

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

TESE DE DOUTORADO

**PROTEÍNAS MODIFICADORAS DA CROMATINA EM TUMORES SÓLIDOS  
PEDIÁTRICOS: INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO  
CELULAR E ATIVIDADE ONCOGÊNICA**

**BÁRBARA KUNZLER SOUZA**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael Roesler  
Coorientadora: Dra. Carol Jeanne Thiele

Porto Alegre, março de 2017



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

**PROTEÍNAS MODIFICADORAS DA CROMATINA EM TUMORES SÓLIDOS  
PEDIÁTRICOS: INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO  
CELULAR E ATIVIDADE ONCOGÊNICA**

**BÁRBARA KUNZLER SOUZA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael Roesler  
Coorientadora: Dra. Carol Jeanne Thiele

Porto Alegre, março de 2017



## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Câncer e Neurobiologia, Centro de Pesquisa Experimental no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e no *Cell and Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch at Center for Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA*, com o apoio financeiro das seguintes instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – número 303276/2013-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), PRONON/Ministério da Saúde, (número: 25000.162.034/2014-21), Centro de pesquisa Rafael Koff Acordi – Instituto do Câncer Infantil (ICI), e *National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA* (Project number: Z01 BC 010788 – *Regulation of Pediatric Embryonal Tumors – Neuroblastoma Differentiation*).



*There is only one corner of the universe you can be certain of improving, and that's your own self.*

*Aldous Huxley*



Dedico esta tese a todos que buscam o desafio de melhorar constantemente. Em especial às pessoas que sempre me inspiraram nessa busca: aos meus pais, que sempre fizeram tudo com muito amor, dedicação, respeito e ética; à minha irmã que sempre me inspirou com sua coragem, determinação e persistência; e ao meu amor, Diego, que sempre me inspirou pelo seu jeito altruísta, e por querer sempre fazer o seu melhor.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Rafael Roesler**, um grande exemplo de pesquisador e professor, que me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, que confiou a mim esse trabalho e sempre me deu total liberdade para executá-lo, e que sempre me incentivou e me deu todo o suporte para que eu pudesse realizar parte desse trabalho no exterior.

À minha coorientadora, Dra. **Carol J. Thiele**, uma brilhante pesquisadora que inspira pela sua paixão, força, dedicação e pela sua busca incansável por questionamentos, que me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, confiou no meu trabalho, e que com paciência me ajudou muito com seus valiosos ensinamentos contribuindo para o meu amadurecimento como cientista.

À **Patilu**, uma grande amiga, conselheira, e pesquisadora exemplar, que sempre me incentivou a aprender o novo, que sempre me mostrou que diferentes pontos de vista são importantes na busca do aprimoramento, que contribuiu para que eu amadurecesse como cientista e para que este trabalho tivesse este nível de qualidade.

À Dra. **Veronica Veschi**, uma pesquisadora dedicada e persistente, que me recebeu com muita simpatia, que fez com que me sentisse em casa através de seu abraço italiano, que com paciência me ensinou diversas técnicas e me aconselhou nos momentos que precisei, que contribuiu para minha formação como cientista e me deu a oportunidade de contribuir no seu projeto.

À comissão de acompanhamento, Prof. Dr. **Fábio Klamt** e Prof. Dra. **Jenifer Saffi** que acompanharam e agregaram ideias ao trabalho.

Aos secretários: **Sílvia e Luciano** (PPGBCM), **Everaldo** (CPE-HCPA), e **Fidelia** (POB-NCI), que com empenho e simpatia facilitam a realização de muitos trabalhos.



À **Carol Brunetto** e **Ana Abujamra** que me apoiaram desde o início da minha entrada no laboratório, me ensinaram a rotina do laboratório e sempre se esforçaram para adquirir os materiais para a execução deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Câncer e Neurobiologia, **Amanda P.**, **Débora P.**, **Tiago**, **Mariane**, **Rafa Santos**, **Mari Lobo**, **Danielly**, **Camila**, **Lívia**, **Kelly**, **Leonardo**, **Júlia**, **Amanda T.**, **Mirela**, **Duda**, **Sophia**, **Jéssica**, **Marianela**, **Matheus**, **Karol**, **Pietro**, agradeço os bons momentos que passamos juntos, as risadas, a ajuda e pelo trabalho em equipe.

Aos colegas e amigos do *Cell and Molecular Biology Section, POB-NCI-NIH*, **Norris**, **Deblina**, **Zhihui**, **Seiichi** e **Vivian**, agradeço pela ótima recepção, por todos ensinamentos e ajuda nos experimentos, pelos momentos de alegria e risadas no laboratório, e por me proporcionar uma experiência incrível de conhecer um pouco da cultura de cada um.

Aos laboratórios de **Medicina genômica**, **Psiquiatria**, **Terapia gênica**, **Endocrinologia**, **UAMP**, **Cardiologia**, e **Imunohistoquímica experimental** do HCPA que deram o suporte de infraestrutura necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Pâmela**, uma amiga, pessoa incrível, excelente pesquisadora, minha aluna de iniciação científica durante o doutorado, que me ensinou a ensinar, e que me auxiliou ativamente na bancada sempre com muito entusiasmo e alegria.

Aos colegas e amigos **Igor** e **Nathália**, que me ajudaram ativamente na execução dos Westerns, que fizeram meus dias e noites de experimentos mais alegres e divertidos, e que continuaram tocando meus experimentos mesmo eu estando no exterior.

À colega e amiga **Viviane**, que sempre me apoiou, incentivou, aconselhou, que mesmo longe se preocupou em saber se eu estava bem, e que tornou meus dias e noites de experimentos no laboratório muito mais agradáveis e alegres.



Aos meus amigos **Marina, Leandro, Marol, Jose, Moara e Paula** que foram como uma família para mim durante o período no exterior. Obrigada pela parceria, pelos finais de semana incríveis com muitas trilhas de *bike* (de Bethesda a Virgínia), pelo alto astral, por fazerem meus dias no NIH muito mais alegres.

Também não posso deixar de agradecer ao meu cunhado **Rodrigo** que ao longo de todos esses anos sempre me apoiou e incentivou.

À minha amada afilhada **Alice** por compreender a minha ausência por inúmeras vezes. Aos meus sogros **Eloisa e Luiz** que sempre torceram por mim, e me apoiaram ao longo desses anos.

Ao **Diego**, meu amor, amigo e companheiro, com quem compartilhei todos os momentos (de alegrias e tristezas) durante esses anos de doutorado, que sempre me apoiou, incentivou e me fez acreditar no meu potencial, que topou largar tudo pra enfrentar o desafio de morar no exterior, que nos dias mais difíceis sempre me soube me aconselhar da melhor forma, que me escutou pacientemente todas as vezes que eu vinha empolgada falando sobre meus experimentos ou sobre epigenética e que sempre me inspirou a ser uma pessoa melhor.

E por último, não menos importante, à minha família: meus pais **Ântonio e Zuleica** que me ensinaram importantes valores como ética, generosidade e respeito ao próximo, e que sempre me deram todo o amor, incentivo e apoio para que eu pudesse chegar até aqui. À minha irmã, amiga, e colega de profissão, **Carine**, que sempre me incentivou, ajudou a superar as dificuldades, e sempre me fez acreditar no meu potencial.





## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>15</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>19</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 Tumores sólidos pediátricos</b> .....	<b>22</b>
1.1.1 Sarcoma de Ewing .....	23
• Etiologia.....	23
• Histologia e anormalidades genéticas e moleculares .....	26
• Epidemiologia.....	31
• Aspectos clínicos, prognóstico e tratamento.....	31
1.1.2 Neuroblastoma.....	35
• Etiologia.....	35
• Histologia e anormalidades genéticas e moleculares .....	41
• Epidemiologia.....	45
• Aspectos clínicos e prognóstico e tratamento.....	46
<b>1.2 Células tronco tumorais</b> .....	<b>52</b>
1.2.1 Identificação de CTTs .....	54
1.2.2 Identificação de CTTs em tumores pediátricos.....	55
1.2.3 Vias de sinalização associadas às CTTs.....	56
1.2.4 Implicações Clínicas das CTTs.....	58
<b>1.3 Regulação epigenética</b> .....	<b>59</b>
1.3.1 Metilação do DNA .....	63
1.3.2 Modificações pós-traducionais em histonas .....	63
• Metilação de histonas.....	65
• Fosforilação de histonas.....	67
• Acetilação de histonas.....	67
1.3.3 Modificadores epigenéticos.....	68



• Histonas acetilases.....	68
• Histonas desacetilases.....	70
• Proteínas do grupo Polycomb (PcGs).....	74
<b>1.4 Modulação epigenética como estratégia terapêutica.....</b>	<b>77</b>
1.4.1 Inibidores de HDACs.....	77
1.4.2 Inibidores de PRC2-EZH2.....	80
<b>2. Hipótese e Objetivos.....</b>	<b>84</b>
<b>3. Manuscritos .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1 Manuscrito I – Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth, reduce pluripotency, and promote differentiation in Ewing sarcoma .....</b>	<b>87</b>
<b>3.2 Manuscrito II – Dual EZH2 and EZH1 catalytic depletion suppress tumor growth and re-establishes transcriptional activation of tumor suppressor genes in neuroblastoma .....</b>	<b>142</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>185</b>
<b>5. Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>197</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>200</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>239</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>240</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>255</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
5meC	5-metilcitosina
AKT	Proteína cinase B
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i> (Cinase de linfoma anaplásico)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (trifosfato adenosina)
ATRA	<i>All trans-retinoic</i> (ácido transretinóico)
BET	<i>bromodomains and extra-terminal domain (BET) family proteins</i> (proteínas da família de bomodomínios e domínios extra-terminais)
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento fibroblástico básico)
BMP	<i>Bone mophogenetic protein</i> (Proteína morfogênica óssea)
CaMKs	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i> (proteína cinase dependente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina)
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (monofosfato de adenosine cíclico)
CASZ1	<i>Castor zinc finger 1</i>
CBP/300	<i>CREB-binding protein</i> (proteína de ligação a CREB)
CCND1	Ciclina D1
cDNA	DNA complementar
CGIs	Ilhas de CpG
CHD5	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein</i>
CPD	<i>Cumulative Population Doubling</i>

CpG	dinucleotídeos citosina e guanina
CTCL	<i>Cutaneous T-Cell Lymphoma</i>
CTM	Células tronco mesenquimais
CTN	Células tronco neurais
CTTs	Células tronco tumorais
d	Dias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA metiltransferases
DZNep	3-deazaneplanocin A
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EZH1	Enhancer of Zeste Homolog 1
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FTSE	Família de tumores de sarcoma de Ewing
GD2	<i>disialoganglioside</i>
h	Horas
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HDI	Inibidor de histona desacetilase
HMT	Histona metiltransferase
IC50	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

INRG	The International Neuroblastoma Risk Group
LOH	<i>loss of heterozigosity</i> (perda de heterozigosidade)
MBD	Methyl-CpG-binding domain
miRNA	Micro-RNA
MLL	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1
mM	Mili molar
mRNA	RNA mensageiro
MSC	Mesenchymal stem cell
NaB	Butirato de sódio
NB	Neuroblastoma
NGF	Nerve growth factor (fator de crescimento do nervo)
NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento nervoso)
nM	Nano molar
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
NTRK1	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i> (receptor neurotrófico tirosina cinase 1)
p75NGFR	Receptor de neurotrofina p75
pb	Pares de bases
PcG	<i>Polycomb group</i>
PHOX2B	<i>Paired like homeobox 2B</i> (proteína homeobox mesodermal pareada 2B)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase

PKA	Proteína cinase A
PLC- $\gamma$	fosfolipase Cy
PNET	Tumor primitivo neuroectodérmicos
PRC1	<i>Polycomb repressive complex 1</i> (complex repressive polycomb 1)
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i> (complex repressive polycomb 2)
PRMT	<i>Protein arginine methyltransferase</i>
PSG	<i>Primary sympathetic ganglia</i> (gânglios simpáticos primitivos)
qPCR	PRC quantitativo
RAR $\beta$	Receptor do ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RNA Pol II	RNA polimerase II
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SAH	adenosil-I-homocisteína
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilanilida
SAM	S-adenosilmetionina
SE	Sarcoma de Ewing
Shh	Via de sinalização <i>Sonic hedgehog</i>
shRNA	<i>short harpin</i> RNA
siRNA	RNA de interferência
SP	<i>Side population</i>
TEM	Transição epithelial-mesenquimal
Th-MYCN hidroxilase	superexpressão de MYCN regulada pelo promotor da tirosina hidroxilase
Trk	<i>Tropomyosin receptor kinase</i> (receptor tropomiosina cinase)

TrkA	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TrkC	<i>Tropomyosin receptor kinase C</i>
TSA	Tricostatina A
TUBB3	$\beta$ -3-tubulina
VPA	Ácido valpróico
Wnt	Via de sinalização Wnt
$\mu$ M	Micro molar

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Origens de desenvolvimento de tumores sólidos pediátricos. ....	22
<b>Figura 2.</b> Origens celulares putativas para sarcoma de Ewing. ....	26
<b>Figura 3.</b> Histopatologia de sarcoma de Ewing .....	27
<b>Figura 4.</b> Esquema da formação da translocação gene de fusão <i>EWS-FLI1</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Sítios primários e metastáticos em sarcoma de Ewing .....	32
<b>Figura 6.</b> Desenvolvimento da crista neural e de neuroblastoma .....	36
<b>Figura 7.</b> Espectro de diferenciação de neuroblastoma associado ao risco, baseado na histopatologia dos tumores. ....	41
<b>Figura 8.</b> Apresentação clínica de neuroblastoma .....	47
<b>Figura 9.</b> Diferentes modelos de propagação tumoral. ....	53
<b>Figura 10.</b> Principais vias de sinalização associadas às propriedades tronco ( <i>stemness</i> ) das CTTs. ....	57
<b>Figura 11.</b> Regulação epigenética. ....	61
<b>Figura 12.</b> Regulação epigenética por modificações covalentes de histona e DNA. ....	62
<b>Figura 14.</b> Influência das modificações de histonas na atividade transcricional. ....	65
<b>Figura 15.</b> Efeito da acetilação de histonas no remodelamento da cromatina e na expressão gênica. ....	70
<b>Figura 16.</b> Esquema representativo do efeito de HDACs no núcleo e no citoplasma. ....	73
<b>Figura 17.</b> Os complexos repressivos Polycomb PRC1 e PRC2. ....	75
<b>Figura 18.</b> Efeito de HDi na regulação do crescimento, sobrevivência, apoptose e diferenciação celular .....	80
<b>Figura 19.</b> Distribuição do ciclo celular das linhagens de sarcoma de Ewing em diferentes tempos de exposição a NaB. ....	239
<b>Tabela 1.</b> Características genéticas, moleculares e celulares de linhagens de sarcoma de Ewing humano. ....	30
<b>Tabela 2.</b> Características celulares e moleculares de linhagens de neuroblastoma. ....	44



<b>Tabela 3.</b> Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma.....	49
<b>Tabela 4.</b> Marcadores específicos de CTTs para algumas neoplasias pediátricas. ...	56
<b>Tabela 5.</b> Famílias de histonas acetiltransferases .....	69
<b>Tabela 6.</b> Características moleculares dos inibidores de histona desacetilases e seus status na clínica.....	78
<b>Tabela 7.</b> Inibidores de EZH2 e seu <i>status</i> de desenvolvimento na clínica.....	81

## RESUMO

A atividade aberrante de genes que codificam enzimas modificadoras da cromatina, por consequência de mutação ou alterações na expressão gênica, tem sido frequentemente identificada como principal fator condutor para a perturbação de programas de desenvolvimento em cânceres pediátricos. No sentido de reverter esse estado epigenético aberrante, diversos inibidores utilizando como alvo enzimas modificadoras da cromatina têm sido desenvolvidos como novas estratégias para o tratamento do câncer. Neste trabalho, nós investigamos se o potente inibidor de HDAC butirato de sódio (NaB) apresenta a capacidade de reprogramar as células de sarcoma de Ewing (SE) para um estado mais diferenciado, bem como afetar seu crescimento e sobrevivência. Nós encontramos que a exposição das linhagens SK-ES 1 e RD-ES ao NaB resulta em uma potente inibição da atividade global de HDACs (1 h), bem como uma significativa redução do crescimento celular de SE (72 h). NaB também afetou o ciclo celular provocando acúmulo de G0/G1 e redução nos níveis proteicos do marcador mitótico histona 3 fosforilada em S10 (H3 phos-S10). Os efeitos mediados por NaB envolveram supressão da proliferação celular acompanhada pela expressão reduzida do transcrito oncogênico *EWS-FLI1* e de genes associados a pluripotência e sobrevivência, e a re-expressão do marcador de diferenciação neuronal  $\beta$ III-tubulina. Além disso, NaB promoveu um aumento na complexidade celular o que leva a alterações morfológicas características de crescimento neurítico. Por fim, nós observamos uma potente atividade de NaB para impedir o crescimento e a sobrevivência de tumoresferas de SE. Nossos resultados suportam o uso da inibição de HDAC como uma estratégia para impedir o crescimento e a sobrevivência celular e para reprogramar tumores de SE para um estado de diferenciação. Além disso, esses resultados corroboram com nossos estudos anteriores em que demonstraram que inibidores de HDAC podem modular o crescimento e a diferenciação de células de tumores pediátricos com putativa origem de células tronco neurais. Além deste estudo, nós caracterizamos o papel funcional da histona metiltransferase EZH2 no crescimento e diferenciação celular de

neuroblastoma (NB), utilizando intervenções farmacológica e genética. Nós demonstramos que UNC-1999, um inibidor duplo de EZH2 e EZH1, foi mais efetivo para inibir o crescimento de células de NB (7 d), em comparação aos inibidores seletivos para EZH2 (GSK-126 e GSK-343). Os mecanismos mediados por inibidores de EZH2 envolveram uma robusta redução dos níveis globais da marca repressiva H3K27me3, e a reativação transcricional dos genes supressores tumorais *CASZ1*, *NTRK1*, *RAR $\beta$*  and *CHD5*, que controlam diferenciação em NB. Além disso, experimentos *ex-vivo* demonstraram que UNC-1999 possui uma robusta capacidade de reduzir a atividade oncogênica de tumores de xenoenxerto de NB e prolongar a sobrevivência murina. Foram ainda examinados os efeitos da ablação genética crônica de EZH2 (por silenciamento gênico utilizando um shRNA constitutivo para o gene EZH2) no crescimento tumoral de NB. O efeito da ablação genética crônica de EZH2, surpreendentemente, provocou um aumento na atividade oncogênica das células de NB, seguida por uma importante progressão tumoral observada em tumores de xenoenxerto de NB. Portanto, estes resultados sugerem que o crescimento de tumores de NB provavelmente não depende apenas da função de PRC2-EZH2. Todavia, a inibição catalítica dupla de EZH2 e EZH1 demonstrou-se como uma estratégia terapêutica efetiva para suprimir o crescimento das células NB e reativar programas gênicos envolvidos na diferenciação.

**Palavras-chave:** Enzimas modificadoras da cromatina ♦ Tumores sólidos pediátricos ♦ HDACs ♦ Sarcoma de Ewing ♦ EZH2 ♦ Neuroblastoma ♦ Diferenciação celular.

## ABSTRACT

Aberrant activity of genes encoding chromatin-modifying enzymes, as a consequence of mutation or changes in gene expression, has been frequently identified as a main driver of disruption of the developmental programs in pediatric cancers. In order to reverse this aberrant epigenetic state, several inhibitors targeting chromatin-modifying enzymes have been developed as a novel strategy for the treatment of cancer. In the first section of this study, we investigated whether the potent HDAC inhibitor sodium butyrate (NaB) has ability to reprogram Ewing sarcoma (EWS) cells towards to a more differentiated state and affect their growth and survival. In this work, we found that exposure of SK-ES 1 and RD-ES cells to NaB produce a potent inhibition of global HDAC activity (1 h), as well as, a significant reduction in the growth of ES cells (72 h). NaB also affected the cell cycle inducing G0/G1 accumulation and reducing the protein levels of the mitotic marker phosphorylated histone 3 (S10) (H3 phos-S10). NaB-mediated effects involved suppression of cell proliferation accompanied by decreased expression of *EWS-FLI1* oncogenic transcript and key survival and pluripotency-associated genes, and the re-expression of the differentiation neuronal marker  $\beta$ III-tubulin. Additionally, NaB induced an increase in cellular complexity, which leads to morphological changes characteristic of neuritic growth. Finally, we observed a potent activity of NaB to prevent growth and survival of ES tumorspheres. Our results suggest that inhibition of global HDAC activity may represent an effective strategy to inhibit cell growth, and to reprogram ES cells to a differentiated state. Furthermore, these results corroborate with our previous studies in which demonstrated that HDAC inhibitors may modulate cell growth and differentiation of childhood pediatric tumors with putative neural stem cell origin. Aside this study, we characterized the functional role of the histone methyltransferase EZH2 in neuroblastoma (NB) cell growth and differentiation, using pharmacological and genetic interventions. Here, we demonstrated that UNC-1999, a dual EZH2 and EZH1 inhibitor, is more effective to inhibit NB cell growth (7 d) compared with EZH2-selective inhibitors (GSK-126 and GSK-343). The EZH2 inhibitors-mediated

mechanisms involved a robust reduction in the global level of the repressive mark H3K27me3, and the transcriptional reactivation of the tumor suppressor genes CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  and CHD5, that control differentiation in NB. In addition, *ex vivo* experiments showed that UNC-1999 has a robust ability to reduce the oncogenic activity of NB xenograft tumors and prolong murine survival. We further examined the effects of chronic EZH2 genetic ablation (by gene silencing using a constitutive shRNA targeting EZH2 gene) on NB tumor growth. The effect of chronic EZH2 genetic ablation, surprisingly, led to an increase in the oncogenic activity of NB cells, followed by a significant tumor progression observed in NB xenograft tumors. Therefore, these results suggest that NB tumor growth probably does not rely on the PRC2-EZH2 function alone. However, dual catalytic inhibition of EZH2 and EZH1 showed to be an effective therapeutic strategy for suppressing NB tumor growth and reactivating differentiation gene programs.

**Keywords:** Chromatin-modifying enzymes ♦ Pediatric solid tumors ♦ HDACs ♦ Ewing's sarcoma ♦ EZH2 ♦ Neuroblastoma ♦ Cellular differentiation

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está estruturada da seguinte maneira:

**Seção 1** – apresenta a introdução, uma fundamentação teórica relacionada a tumores sólidos pediátricos particularmente sarcoma de Ewing e neuroblastoma (alvos do estudo). Também são descritos os principais conceitos de células tronco tumorais (CTTs) abrangendo como as CTTs são identificadas em tumores sólidos pediátricos e suas implicações na clínica, além disso conceitos básicos de epigenética e a modulação de modificadores da cromatina como estratégia terapêutica para o câncer.

**Seção 2** – descreve a hipótese geral do trabalho, objetivos gerais e específicos.

**Seção 3** – consiste de dois artigos de dados experimentais: no Manuscrito I (seção 3.1) foi investigado o papel da atividade global de HDAC no crescimento, sobrevivência, pluripotência e diferenciação de células de sarcoma de Ewing, e é intitulado de *Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma*, aceito para publicação no periódico *Molecular Neurobiology*. No Manuscrito II (seção 3.2) foi avaliado o papel da histona metiltransferase EZH2 no crescimento, diferenciação celular e atividade oncogênica de neuroblastoma, e é intitulado de *Dual EZH2 and EZH1 catalytic depletion suppress tumor growth and re-establishes transcriptional activation of tumor suppressor genes in neuroblastoma*, e está em fase de preparação.

