alava E, Lessnick SL et al. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone (eds Fletcher, C. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W., Mertens, F.) 305–309 (IARC, Lyon, 2013).
29. De Farias, CB, Heinen TE, et al. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(2):328–32, 2012.
30. De Feo, Sciandra M, et al. Exosomes from CD99-deprived Ewing sarcoma cells reverse tumor malignancy by inhibiting cell migration and promoting neural differentiation. *Cell Death Dis.* 2019 Jun 17;10(7):471.
31. Delattre O, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359, 162–165 (1992).
32. Demir IE, Friess H, et al. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12(11) (2015) 649-59.
33. Demont Y, Corbet C, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein, *J Biol Chem* 287(3) (2012) 1923-31.
34. Dos Santos MP, De Farias CB et al. 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.* 2014 Feb;31(2):955-68.
35. Doyle LA. Sarcoma classification: an update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer* 120, 1763–1774 (2014).

36. DuBois SG et al. Comparative evaluation of local control strategies in localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 121, 467–475 (2015).
37. Eppert K, Takenaka K, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 17:1086–1093. (2011).
38. Esiashvili N, Goodman M, et al. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008; 30:425–430.
39. Ewing, J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc.* 1921; 21:17-24.
40. Eyler CE, Foo WC, et al. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells* 26(12):3027–3036. (2008).
41. Faulkner S, Jobling P, et al. Neurotrophin Receptors TrkA, p75(NTR), and Sortilin Are Increased and Targetable in Thyroid Cancer, *Am J Pathol* 188(1) (2018) 229-241.
42. Faulkner S, Roselli S, et al. ProNGF is a potential diagnostic biomarker for thyroid cancer, *Oncotarget* 7(19) (2016) 28488-97.
43. Filemon S. Dela Cruz. Cancer Stem Cells in Pediatric Sarcomas. *Front Oncol.* 2013; 3: 168.
44. Forsyth PA, Krishna N, et al. p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and c-secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem* 289(12):8067–8085.
45. Franzetti GA et al. Cell-to-cell heterogeneity of EWSR1-FLI1 activity determines proliferation/migration choices in Ewing sarcoma cells. *Oncogene* 36, 3505–3514 (2017).
46. Fraumeni JF & Glass AG. Rarity of Ewing's sarcoma among U. S. Negro children. *Lancet* 1, 366–367 (1970).
47. Gallia GL, Tyler BM, et al. Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Mol Cancer Ther* 8(2):386–393. (2009).
48. Garrido MP, Torres I, et al. Angiogenesis in Gynecological Cancers: Role of Neurotrophins. *Front Oncol.* 2019; 9:913.

49. Gaspar, N. et al. Ewing sarcoma: current management and future approaches through collaboration. *J. Clin. Oncol.* 33, 3036–3046 (2015).
50. Ghanbarzadeh M, Taheri A, et al. Molecular Structure and Response of the Brain-Derived Neurotropic Factor (BDNF) to Exercise. *Annals of Military and Health Sciences Research*: 14 (4); e59774. December 31, 2016. Review Article.
51. Gotz R, Sendtner M. Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells. *PLoS One* 9(6):e100944. (2014).
52. Gorthi A et al. EWS–FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma. *Nature* 555, 387–391 (2018).
53. Grier HE, Krailo MD, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing’s sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med.* 2003; 348:694–701.
54. Griffin N, Faulkner S, et al. Targeting neurotrophin signaling in cancer: the renaissance. 2018.
55. Grünewald TGP et al. STEAP1 is associated with the invasive and oxidative stress phenotype of Ewing tumors. *Mol. Cancer Res.* 10, 52–65 (2012).
56. Grünewald TGP et al. Ewing Sarcoma. *Nature Reviews* (2018).
57. Grünewald TGP et al. The Zyxin-related protein thyroid receptor interacting protein 6 (TRIP6) is overexpressed in Ewing’s sarcoma and promotes migration, invasion and cell growth. *Biol. Cell* 105, 535–547 (2013).
58. Hayakawa Y, Sakitani K, et al. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling, *Cancer Cell* 31(1) (2017) 21-34.
59. Heinemann M et al. Recurrence of Ewing sarcoma: is detection by imaging follow-up protocol associated with survival advantage? *Pediatr. Blood Cancer* 65, e27011 (2018).
60. Heinen TE, Santos RP, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget.* 2016; 7(23):34860-34880.