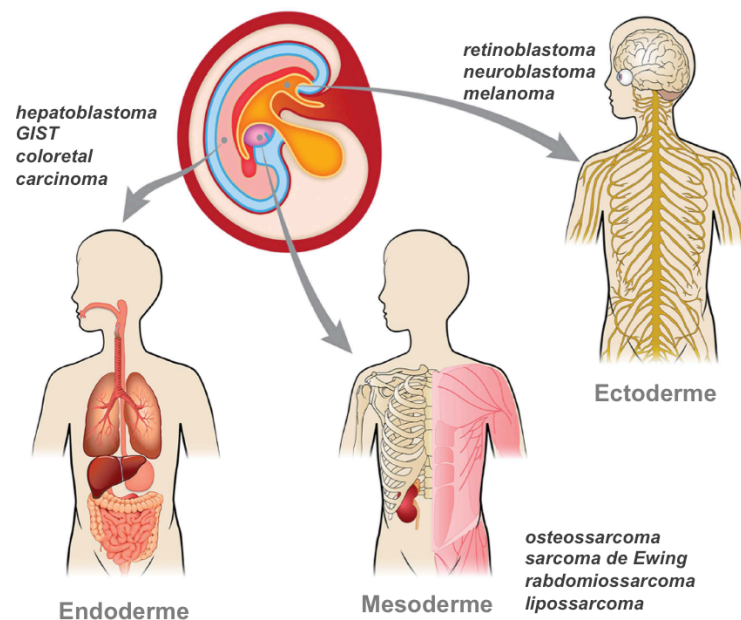
**Seção 4** – contempla a discussão dos resultados apresentados na seção 3, além de ressaltar a importância destes estudos.

**Seção 5** – apresenta as conclusões e perspectivas geradas pelos dois manuscritos, bem como as referências utilizadas na elaboração desta tese de doutorado e anexos.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tumores sólidos pediátricos

Os tumores sólidos pediátricos são considerados uma doença do desenvolvimento, pois se originam de populações celulares que não completaram o processo de diferenciação terminal durante o desenvolvimento fetal e ou pré-natal (MARIS; DENNY, 2002). Curiosamente, os tumores sólidos pediátricos são dramaticamente diversos no que diz respeito às suas origens celulares, desenvolvimento e características clínicas. E diferentemente das neoplasias hematológicas ou de tumores cerebrais, os tumores sólidos pediátricos podem surgir a partir de qualquer um dos três folhetos germinativos: mesoderme, endoderme ou ectoderme, conforme Figura 1 (CHEN; PAPPO; DYER, 2015).



**Figura 1. Origens de desenvolvimento de tumores sólidos pediátricos.** Retinoblastoma e neuroblastoma (ectoderme), rabdmiossarcoma e osteossarcoma (mesoderme), hepatoblastoma e tumores gastrointestinais estromais pediátricos (endoderme). Adaptado de (CHEN; PAPPO; DYER, 2015).

### 1.1.1 Sarcoma de Ewing

- **Etiologia**

O sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico raro, e suas células tumorais são encontradas em ossos e em tecidos moles. Esses tumores apresentam pouca ou nenhuma evidência de diferenciação, e isto está associado ao seu fenótipo altamente agressivo e metastático (BALAMUTH; WOMER, 2010). O cenário etiológico de SE, ainda, não é completamente compreendido. Porém, a oncoproteína quimérica EWS-FLI1, gerada por uma translocação cromossômica, tem sido extensivamente estudada devido a sua presença na maioria dos SE (aproximadamente 85% dos casos) (BALAMUTH; WOMER, 2010; ROSS et al., 2013). Grande parte dos estudos têm focado na identificação de genes alvos de EWS-FLI1, em que a expressão destes pode ser induzida ou reprimida.

O papel funcional da proteína quimérica em ativar e reprimir a expressão gênica é dada pela função combinada de EWS (como um ativador transcricional) e FLI1 (como o domínio de ligação ao DNA). Porém, para que essas proteínas EWS-ETS funcionem, a ação conjunta de proteínas adicionais e da maquinaria de transcrição se faz necessária, que inclui as proteínas c-Fos e c-Jun pertencentes do complexo de transcrição AP-1 (KIM; DENNY; WISDOM, 2006). As propriedades oncogênicas da proteína quimérica EWS-FLI1 têm sido implicadas na ativação de genes que regulam a proliferação, diferenciação celular e sobrevivência, tais como, *IGF1*, *NKX2*, *TOPK*, *SOX2* e *EZH2*. Em contrapartida, EWS-FLI1 pode agir na repressão de genes envolvidos na apoptose, e parada do ciclo celular que inclui *IGFBP3*, *p57Kip*, *p21*, *TGFB2* (CIRONI et al., 2008; DAUPHINOT et al., 2001; FUKUMA et al., 2003; GARCÍA-ARAGONCILLO et al., 2008; HAHM et al., 1999; KIKUCHI et al., 2007; LIN; WANG; LOZANO, 2011; NAKATANI et al., 2003; PRIEUR et al., 2004; RICHTER et al., 2009; RIGGI et al., 2010; SILIGAN et al., 2005; SMITH et al., 2006; SOLLAZZO et al., 1999; ZWERNER et al., 2008).



Análises por microarranjos identificaram mais de 1000 genes alvos de EWS-FLI1, dos quais 80% são suprimidos (TOOMEY; SCHIFFMAN; LESSNICK, 2010). Outros eventos secundários, tais como mutações em *p53*, também têm sido correlacionados com prognóstico (ICHIKAWA et al., 1994). Estudos *in vitro* utilizando linhagens de células humanas demonstraram que a expressão de EWS-FLI1 não é suficiente para promover transformação maligna, sugerindo que possivelmente haja a cooperação de mutações ou de vias paralelas relacionadas desempenhando um papel essencial na patogênese (TOOMEY; SCHIFFMAN; LESSNICK, 2010). Tais vias relacionadas incluem *p53*, INK4A, IGF-1/IGF-1R, bFGF, CD99, diversas tirosinas cinases e proteínas da via Wnt (HERRERO-MARTIN et al., 2011; ORDÓÑEZ et al., 2009). Além disso, miRNAs têm sido descritos na regulação da tumorigênese de SE. O miRNA-145 e EWS-FLI1 desempenham um mecanismo de controle recíproco na sua expressão mútua, bem como nos seus genes alvos *SOX2* e *OCT4* impactando diretamente nos processos de diferenciação e tumorigenicidade em células de SE (RIGGI et al., 2010).

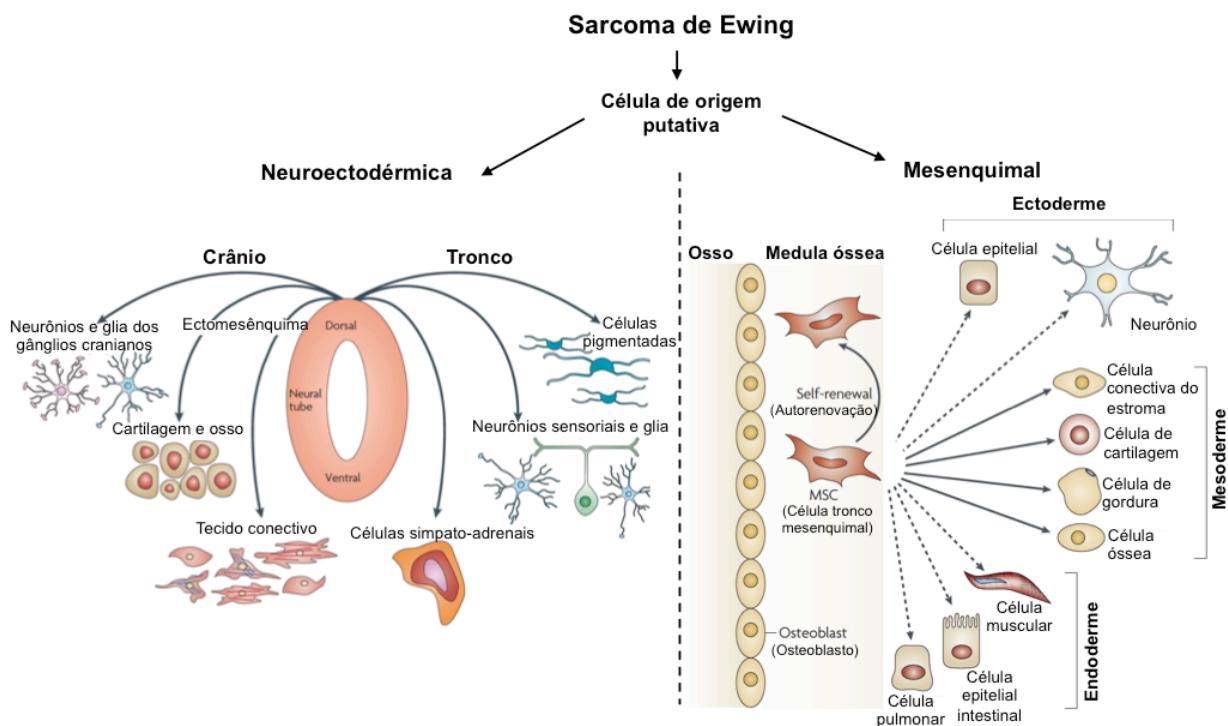
Recentemente, um novo modelo para investigar a iniciação da tumorigênese de SE, utilizando a expressão induzível de EWS-FLI1 em corpos embrionários ou em coleções de células tronco embrionárias humanas, demonstrou que a expressão da proteína de fusão produz células com propriedades de SE, incluindo características de transformação, crescimento independente de ancoragem, falta de inibição de contato celular e uma forte assinatura de expressão gênica característica de SE (GORDON; MOTWANI; PELLMAN, 2015). Com isso, na busca por terapias mais efetivas para tumores de SE, entender a complexidade da origem desses tumores de tem sido um tópico extensivamente investigado e discutido.

Até o momento não há um consenso sobre a origem celular de SE, uma vez que ambas células tronco mesenquimais (CTMs) e/ou células tronco neurais (CTNs) têm sido implicadas como células de origem. Inúmeras evidências, inicialmente, têm apontado as células de origem neuroectodérmica primitiva ou da crista neural como células precursoras de SE (CAVAZZANA et al., 1987; LIN; WANG; LOZANO, 2011; SUH et al., 2002), com base na biologia de ambos subtipos de SE (clássico) e PNET

dos quais apresentam a mesma translocação cromossômica t(11;22)(q24;q12). A expressão da proteína quimérica EWS-FLI1 induz a diferenciação neuroectodérmica e ativa a transcrição de genes associados à diferenciação neural, o que leva a hipótese de que as características neuroectodérmicas dos tumores de SE podem ser resultantes da expressão da EWS-FLI1 (HU-LIESKOVAN et al., 2005; LESSNICK; DACWAG; GOLUB, 2002; LIN; WANG; LOZANO, 2011; RORIE et al., 2004; TEITELL et al., 1999; TOOMEY; SCHIFFMAN; LESSNICK, 2010). Em um modelo de iniciação de SE utilizando CTNs foi demonstrado que a expressão ectópica da oncoproteína EWS-FLI1 é facilmente tolerada por CTNs indiferenciadas, e por sua progênie tronco neuro-mesenquimal, resultando na expressão alterada tanto de genes alvos da oncoproteína já bem estabelecidos, assim como novos genes alvos. Estudos do perfil de expressão do genoma completo revelaram que a assinatura molecular de SE é mais semelhante às CTNs do que a qualquer outro tecido normal, incluindo células tronco mesenquimais (CTMs), indicando que a manutenção ou reativação de programas gênicos associados às CTNs é uma característica da patogênese de SE (VON LEVETZOW et al., 2011).

Entretanto, outros estudos têm demonstrado que as CTMs podem ser possíveis candidatas as células de origem de SE, uma vez que derivam da medula óssea, e sendo considerado que a maioria dos tumores de SE surgem no tecido ósseo. Com base na presença de CTMs de origem neuroectodérmica na medula óssea e devido às células da crista neural apresentarem um potencial de plasticidade de linhagens mesenquimais, Riggi e colaboradores (2009) propuseram que tumores SE exibem uma dupla plasticidade, ou seja, podem derivar de ambas origens celulares neuroectodérmica e/ou mesenquimal (RIGGI; SUVA; STAMENKOVIC, 2009). Este parece um racional biológico plausível uma vez os tumores de SE exibem essa característica fenotípica dupla. Porém, entrar em um consenso sobre a célula de origem de SE é crucial para entender a patogênese e assim possibilitar a detecção da sarcomagênese precocemente, além do desenvolvimento de novas terapias alvo que ofereçam uma maior especificidade e efetividade no tratamento. Na

Figura 2 é demonstrada uma ilustração da possível origem celular para tumores de SE.

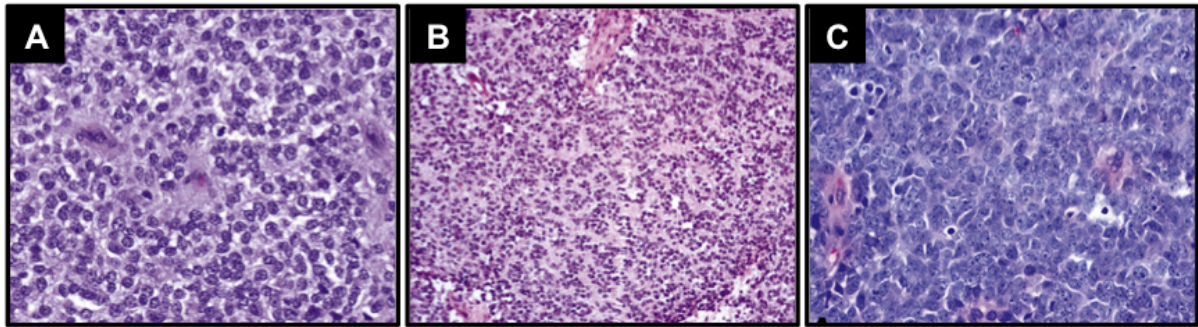


**Figura 2. Origens celulares putativas para sarcoma de Ewing.** Neuroectodérmica (esquerda) e mesenquimal (direita). Adaptado de: (MASON, 2007; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

- **Histologia e anormalidades genéticas e moleculares**

SE é histologicamente diverso, pois apresenta diferentes graus de diferenciação neural. Tradicionalmente, SE é dividido em três principais subtipos histológicos: SE clássico, PNET e atípico. O SE clássico constitui a maioria dos casos, do qual apresenta camadas uniformes e densas de pequenas células arredondadas e azuis. O núcleo apresenta uma cromatina fina, nucléolos discretos, e está em grande proporção em relação ao citoplasma na célula. Os tumores que apresentam evidências de diferenciação neural são classicamente denominados de tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET). Para suportar o diagnóstico dos tumores

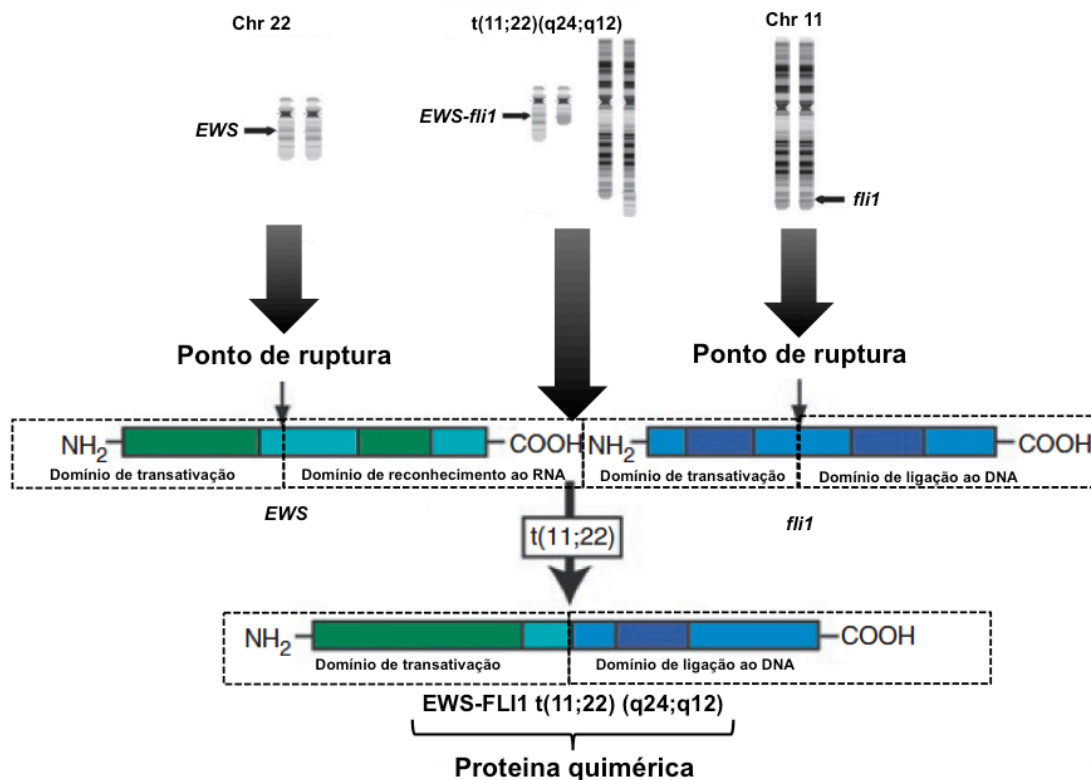
PNET são consideradas a presença de rosetas de Homer Wright ou evidências imunohistoquímicas de diferenciação neural. Os tumores SE atípicos (de grandes células) apresentam características que desviam das descritas em SE clássicos, tais como núcleos grandes, levemente pleomórficos, sobrepostos a uma cromatina irregular e nucléolos grandes, conforme Figura 3 (CHOI et al., 2014).



**Figura 3. Histopatologia de sarcoma de Ewing.** (A) SE clássico (B) PNET (C) Atípico. Adaptado de: (CHOI et al., 2014).

Além dessas características histológicas que não são confirmatórias para o diagnóstico de SE (pois outros tumores também apresentam células azuis) tem sido utilizada a imunomarcagem de CD99, uma glicoproteína que é expressa na membrana plasmática (CHOI et al., 2014; DESAI; JAMBHEKAR, 2010).

O cariótipo da SE é relativamente simples, apresentando poucas alterações numéricas e estruturais. Porém esses tumores são definidos por translocações cromossômicas que fusionam o gene EWS (EWSR1), localizado no 22q12, e o gene da ETS pertencente a família de fatores de transcrição. Estudos utilizando técnicas de hibridização fluorescente *in situ* e RT-PCR demonstraram que a translocação mais comum (em cerca de 85% dos casos) é a fusão gênica *EWS-FLI1* que codifica o domínio de ativação da porção N-terminal de EWS e o domínio de ligação ao DNA da porção C-terminal de FLI1, conforme demonstrado na Figura 4 (DELATTRE et al., 1992).



**Figura 4. Esquema da formação da translocação gene de fusão *EWS-FLI1*.** A translocação entre os cromossomos 11 e 22 resulta na formação de um gene de fusão *EWS-FLI1* no cromossomo 22 aberrante que codifica um fator de transcrição quimérico com o domínio regulador da transcrição na porção N-terminal derivado de *EWS* e o domínio de ligação ao DNA *ETS*-específico derivado de *FLI1*. Adaptada de: (ANDERSON et al., 2012; BERNSTEIN et al., 2006b).

A fusão gênica *EWS-ERG* onde o gene *ERG* no cromossomo 21q22 substitui *FLI1* é encontrada em 5 a 10% dos casos. Raros casos de SE apresentam fusões de *EWS* a outros genes membros da família *ETS* (tais como *ETV1*, *E1AF (ETV4)*, *FEV*), ou fusões similares com o gene *FUS* relacionado a *EWS* (*FUS-ERG* OU *FUS-FEV*) (NG et al., 2007; SHING et al., 2003; WANG et al., 2007). Embora todas as variantes de translocações estejam associadas a genes da mesma família de fatores de transcrição em sarcomas, tumores semelhantes a SE com fusões não-ETS (tais como, *NFATC*, *POU5F1*, *SMARCA5*) têm sido identificados recentemente (TIRODE et al., 2014), no entanto, estes são tão raros que dificulta obter uma análise mais conclusiva. (LESSNICK; LADANYI, 2012).

Recentemente, estudos utilizando o sequenciamento completo do genoma de SE revelaram que esses tumores apresentam poucas variantes estruturais, polimorfismos, alterações em número de cópias de genes (BROHL et al., 2014; TIRODE et al., 2014; ZHANG et al., 2016), suportando estudos citogenéticos anteriores e desafiando ainda mais a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem a iniciação e desenvolvimento do SE. Na Tabela 1, são demonstradas características moleculares e celulares das linhagens de SE (SK-ES 1 e RD-ES) utilizadas como modelo no presente estudo.

**Tabela 1. Características genéticas, moleculares e celulares de linhagens de sarcoma de Ewing humano.**

Linhagem celular de SE	Tempo de duplicação (h) <sup>a</sup>	Tipo de fusão <sup>b</sup>	t(11;22) (q24;q22)	-17p ou del(17p)	del(1p)	P53	P16 <sup>Ink4A</sup>	Ciclina D1	P21 <sup>CIP1</sup>	c-MYC	STAG2
<b>SK-ES 1</b>	35	7/5	+	+	+	mis mut.	exp. det.	alta exp.	exp. n.d.	alta exp.	del
<b>RD-ES</b>	60	7/5	+	+	+	mis. mut.	exp. det.	alta exp.	exp. n.d.	alta exp.	del

<sup>a</sup>: informação obtida através do banco de dados *expasy/cellosaurus*; <sup>b</sup>: tipo da fusão se refere ao éxon de EWS e FLI1 flanqueando a junção; +: presença da alteração; exp.: expressão; exp. det.: expressão detectável; del: mis. mut: mutação do tipo *missense*; deletado; n.d.: não detectável. Revisado em: (BROHL et al., 2014; DAUPHINOT et al., 2001; KOMURO; HAYASHI; KAWAMURA, 1993).

- **Epidemiologia**

Os tumores primários ósseos representam 5% de todos os cânceres em crianças e adolescentes, e os tumores de SE são considerados o segundo tumor ósseo primário mais comum. A maior incidência ocorre na segunda década de vida com aproximadamente 9 – 10 casos por milhão em pacientes com idade entre 10 – 19 anos comparado a uma incidência global de três casos por milhão na população norte-americana (ESIASHVILI; GOODMAN; MARCUS, 2008). O SE é incomum em pacientes menores de 5 anos ou maiores de 30 anos, e ocorre predominantemente em caucasianos, sendo extremamente rara a ocorrência na população africana americana e asiáticas por razões ainda desconhecidas. Além disso, existe uma leve predominância da doença em pacientes do sexo masculino apresentando uma proporção entre M:F = 1.5:1 (ESIASHVILI; GOODMAN; MARCUS, 2008; JAWAD et al., 2009).

No Brasil, a distribuição das taxas médias de incidência de tumores ósseos malignos varia entre as regiões do país, sendo que a maior taxa média de incidência ajustada por idade para o sexo masculino é de 22.2 casos por milhão na cidade de Goiânia (1999-2003), e a menor maior taxa média de incidência é de 3.2 casos por milhão na cidade de Natal (1998-2001). Com relação às taxas de incidência médias para o sexo feminino, a maior foi de 19.4 casos por milhão registrada em Cuiabá (2000-2003) e a menor taxa foi de 2,3 casos por milhão em Campinas (1991-1995) (INCA 2008).

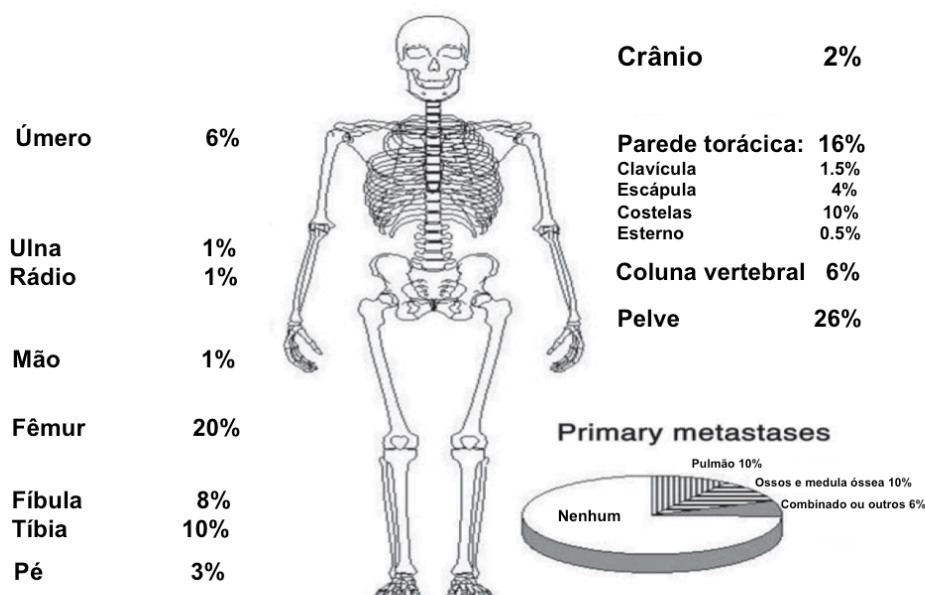
- **Aspectos clínicos, prognóstico e tratamento**

A maioria dos pacientes diagnosticados com SE apresentam sintomas relacionados ao tumor, tais como dor ou um aumento em massa na região afetada. Muitas vezes erros e atrasos no diagnóstico de SE podem ocorrer, uma vez que os pacientes são jovens e frequentemente ativos fisicamente, a dor pode ser confundida



com crescimento ósseo ou lesões físicas (SNEPPEN; HANSEN, 1984; WIDHE; WIDHE, 2000). O SE frequentemente progride rapidamente, resultando em inchaço visível ou palpável. Porém o volume tumoral e o inchaço, muitas vezes, podem ser difíceis de detectar em tumores localizados em regiões como fêmur, pélvis, toráx ou coluna espinhal, o que pode retardar o início do tratamento logo na fase inicial da doença (BARKER et al., 2005).

Em aproximadamente 25% dos tumores de SE, o surgimento ocorre em tecidos moles. Em termos de localização corporal, o SE ocorre com maior frequência na diáfise de ossos tubulares e na pelve, como demonstrado na Figura 5.



**Figura 5. Sítios primários e metastáticos em sarcoma de Ewing.** Obtido de: (BERNSTEIN et al., 2006b).

Em 25% dos pacientes com SE são detectadas metastases, por isso, uma pesquisa adequada e estadiamento para metastases devem ser incluídos no diagnóstico. Os sítios metastáticos mais comuns são os pulmões e o espaço pleural, o sistema esquelético e a medula óssea, ou a combinação destes. O envolvimento de linfonodos na região local é bastante raro. As metastases na medula óssea microscopicamente detectáveis ocorrem em menos de 10% dos pacientes e estão

associadas a um pior prognóstico (PAULUSSEN et al., 1998). Pacientes com metástases pulmonares isoladas têm um desfecho levemente melhor, com aproximadamente 30% de taxa sobrevivência, em contraste, aqueles que apresentam no início do diagnóstico metástases ósseas ou de medula óssea possuem apenas 20% ou menos chance de sobrevivência (COTTERILL et al., 2000; GRIER et al., 2003; MEYERS et al., 2001). A recidiva da doença pode ocorrer no local ou em sítios distantes ao tumor, ocorrendo em aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com SE, e estes apresentam uma baixa sobrevida menor que 13% em cinco anos (LEE et al., 2010).

Outro aspecto que pode representar um prognóstico desfavorável é a persistência de RNA específico de SE na medula óssea (AVIGAD et al., 2004; SCHLEIERMACHER et al., 2003). Além disso, crianças menores de 10 anos de idade possuem uma melhor resposta ao tratamento comparado a pacientes com idades mais avançadas (GRIER et al., 2003). O tamanho e a localização dos tumores SE são geralmente inter-relacionados, sendo que lesões maiores se localizam na pélvis, e pacientes com estas lesões possuem menor chance de sobrevivência. A resposta inicial ao tratamento também pode prever o desfecho clínico. Além disso, o tipo de translocação que o tumor apresenta, bem como a presença de alterações cromossômicas adicionais são informações bastante relevantes para definir o prognóstico (GRIER et al., 2003; PAULUSSEN et al., 2001).

A utilização da quimioterapia tem melhorado muito as taxas de sobrevivência de pacientes com tumores SE localizados, de 10% para 70 – 80%, desde a descoberta da doença por James Ewing. Porém, infelizmente a quimioterapia é menos eficiente em pacientes diagnosticados com metástases ou recidiva. Devido a sua alta letalidade, a maioria da literatura recomenda o tratamento padrão que é baseado na combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A maioria das terapias atuais requerem quimioterapia de multidrogas, que consiste em ciclos de combinações variadas de vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida, etoposídeo, ifosfamida, actinomicina D, e topotecano, seguidos por terapias locais, tais como radiação e/ou cirurgia (BERNSTEIN et al., 2006b; TEICHER et al., 2011).

Durante décadas a radioterapia foi considerada tratamento padrão para tumores locais e focalizados, no entanto, as evidências atuais defendem a cirurgia quando é possível a ressecção completa (SAILER et al., 1988; SCHUCK et al., 2003). O tratamento de escolha quando se consegue grandes margens ao redor do tumor é a ressecção com quimioterapia pré-operatória e pós-operatória, e sem radiação pós-operatória. Porém, a radioterapia como única forma de tratamento é tipicamente a escolha terapêutica para pacientes com tumores grandes ou com tumores em locais que a ressecção cirúrgica não é possível (BERNSTEIN et al., 2006b; IWAMOTO, 2007).

Pacientes com metástases combinadas de osso, medula óssea e pulmão têm demonstrado uma taxa de sobrevida livre de eventos de apenas 14% em 4 anos (PAULUSSEN et al., 1998). Apesar de o tratamento para esses casos incluir intensos regimes de quimioterapia em combinação com radioterapia, ou seja, doses mais altas de quimioterapia juntamente com radiação total do corpo e transplante de medula óssea, as taxas sobrevida livre de eventos não mostram aumento (MEYERS et al., 2001; MISER et al., 2007). Cerca de 30 – 40% dos pacientes com SE sofrem com a recorrência de tumores, podendo ocorrer localmente, em sítios distantes, ou alguma combinação de ambos, e seu prognóstico permanece ruim (COTTERILL et al., 2000; JÜRGENS et al., 1988). Os pacientes com tumores recorrentes apresentam uma taxa de sobrevida estimada em aproximadamente 20 – 25%. Para esses casos de tumores recorrentes ainda não existe um regime de tratamento específico devido à variância entre eles. Basicamente, o tratamento envolve alguma combinação de quimioterapia, cirurgia e radioterapia, com tipos e doses de tratamento baseados na extensão do local de recorrência e a presença da doença metastática após recidiva (COTTERILL et al., 2000).

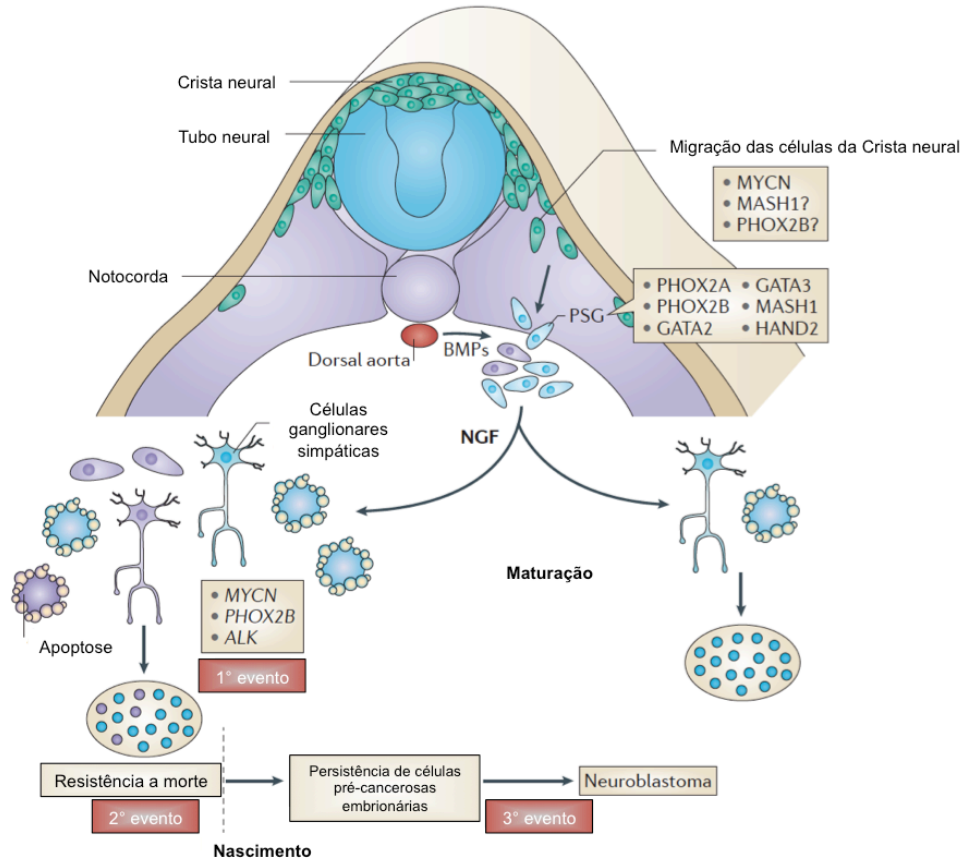
Apesar de um significativo avanço no tratamento de SE, a quimioterapia citotóxica convencional ainda é ineficaz para um quarto dos pacientes com tumores localizados e três quartos dos pacientes com metástases, dessa forma, há uma urgente demanda para subverter esses índices de sobrevida. Portanto, o

desenvolvimento de promissoras terapias alvo, com uma maior seletividade, eficiência e menor toxicidade, é o que se tem buscado para o tratamento de SE.

## 1.1.2 Neuroblastoma

- **Etiologia**

Neuroblastoma (NB) é classificado como tumor neuroblástico periférico por afetar principalmente gânglios simpáticos e medula adrenal, estruturas derivadas da crista neural embrionária (PARK; EGGERT; CARON, 2010; RATNER et al., 2016). Durante desenvolvimento embrionário, as células da crista neural do tronco deixam a face dorsal do tubo neural, migrando ventralmente para perto do tubo neural e começam a se diferenciar em resposta a sinais locais. Algumas delas se diferenciam em células neuronais como gânglios simpáticos ou células simpáticas de cromafins semelhantes aos neurônios da medula adrenal, influenciadas por sinais da proteína morfogenética óssea próximos da aorta dorsal (SAITO et al., 2012). A falha completa da maturação simpatoadrenal pode predispor a transformação maligna de células precursoras pluripotentes da crista neural em células pré-cancerosas (MARSHALL et al., 2014), e este modelo é demonstrado conforme a Figura 6.



**Figura 6. Desenvolvimento da crista neural e de neuroblastoma.** Sob influência da oncoproteína MYCN e proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), os progenitores neuroblásticos migram do tubo neural da crista para uma região que é lateralmente próxima a aorta dorsal. Neste local, as células sofrem especificação em gânglios simpáticos primitivos (PSG), que ocorre antes da diferenciação em gânglios simpáticos ou células cromafins (não mostrado). MYCN é o primeiro evento com base em observações do modelo de camundongo transgênico que utiliza a superexpressão de MYCN regulada pelo promotor da tirosina hidroxilase (Th-MYCN), enquanto que mutações na cinase de linfoma anaplásico (ALK) e a proteína homeobox mesodermal pareada 2B (PHOX2B) são mutações germinativas. O acesso local para o fator de crescimento do nervo (NGF) determina se as células ganglionares simpáticas normais (azul) amadurecem em gânglio terminal ou sofrem morte celular por apoptose. Um estado patológico relativamente comum é a sobrevivência pós-natal de células neuroblásticas pré-cancerosas (roxo), que exige que a célula que é destinada a se tornar maligna seja resistente à retirada do fator trófico, antes que estas células pré-cancerosas persistentes sofram um terceiro evento que induz a transformação, que se apresenta como neuroblastoma na primeira infância. HAND2, derivados expressos do coração e crista neural 2; Mash1 homólogo murino achaete-scute 1. Adaptado de: (MARSHALL et al., 2014).

Com base em características fenotípicas similares as células neuronais ou cromafins apresentada nos tumores de NB, tem sido proposto que a célula de origem pode ser derivada de células precursoras pluripotentes da crista neural. Porém a célula de origem de NB permanece desconhecida. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na falha do desenvolvimento normal que levam ao bloqueio da diferenciação, e por consequência uma persistência de células embrionárias com uma capacidade de proliferação desregulada (SCHOR, 2013; VAN NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Na biologia dos tumores de NB, a amplificação de *MYCN* tem sido alvo de extensas investigações, pelo fato de ocorrer em aproximadamente 25% dos NBs e estar correlacionada a tumores mais agressivos. Porém, é possível que *MYCN* de cópia única também possa desempenhar algum papel na biologia tumoral de NBs sem amplificação do oncogene, pois mesmo na crista neural normal *MYCN* funciona na manutenção do estado pluripotente, proliferativo, e no bloqueio da diferenciação, e além disso, quando o microambiente é adequado pode promover a apoptose de neuroblastos (HUANG; WEISS, 2013). Estudos anteriores demonstraram que células neuronais imaturas de NB com características mais agressivas apresentam *MYCN* amplificado, e células de NB do tipo Schwann com menor potencial maligno raramente possuem a presença ou amplificação de *MYCN* (SPENGLER et al., 1997). Estudos funcionais utilizando a superexpressão de *MYCN*, sob controle do promotor do gene hidroxilase tirosina em neuroblastos de camundongos, demonstraram que altos níveis de *MYCN* contribui na recapitulação de neuroblastos pré-cancerosos e na iniciação de NB (WEISS et al., 1997). Mais recentemente foi demonstrado que a superexpressão de *MYCN* em esferas de células progenitoras simpatoadrenal induz a proliferação, e diferenciação neural suportando a hipótese de que as células progenitoras medulares adrenais multipotentes são células de origem para NB. Porém, não é suficiente para induzir a formação de tumores de xenoenxertos em camundongos, sugerindo que são necessárias alterações genéticas e epigenéticas adicionais para a tumorigênese (MOBLEY et al., 2015).

As células normais da crista neural são caracterizadas pela sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos celulares. E além disso é importante destacar que as propriedades de células tronco podem ser readquiridas por células diferenciadas derivadas da crista neural (DUPIN et al., 2007). A capacidade das células de se autorrenovar e de se diferenciar em múltiplas linhagens é também uma característica de células tipo tronco/precursora encontradas em cânceres. As células tronco/precursoras tumorais podem surgir quando células maduras se desdiferenciam em resposta a alterações genéticas ou epigenética e/ou se as células em desenvolvimento acumulam essas alterações. Este modelo é suportado pelo caráter embrionário de NB, pois mantém a expressão proteica do marcador pro-neural ASCL1, de marcadores noradrenérgicos PHOX2A, HAND2 e TH – hidroxilase tirosina e de padrões de modificações pós-traducionais característicos da crista neural embrionária (WYLIE et al., 2015). Portanto, a plasticidade celular das células de NB de se desdiferenciar gerando células progenitoras pluripotentes da crista neural têm inspirado o racional de que a indução da diferenciação celular pode ser uma terapia eficaz para NB, porém, a possibilidade de que as células de NB sejam diferenciadas em células de Schwann ainda não foi estudada terapeuticamente (RATNER et al., 2016).

Outro aspecto relacionado a etiologia de NBs é que cerca de 1 – 2% dos pacientes com NB possuem um histórico familiar da doença (MARIS et al., 2002; MOSSE; LAUDENSLAGER, 2004; MOSSÉ et al., 2008a; SHOJAEI-BROSSEAU et al., 2004). Em aproximadamente 80% dos NBs hereditários os genes *ALK* e *PHOX2B* têm sido identificados. Especificamente diversos grupos têm demonstrado que mutações de ganho de função no gene *ALK* são responsáveis por 75% dos NBs hereditários (CHEN et al., 2008; GEORGE et al., 2008; JANOUEIX-LEROSEY et al., 2008; MOSSÉ et al., 2008a). NBs também podem ocorrer em pacientes que apresentam a síndrome congênita de hipoventilação central, e mutações de perda de função no gene *PHOX2B* (que codifica a proteína homeobox mesodermal pareada 2B – reguladora do desenvolvimento da crista neural) estão presentes na maioria

desses pacientes, representando mais de 5% dos casos hereditários (MOSSE; LAUDENSLAGER, 2004; RAABE et al., 2008; TROCHET et al., 2004).

O ALK, receptor tirosina cinase, tem um papel chave no desenvolvimento simpático-adrenal precoce para proteger o crescimento neuroblástico contra a privação de nutrientes (CHENG et al., 2011; REIFF et al., 2011). Mutações germinativas e somáticas em ALK das quais causam ativação constitutiva da cinase estão presentes em 8-10% dos casos de neuroblastoma, e isto está correlacionado com um pior prognóstico (CHEN et al., 2008; DE BROUWER et al., 2010; JANOUEIX-LEROSEY et al., 2008; MOSSÉ et al., 2008a). A mutação ativadora de ALK mais comum e agressiva, na qual resulta em F1174L, é suficiente para induzir a formação de tumores quando é especificamente expressa na crista neural em camundongos transgênicos (HEUKAMP et al., 2012; SCHULTE et al., 2013). ALK-F1174L tem sido associada com a amplificação MYCN em tumores humanos e a coexpressão de ALK-F1174L e MYCN promove sinergisticamente a formação de tumores *in vivo*, o que sugere que estes eventos podem cooperar para a iniciação de NB (HEUKAMP et al., 2012). Dessa forma, a expressão ou função aberrante de MYCN em colaboração com a função desordenada de um pequeno grupo de reguladores-chave no neurodesenvolvimento são potenciais candidatos para a iniciação pré-cancerosa neuroblástica (MARSHALL et al., 2014).

Devido a ampla heterogeneidade apresentada pelos tumores de NB, que varia desde regressão espontânea ou diferenciação a uma severa progressão (mesmo com terapia intensiva e multimodal), tem se buscado entender melhor quais são os mecanismos responsáveis pela regressão espontânea visando identificar abordagens terapêuticas alternativas. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno regressão espontânea em NB, incluindo a perda da atividade de telomerase, resposta imune celular e humoral, alterações na regulação epigenética e a privação de neurotrofinas (BRODEUR; BAGATELL, 2014).

As neurotrofinas e seus receptores têm sido amplamente estudados em NB, pois o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso periférico depende da via de sinalização das neurotrofinas que regulam os processos de crescimento,



sobrevivência e diferenciação neuronal. Os ligantes dos receptores de neurotrofinas TrkA, TrkB e TrkC (também conhecidos como NTRK1, NTRK2 e NTRK3, respectivamente) são: o fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a neurotrofinas-3 (NT-3), respectivamente. A neurotrofina-4 (NT-4, também conhecido como NT-5) pode também funcionar através de TrkB. Esses receptores possuem um importante papel na patogênese de NB, uma vez que padrões de expressões aberrantes desses receptores de neurotrofinas têm sido identificados (HUANG; REICHARDT, 2001; TESSAROLLO, 1998; THIELE; LI; MCKEE, 2009).

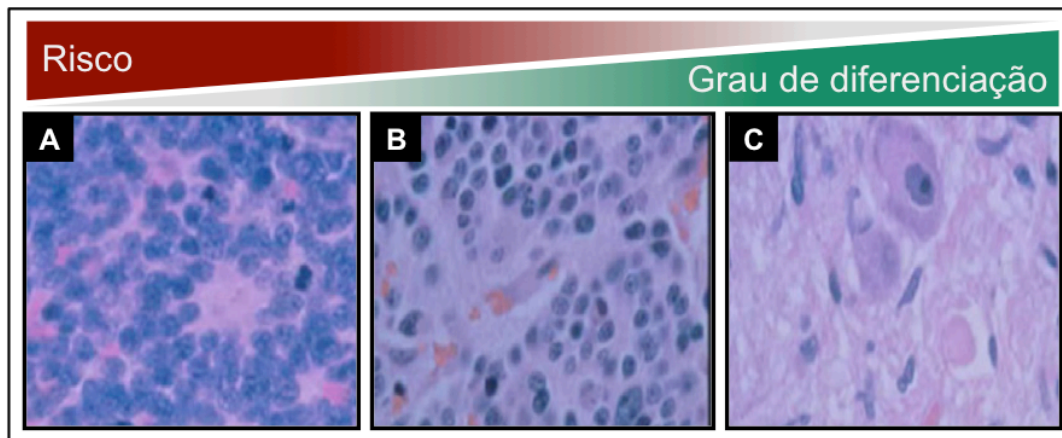
A expressão aumentada de TrkA está associada a NBs com prognóstico favorável, que frequentemente apresentam regressão espontânea (KOGNER et al., 1993; NAKAGAWARA et al., 1992; SUZUKI et al., 1993). A ativação da via NGF/TrkA induz diferenciação neuronal e sobrevivência em células derivadas de tumores de NB, no entanto, quando ocorre a privação de NGF, essas células são induzidas a morte celular via apoptose (NAKAGAWARA et al., 1993; NAKAGAWARA; BRODEUR, 1997). Em contraste, TrkB é coexpresso em níveis elevados com o seu ligante BDNF em tumores clinicamente e biologicamente desfavoráveis, especialmente aqueles com amplificação de MYCN. A ativação via autócrina TrkB/BDNF pode induzir invasão, metástase, angiogênese, e resistência à fármacos (ACHESON et al., 1995; JABOIN et al., 2002; MATSUMOTO et al., 1995; NAKAGAWARA et al., 1994; NAKAMURA et al., 2006). Uma nova variante de TrkA, TrkAIII, foi identificada em NBs, e esta antagoniza a sinalização NGF/TrkA promovendo a progressão tumoral (TACCONELLI et al., 2004).

Os receptores TrkA e TrkC também são conhecidos como receptores de dependência, uma vez que a ausência do ligante de ativação pode gerar sinais apoptóticos. O receptor TrkC é mais expresso em tumores de biologia favorável (YAMASHIRO et al., 1997). E além disso, a coexpressão dos receptores P75/NGFR pode aumentar a sensibilidade e especificidade de todos os três receptores Trk com os seus ligantes cognatos, no entanto, a superexpressão e ativação de P75/NGFR na

ausência da expressão de Trk pode levar a apoptose (HO et al., 2011; RABIZADEH et al., 1999).

- **Histologia e anormalidades genéticas e moleculares**

Os tumores de NB, em grande maioria, são considerados de alto risco, pois apresentam células pequenas e arredondadas chamadas de neuroblastos que possuem pouca ou nenhuma evidência de diferenciação neural, e pobres em estroma de schwann. Porém, alguns tumores de NB apresentam diferenciação histológica parcial e uma quantidade de estroma de schwann aumentada, sendo estes são chamados de ganglioneuroblastomas. Os tumores mais diferenciados do espectro, considerados benignos e de baixo risco são os ganglioneuromas, que apresentam agrupamentos de neurônios maduros cercado por um estroma denso de células de Schwann, conforme a Figura 7 (BRODEUR, 2003).