61. Hempstead BL. Deciphering proneurotrophin actions, *Handb Exp Pharmacol* 220 (2014).
62. INCA: Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2020.
63. Jawad MU, et al. Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973–2005. *Cancer* 115, 3526–3536 (2009).
64. Josephy-Hernandez S, Jmaeff S, et al. Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm, *Neurobiol Dis* 97(Pt B) (2017) 139-155.
65. Juergens C et al. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr. Blood Cancer* 47, 22–29 (2006).
66. Kam Y, Guess C et al. A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro. *BMC Cancer* 8:198 (2008).
67. Kamura S, Matsumoto Y et al. Basic fibroblast growth factor in the bone microenvironment enhances cell motility and invasion of Ewing's sarcoma family of tumours by activating the FGFR1-PI3K-Rac1 pathway. *Br J Cancer* 103(3):370–381 (2010).
68. Khotskaya YB, Holla VR, et al. Targeting TRK family proteins in cancer *Pharmacol Ther* . 2017 May;173:58-66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.006.
69. Klein R, Jing SQ, et al. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65:189–197, 1991.
70. Krook MA et al. Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma. *Mol. Cancer Res.* 12, 953–964 (2014).
71. Kupferman ME, Jiffar T, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 29(14):2047–2059. (2010).

72. Lagadec C, Meignan S, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells, *Oncogene* 28(18) (2009) 1960-70.
73. Lagares-Tena L et al. Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway. *Oncotarget* 7, 56889–56903 (2016).
74. Lamballe F, Klein R. et al. TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66: 967–979, 1991.
75. Lathia J, Liu H, et al. The Clinical Impact of Cancer Stem Cells. *Oncologist*. 2019; 2019-0517.
76. Lawn S, Krishna N, et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*, 290(6):3814–24, 2015.
77. Lei Y, Tang L, et al. Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer, *Nat Commun* 8 (2017) 15130.
78. Lessnick SL, Braun BS, et al. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10, 423–431 (1995).
79. Liebl F, Demir le, et al. The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer, *Clin Cancer Res* 19(1) (2013) 50-61.
80. Liu S, Liu C, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a metaanalysis. *PLoS One* 8:e81050. (2013).
81. Livshits Z, Rao RB, et al. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*. 2014; 32:167–203.
82. Llombart-Bosch A et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 455, 397–411 (2009).
83. Machado I et al. Review with novel markers facilitates precise categorization of 41 cases of diagnostically challenging, 'undifferentiated small round cell tumors'. A clinicopathologic, immunophenotypic and molecular analysis. *Ann. Diagn. Pathol.* 34, 1–12 (2017).

84. Magnon C, Hall SJ, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression, *Science* 341(6142) (2013) 1236361.
85. May WA et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 5752–5756 (1993).
86. Mendoza-Naranjo A et al. ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. *EMBO Mol. Med.* 5, 1087–1102 (2013).
87. Nakamura T, Grimer RJ, et al. The prognostic value of the serum level of C-reactive protein for the survival of patients with a primary sarcoma of bone. *Bone Joint J*, 95-B(3):411–418, 2013.
88. Nakatani F, Tanaka F, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem*, 278(17):15105–15115, 2003.
89. Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci* 35(4) (2012) 261-70.
90. O'Brien CA, Pollett A, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106–110. (2007).
91. O'regan S, Diebler MF, et al. A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. *J Neurochem*, 64: 69–76, 1995.
92. Odri GA et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res.* 70, 7610–7619 (2010).
93. Okugawa Y, Tanaka K, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br J Cancer* 108:121–130 (2013).
94. Ordóñez JL, Osuna D, et al. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead. *Cancer Res*, 69(18):7140–7150, 2009.
95. Pappo AS & Dirksen U. Rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma, and other round cell sarcomas. *J. Clin. Oncol.* 36, 168–179 (2018).
96. Pastrana E, Silva-Vargas V, et al. Eyes wide open: a critical review of sphere formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011; 8(5):486–498.