**Figura 7. Espectro de diferenciação de neuroblastoma associado ao risco, baseado na histopatologia dos tumores. (A) Neuroblastoma (B) Ganglioneuroblastoma (C) ganglioneuroma. Adaptada de: (LACAYO, 2016).**

NBs e linhagens celulares derivadas de tumores de NB contém células que se assemelham a neurônios simpáticos imaturos (que podem ser chamadas de células neuroblásticas – tipo N) com propriedades noradrenégicas, células de Schwann (substrato aderentes – tipo S) com propriedades de melanócitos, e células com

morfologia intermediária (tipo I). Considerando os pacientes com tumores que apresentam maiores proporções de células de Schwann apresentam melhores desfechos (SPENGLER et al., 1997).

Estudos citogenéticos iniciais realizados em 1983, revelaram que tumores de NB apresentam frequentemente pequenos fragmentos de DNA extra-cromossômicos chamados de duplo-minutos e regiões de coloração homoganeamente integradas cromossomicamente, ambas características de ampliações gênicas (SCHWAB et al., 1983). Além disso, foi demonstrado que a região amplificada era proveniente do braço curto distal do cromossomo 2 (2p24) que contém o proto-oncogene *MYCN* (BRODEUR et al., 1984). Desde a sua identificação, *MYCN* vem sendo considerado um poderoso marcador de prognóstico de tumores que apresentam comportamento biologicamente mais agressivo. Com base em análises de cariótipo acessando o conteúdo de DNA, cerca de 55% dos tumores primários de NB apresentam triploidia, também chamada de hiperploides, no entanto, a ploidia impacta potencialmente apenas crianças de 12 a 18 meses de idade com doença metastática (DAVIDOFF, 2012; KANEKO et al., 1987).

Dentre as alterações cromossômicas estruturais, há evidências de que a perda de heterozigosidade (*Loss of heterozygosity* – LOH) no braço longo do cromossomo 14 ocorre com alta frequência em NBs (HOSHI et al., 2000; SRIVATSAN; YING; SEEGER, 1993; SUZUKI et al., 1989; THOMPSON et al., 2001). A grande maioria dos NBs de alto risco apresenta o ganho de 17q que está presente em mais da metade dos casos de NB (BOWN et al., 1999) e a perda de 1p em um terço dos casos (ATTIYEH et al., 2005). Ambas alterações cromossômicas estão correlacionadas com a amplificação de *MYCN* e pior prognóstico. A perda de 11q tem sido demonstrada em um terço dos casos de NB de alto risco, porém é inversamente correlacionada com a amplificação de *MYCN* (ATTIYEH et al., 2005). Outras alterações cromossômicas segmentares relativamente comuns em NB incluem ganhos de 1q e 2p e perda de 3q, 4p e 14q, no entanto, o risco de prognóstico ruim associado a estas alterações ainda não está bem estabelecido (HUANG; WEISS,

2013; PUGH et al., 2013). Algumas alterações como deleções de 1p e 6q podem também ocorrer na recidiva da doença (ELEVELD et al., 2015).

De um modo geral, a deleção de 1p e 11q e sua associação com NB de alto risco sugere a presença de um gene supressor tumoral nesses cromossomos. Diversos genes supressores tumorais candidatos têm sido identificados na região de deleção 1p, dentre eles, *CHD5*, *CAMTA1*, *KIF1B*, *CASZ1* e *mir-34A*. Cada um desses genes, notavelmente, apresenta uma reduzida expressão gênica e isto está associado com o avanço da doença e/ou baixas taxas de sobrevivência de pacientes (HENRICH; SCHWAB; WESTERMANN, 2012; LIU et al., 2011).

A maioria dos NBs de alto risco que não possui amplificação de *MYCN* ou mutações em *ATRX* (gene que codifica a proteína remodeladora da cromatina SWI/SNF, uma helicase dependente de ATP), apresentam poucas mutações somáticas recorrentes em qualquer gene codificante de proteína conhecida (PUGH et al., 2013). Na tabela 1, são demonstradas algumas anormalidades genéticas e características das linhagens de NB utilizadas como modelo neste estudo, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2. Características celulares e moleculares de linhagens de neuroblastoma.**

Linagem celular de NB	Tempo de duplicação (h) <sup>a</sup>	MYCN	17q23 ganho	1P LOH	3p22 LOH	11q23 LOH	Mutação em P53	Mutação em ALK	Mutação em NF1	ARID1A/B
<b>NGP</b>	50-70	A	del	rearranjo/duplicação	del	del	Wt	Wt alta exp.	baixa exp.	Wt
<b>SMS-KCNR</b>	72	A	ganho	1p del,+1p LOH, t(17,20) (p21, q13)		Wt	Wt	R1275Q, F1174L		
<b>SY5Y</b>	55	NA	del	Wt	Wt	Wt	Wt	F1174L	intacto	
<b>SMS-SAN</b>	71	A	ganho			Wt		F1174L		A=Pro251fs
<b>NB69</b>	-	NA	ganho	1p del		Wt		Wt	baixa exp.	A=Gln1364L ou B=Gln579del
<b>IMR32</b>	40-50	A	ganho	1p del	Wt	del	Wt	Wt	alta exp.	

<sup>a</sup>: informação obtida através do banco de dados expasy/cellosaurus; A: amplificado, NA: não amplificado, del: deletado, LOH: *loss of heterozigosity* (perda de heterozigosidade), Wt: selvagem, exp.: expressão. Revisado em: (CARÉN et al., 2007; COLE et al., 2008; CUI; SCHROERING; DING, 2002; DE PRETER et al., 2004; DJOS et al., 2013; GEORGE et al., 2008; GOLDSCHNEIDER et al., 2006; HÖLZEL et al., 2010; JANOUÉIX-LEROSEY et al., 2008; MOSSÉ et al., 2008b; MOSSE et al., 2005; NAKAMURA et al., 2007; OKAWA et al., 2008; RODOLFO et al., 2003; SAUSEN et al., 2012; VAN MAERKEN et al., 2006).

Em contraste, algumas mutações somáticas recorrentes em regiões não codificantes do genoma, como elementos de *enhancer* ou outras regiões regulatórias, têm sido identificadas em NBs, porém o papel funcional dessas alterações ainda permanece obscuro (SCHLEIERMACHER; JANOUEIX-LEROSEY; DELATTRE, 2014). Portanto, a notória raridade de mutações recorrentes em genes codificadores de proteínas conhecidas e a alta frequência de alterações cromossômicas estruturais reforça a necessidade de compreender a interação desses fatores genéticos no contexto do desenvolvimento do sistema nervoso periférico e de NB. Estudos de associação genômica em larga escala, têm revelado que NB é uma doença genética complexa, e tem sido associado a alguns polimorfismos genéticos comuns que podem influenciar o desenvolvimento de NB. Até o momento, foram identificadas 12 associações genéticas altamente significantes e validadas em NB, que incluem os genes *BARD1*, *LMO1*, *LIN28B* (PUGH et al., 2013; TROCHET et al., 2004). Cada associação apresenta um efeito individual relativamente modesto na iniciação da doença, no entanto, associações múltiplas podem cooperar, e assim, promover a transformação maligna durante o neurodesenvolvimento. Contudo, esses estudos têm ilustrado como as marcas genômicas convergem para a identificação de mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão tumoral, o que em alguns casos, oferece uma compreensão sobre quais alvos terapêuticos podem ser explorados na clínica (BOSSE; MARIS, 2016)

- **Epidemiologia**

NB representa aproximadamente 8% de todas as neoplasias em pacientes com menos de 15 anos de idade, e é responsável por aproximadamente 15% das mortes por câncer pediátrico. Com aproximadamente 700 novos casos por ano, NB apresenta uma taxa de incidência de aproximadamente 9.7 casos por milhão na população branca norte-americana, porém na população negra a incidência é menor com aproximadamente 6.8 casos por milhão. (DAVIDOFF, 2012; STILLER; PARKIN, 1990; YOUNG et al., 1986). Adicionalmente, mesmo que rara a incidência em

indivíduos com descendência africana, estes apresentam maior propensão a ter um fenótipo mais maligno em comparação a indivíduos de descendência europeia (GAMAZON et al., 2013). As taxas de incidência de NB em outras etnias não são precisamente conhecidas. No Brasil, NB apresenta uma taxa de incidência média de aproximadamente 7.3 casos por milhão, com base em dados registrados nos estados de São Paulo, Recife e Fortaleza (STILLER; PARKIN, 1990).

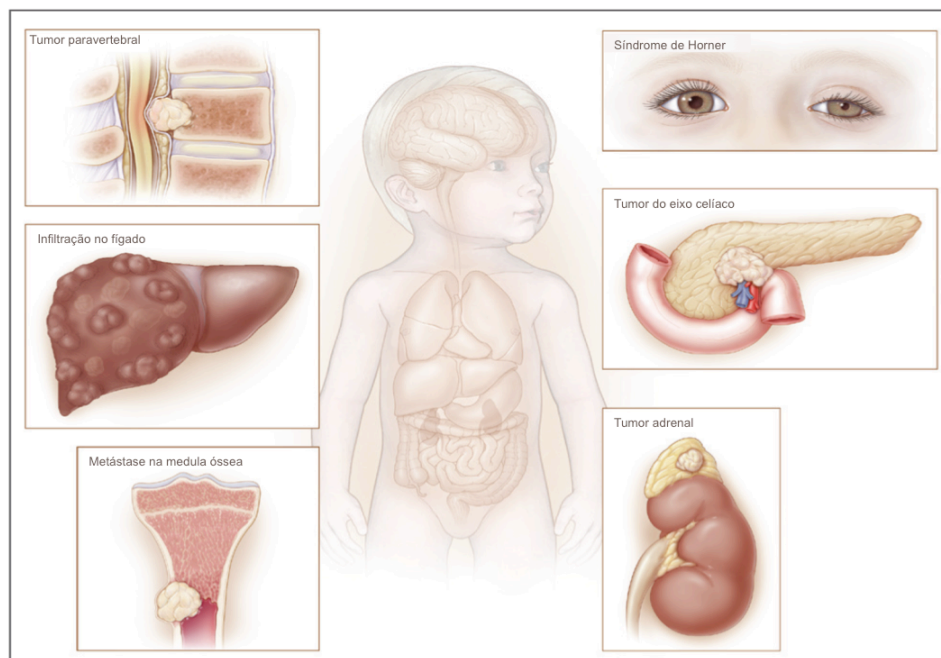
A probabilidade do desenvolvimento de NB pode variar amplamente por idade, sendo o maior número de casos detectados no período perinatal, e diminuindo gradualmente nos primeiros 10 anos de idade. A incidência em adolescentes e jovens adultos é mais rara, e apesar de ser uma doença mais indolente, é letal (MOSSÉ et al., 2014). O fenótipo de NB é extremamente relacionado a idade, uma vez que pacientes menores de 18 meses de idade apresentam mais propensão a regressão espontânea do tumor do que crianças mais velhas (MARIS, 2010).

Na tentativa de detectar NB precocemente através do rastreio de metabólitos de catecolaminas na urina, foi observado que aproximadamente metade de todos os NBs que surgem no primeiro ano de vida nunca sejam detectados devido à regressão espontânea completa (SCHILLING et al., 2002; WOODS et al., 1996). Curiosamente, NB é mais comum em crianças do sexo masculino do que feminino, no entanto, a base genética e epigenética para esta prevalência é ainda desconhecida (WARD et al., 2014).

- **Aspectos clínicos e prognóstico e tratamento**

NB pode surgir em qualquer lugar ao longo do sistema nervoso simpático. A maioria dos tumores (cerca de 65%) surge no abdômen, com metade desses surgindo na glândula adrenal. Sítios de origem adicionais incluem pescoço, peito e pélvis. Os bebês são mais propensos a apresentarem a doença principalmente em locais torácicos e cervicais, e 1% dos pacientes não possuem tumor primário detectável. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam doença localizada ou regional e cerca de 35% dos pacientes apresentam propagação linfonodal regional

no momento do diagnóstico. Os pacientes que possuem doença localizada frequentemente não apresentam sintomas, e são diagnosticados ocasionalmente. Porém, alternativamente os pacientes podem apresentar massa e distensão abdominais, e dor. Pacientes com doença cervical localizada surgindo a partir do gânglio cervical pode apresentar a síndrome Horner (paralisia óculo-simpática). A extensão epidural ou intradural do tumor pode ocorrer em aproximadamente 5 a 15% dos pacientes diagnosticados com NB e podem ser acompanhados por deficiências neurológicas (MARIS, 2010; PARK; EGGERT; CARON, 2010; VO et al., 2014). A apresentação clínica de NB é demonstrada conforme ilustração na Figura 8.



**Figura 8. Apresentação clínica de neuroblastoma.** Sítios primários e metastáticos de NB. Adaptado de: (MARIS, 2010).

Ao contrário da frequente falta de sintomas em pacientes com doença localizada, pacientes com doença disseminada frequentemente apresentam sintomas como febre, dor e irritabilidade. Além disso, uma apresentação clínica de inchaço periorbital e equimose (olhos de guaxinim) é observada em crianças com doença disseminada para a região periorbital (PARK; EGGERT; CARON, 2010; VO et al., 2014).



Com o avanço das técnicas moleculares para a caracterização tumoral, a maioria dos grupos cooperativos atualmente integram dados pan-genômicos, ao invés de dados genômicos de *locus* único, para a estratificação de risco no diagnóstico, especialmente, para os pacientes de baixo risco e de doença de risco intermediário. Com as técnicas genômicas de maior resolução e integração de sequenciamento de última geração em nível de DNA e RNA, será possível que os grupos de risco sejam refinados com base no perfil molecular do tumor (MATTHAY et al., 2016).

O sistema de estadiamento de NB mais aceito nos estudos de relatos de casos das últimas três décadas é o sistema internacional de estadiamento de NB (*International Neuroblastoma Staging System – INSS*), que se baseia na extensão da ressecção cirúrgica no diagnóstico e metástases, como é demonstrado na Tabela 3 (BRODEUR et al., 1993; MATTHAY et al., 2016).

**Tabela 3. Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma.**

<b>Estágio 1</b>	Tumor localizado com completa ressecção bruta cirúrgica e sem metástase para os gânglios linfáticos ipsilaterais representativos que não estavam ligados ao tumor.
<b>Estágio 2A</b>	Tumor localizado com incompleta ressecção bruta cirúrgica; e sem metástase para os gânglios linfáticos.
<b>Estágio 2B</b>	Tumor localizado com ou sem completa ressecção bruta cirúrgica; com metástase tumoral para os gânglios linfáticos ipsilaterais, mas sem metástase tumoral observada em quaisquer gânglios linfáticos contralaterais aumentados
<b>Estágio 3</b>	Tumor unilateral não ressecável infiltrado na linha média (coluna vertebral), com ou sem metástase linfonodal regional, ou tumor unilateral localizado com metástase linfonodal regional contralateral, ou tumor de linha média com infiltração bilateral ou comprometimento linfonodal.
<b>Estágio 4</b>	Qualquer tumor primário com disseminação para linfonodos distantes, osso, medula óssea, fígado, pele ou outros órgãos (exceto como definido para a fase 4S)
<b>Estágio 4S</b>	Tumor primário localizado (como definido para a fase 1, 2A ou 2B) em pacientes menores de 1 ano de idade, com metástase limitada à pele, fígado ou medula óssea <sup>c</sup> (<10 % de envolvimento tumoral).

Revisado de: (BRODEUR et al., 1993).

O estadiamento da doença é combinado a outros fatores prognósticos, incluindo idade no diagnóstico, patologia e caracterização genômica (incluindo MYCN, status 11q e ploidia), o que possibilita a definição de grupos de risco para o pré-tratamento. Além disso, este sistema permite agrupar os pacientes em quatro grupos de risco (muito baixo, de baixo risco, de risco intermediário, ou de alto risco) sendo então determinante para o plano de tratamento (MATTHAY et al., 2016).

Os NBs de muito baixo risco e de baixo risco (nos estádios de INRG L1, L2 e MS com características genômicas favoráveis) correspondem a aproximadamente 50% de todos os novos casos de NB diagnosticados (COHN et al., 2009; PINTO et al., 2015). Para esses pacientes a conduta é geralmente observação que inclui monitoramento utilizando exame físico, níveis de catecolamina na urina e imagens

tumorais com ultrassom ou ressonância magnética. Esta abordagem observacional evita potenciais complicações de cirurgia na criança, tais como hemorragia, dano vascular, obstrução intestinal ou dano a um órgão vital como rim ou fígado (NUCHTERN et al., 2012) (DE BERNARDI et al., 2009; HERO et al., 2008; RUBIE et al., 2011; STROTHER et al., 2012). Na ausência de amplificação de *MYCN*, qualquer doença residual após ressecção cirúrgica do tumor não é considerada um fator de risco para recidiva, apresentando uma sobrevida livre de eventos >90% e uma sobrevida global de 99 – 100% (IEHARA et al., 2013; STROTHER et al., 2012). Para crianças com NB de baixo risco (INRG, estágio L2 ou MS com características genômicas favoráveis) que apresentam de sintomas clínicos, o tratamento com quimioterapia é indicado, mas com limitação do número de ciclos até a resolução dos sintomas clínicos. Nesses pacientes não é indicada ressecção completa do tumor primário nem radioterapia (BAKER et al., 2010; DE BERNARDI et al., 2009; STROTHER et al., 2012).

Para crianças com NB de risco intermediário, podem ser prescritos de dois a oito ciclos de quimioterapia. A ressecção cirúrgica do tumor primário residual é realizada quando possível, conforme determinado por imagem, mas a ressecção completa não é essencial (BAKER et al., 2010; DEFFERRARI et al., 2015; KOHLER et al., 2013; MARACHELIAN et al., 2012). Porém, o tratamento com quimioterapia isolada para crianças menores de 12 – 18 meses de idade com NB não ressecável com estágio INRG L2 (com histologia desfavorável ou características genômicas desfavoráveis e sem amplificação de *MYCN*) pode não ser suficiente. Essas crianças têm menor sobrevida do que pacientes semelhantes com biologia favorável, indicando que um regime de tratamento mais intensivo, incluindo radioterapia pode garantir uma maior sobrevida (BAKER et al., 2010; DEFFERRARI et al., 2015; KOHLER et al., 2013; MATTHAY et al., 1998). O tratamento de pacientes do grupo de risco intermediário pode ser adaptado para incluir a intensidade e a duração da terapia com base na resposta à terapia, outros critérios genéticos (incluindo o número de cópias genômicas) e histologia. Com base nessas abordagens terapêuticas, a sobrevida global em 5 anos estimada para NB de risco intermediário é >90% para os

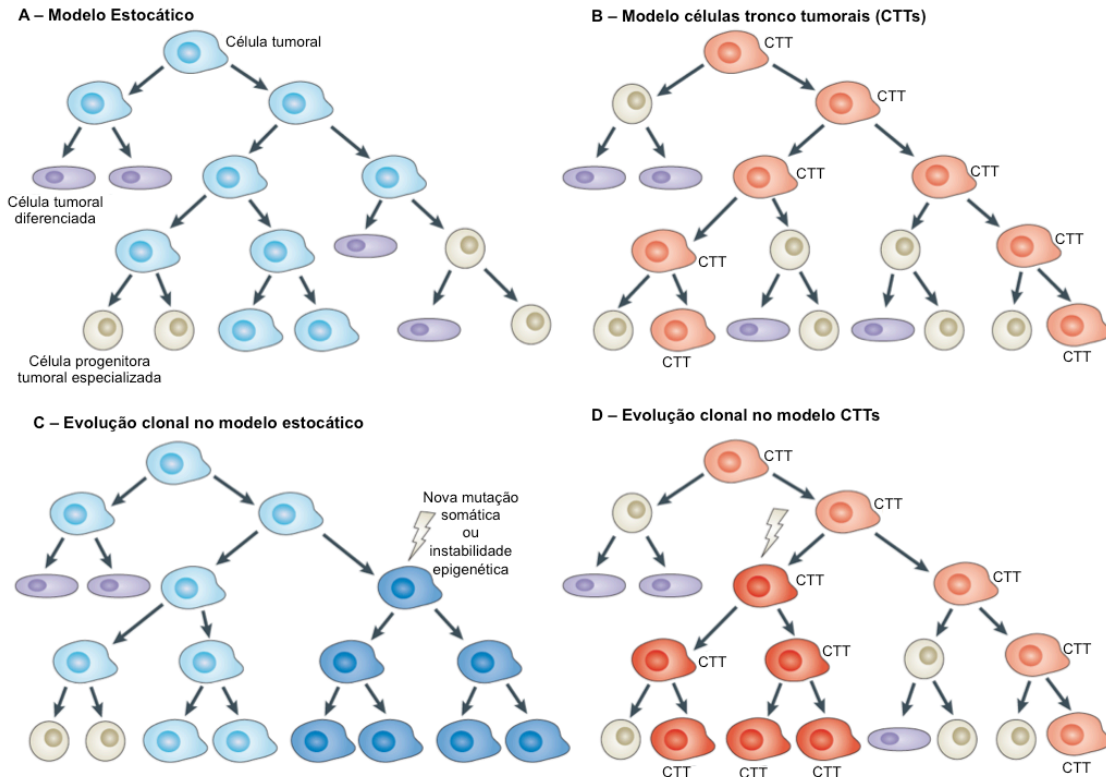
lactentes com doença em estágio INRG M, porém apenas 70% das crianças >18 meses de idade com doença em estágio INRG L2 (BAKER et al., 2010; KOHLER et al., 2013).

A maioria (> 80%) dos pacientes com NB de alto risco ocorrem em pacientes >18 meses de idade com doença em estágio INRG M, bem como em crianças de 12 a 18 meses de idade com doença em estágio INRG M, cujos tumores apresentam características biológicas desfavoráveis (amplificação de *MYCN*, patologia desfavorável e/ou diploide). Cerca de 15 a 20% restantes dos pacientes de alto risco apresentam qualquer idade e estágio da doença com amplificação de *MYCN* (COHN et al., 2009). A taxa de sobrevida global em 5 anos para pacientes de 0 a 30 anos de idade com NB de alto risco foi estimada em 29% (pacientes diagnosticados entre 1990 e 1994, n = 356), 34% (pacientes diagnosticados entre 1995 e 1999, n = 497), 47% (pacientes diagnosticados entre 2000 e 2004, n = 1015) e 50% (pacientes diagnosticados entre 2005 e 2010, n = 1484). Este visível aumento nas taxas de sobrevida global tem sido atribuído à introdução da terapia mieloablativa e da imunoterapia. Embora as perspectivas para pacientes com NB de alto risco tenham melhorado, é imperativo que terapias mais eficientes e menos tóxicas sejam desenvolvidas (PINTO et al., 2015).

A abordagem atual que está sendo utilizada para o tratamento de NBs de alto risco incorpora quimioterapia de indução (para reduzir a carga tumoral através do encolhimento do tumor primário e redução de metástases) utilizando uma quimioterapia combinada que incorpora pares ou trios rotativos de fármacos ativos (por exemplo, vincristina, vindesina, etoposídeo, cisplatina, carboplatina, dacarbazina, doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida e topotecano), seguida de ressecção cirúrgica do tumor primário e subsequente quimioterapia mieloablativa suportada com transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. A quimioterapia mieloablativa é seguida por terapia de manutenção para doença residual mínima com anticorpo monoclonal anti-GD2 e imunoterapia de citosinas, além de terapia diferenciativa com isotretinoína (PARK et al., 2013).

## 1.2 Células tronco tumorais

Ao longo de quase duas décadas tem se acumulado evidências de que dentro de tumores sólidos individuais existe uma heterogeneidade, onde nem todas as células malignas são funcionalmente equivalentes (VISVADER; LINDEMAN, 2008). Dois modelos de propagação são geralmente usados para explicar o crescimento tumoral e a heterogeneidade. No primeiro modelo, todas as células do tumor são equipotentes, e uma proporção de células tumorais prolifera-se de maneira estocástica para alimentar o crescimento tumoral enquanto outras células tumorais se diferenciam. No segundo modelo, os tumores são hierarquicamente organizados como no tecido normal, porém apenas uma subpopulação de células contribui para a iniciação e crescimento tumoral a longo prazo. Esta subpopulação de células é referida como células tronco tumorais (CTTs), pois apresentam propriedades características de células tronco, tais como, quiescência, autorrenovação, e a capacidade de dar origem a células progenitoras diferenciadas que possuem um potencial de crescimento limitado. Além disso, o modelo de evolução clonal, o qual sustenta que as alterações genéticas e epigenéticas ocorrem ao longo do tempo em células tumorais individualmente, e se tais alterações conferirem uma vantagem seletiva, permite que clones individuais de células tumorais sobrepujem a capacidade de outros clones. Dessa forma, a evolução clonal pode levar a heterogeneidade genética, conferindo diferenças fenotípicas e funcionais entre as células tumorais dentro do ambiente tumoral. A evolução clonal pode ocorrer em ambos os modelos de propagação tumoral, como demonstrado na Figura 9 (BECK; BLANPAIN, 2013; GREAVES; MALEY, 2012; SHUKLA; MEERAN, 2014).



**Figura 9. Diferentes modelos de propagação tumoral.** (A) Modelo estocástico. (B) Modelo de células tronco tumorais. (C-D) A evolução clonal em ambos modelos. Adaptado de: (BECK; BLANPAIN, 2013).

A primeira evidência para a hipótese de CTTs foi demonstrada em leucemia mielóide aguda, onde uma pequena subpopulação de células imaturas expressando antígenos de superfície  $CD34^+$  e sem  $CD38$  foi capaz de iniciar um tumor em camundongos imunocomprometidos (BONNET; DICK, 1997). Similarmente, subpopulações de CTTs também foram descritas em outras malignidades hematológicas (HOLYOAKE et al., 2002). Posteriormente, as CTTs foram descritas em tumores sólidos de mama (AL-HAJJ et al., 2003). E até agora, as CTTs têm sido descritas em diversos tumores sólidos, tais como glioblastoma, meduloblastoma, neuroblastoma, cólon, mama, pulmão, pâncreas, fígado, câncer de próstata e cabeça e pescoço carcinomas escamosos (AL-HAJJ et al., 2003; COLLINS et al., 2005; O'BRIEN et al., 2007; PRINCE et al., 2007; SINGH et al., 2004a; YIN et al., 2007).

Com o intuito de identificar as CTTs, uma variedade considerável de marcadores de superfície celular que as distinguem das células tumorais tem sido demonstrada.

### 1.2.1 Identificação de CTTs

CTTs putativas têm sido identificadas através da utilização de diversos marcadores, tais como, proteínas de superfície celular, proteínas nucleares ou citoplasmáticas, fatores de transcrição, enzimas e/ou atributos funcionais. A combinação de diferentes marcadores específicos tem sido empregada para identificação de CTTs de diferentes tipos de tumores sólidos, tais como, as proteínas de superfície celular CD133, CD44, CD34, CD24, CD90, CD20, CD117, genes associados à pluripotência incluindo OCT3/4, Nanog, SOX2, MYC, marcadores de invasividade como vimetina, N-caderina, snail, twist e Zeb1, e marcadores de resistência a drogas, tais como, aldeído desidrogenase (ALDH) e transportadores ABC (MIMEAULT; BATRA, 2014).

Para estudar as CTTs *in vitro*, algumas abordagens experimentais têm sido empregadas, que inclui a separação de CTTs por citometria de fluxo (FACS), utilizando uma marcação fluorescente com anticorpos contra marcadores de superfície específicos, o ensaio de *side population* (SP) que identifica as CTTs pela capacidade de efluxo do corante Hoechst, e diversos modelos de cultura celular tridimensional (3D), incluindo tumoresferas (BIELECKA et al., 2016; HADNAGY et al., 2006). Dentre as técnicas para o cultivo 3D de tumoresferas, duas principais são utilizadas: (i) cultivo em suspensão em meios isentos de soro; e (ii) a criação de arcabouços (*scaffolds*) de base de membrana. Ambas as técnicas permitem a comunicação bioquímica entre as CTTs e a matriz extracelular; interação que é crucial para no microambiente tumor-tecido observado *in vivo* (MEDEMA; VERMEULEN, 2011). Porém, o modelo de tumoresfera não procura mimetizar tecidos de câncer, mas sim estudar as propriedades das CTTs, então admite-se que este modelo não replica completamente a estrutura 3D e o ambiente de um tumor *in vivo* (VALENT et al., 2012).

Nesse sentido, o padrão ouro para provar que marcadores específicos enriquecem, de fato, a frequência de CTTs é o ensaio de diluição limitante *in vivo*, em que CTTs são injetadas em camundongos imunocomprometidos; e apenas as CTTs possuem a capacidade de formar tumores em ensaios de xenotransplante em série após a injeção de um baixo número de células e reestabelecer, em cada passagem *in vivo*, a organização hierárquica e heterogeneidade do tumor parental (BRIEN; KRESO; JAMIESON, 2010; VISVADER; LINDEMAN, 2008). Uma limitação crítica para a identificação de marcadores é que nem todas as células que expressam um dado marcador específico para CTTs possuem atributos funcionais de CTTs, e inversamente, células que não têm expressão detectável de um marcador de CTTs podem se comportar como CTTs. Dessa forma, a determinação precisa de marcadores de CTTs ainda é um dos principais desafios na identificação de CTTs, porém é crucial para que terapias direcionadas contra as CTTs possam ser desenvolvidas.

### **1.2.2 Identificação de CTTs em tumores pediátricos**

Diversos marcadores de CTTs utilizados em tumores sólidos de adultos têm sido empregados para identificar CTTs em tumores pediátricos. Um exemplo é a glicoproteína transmembrana com função biológica incerta, CD133, que continua a ser o marcador mais utilizado para identificar CTTs em neoplasias pediátricas. CD133 tem sido bastante útil para identificar CTTs através de diferentes abordagens experimentais e também tem sido correlacionado com agressividade tumoral e ao prognóstico de diferentes cânceres pediátricos, que inclui neuroblastoma, sarcoma de Ewing, osteossarcomas, rabdomiossarcomas, tumores cerebrais, retinoblastoma, tumores rabdóides e melanomas infantis (FRIEDMAN; GILLESPIE, 2011). Outros marcadores também têm sido empregados na identificação de CTTs de tumores pediátricos, como demonstrado na Tabela 4.



**Tabela 4. Marcadores específicos de CTTs para algumas neoplasias pediátricas.**

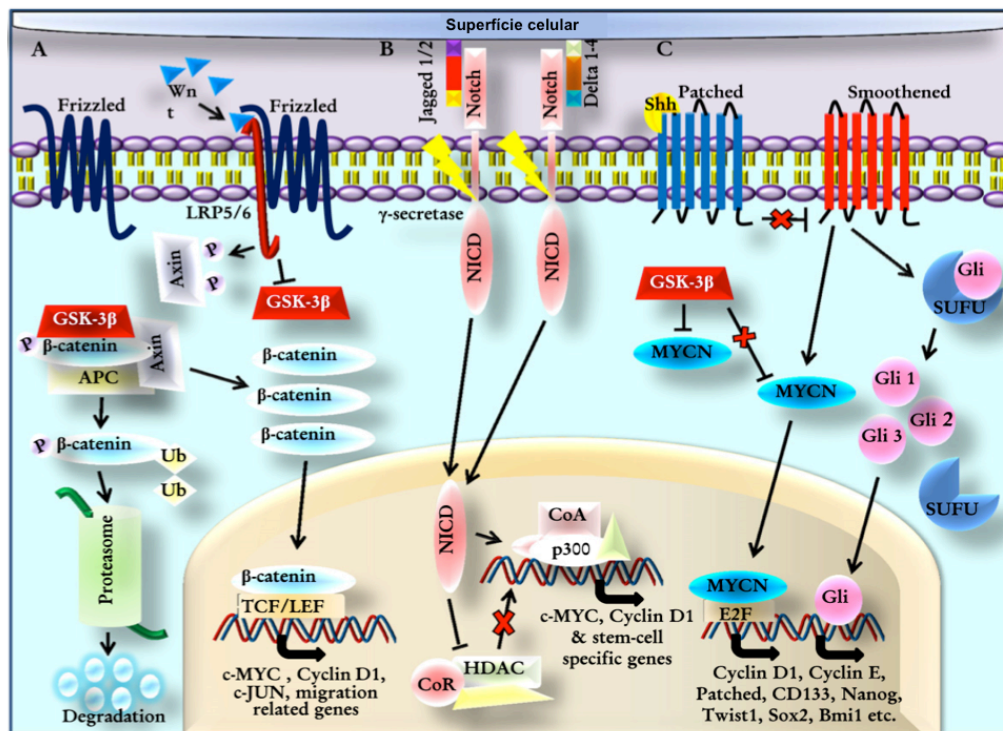
<b>Neoplasia pediátrica</b>	<b>Proteínas/oligossacáridos/glicolipídeos de superfície celular</b>	<b>Proteínas nucleares/citoplasmáticas</b>	<b>Fatores de transcrição</b>	<b>Propriedades funcionais / enzimas</b>
<b>Meduloblastoma</b>	CD133, CD15	Nestina		SP
<b>Melanoma infantil</b>	CD133			
<b>Neuroblastoma</b>	CD133, ABCG2, CD114 (receptor G-CSF), GD2, CD117 (c-Kit), NOTCH1, GPRC5C, PIGF2, TRKB e LNGFR	Nestina Fzd6		SP
<b>Osteossarcoma</b>	CD133, CD117, Stro-1	Nestina	Oct3/4, Nanog	ALDH, SP
<b>Rabdomiossarcoma</b>	CD133		Oct3/4, c-Myc Nanog, Sox2, Pax-3	ALDH, SP
<b>Retinoblastoma</b>	CD133, CD44	Nestina, Musashi-1, Bmi-1	Oct3/4, Nanog, pax-6, chx10	ALDH, SP
<b>Sarcoma de Ewing</b>	CD133, CD57			ALDH, SP
<b>Rabdóide maligno</b>	CD133			

Revisado em: (ABARRATEGI et al., 2016; DELA CRUZ, 2013; FRIEDMAN; GILLESPIE, 2011; GARNER; BEIERLE, 2015; HUANG et al., 2016)

### **1.2.3 Vias de sinalização associadas às CTTs**

As células tronco normais e tumorais compartilham vias de sinalização comuns para manutenção de suas propriedades tronco. As vias de sinalização mais importantes relacionadas com as características de autorrenovação incluem sinalização das vias: Wnt/  $\beta$ -catenina, notch, e sonic hedgehog (shh). A família Wnt consiste em moléculas de sinalização intercelular que estão envolvidas na regulação

do desenvolvimento embrionário e são frequentemente alteradas durante o processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM) na carcinogênese (BOGAERTS et al., 2014; DIMEO et al., 2009). A família Notch está implicada na autorrenovação e manutenção das características das células tronco pela ativação de moléculas efetoras a jusante como o complexo  $\gamma$ -secretase, seguida pela ativação do oncogene *c-MYC* (ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS et al., 2006; BOLÓS et al., 2009; HARRISON et al., 2013). A Shh é outra importante molécula de sinalização intercelular, funcionando na regulação do desenvolvimento e comportamento das células tronco. Estudos demonstraram que Shh está envolvida na regulação da proliferação de células tronco e determinação do destino celular de células tronco neurais e mesenquimais (PALMA; RUIZ I ALTABA, 2004); e na atividade da proliferação regenerativa de células tronco epiteliais no câncer (PALMA; RUIZ I ALTABA, 2004; SHIN et al., 2011). As principais vias de sinalização associadas às propriedades tronco (*stemness*) das CTTs são demonstradas na Figura 10.



**Figura 10. Principais vias de sinalização associadas às propriedades tronco (*stemness*) das CTTs. (A) Via de sinalização Wnt. (B) Via de sinalização Notch. (C) Via de sinalização Shh. Adaptado de: (SHUKLA; MEERAN, 2014)**

## 1.2.4 Implicações Clínicas das CTTs

A hipótese de CTTs tem implicações significativas para a terapêutica clínica do câncer, uma vez que, até o momento, os tratamentos mais comuns utilizados na clínica são quimioterapia e radioterapia, em que os alvos dessas terapias são células altamente proliferativas. Porém, como as CTTs possuem propriedades de células quiescentes, elas provavelmente não são alvos de tais terapias (VERMEULEN et al., 2008). Além disso, com características semelhantes às células tronco normais, as CTTs expressam proteínas de efluxo multidroga, o que aumenta a capacidade de resistência à terapêutica convencional (DEAN; FOJO; BATES, 2005). Diversos estudos avaliando a toxicidade em CTTs sob diferentes tipos tumorais indicaram uma sensibilidade reduzida e resistência dessa subpopulação de células.

As CTTs têm sido correlacionadas com doença residual mínima, uma vez que mesmo após a terapia bem sucedida, alguns pacientes sofrem recidiva da doença (VERMEULEN et al., 2008). Dado que as CTTs possuem a capacidade de sobrepujar a terapia, de fato, a detecção das CTTs pode fornecer uma estratégia para combater a doença residual mínima. Além disso, evidências substanciais apontam que a terapia convencional afeta apenas as populações de células de amplificações em trânsito e diferenciadas do tumor, não possuindo capacidade de erradicar o compartimento de CTTs, e pode, de fato, expandí-lo (BAO et al., 2006; JIANG et al., 2010; TSUCHIDA et al., 2008). Alguns estudos sugerem que tumores com maiores compartimentos de CTTs podem levar a maiores taxas de recidivas e pior prognóstico. Com a identificação de CTTs em uma variedade de cânceres, há uma crescente necessidade da descoberta de novas terapias alvo contra as CTTs. Algumas terapias alvo para as CTTs têm sido utilizadas para neuroblastoma, leucemias, gliomas, câncer de pâncreas entre (GUZMAN et al., 2007; MUELLER et al., 2009; PICCIRILLO et al., 2006; ZHANG et al., 2009). As terapias dirigidas às CTTs podem induzir apoptose, sensibilizando-as a terapias convencionais, ou induzir diferenciação. E por fim, pelo fato de que o desenvolvimento das CTTs ocorre devido às alterações genéticas e epigenéticas (SHUKLA; MEERAN, 2014), diversas enzimas

modificadoras da cromatina têm sido alvo para o desenvolvimento de inibidores (que incluem inibidores de histona desacetilases (HDis) e de histonas metiltransferases). Esses inibidores podem alterar o estado epigenético do tumor, e por isso, representam uma potente estratégia terapêutica contra as CTTs que necessita ser explorada.

### **1.3 Regulação epigenética**

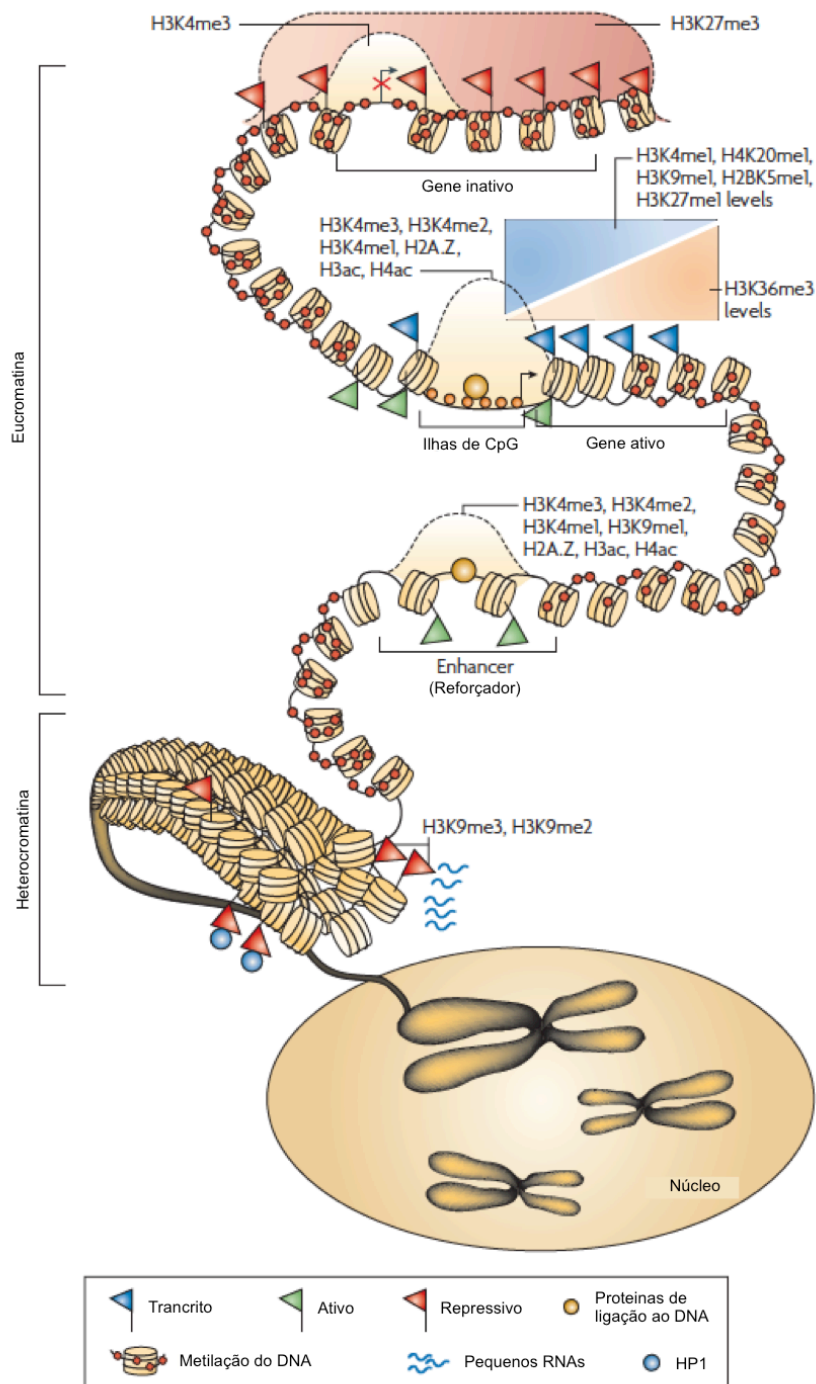
A epigenética (que significa literalmente “acima” ou “além da genética”) foi inicialmente descrita como responsável pelos mecanismos que regulam o destino e especificação de uma linhagem celular durante o desenvolvimento animal (HOLLIDAY, 1990; WADDINGTON, 1959). Atualmente, o termo epigenoma tem sido geralmente usado para descrever a visão global dos processos que modificam a expressão gênica em uma célula, independente da sequência do DNA (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007).

Ao longo das últimas décadas, desde o sequenciamento do genoma humano, muitos esforços têm sido feitos para desvendar o papel funcional dessas informações contidas na sequência do DNA, no entanto como estas informações genômicas direcionam programas de expressão gênica espacial e temporalmente, continuam a ser elucidadas (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; LANDER et al., 2001). Dessa forma, a compreensão desses mecanismos é essencial para entendermos os mecanismos do desenvolvimento humano, bem como para que possamos desvendar as variações fenotípicas entre populações humanas, a etiologia de diversas doenças humanas (ARROWSMITH et al., 2012; BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; RIVERA; REN, 2013)

A cromatina, plataforma para diversos eventos genéticos, pode sofrer modificações enzimáticas tanto em nível de DNA como de proteína, conferindo uma camada adicional de informações ao código do DNA que é herdável e essencial para que a regulação da expressão gênica ocorra de forma apropriada. Um exemplo disso é o funcionamento próprio dos programas gênicos que atuam no desenvolvimento e

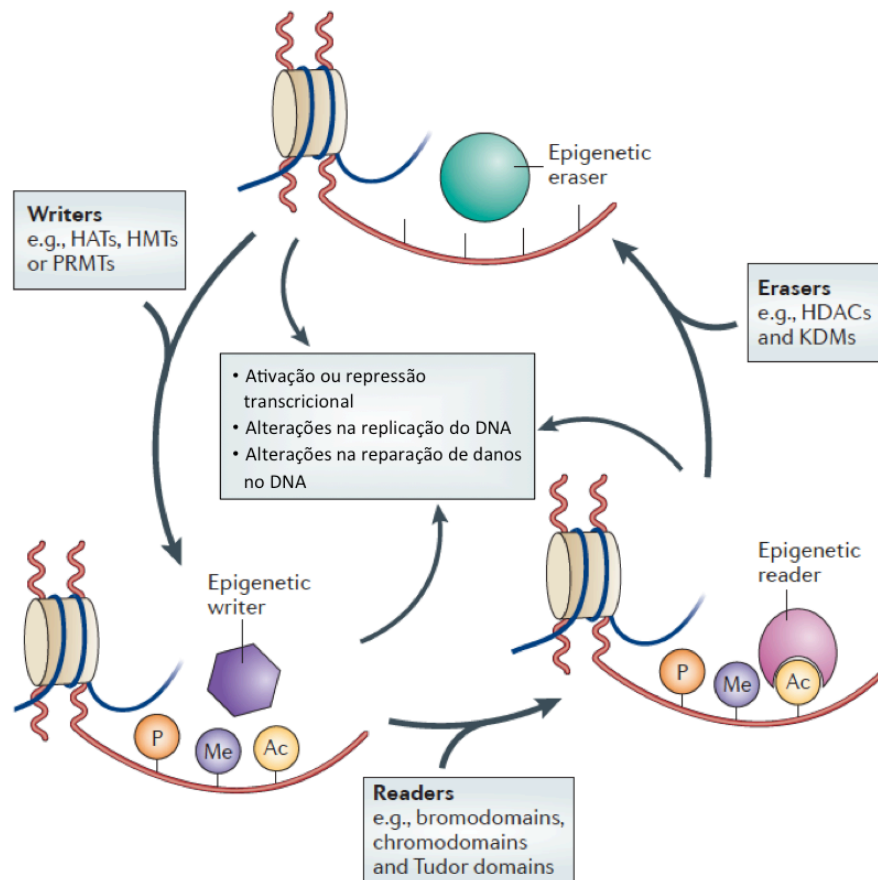
na manutenção dos destinos celulares, pois estes dependem da ativação ou repressão da expressão gênica de forma precisa e adequada. Além disso, as histonas e suas modificações juntamente com fatores de transcrição, metilação do DNA, modificações pós-traducionais, e microRNAs podem agir no controle da atividade transcricional de forma repressora ou ativadora, como demonstrado na Figura 11 (HENIKOFF, 2008; NDLOVU; DENIS; FUKS, 2011).

Dentre os processos epigenéticos citados, as modificações covalentes de histonas e DNA são os principais mecanismos envolvidos na regulação epigenética da expressão gênica. Diversas famílias de enzimas relacionadas e proteínas que interagem com a cromatina podem mediar essas modificações estabelecendo um código ou marca epigenética que está relacionado com a atividade transcricional em locais próximos aos genes. Marcas epigenéticas individuais e em combinações são reconhecidas por várias classes de domínios de proteínas conservadas (dentro de um contexto de complexos multiproteicos grandes) que contribuem para a composição física da cromatina e para o recrutamento de proteínas específicas para o loci genômico (SCHREIBER et al., 2002).