97. Pedersen EA et al. Activation of Wnt/ β -catenin in Ewing sarcoma cells antagonizes EWS/ETS function and promotes phenotypic transition to more metastatic cell states. *Cancer Res.* 76, 5040–5053 (2016).
98. Peschansky VJ & Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9, 3–12 (2014).
99. Peter Y. Target specificity, in vivo pharmacokinetics, and efficacy of the putative STAT3 inhibitor LY5 in osteosarcoma, Ewing's sarcoma, and rhabdomyosarcoma, *PLoS One.* 2017; 12(7): e0181885.
100. Pizzo PA. & Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* 7th edn (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2015).
101. Plaks V, Kong N, et al. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* 16:225–238. (2015).
102. Portich JP, Santos RP et al. DNA damage response in patients with pediatric Acute Lymphoid Leukemia during induction therapy. *Leuk Res* 2017 Mar;54:59-65.
103. Pundavela J, Demont Y, et al. ProNGF correlates with Gleason score and is a potential driver of nerve infiltration in prostate cancer, *Am J Pathol* 184(12) (2014) 3156-62.
104. Raciborska A et al. Vincristine, irinotecan, and temozolomide in patients with relapsed and refractory Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* 60, 1621–1625 (2013).
105. Randall RL, Lessnick SL, et al. Is there a predisposition gene for Ewing's sarcoma? *J Oncol*, 2010:397632, 2010.
106. Rasper M et al. The value of high-dose chemotherapy in patients with first relapsed Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* 61, 1382–1386 (2014).
107. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473):1545–64, 2006.(REICHARDT, 2006)
108. Ren C, Ren T, et al. Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G1/S arrest in Ewing's sarcoma through the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 Mar 11;35:44. doi: 10.1186/s13046-016-0321-3.

109. Ricci A, De Vitis C, et al. TrkB is responsible for EMT transition in malignant pleural effusions derived cultures from adenocarcinoma of the lung. *Cell Cycle* 12(11):1696–1703. (2013).
110. Richter GHS et al. G-protein coupled receptor 64 promotes invasiveness and metastasis in Ewing sarcomas through PGF and MMP1. *J. Pathol.* 230, 70–81 (2013).
111. Richter GHS, PLehm S, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuroectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13):5324–5329, 2009.
112. Riggi N, Knoechel B, et al. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2014; 26: 668-681.
113. Riggi N, Suvà ML, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*, 68:2176–2185, 2008.
114. Riggi N, Suvà ML, et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev*, 24(9):916–932, 2010.
115. Rosen GP, Nguyen HT, et al. Metabolic syndrome in pediatric cancer survivors: a mechanistic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60:1922–8.
116. Ross KA, Smyth NA, et al. The biology of Ewing sarcoma. *ISRN Oncol.* 2013; 2013:759725.
117. Ruggeri P, Farina AR, et al. The TrkAIII oncoprotein inhibits mitochondrial free radical ROS-induced death of SH-SY5Y neuroblastoma cells by augmenting SOD2 expression and activity at the mitochondria, within the context of a tumour stem cell-like phenotype. *PLoS One* 9(4):e94568.
118. Rutkowski P, Kamin'ska J, et al. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol*, 84(3):151–159, 2003.

119. Saini V, Shoemaker RH. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells. *Cancer Sci.* 2010; 101(1):16–21.
120. Saloman JL, Albers KM, et al. Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(11) (2016) 3078-83.
121. Sankar S & Lessnick SL. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet.* 204, 351–365 (2011).
122. Sannino G, Marchetto A, et al. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transition in mesenchymal tumors: a paradox in sarcomas? *Cancer Res.* 77, 4556–4561 (2017).
123. Sarabi M, Perraud A, et al. Psychoactive drugs influence brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5 levels in the serum of colorectal cancer patients, *Biomed Rep* 6(1) (2017) 89-94.
124. Schmidt BL. The neurobiology of cancer pain, *Neuroscientist* 20(5) (2014) 546-62.
125. Schuck A et al. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55, 168–177 (2003).
126. Shamberger RC et al. Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the chest wall: impact of initial versus delayed resection on tumor margins, survival, and use of radiation therapy. *Ann. Surg.* 238, 563–568 (2003).
127. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2):827–837, 2001.
128. Singh SK, Hawkins C, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401. (2004).
129. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview, *Methods Mol Biol* 846 (2012) 1-12.
130. Smit MA, Peeper DS. Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* 30(35):3735–3744.