**Figura 11. Regulação epigenética.** As interações entre a metilação do DNA, modificações de histonas, posicionamento dos nucleossomos e outros fatores, tais como microRNAs integram o cenário do epigenoma, que regula a expressão gênica e permite que as células mantenham sua identidade. Adaptado de: (SCHONES; ZHAO, 2008).

As classes de proteínas modificadoras da cromatina são divididas em 3 grupos: *writers* - proteínas que covalentemente adicionam grupos acetila ou metila em resíduos de aminoácidos nas caudas de histonas, *readers* – proteínas que reconhecem e se ligam às marcas epigenéticas, e *erasers* – proteínas que removem as marcas de histonas de acordo com a Figura 12. E essas proteínas estão envolvidas na regulação de diferentes processos associados ao DNA, tais como transcrição, replicação e reparo do DNA (ARROWSMITH et al., 2012; FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014).



**Figura 12. Regulação epigenética por modificações covalentes de histona e DNA.** O processo de regulação epigenética pode ser dinamicamente efetuado por *writers*: histonas acetiltransferases (HATs), histonas metiltransferases (HMTs), proteínas arginina metiltransferases (PRMTs) e cinases, por *readers*: proteínas contendo bromodomínios, cromodomínios e Tudor domínios, ou por *erasers*: histonas desacetilases (HDACs), lisinas demetilases e fosfatases. Adaptado de: (FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014) .

### **1.3.1 Metilação do DNA**

A metilação do DNA, primeira modificação epigenética descrita na literatura, ocorre pela adição covalente de grupos metila no carbono 5' dos resíduos de citosina, resultando em 5-metilcitosina (5meC) (NDLOVU; DENIS; FUKS, 2011). Essa reação é catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs) que principalmente agem nas sequências de dinucleotídeos citosina e guanina (CpG), e influenciam diretamente a atividade transcricional gênica (BRENNER; FUKS, 2007). O silenciamento gênico por metilação de DNA pode ocorrer através de diferentes mecanismos: (i) a presença de 5meC pode inibir diretamente a ligação específica de fatores de transcrição ou (ii) as proteínas de domínio de ligação a metila (MBDs) reconhecem diretamente o DNA metilado e recrutam complexos repressivos modificadores da cromatina (KLOSE; BIRD, 2006).

No genoma de vertebrados, cerca de 70-80% dos dinucleotídeos CpGs são metilados, com exceção das ilhas de CpGs (CGIs) que são regiões não metiladas altamente ricas em guanina e citosina e com pelo menos 200 pb). As CGIs são caracterizadas por apresentarem uma cromatina transcricionalmente mais permissiva, e estão localizadas geralmente em sítios de início de transcrição e em aproximadamente 70% de promotores de genes. Porém, os mecanismos que estabelecem e mantêm as CGIs não metiladas permanecem desconhecidos. (DEATON; BIRD, 2011; ILLINGWORTH; BIRD, 2009; STRAUSSMAN et al., 2009). Além disso, muitas questões sobre como a metilação do DNA regula a expressão gênica, influenciando a diferenciação celular normal e a etiologia de diversas doenças, incluindo câncer, ainda precisam ser elucidadas (ESTÉCIO; ISSA, 2011; NDLOVU; DENIS; FUKS, 2011).

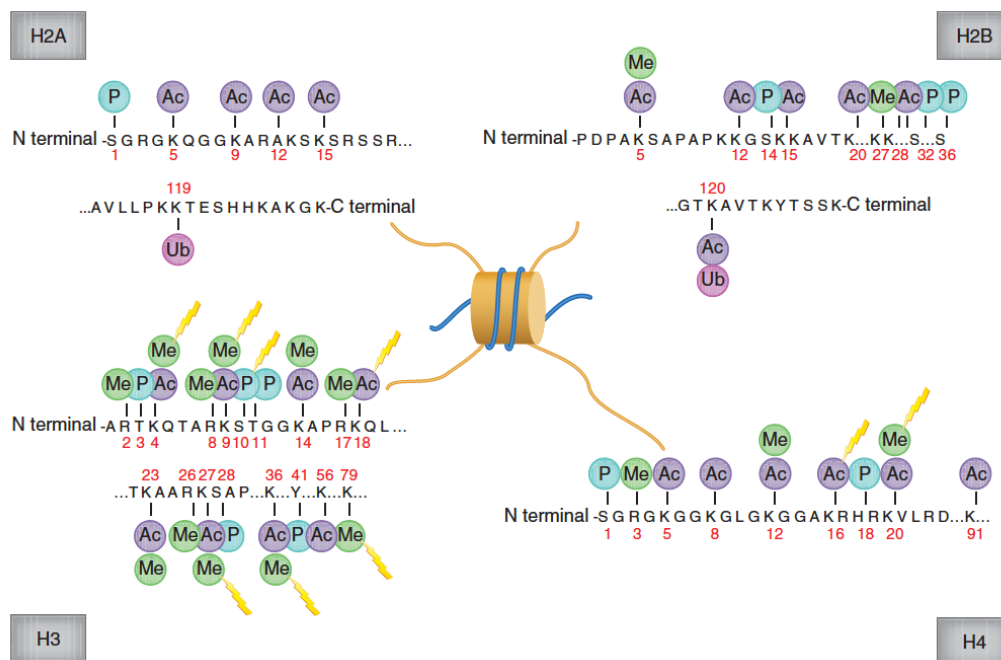
### **1.3.2 Modificações pós-traducionais em histonas**

Em comparação com a metilação do DNA que é bastante estável, as modificações em histonas são consideradas extremamente lábeis. O balanço entre



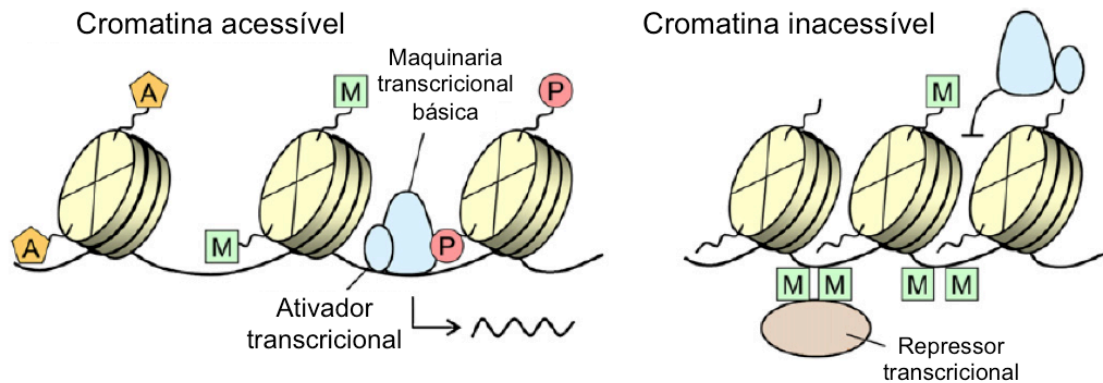
os níveis de atividade de enzimas modificadoras de histonas, que adicionam ou removem modificações específicas, é fundamental para estabelecer a nível global e local os estados de cromatina (condensados ou não) que determinam a atividade transcricional (KELLY; DE CARVALHO; JONES, 2010). As histonas podem sofrer modificações pós-traducionais principalmente ao longo de suas caudas N-terminais protuberantes, mas também dentro de suas regiões C-terminais (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011).

A regulação da expressão gênica pode ser controlada através de ações sinérgicas de múltiplos fatores, incluindo fatores de transcrição, a maquinaria transcricional, remodeladores da cromatina, a presença de específicas variantes de histonas e modificações de histonas. Dentre as modificações pós-traducionais em histonas incluem a metilação em resíduos de arginina (R) e lisina (K), a acetilação em resíduos de lisina (K), a fosforilação em resíduos de serina (S) e treonina (T) e a ubiquitinação em resíduos de lisina (K), (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011), conforme a Figura 13.



**Figura 13. Padrões de modificações de histonas** Principais modificações em cada uma das quatro histonas que compõem a unidade fundamental da cromatina. Ac: acetilação, Me: metilação, P: fosforilação, Ub: ubiquitinação. Obtido de: (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011)

A acessibilidade da cromatina pela maquinaria transcricional é controlada pela ação combinatória de uma ou mais modificações pós-traducionais em histonas que se comunicam dinamicamente ativando ou reprimindo domínios da cromatina, conforme Figura 14 (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; KOUZARIDES, 2007). Diferentemente da metilação de histonas que não altera a carga da proteína histona, a acetilação e a fosforilação de histonas alteram as cargas das histonas de forma que modifique a estabilização das interações eletrostáticas com o DNA criando uma estrutura aberta na cromatina e possibilitando o recrutamento de efetores que medeiam um estado transcricional competente (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; YANG; SETO, 2007).



**Figura 14. Influência das modificações de histonas na atividade transcricional.** Esquema representando as diferenças na condensação da cromatina entre estados transcionalmente ativo ou silenciado. Adaptada de: (GRÄFF; MANSUY, 2008).

- **Metilação de histonas**

Ao longo da última década, os mecanismos que regulam o epigenoma associados à metilação de histonas têm sido gradualmente elucidados. (ARROWSMITH et al., 2012). A metilação de histonas é catalisada por histonas metiltransferases (HMTs) que transferem grupos metila aos resíduos de lisina (K) (podendo ser mono, di ou trimetiladas) e aos resíduos de arginina (R) (podendo ser mono ou dimetiladas) nas histonas H3 e H4. As proteínas arginina metiltransferases

(PRMTs) são enzimas que catalisam a metilação de histonas em resíduos de arginina. As PRMTs apresentam um centro catalítico conservado, no entanto, o que determina a especificidade ao substrato são suas porções N-terminal e C-terminal, pois apresentam regiões não conservadas. (WEISS et al., 2000). Além disso, estudos demonstraram que essas enzimas podem desempenhar um papel na regulação da expressão de genes supressores tumorais (PAL et al., 2004; SINGH et al., 2004b).

As metiltransferases que catalisam a metilação de histonas em resíduos de lisina têm sido agrupadas em duas principais classes: a histona metiltransferase de lisina – específica contendo o domínio SET, que possui uma forte homologia em seu domínio catalítico com 140 aminoácidos, conhecido como SET (Su(var), Enhancer of Zeste, e Trithorax) e a metiltransferase lisina – específica que contém domínios não-SET (FENG et al., 2002; NG et al., 2002). A metilação de histonas em resíduos de lisina é extremamente diversificada no que diz respeito as consequências que pode causar na cromatina, podendo servir tanto como um marcador da eucromatina (transcricionalmente ativa) ou da heterocromatina (transcricionalmente reprimida). Por exemplo, a metilação nas histonas H3K9, H4K20 e H3K27 (marcas repressivas) estão principalmente envolvidas na formação da heterocromatina, enquanto que nas histonas H3K4, H3K36 e H3K79 (marcas ativadoras) estão correlacionadas com a eucromatina. Curiosamente, a manutenção de padrões de transcrição associados à pluripotência em células-tronco embrionárias é controlada por um rigoroso equilíbrio entre a metilação das histonas H3K4 e H3K27, que ativam e reprimem a transcrição, respectivamente (BERNSTEIN et al., 2006a; JAENISCH; BIRD, 2003).

Inicialmente, se pensava que a metilação de histonas era um processo irreversível, no entanto, em 2004, a primeira lisina demetilase LSD1 (lisina demetilase específica 1, também conhecida como KDM1A) foi identificada, e a visão sobre a regulação da metilação de histonas se tornou mais dinâmica, o que propiciou a identificação de muitas outras histonas demetilases. A LSD1 catalisa a demetilação de ambas mono- e dimetilação das lisinas 4 e 9 na histona H3 (RUDOLPH; BEUCH; REUTER, 2013; SHI et al., 2004). Apesar do progresso na identificação de inúmeras

histonas demetilases nos últimos anos, ainda faltam informações com relação ao papel biológico dessas enzimas.

- **Fosforilação de histonas**

A fosforilação de histonas é um processo altamente dinâmico mediado por cinases e fosfatases que pode ocorrer em resíduos de serinas (S), treoninas (T) e tirosinas (Y) predominantemente nas caudas N-terminais de histonas. Ao contrário das fosfatases que removem esta modificação, as cinases controlam os níveis de fosforilação através da adição de um grupo fosfato a partir do ATP ao grupo hidroxila da cadeia de aminoácidos. Esta modificação adiciona carga negativa na histona tornando a interação histona-DNA mais fraca resultando em uma maior acessibilidade do DNA na estrutura da cromatina, o que pode facilitar a atividade transcricional. Porém, o mecanismo de como as cinases são recrutadas, de forma precisa, para seu local de ação na cromatina ainda não está claro (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Estudos demonstram que a fosforilação de histonas desempenha papéis essenciais no remodelamento da cromatina associados a outros processos celulares nucleares como transcrição e compactação da cromatina durante a divisão celular e apoptose. Um exemplo, é a fosforilação da histona 3 H3 na serina 10 (S10), uma marca característica de condensação da cromatina que está associada a mitose e meiose em organismos eucariotos (ROSSETTO; AVVAKUMOV; CÔTÉ, 2012).

- **Acetilação de histonas**

Desde sua primeira descrição na literatura, (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964), a acetilação de histonas tem sido estabelecida como um processo altamente dinâmico regulado por duas famílias de enzimas – as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs) – das quais operam de maneira oposta. As HATs utilizam o acetil-CoA como um cofator para catalisar a transferência do

grupo acetila para o grupo  $\epsilon$ -amina de cadeias laterais da lisina na histona. Isto resulta na neutralização da carga positiva na lisina, reduzindo, assim, as interações entre histona e DNA, o que resulta em uma estrutura da cromatina mais relaxada, possibilitando o recrutamento da maquinaria transcricional (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Além disso, acetilação de histonas tem sido correlacionada com diversas funções no genoma, incluindo montagem da cromatina, reparo do DNA, recombinação gênica e regulação da expressão gênica (POLO; ALMOUZNI, 2005; VIDANES; BONILLA; TOCZYSKI, 2005; WEINREICH; PALACIOS DEBEER; FOX, 2004).

### **1.3.3 Modificadores epigenéticos**

- **Histonas acetilases**

Existem duas principais classes de HATs: tipo-A e tipo-B, conforme descrito na Tabela 5. As HATs do tipo A compõem complexos multiproteicos grandes que agem na cromatina e estão envolvidos no controle transcricional. Essa classe é dividida em pelo menos 3 grupos dependendo da homologia de sequência e estrutura conformacional: GNAT, MYST e CBP/p300 (HODAWADEKAR; MARMORSTEIN, 2007). Essas enzimas não apenas possuem a capacidade de modificar diferentes sítios da porção N-terminal das caudas de histonas, bem como sítios adicionais de acetilação presentes dentro do núcleo globular da histona, como por exemplo, H3K56 que é acetilada em humanos pela hGCN5 (TJEERTES; MILLER; JACKSON, 2009).

A maioria das HATs do tipo-B são localizadas predominantemente no citoplasma, e são responsáveis pela acetilação de histonas livres, ou seja que recentemente foram sintetizadas, e estão envolvidas diretamente na montagem do nucleossomo (Tabela 5) (PARTHUN, 2007).

**Tabela 5. Famílias de histonas acetiltransferases**

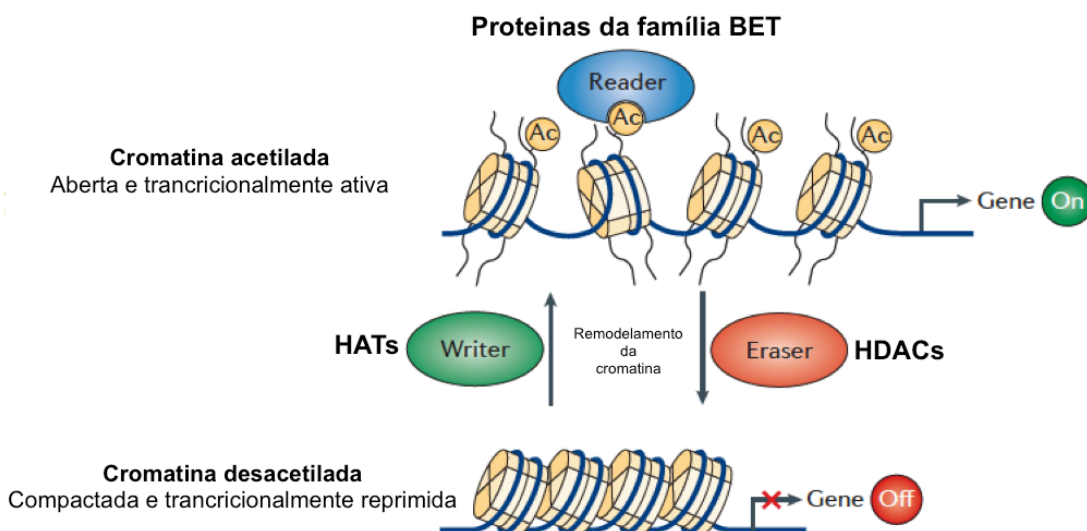
<b>Família HAT/KAT</b>	<b>Membros representativos</b>	<b>Modificação de histona</b>
<b>Tipo A (HAT nuclear)</b>		
<b>1) GNAT</b>	GCN5/KAT2A, PCAF/KAT2B ELP3/KAT9 CBP/KAT3A, p300/KAT3B	H3K9, K14, K18, H2B H3, acetilação H4
<b>2) p300/CBP</b>	CBP, KAT3A, p300/KAT3B	H3K9, K14, K18, H2B H2AK5, H2BK12, K15
<b>3) MYST</b>	TIP60/KAT5, MOZ/KAT6A, MORF/KAT6B, HBO1/KAT7, HMOF/KAT8	H4K5, K8, K12, K16 H3K14 H4K5, K8, K12 H4K16
<b>4) Fator de transcrição relacionado</b>	TFIIIC90/KAT12, TAF1/KAT4	H3K9, K14, K18 H3, acetilação H4
<b>5) receptor nuclear associado</b>	SCR1/KAT13A, ACTR/KAT13B	acetilação H3/H4
<b>Tipo B HAT (HAT citoplasmática)</b>	HAT1/KAT1	H4K5, K12

Revisado de: (SELVI et al., 2010).

As HATs apresentam o papel de promover sítios de ligação para proteínas que ativam a expressão gênica (ARROWSMITH et al., 2012; MINUCCI; PELICCI, 2006). Particularmente, os bromo-domínios presentes nas HATs GCN5, PCAF, p300 e CBP, que são altamente conservados desde levedura a humano, regulam a transcrição gênica tanto pela sua atividade enzimática de histona acetiltransferase quanto pela sua interação com a cromatina (BEDFORD et al., 2010; FARRIA; LI; DENT, 2015). Adicionalmente, os bromo-domínio nas HATs possuem um papel no reconhecimento de acetil-lisinas principalmente nas caudas de histonas H3 e H4, mas também na H2A/H2B e em proteínas não-histona (FILIPPAKOPOULOS; KNAPP, 2012).

De um modo operacional reverso as HATs, as HDACs removem os grupos acetilas de lisinas, o que restaura a carga positiva das caudas de histonas, resultando em maior estabilidade da arquitetura local da cromatina. Esta modificação

está associada à condensação da cromatina e repressão transcricional, conforme Figura 15 (ROTH; DENU; ALLIS, 2001; THIAGALINGAM et al., 2003).



**Figura 15. Efeito da acetilação de histonas no remodelamento da cromatina e na expressão gênica.** Adaptado de: (VERDIN; OTT, 2015).

- **Histonas desacetilases**

Em humanos existem 18 enzimas HDACs, e estas são agrupadas em 2 famílias e divididas em 4 classes: a família de HDACs clássica é composta por HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 (classe I); HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10 (classe II); e HDAC11 (classe IV), das quais apresentam similaridade de sequência e mecanismo catalítico dependente de  $Zn^{2+}$ ; e a família das sirtuínas SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, e SIRT7 (classe III) que requerem  $NAD^+$  como cofactor para atividade enzimática (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006; KINGSTON et al., 2014).

Além da função nuclear na condensação da cromatina e inibição da atividade transcricional, as HDACs apresentam importantes funções citoplasmáticas no controle do status de acetilação de inúmeras proteínas citoplasmáticas e de fatores de transcrição (YANG; SETO, 2008). As HDACs membros da classe I são expressas

de forma ubíqua. As HDACs 1, 2, e 3 compõem subunidades de complexos multiproteicos nucleares cruciais na repressão transcricional, sendo que as HDACs 1 e 2 são componentes dos complexos remodeladores da cromatina NURD, SIN3 e coREST envolvidos na repressão da expressão gênica (VIDAL; GABER, 1991; YANG et al., 1996). Esse último complexo (coREST) mais especificamente está envolvido na repressão de genes neuronais em tecidos não neuronais (VIDAL; GABER, 1991). A HDAC 3 é encontrada nos complexos repressores N-COR e SMRT (RUNDLETT et al., 1996). Curiosamente, a HDAC 8, também membro da classe I, não é encontrada como componente de complexos repressores, o que sugere uma função específica para esta enzima.

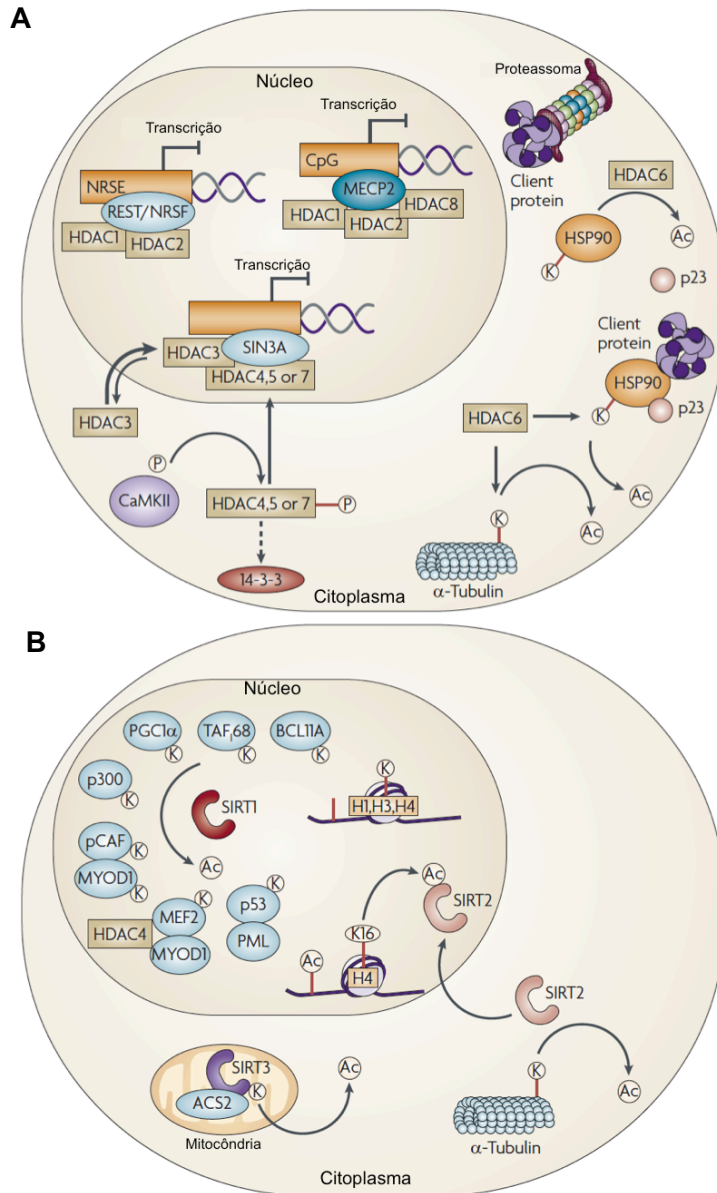
A classe II de HDACs pode ser subdividida em IIA e IIB. Os membros da classe IIA (HDACs 4, 5, 7, 9) apresentam uma função nuclear bem estabelecida, enquanto que seu papel no citoplasma ainda não está bem elucidado. Estas enzimas são definidas por um grande domínio funcionalmente importante e por funcionarem como transdutores de sinal para reprimir a transcrição de maneira dependente de fosforilação (YANG; SETO, 2008). Alguns grupos de cinases, tais como, cinases dependentes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKs), cinases regulando afinidade de microtúbulos, e cinase checkpoint 1 (CHK1) têm sido demonstrados na regulação da fosforilação dos sítios de ligação 14-3-3 em HDACs (CHANG et al., 2005; KIM et al., 2007; LINSEMAN et al., 2003; MARTIN; KETTMANN; DEQUIEDT, 2007; MCKINSEY et al., 2000).

Em comparação com a função nuclear das HDACs da classe IIA, o principal membro da classe IIB, a HDAC6, apresenta funções independentes da atividade de desacetilase, o que suporta a teoria de que esta possui um importante papel como regulador de múltiplos processos citoplasmáticos. Através de seu domínio de dedo de zinco, a HDAC6 se liga a ubiquitina, e assim, regula diversas funções citoplasmáticas como agressoma, autofagia, fator de choque térmico 1 (HSF-1) e funções associadas ao fator de crescimento derivado de plaquetas (KAWAGUCHI et al., 2003; PANDEY et al., 2007). A HDAC10, apresenta-se estruturalmente



relacionada à HDAC6, no entanto, possui um domínio catalítico adicional inativo, e função ainda é desconhecida (WITT et al., 2009).

A classe IV é composta por apenas um membro conhecido, a HDAC11, que pode se localizar tanto no núcleo quanto no citoplasma dependendo do modelo celular, interage com proteínas que exercem funções nos seguintes processos biológicos: expressão gênica e remodelamento da cromatina, processamento do RNA, ciclo celular, ubiquitinação, transdução de sinal, transporte de proteínas e íons, e enovelamento de proteínas (JOSHI et al., 2013). A classe III é composta por sirtuínas que podem ser encontradas em diferentes compartimentos subcelulares, as SIRT6 e SIRT7 são localizadas no núcleo, as SIRT3, SIRT4, SIRT5 são localizadas em mitocôndrias, as SIRT1 e SIRT2 podem ser encontradas no núcleo e no citoplasma dependendo do contexto celular ou tecidual (HAIGIS; GUARENTE, 2006). As sirtuínas são funcionalmente associadas a diversos processos biológicos como regulação da cromatina e atividade transcricional, reparo do DNA, sobrevivência celular, ciclo celular, e metabolismo, conforme Figura 16 (FINKEL; DENG; MOSTOSLAVSKY, 2009; HAIGIS; GUARENTE, 2006).



**Figura 16. Esquema representativo do efeito de HDACs no núcleo e no citoplasma.** (A) Os complexos de HDACs formam-se no núcleo para regular a transcrição, tipicamente através de mecanismos que conduzem à repressão transcrricional, como representado pelas linhas bloqueadas nos promotores. Além disso, a HDAC6 está envolvido na estrutura do citoesqueleto e de degradação proteassomal, enquanto que as HDAC4, HDAC5, HDAC7 podem transitar entre o núcleo e o citosol, e são fosforiladas no citosol. (B) Representação esquemática de diversos alvos proteicos da desacetilação da situína 1 (SIRT1) no núcleo, bem como os papéis da SIRT2 na desacetilação de histonas e estrutura do citoesqueleto, e SIRT3 na função mitocondrial. Adaptado de (KAZANTSEV; THOMPSON, 2008).

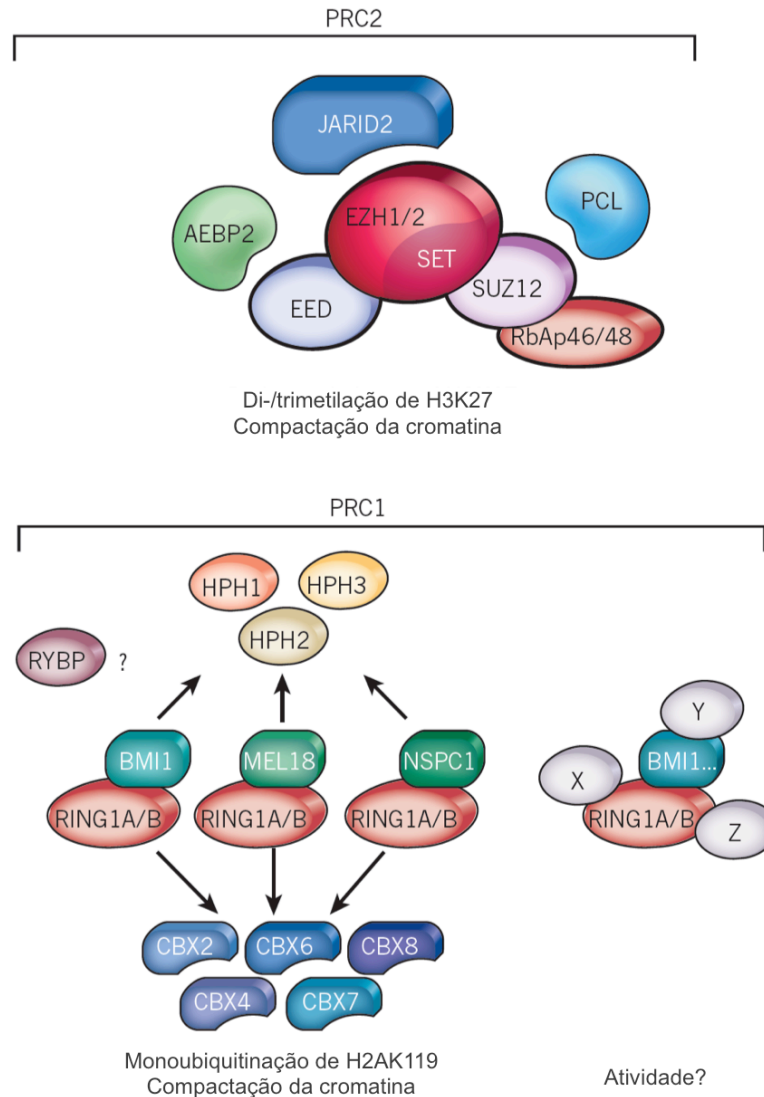
- **Proteínas do grupo polycomb (PcGs)**

Polycomb (Pc) foi primeiramente descrito em uma *Drosophila* mutante que apresentava uma segmentação corporal inadequada. Além disso, foi sugerido que polycomb desempenha um papel de regulador negativo afetando genes da família Homeobox, requeridos para segmentação (LEWIS, 1978). As proteínas do grupo polycomb (PcGs), atualmente, são caracterizadas por desempenhar um papel na manutenção do padrão da expressão gênica em diferentes células durante estágios iniciais do desenvolvimento, através da regulação da estrutura da cromatina (SCHUETTENGRUBER; CAVALLI, 2009).

O silenciamento gênico mediado por proteínas do grupo polycomb ocorre em parte principalmente através de modificações pós-traducionais de histonas. Em mamíferos, existem dois principais complexos do grupo polycomb – o complexo repressivo polycomb 1 (PRC1) e o 2 (PRC2). O complexo repressivo PRC2 é responsável pela metilação (di- ou tri) da lisina 27 na histona H3 (H3K27me2/3) através de suas subunidades enzimáticas EZH1 e EZH2, enquanto o complexo repressivo PRC1 atua na compactação da cromatina e catalisando a monoubiquitinação na lisina 119 (K119) na histona H2A (H2AK119ub) via enzimas ubiquitina ligases RING1A e RING1B (ESKELAND et al., 2010; SCHUETTENGRUBER; CAVALLI, 2009; SIMON; KINGSTON, 2009).

O componente do PRC1 Pc, conhecido como CBX, se liga especificamente ao produto da catálise de PRC2, H3K27me3, o que leva a hipótese de que a função de PRC1 ocorre à jusante de PRC2. Embora isto ainda seja citado na literatura, esse estado operacional pode ser um equívoco, pois existem genes alvo de PRC2 que não apresentam a marca H2AK119ub e genes alvo de PRC1 na ausência de PRC2. No entanto, muitas vezes ambos PRC2 e PRC1 são necessários para manter a repressão gênica (KU et al., 2008; SCHOEFTNER et al., 2006; SING et al., 2009). O cerne do complexo PRC2, que é conservado de *Drosophila* a mamíferos, compreende de quatro principais componentes: EZH1/2, SUZ12, EED e RbAp46/48 (também conhecido como RBBP7/4). Além desses, outros polipeptídeos como

AEBP2, PLCs e JARID2 fazem parte do complexo PRC2. Já a composição do complexo PRC1 é mais variável, apresentando apenas dois componentes do cerne em comum: RING1A/B em conjunto com BMI1, MEL18 (PCGF2) ou NSPC1 (PCGF1) (MARGUERON; REINBERG, 2011; SIMON; KINGSTON, 2009; WHITCOMB et al., 2007), conforme Figura 17.



**Figura 17. Os complexos repressivos Polycomb PRC1 e PRC2.** Diagramas representando a composição de PRC2 e PRC1. Em PRC1 são demonstradas as composições clássicas do complexo (à esquerda), e os complexos chamados PRC1 semelhante (à direita) Adaptado de: (MARGUERON; REINBERG, 2011).

Em vertebrados, o complexo PRC2 contém duas cópias do *Enhancer of Zeste Homologue*, EZH1 e EZH2, no entanto, diferentes padrões de expressão são observados, como EZH1 está presente tanto em células que estão sofrendo divisão e também diferenciação, enquanto que EZH2 está presente apenas em células que estão se dividindo ativamente. Além disso, os complexos contendo EZH1 (PRC2-EZH1) em vez de EZH2 apresentam baixa atividade de metiltransferase comparado ao PRC2-EZH2. Isto sugere que PRC2-EZH2 estabelece os níveis celulares de H3K27me<sub>2/3</sub> mediado pela atividade de metiltransferase de EZH2, e que PRC2-EZH1 pode restaurar eventual perda de H3K27me<sub>2/3</sub> após troca de histona ou via atividade de demetilases (MARGUERON et al., 2008; SHAVER et al., 2010).

A metilação de H3K27, que pode ser catalisada por EZH1 ou EZH2, é uma reação processiva na qual a estável marca epigenética H3K27me<sub>3</sub> é o resultado da monometilação de H3K27me<sub>2</sub> (ZEE et al., 2010). A H3K27 acetilada possui um papel antagonista ao silenciamento mediado por proteínas PcG, e seus níveis são enriquecidos na ausência de PRC2. A metilação de H3K27 é bastante abundante em células tronco embrionárias, com aproximadamente 50% da histona H3K27 dimetilada, 15% trimetilada e 15% monometilada (PETERS et al., 2003). Estudos têm demonstrado que PRC2 especificamente reside e direciona-se na deposição de H3K27me<sub>3</sub> nos genes *Hox*, bem como em inúmeros outros genes que codificam reguladores do desenvolvimento. Com base no estudo da diferenciação celular de células tronco embrionárias, a inativação de PRC2 resulta na prevenção da especificação de linhagem e diferenciação terminal. Embora isto previna a adipogênese e linfopoiese, a inativação de PRC2 também pode promover diferenciação durante a miogênese e formação da epiderme, através da reativação de genes associados à diferenciação (SU et al., 2003; WANG et al., 2010). Portanto, é provável que as funções individuais codificadas por genes alvos de PRC2 sejam reativados e assim ativem os programas gênicos reguladores da diferenciação celular.

Grande número de evidências tem demonstrado que a desregulação de PRC2-EZH2 está associada a uma variedade de cânceres humanos. Mutações com ganho de função enzimática ou a superexpressão de EZH2 é frequentemente correlacionada com metástase e prognóstico ruim de doenças hematopoiéticas malignas, assim como também, em tumores sólidos, tais como, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, glioblastoma e rabdomyossarcoma (CIARAPICA et al., 2014; LI et al., 2013; MCCABE et al., 2012; RICHTER et al., 2009; WANG et al., 2012).

## **1.4 Modulação epigenética como estratégia terapêutica**

### **1.4.1 Inibidores de HDACs**

A expressão alterada e o recrutamento aberrante de HDACs têm sido frequentemente identificados em diferentes malignidades humanas. Com isso, ao longo de quase duas décadas, as HDACs têm sido extensivamente investigadas como alvos terapêuticos promissores para reverter o estado epigenético aberrante encontrado no câncer (ELLIS; ATADJA; JOHNSTONE, 2009; HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009; JONES; BAYLIN, 2007; MARKS; XU, 2009). Esse conhecimento estimulou o desenvolvimento de diversos inibidores de HDACs (*HDAC inhibitors*, HDis) que são clinicamente eficazes em vários tipos de câncer, validando, assim, a importância das terapias epigenéticas em oncologia. Um grande número de HDis estruturalmente diversos tem sido purificado a partir de fontes naturais ou sinteticamente desenvolvidos (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006). A seletividade dos HDis é baixa, portanto, possuem um amplo espectro de atividade sobre múltiplas HDACs, o que dificulta o entendimento de seus mecanismos mais especificamente (MARKS, 2010). Os HDis são classificados com base na sua estrutura química: ácidos graxos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, benzamidas, tetrapeptídeos cíclicos, cetonas eletrofilicas, e diversos, conforme Tabela 6.

**Tabela 6. Características moleculares dos inibidores de histona desacetilases e seus *status* na clínica.**

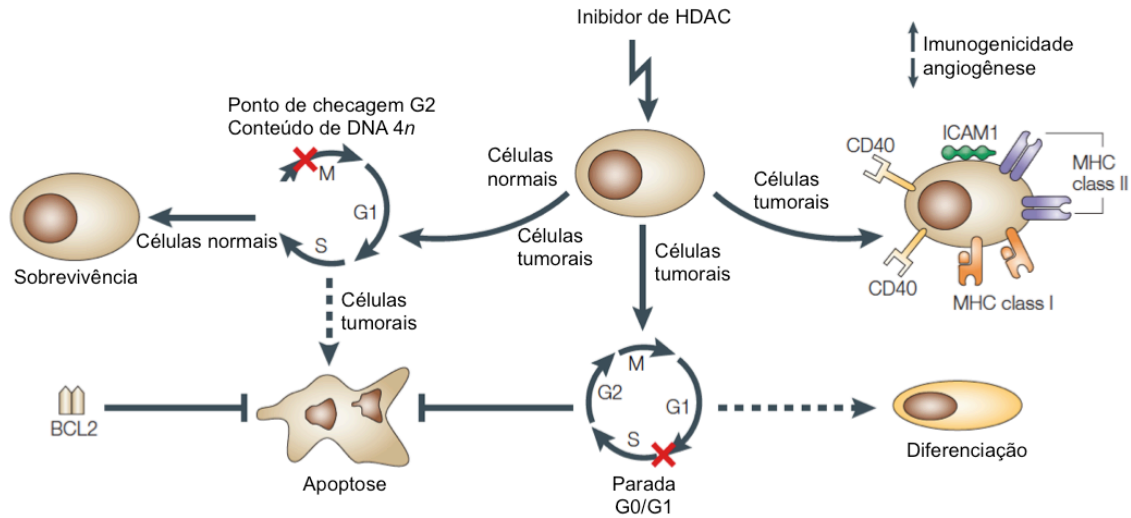
Composto	Classe	[Conc.]	Especificidade de HDAC	Genes ativados	Genes reprimidos	Efeito <i>in vitro</i>	Ensaios clínicos
<b>Butirato de sódio</b>	ácido graxo de cadeia curta	mM	Classe I, IIa	<i>CDKN1A, GATA2, PKCD, MHC1, MHC2, BAK, IL8, RARβ, TG1, Cyclin E, CPA3, CD86, ICAM1</i>	Cyclin D1, Cyclin A, <i>BCL2, IL2, BCLX</i>	Apoptose Diferenciação Parada no ciclo celular	Fase I, II
<b>Fenil-butarato</b>	ácido graxo de cadeia curta	mM	Classe I, II				Fase II
<b>Ácido valproílico</b>	ácido graxo de cadeia curta	mM	Classe I, IIa	β-catenina		Apoptose Diferenciação	Fase I, II
<b>Tricostatina A</b>	ácido hidroxâmico	nM	Classe I, II	<i>CDKN1A, GATA2, HSP86, CDKN1B, PKCD, HDAC1, IGFBP3, DHFR, TGFB1, ER, CD86, Cyclin E, IFNG, IFNB, TP53, VHL, MHC1, MHC2, CPA3, P107, BAX, BAK, TG1, CDKN2A, MLH1, TIMP3</i>	Cyclin A, <i>CDKN1C, BCLX, PU.1, HIF1A, VEGF, IL2, IL10</i>	Apoptose Diferenciação Parada no ciclo celular	N/D
<b>Ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA)</b>	ácido hidroxâmico	μM	Classe I, II	<i>CDKN1A</i>	<i>cMYC, cMYB, BMYB</i>	Apoptose Diferenciação Parada no ciclo celular	Aprovado (CTCL)
<b>Depsipeptídeo (Istodax)</b>	tetrapeptídeos cíclicos	nM	Classe I	<i>CDKN1A, MAGE3, NY-ESO1, CD86</i>	<i>CD95L, cMYC, Cyclin D</i>	Apoptose Parada no ciclo celular	Aprovado (CTCL)
<b>MS-275 (Entinostat)</b>	benzamida	μM	HDACs 1, 2,3, e 8 (fracamente)	<i>CDKN1A</i>		Parada no ciclo celular	Fase II, (mama, linfoma de Hodgkin, e NSCLC)

Adaptado e revisado de: (ARROWSMITH et al., 2012; BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006; JOHNSTONE, 2002; MOTTAMAL et al., 2015).

Os primeiros HDis que foram identificados são os ácidos graxos de cadeia curta como butirato de sódio (NaB) e o ácido valpróico (VPA) (LEDER; LEDER, 1975; NOVOGRODSKY et al., 1983; REPHAELI; ZHUK; NUDELMAN, 2000; RIGGS et al., 1977). Esses agentes são menos potentes comparados as outras várias classes de HDis, pois apresentam IC<sub>50</sub> na faixa de concentração de mM. NaB foi inicialmente caracterizado por apresentar potencial para induzir diferenciação celular e por causar hiperacetilação de histonas (LEDER; ORKIN; LEDER, 1975; RIGGS et al., 1977). Além dessas características, NaB e o ácido valpróico (VPA) inibem predominantemente a atividade de HDACs das classes I, IIA, e afetam a expressão de um grande número de genes envolvidos em funções celulares (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006). Outros HDis tricostatina A (TSA) e o ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA), classificados como ácidos hidroxâmicos, são caracterizados por apresentarem maior potência de inibição de HDACs (com respectivos IC<sub>50</sub> na faixa nM – µM) e um amplo espectro de ação podendo afetar a expressão de 2 – 10% dos genes do genoma humano (WITT et al., 2009). O depsipeptídeo, da classe dos tetrapeptídeos cíclicos, possui atividade mais potente contra HDAC1 e HDAC2 do que as HDACs de classe II HDAC4 e HDAC6 (FURUMAI et al., 2002). Já o MS-275, da classe das benzamidas, preferencialmente inibe HDAC1, é menos ativo contra HDAC3 e fracamente inibe HDAC8 (HU et al., 2003).

De maneira geral, os HDis induzem parada no ciclo celular, diferenciação ou apoptose (*in vitro*) e muitos deles possuem potentes atividades antitumorais (*in vivo*) (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006; MARKS et al., 2001) O mecanismo de ação dos HDis envolve a inibição da atividade das HDACs e a hiperacetilação de histonas. Como as HAT e HDACs possuem como substrato não apenas as histonas, inúmeras outras proteínas não histonas podem sofrer modificação decorrente da atividade dessas enzimas. Por essa razão, os HDis apresentam efeitos de ativação ou repressão na expressão de diversas proteínas que regulam crescimento celular, parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose (XU; PARMIGIANI; MARKS, 2007), conforme Figura 18.





**Figura 18. Efeito de HDi na regulação do crescimento, sobrevivência, apoptose e diferenciação celular. Adaptado de: (JOHNSTONE, 2002).**

### 1.4.2 Inibidores de PRC2-EZH2

O desenvolvimento de inibidores específicos para EZH2 tem sido uma área de investigação bastante ativa, da qual resultados pré-clínicos promissores estão sendo obtidos e ensaios clínicos de fase I já estão em andamento com resultados preliminares que sugerem uma potencial atividade clínica como descrito na Tabela 7.

**Tabela 7. Inibidores de EZH2 e seu *status* de desenvolvimento na clínica.**

<b>Composto</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Potência (Ki, nM)</b>	<b>Seletividade</b>	<b>Status</b>	<b>Referências</b>
<b>DZNep</b>	Inibidor da SAH hidrolase de metiltransferases	Desconhecida	Desconhecida	Pré-clínico	(HAYDEN et al., 2011; KEMP et al., 2012; SUVÀ et al., 2009)
<b>EI1</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	13 ± 3 nM	> 10.000 vezes sobre outras HMTs, ≈ 90 vezes sobre EZH1	Pré-clínico	(QI et al., 2012)
<b>EPZ005687</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	24 ± 7 nM	> 500 vezes sobre outras HMTs, ≈ 50 vezes sobre EZH1	Pré-clínico	(KNUTSON et al., 2012a)
<b>GSK-343</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	1.2 ± 0.2 nM	> 1000 vezes sobre outras HMTs, ≈ 60 vezes sobre EZH1	Pré-clínico	(VERMA et al., 2012)
<b>GSK-126</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	0.5 ± 3 nM	> 1000 vezes sobre outras 20 HMTs, ≈ 150 vezes sobre EZH1	Estudo clínico de fase I	(MCCABE et al., 2012)
<b>UNC-1999</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	4.6 ± 0.5 nM	> 1000 vezes sobre outras HMTs, ≈ 10 vezes sobre EZH1	Pré-clínico	(KONZE et al., 2013)
<b>EPZ-6438</b>	Inibidor SAM-competitivo de PRC2	2.5 ± 0.5 nM	> 4500 vezes sobre outras 14 HMTs, ≈ 35 vezes sobre EZH1	Estudo clínico de fase I e II	(KNUTSON et al., 2013, 2014)
<b>SAH-EZH2</b>	Peptídeo que mimetiza a α – hélice do domínio de ligação a EED de EZH2 para impedir ou romper a interação entre EZH2 e EED,	desconhecida	Seletivo para EZH2 sobre EZH1	Pré-clínico	(KIM et al., 2013)

Revisado de: (KIM; ROBERTS, 2016).

O primeiro inibidor de EZH2 que foi amplamente usado para estudos experimentais foi o 3-deazaneplanocin A (DZNep). Este é um análogo de ciclopentanil de 3-deazaadenosina que interfere potencialmente na hidrolase S-adenosil-l-homocisteína (SAH), um componente do ciclo da metionina que causa o aumento nos níveis celulares de SAH, reprimindo a atividade da histona lisina metiltransferase dependente de S-adenosil-l-metionina, no entanto, o efeito de DZNep na inibição da histona metiltransferase não é específico para EZH2 (GLAZER et al., 1986). DZNep apresenta significativa atividade antitumoral para vários tipos de cânceres, impactando com a inibição de PRC2 e remoção da marca repressiva H3K27me3 (TAN et al., 2007). Apesar dos resultados *in vitro* e *in vivo* serem potencialmente promissores, DZNep possui uma meia vida muito curta no plasma, conferindo inibição não-específica da metilação de histonas e é tóxico em modelos animais (MIRANDA et al., 2009).