131. Souza BK, Lopez PLC, et al. Targeting Histone Deacetylase Activity to Arrest Cell Growth and Promote Neural Differentiation in Ewing Sarcoma. 2018; 55:7242–7258.
132. Squinto SP, Stitt TN, et al. TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 65:885–893, 1991.
133. Staeger MS, Hutter C, et al. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res*. 2004; 64:8213–8221.
134. Stahl M et al. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* 57, 549–553 (2011).
135. Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* 16(4):201–218
136. Subbiah V, Kurzrock R. Ewing's sarcoma: overcoming the therapeutic plateau. *Discov Med*. 2012; 13:405–15.
137. Suh CH, Ordóñez NG, et al. Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastruct Pathol*, 26(2):67–76, 2002.
138. Suvà ML, Riggil GGI, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing sarcoma. *Cancer Res*, 69(5):1776–81, 2009.
139. Tabassum A, Khwaja F, et al. The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer* 105(1):47–52 (2013).
140. Tanaka K, Okugawa Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced tropomyosin-related kinase B (Trk B) signaling is a potential therapeutic target for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer, *PLoS One* 9(5) (2014) e96410.
141. Tang DG .Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 22:457–472. (2012).
142. Thomaz A, Pinheiro KV, et al. Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 698. Published online 2019 Jun 26.
143. Tirode F, Laud-Duval K, et al. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*, 11(5):421–9, 2007.
144. Tomellini E, Touil Y, et al. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and

- epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment *Stem Cells* 2015 Feb;33(2):342-53.
145. Toomey EC, Schiffman JD, et al. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene*. 2010; 29(32):4504–4516.
 146. Triaca V, Carito V, et al. Cancer stem cells-driven tumor growth and immune escape: the Janus face of neurotrophins. *Aging*. 2019; 8:11
 147. Vaishnavi A, Capelletti M, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer, *Nat Med* 19(11) (2013) 1469-1472.
 148. Valery PC, McWhirter W, et al. Farm exposures, parental occupation, and risk of Ewing's sarcoma in Australia: a national case-control study. *Cancer Causes Control* 13, 263–270 (2002).
 149. Von Levetzow C, Jiang X, et al. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One*, 6(4), 2011.
 150. Wang L, Bhargava R, et al. Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *J Mol Diagn JMD*, 9(4):498–509, 2007.
 151. Watson S. et al. Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *J. Pathol.* 245, 29–40 (2018).
 152. Whelan J et al. Efficacy of busulfan-melphalan high dose chemotherapy consolidation (BuMel) in localized high-risk Ewing sarcoma (ES): results of EURO-EWING 99-R2 randomized trial (EE99R2Loc). *J. Clin. Oncol.* 34, (15 Suppl.), Abstr. 11000 (2016).
 153. White B & White T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am*, 82(5):667–674, 2000.
 154. Womer RB et al. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 30, 4148–4154 (2012).
 155. Xiong J, Zhou L, et al. Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro, *Oncol Rep* 30(6) (2013) 2719-24.

156. Xiong J, Zhou L, et al. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro, *Neuro Oncol* 15(8) (2013) 990-1007.
157. Xu AJ, Fu LN, et al. MicroRNA744 inhibits tumor cell proliferation and invasion of gastric cancer via targeting brain-derived neurotrophic factor, *Mol Med Rep* 16(4) (2017) 5055-5061.
158. Yang XQ, Xu YF, et al. Clinical significance of nerve growth factor and tropomyosin-receptor-kinase signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma, *World J Gastroenterol* 20(14) (2014) 4076-84.
159. Yu X, Liu Z, et al. Nerve growth factor and its receptors on onset and diagnosis of ovarian cancer, *Oncol Lett* 14(3) (2017) 2864-2868.
160. Zambo I, Hermanova M, et al. Expression of nestin, CD133 and ABCG2 in relation to the clinical outcome in pediatric sarcomas. *Cancer Biomark*. 2016 Jun 7;17(1):107-16.
161. Zhao CM, Hayakawa Y, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis, *Sci Transl Med* 6(250) (2014) 250ra115.
162. Zhou Z, Stewart KS, et al. Bone marrow cells participate in tumor vessel formation that supports the growth of Ewing's sarcoma in the lung. *Angiogenesis* 14, 125–133 (2011).
163. Zucman-rossi J, Batzer MA, et al. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet*, 99:357–363, 1997.