Então, com o intuito de melhorar a atividade antitumoral e reduzir toxicidade, compostos potentes e seletivos que inibem EZH2 têm sido desenvolvidos. Em 2012, diversos grupos de pesquisa têm revelado o desenvolvimento de inúmeros compostos inibidores competitivos para S-adenosilmetionina (SAM) derivados de triagens bioquímicas de alto rendimento. EPZ005687 pode se ligar em ambos EZH2 selvagem e mutante-Y641 de células de linfoma, e este composto apresenta 500 vezes mais seletividade para EZH2 comparado a 15 outras metiltransferases humanas, 50 vezes de seletividade para EZH1. Além disso, demonstra inibição de H3K27me3 de maneira dose-dependente para ambos EZH2 selvagem e mutante (KNUTSON et al., 2012a). EI1 inibe ambos EZH2 selvagem e mutante, e possui uma seletividade maior que 10.000 vezes comparado a outras metiltransferases e 90 vezes comparado a EZH1 (QI et al., 2012). GSK-126 também demonstra inibição para ambos EZH2 selvagem e mutante, porém apresenta maior seletividade para EZH2, mais de 1000 vezes comparado a outras metiltransferases e 150 vezes comparado a EZH1. Estudos *in vivo*, demonstraram que GSK-126 inibe significativamente o crescimento de linfomas que carregam mutações ativadoras de EZH2 (MCCABE et al., 2012). Similarmente ao GSK-126, GSK-343 inibe a atividade

catalítica de EZH2 e apresenta uma seletividade para EZH2 de mais de 1000 vezes em comparação a outras metiltransferases, no entanto, apresenta uma maior seletividade para EZH1 (aproximadamente 60 vezes). Além disso, GSK-343 demonstrou uma potente capacidade de inibir a proliferação de células de câncer de mama e de próstata com um  $IC_{50}$  de aproximadamente 2.9  $\mu$ M (VERMA et al., 2012).

UNC-1999 foi o primeiro inibidor altamente seletivo para EZH2 selvagem e mutante oralmente biodisponível. Este apresenta uma seletividade acima de 1000 vezes para EZH2 em comparação a outras metiltransferases e é relativamente ativo contra EZH1 pois apresenta uma potência 10 vezes menor do que para EZH2, oferecendo assim o potencial para inibir a atividade de ambos EZH2 e EZH1 (KONZE et al., 2013). UNC-1999 apresenta uma potente atividade para suprimir a tri-/dimetilação da H3K27 (H3K27me<sub>3/2</sub>), e além disso demonstrou um potente efeito de inibitório no crescimento de células de leucemia MLL-rearranjadas (XU et al., 2015a). EPZ-6438 foi desenvolvido subsequentemente, e demonstra maior potência e melhores propriedades farmacocinéticas do que o EPZ005687, incluindo uma boa biodisponibilidade oral (KNUTSON et al., 2013). Estudos clínicos de fases I e II com EPZ-6438 estão sendo iniciados em pacientes com tumores sólidos em estágio avançado e em pacientes com linfoma de células B.

O inibidor SAH-EZH2 é um peptídeo com alfa-hélice de EZH2 estabilizada, e foi derivado a partir do domínio de EZH2 que interage com EED. SAH-EZH2 rompe a estabilidade do complexo EZH2-EED, reduzindo os níveis proteicos de EZH2 e seletivamente inibe a trimetilação H3K27 de maneira dose-dependente (KIM et al., 2013). Esse peptídeo tem demonstrado efetividade para células de leucemia (MLL-AF9) dependentes de EZH2 e para células de linfoma mutadas para EZH2, no entanto, nenhum efeito foi observado em células não transformadas e para EZH2 selvagem. Apesar do efeito de SAH-EZH2 resultar na diminuição dos níveis de H3K27me<sub>3</sub>, o efeito parece estar mais fortemente correlacionado com a redução dos níveis proteicos de EZH2, o que corrobora com os achados mostrando dependência não-enzimática de EZH2 em células tumorais que carregam mutações no complexo remodelador da cromatina SWI-SNF (KIM et al., 2015)

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

- **Hipótese**

A inibição da atividade de proteínas modificadores da cromatina reprograma epigeneticamente as células de tumores sólidos pediátricos para um estado mais diferenciado.

- **Objetivo geral**

Avaliar o efeito da modulação da atividade de enzimas modificadoras da cromatina no crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência e atividade oncogênica de linhagens celulares dos tumores sólidos pediátricos: sarcoma de Ewing e neuroblastoma.

- **Objetivos específicos**

**Manuscrito I**

- a. Avaliar o efeito de NaB sobre os níveis globais da atividade de HDAC em células de sarcoma de Ewing (SK-ES 1 e RD-ES);
- b. Examinar o efeito da inibição da atividade de HDAC por NaB no crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência de células de sarcoma de Ewing (SK-ES1 e RD-ES);

- c. Investigar em nível molecular os efeitos da inibição atividade global de HDAC, por NaB, sobre os níveis de proteínas-chave que controlam vias de proliferação, sobrevivência, pluripotência e diferenciação celular em sarcoma de Ewing (SK-ES1 e RD-ES);
- d. Avaliar o efeito a longo prazo da inibição da atividade global de HDAC sobre a capacidade proliferativa de células de sarcoma de Ewing (SK-ES1 e RD-ES);
- e. Examinar os efeitos de NaB no crescimento e sobrevivência de tumoresferas de sarcoma de Ewing provenientes das linhagens SK-ES 1 e RD-ES.

### **Manuscrito II**

- a. Avaliar o efeito da inibição da atividade catalítica de EZH2, através da utilização de inibidores de pequenas moléculas altamente seletivos para EZH2 (GSK-126, GSK-343) ou para ambas as subunidades catalíticas EZH2 e EZH1 (UNC-1999), sobre o crescimento, proliferação, diferenciação celular em diferentes linhagens de neuroblastoma (NGP, KCNR, IMR-32, SAN, SY5Y, NB69);
- b. Investigar os níveis proteicos da marca repressiva H3K27me3 e os níveis de mRNA de genes supressores tumorais que controlam diferenciação após a inibição da atividade catalítica de EZH2 em células de neuroblastoma;
- c. Examinar o efeito *in vitro* a longo prazo da inibição da atividade catalítica de EZH2 ou de ambas subunidades EZH2 e EZH1 sobre a atividade oncogênica de células neuroblastoma através do crescimento independente de ancoragem;

**d.** Avaliar o efeito *ex-vivo* da inibição da atividade catalítica de ambas subunidades EZH2 e EZH1, por UNC-1999, no crescimento de tumores de xenoenxerto de neuroblastoma e na sobrevivência murina;

**e.** Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do silenciamento gênico constitutivo de EZH2 na proliferação celular e no crescimento de tumores de xenoenxerto de neuroblastoma.

# 3. MANUSCRITOS

## 3.1 Manuscrito I – Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma

Bárbara Kunzler Souza • Patrícia Luciana da Costa Lopez • Pâmela Rossi Menegotto • Igor Araújo Vieira • Nathalia Kersting • Ana Lúcia Abujamra • André T. Brunetto • Algemir L. Brunetto • Lauro Gregianin • Caroline Brunetto de Farias • Carol J Thiele • Rafael Roesler

Periódico: Molecular Neurobiology

Situação: aceito



## **Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma**

**Bárbara Kunzler Souza**<sup>1,2</sup> • **Patrícia Luciana da Costa Lopez**<sup>3</sup> • **Pâmela Rossi Menegotto**<sup>1,2</sup> • **Igor Araujo Vieira**<sup>4</sup> • **Nathalia Kersting**<sup>1</sup> • **Ana Lúcia Abujamra**<sup>1,5</sup> • **André T. Brunetto**<sup>1,5</sup> • **Algemir L. Brunetto**<sup>1,5</sup> • **Lauro Gregianin**<sup>1,6,7</sup> • **Caroline Brunetto de Farias**<sup>1,5</sup> • **Carol J. Thiele**<sup>8</sup> • **Rafael Roesler**<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute, 90620-110 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>6</sup> Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>7</sup> Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>8</sup> Cell & Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, 20892, MD, USA

**Correspondence:** Rafael Roesler

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.

E-mail: [rafaelroesler@hcpa.edu.br](mailto:rafaelroesler@hcpa.edu.br)

**Keywords:** *histone deacetylase, epigenetics, cell differentiation, Ewing sarcoma, pediatric cancer*

## Abstract

There is an urgent need for advances in the treatment of Ewing sarcoma (EWS), an aggressive childhood tumor with possible neuroectodermal origin. Inhibition of histone deacetylases (HDAC) can revert aberrant epigenetic states and reduce growth in different experimental cancer types. Here, we investigated whether the potent HDAC inhibitor, sodium butyrate (NaB) has the ability to reprogram EWS cells towards a more differentiated state and affect their growth and survival. Exposure of two EWS cell lines to NaB resulted in rapid and potent inhibition of HDAC activity (1 h,  $IC_{50}$  1.5 mM) and a significant arrest of cell cycle progression (72 h,  $IC_{50}$  0.68-0.76 mM), marked by G0/G1 accumulation. Delayed cell proliferation and reduced colony formation ability were observed in EWS cells after long-term culture. NaB-induced effects included suppression of cell proliferation accompanied by reduced transcriptional expression of the *EWS-FLII* fusion oncogene, decreased expression of key survival and pluripotency-associated genes, and re-expression of the differentiation neuronal marker  $\beta$ III-tubulin. Finally, NaB reduced c-MYC levels and impaired survival in putative EWS cancer stem cells. Our findings support the use of HDAC inhibition as a strategy to impair cell growth and survival and to reprogram EWS tumors towards differentiation. These results are consistent with our previous studies indicating that HDIs can inhibit the growth and modulate differentiation of cells from other types of childhood pediatric tumors possibly originating from neural stem cells.

**Keywords** Histone deacetylase • Epigenetics • Neural differentiation • Ewing sarcoma • Pediatric cancer

## Introduction

Ewing sarcoma (EWS), a highly aggressive bone and soft tissue cancer, is the second most common primary solid bone malignancy in children and young adults [1]. Despite advances in multimodal therapy, patients with the disease have a poor prognosis, with a survival rate of 50 – 65% at 5 years and less than 30% for metastatic or refractory tumors [2]. EWS tumors typically harbor a specific genetic alteration characterized by a chromosomal translocation resulting in fusions between the EWS RNA Binding Protein 1 (*EWSR1*) gene and one of the several *ETS* family genes (most frequently *FLI-1*) which is present in 85% of cases [1,3]. EWS tumors are poorly differentiated and their cell of origin remains elusive. Evidence indicates that EWS shares genetic features and may arise from developing neural crest cells, and has potential for neural differentiation [4-7]. It is also possible that EWS derives from mesenchymal stem cells [8-11]. Experiments investigating clear cell sarcoma, a cancer type defined by *EWS-ATF1*, the fusion product of a balanced chromosomal translocation between chromosomes 22 and 12, have shown that the differentiation state of cells of origin impacts tumor characteristics [12].

EWS is a relatively genetically stable, fusion oncogene-driven cancer, harboring few somatic mutations [13]. However, as with other solid tumors of childhood, many epigenetic alterations are likely crucial for EWS tumorigenesis [14]. *EWSR1-FLI-1* acts as an aberrant transcription factor that induces epigenomic reprogramming involving changes in chromatin remodeling through acetylation and methylation, resulting in repression of tumor suppressors and oncogene activation [15, 16]. The chromatin state in EWS is strikingly similar to that found in bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Increased chromatin accessibility in

stem cells may lead to a state that facilitates oncogenic alterations induced by EWSR1-FLI-1, suggesting a stem cell origin for EWS [17].

A balance between the opposing activities of histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs) is key in regulating gene expression. Histone acetyltransferases (HATs) control histone acetylation activity through the transfer of acetyl groups to the amino-terminal lysine residues of histones, thus increasing transcriptional activity. In contrast, histone deacetylases (HDACs) remove acetyl groups, favoring chromatin condensation and repressing gene expression [18]. HDAC inhibitors (HDi) represent a class of experimental antineoplastic agents that target aberrant epigenetic alterations found in cancer [19, 20]. Sodium butyrate (NaB) is an HDi widely used as an experimental tool in cellular studies. It is short fatty acid that acts as a potent class I and IIa HDAC inhibitor inducing arrest in proliferation of cancer cells by increasing histone acetylation. In mammalian cells, NaB promotes hyperacetylation of the histones H3 and H4, resulting in chromatin decondensation and increased transcriptional activity [21]. In EWS cells, we have previously shown a synergistic antitumor effect of NaB combined with commonly chemotherapeutic drugs [22]. Moreover, the HDi suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) showed a synergistically enhanced antitumor activity upon combination with etoposide [23], and HDi NaB, SAHA or entinostat or MS-275 as monotherapies or combined with TRAIL display an additive cytotoxic effect in EWS cells [24].

Here, we show that inhibition of global HDAC activity by NaB inhibits multiple pathways involved in cell proliferation, survival and pluripotency. In addition, NaB exposure stimulates some morphologic and biochemical changes that might be consistent with neural differentiation in EWS cells.

## Materials and Methods

### Cell Lines and Cell Culture

Human EWS cell lines SK-ES-1 and RD-ES-1 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% CO<sub>2</sub>.

### Drug Treatment

NaB (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA) was diluted in sterile ultrapure water in a stock solution of 100 mM. EWS cells ( $2 \times 10^4$ ) were plated in 24-well plate and exposed to NaB in concentrations ranging from 0.5 to 5  $\mu$ M for 72 h. For calculation of IC<sub>50</sub>, data were fitted in a dose response curve (Graphpad Prism v. 6.0) using the equation:  $y = min + (max - min)/(1 + 10^{((LogIC50 - x) * Hillslope + Log ((max - min)/(50-min) - 1))})$ .

## **Cell Viability**

Cells were exposed to NaB as described above. Both cells in the supernatant and adhered cells were detached, collected, centrifuged and washed with PBS twice. To assess viability, cells were incubated with 1 µg/ml propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich) in PBS at 4 °C in the dark. PI uptake was assessed by flow cytometry analysis using an Attune Acoustic focusing cytometer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA). Data was analyzed using Attune Cytometric Software version 1.2.5. Four individual replicates were performed.

## **Cell Cycle**

To assess cell cycle, the EWS cells were cultured in 24-well plates under the same conditions of described above, and then detached, centrifuged and washed with PBS twice. After, the cells were resuspended in 50 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) in 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate solution containing 5 µg/ml RNase A. One million cells were stained in 1.0 ml of the PI cell cycle solution for 5 min. followed by assessment on an Attune Acoustic focusing cytometer by Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, USA) analysis. In each sample 20,000 cells were analysed. Data was analyzed using FlowJo Cytometric Software version 10.1. Three individual experiments were performed.

## Cumulative Population Doubling

Cells were plated [ $2 \times 10^4$  cell/mL] and exposed to NaB, in the same conditions described above, in quadruplicates. Every 4 days, supernatant and adhered cells were collected, quantified by PI uptake and re-plated. The Population Doubling (PD) level was calculated to determine the proliferation potential of the cell lines SK-ES 1 and RD-ES unexposed versus NaB exposed cells. The PD at each passage was calculated using the equation  $PD = (\log X_e - \log X_b) / \log 2$  and doubling time was calculated using  $DT = T * \ln 2 / \ln(X_e / X_b)$ . In both cases 'Xe' is the cell number at the end of the incubation time, 'Xb' is the cell number at the beginning of the incubation time and T is the number of days between time points, as described in the ATCC® Animal Cell Culture Guide. Data is displayed as cumulative PD (CPD), calculated as the sum of all previous PDLs.

All the CPD parameters were analyzed according to Silva and colleagues [25]. Briefly, Relative end CPD (RendCPD) quantifies the end point of cell proliferation analysis, and is obtained by the ratio between the final CPD of cells exposed to drug and control cells. To determine the global effect after the treatment intervention, the relative Area Under Curve (rAUC) was calculated (Graphpad Prism v. 6.0 software) using the lower CPD of the initial population to obtain the minimal threshold. RPR (Relative Proliferation Rate) and RTCT (Relative Time to Cross a Threshold), linear regression for both exposed and control groups was calculated using the higher angular coefficients of the last two or more CPD intervals. RPR is the ratio of the angular coefficients of exposed and control groups. RTCT was determined by the ratio of between the control and exposed cells Time to Cross the Threshold



(TCT), *i.e.*, a threshold set on a CPD value where both treatment and control conditions present the highest velocity of proliferation. Long-term survival index (LSI) is calculated by the average of the four parameters described above.

### **Colony Formation**

Cells were exposed to NaB for 72h and  $1 \times 10^2$  cells per well were re-plated in 6-well plates and cultured for 10 days with the RPMI medium being changed every 3 days. Cells were then fixed with methanol, followed by staining with 0.5% crystal violet. The stained colonies images were scanned and analyzed using the cell counter plugin on Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### **Tumorsphere Culture**

Cells were dissociated with trypsin-EDTA into single cell suspension and seeded at  $2 \times 10^3$  cells/well in 6-well plates. The cells were 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 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 described by

Leuchte and colleagues [26]. The media was changed every 4 days. After 8 – 9 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 to evaluate their capacity to self-renew through secondary EWS tumorsphere formation. Tumorspheres with at least 80µm were analyzed and quantified by inverted phase microscopy (Leica Microsystems, Mannheim Germany). The effect of NaB on tumorsphere formation ability across 7 days was examined.

### **HDAC Activity**

Cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded in a 96-black well plate/clear flat-bottom (Greiner-bioone, Frickenhausen, DE) and exposed to NaB, at the same concentrations described above, for 1 or 3 h. HDAC enzymatic activity was measured by *In Situ* HDAC Activity Fluorometric Assay kit (EPI003, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Three individual experiments were performed. HDAC enzyme activity was calculated across the groups as pmol/min and the percent of HDAC activity was corrected by control (unexposed cells).

### **Immunofluorescence**

For immunofluorescent staining, cells were plated on the glass coverslips, pre-coated with 2 µg/ml of fibronectin. After 72 h of exposure to NaB, cells were fixed in 4% PFA for 15 minutes at room temperature. After two additional washes, the fixed cells were incubated with

blocking buffer (1X PBS containing 3% BSA and 0.3% Triton X-100) for 1 h at room temperature, followed by an overnight incubation at 4°C with the following primary antibodies: Histone 3 phos-S10 (1:200, Cell Signaling), Trkb (1:100, Santa Cruz). After washing with PBS twice, cells were incubated with secondary antibodies conjugated with either Alexa fluor-488 (1:800; Invitrogen) or Rhodamine (1:300, Invitrogen) at room temperature for two h. After three additional washes, DNA was stained with 4 µg/ml of Hoechst 33342 (Invitrogen) for 15 minutes at room temperature. After washing, slides were mounted with Prolong Gold anti-fade reagent. Slides were viewed with Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope, using Leica LAS AF Lite 2.0.2 software to acquire images. For quantitative analysis, was calculated by the percent of mean intensity corrected by the control (unexposed cells). For each group, at least five random images were taken, and the results were determined from at least three independent experiments.

### **Real Time qPCR**

Total RNA was extracted from EWS cells using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Prior to RT-PCR, the samples were treated with DNase I (Promega Corporation, WI, USA). Total RNA was quantified with NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enabled first strand synthesis. The mRNA expression levels of target genes (*EWS-FLII*, TrkB, OCT3/4) were quantified using KiCqStart™ SYBR Green qPCR ReadyMix™, with ROX™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and calculated using the  $\Delta$ CT method from triplicate

reactions, with the levels of gene normalized to the relative Ct value of Gapdh. Cycling parameters were as follows: 95 °C for 2 mins, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 3 secs, annealing at 60 °C for 15 secs, and extension at 72 °C for 30 secs. The primer sequences used are shown in Supplementary Table S1 online.

## **Western Blot**

Proteins were separated using 8 – 14% SDS Tris-glycine gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% fat-free milk and incubated with antibodies against BDNF (H117, SC-20981, Santa Cruz, CA, USA), NGF (H-20, sc-548, Santa Cruz, CA, USA), pERK (E-4 sc-7383, Santa Cruz, CA, USA), ERK1 (K-23, sc-94, Santa Cruz, CA, USA), pAKT (S473) (SAB4300042, Sigma Aldrich, MO, USA), AKT (pan) (C67E7, #4691, Cell Signaling Technology, MA, USA), OCT3/4 (sc-5279, Santa Cruz, CA, USA), NANOG (M-149, sc-33760, Santa Cruz, CA, USA), c-MYC (D84C12 – Cell Signaling Technology, MA, USA), KLF4 (H-180, SC-20691, Santa Cruz, CA, USA), ALDH1A1 (ab23375, Abcam, Cambridge, UK), BMI-1 (D20B7, #6964 – Cell Signaling Technology, MA, USA), Cyclin D1 (D71G9 – Cell Signaling Technology, MA, USA),  $\beta$ III-Tubulin (D71G9 – Cell Signaling Technology, MA, USA) and ACTB (A2228, Sigma Aldrich, MO, USA) used as loading control. Incubation for 1 h with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz) at RT was performed. Chemiluminescence was detected using ECL Western Blotting substrate (EMD Millipore, DE) and analyzed by ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, UK). Densitometric analyses were performed using Image J (NIH, MD, USA). Relative densitometric unit (RDU) was calculated

by the normalization of interest protein level to the housekeeping genes  $\beta$ -actin (ACTB) or Histone 3 (H3), or ERK1 and AKT for pERK and pAKT (S473), respectively. All treatment conditions were corrected by control groups (non-exposed cells). Three individual replicates were performed.

### **Statistical Analysis**

For statistical analysis, GraphPad Prism version 6.0 was used. Each assay was performed at least three times in biologically independent assays. The significance of differences in mean  $\pm$  standard error values was analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test or Student's *t*-test; *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **Inhibition of HDAC Activity Reduces *EWS-FLII* Fusion Oncogene Transcriptional Expression and Induces Growth Arrest in EWS Cells**

To examine the effect of NaB on HDAC activity in EWS cells, we exposed SK-ES1 and RD-ES cells to NaB for 1 and 3 h. HDAC activity was significantly reduced after 1 h when NaB doses higher than 1 mM were used, resulting in a target IC<sub>50</sub> of approximately 1.5 mM (Fig. 1a, 1d). HDAC activity in cells exposed to NaB for 3 h was not as effectively reduced in comparison to 1 h treatments, and a significant decrease was observed only in RD-ES cells

exposed to 2 mM of NaB (Supplementary Fig. S1), suggesting that NaB optimally inhibits HDAC activity in EWS cells at a kinetic rate of 1 h.

In order to evaluate the biological effects of HDAC inhibition, we exposed EWS cells to varying concentrations of NaB (0.5 – 5 mM) for 72 h. Cell viability was potentially reduced in both cell lines (Fig. 1b). Interestingly, cells exposed to NaB showed a change in morphology accompanied by the appearance of short neurite-like extensions (Fig. 1c). At 72 h, the biological IC<sub>50</sub> of NaB was 0.76 and 0.68 mM for SK-ES 1 and RD-ES EWS cell lines, respectively (Fig. 1d). Moreover, to examine whether HDAC inhibition could alter the expression of the fusion oncogene, we designed primers flanking the break point of *EWS-FLII* fusion (type 2) and evaluated its transcriptional expression level after NaB exposure in comparison with untreated EWS cells. HDAC inhibition in EWS cells resulted in an approximately 2-fold decrease of *EWS-FLII* transcriptional expression after treatment with 1.5 mM NaB at 1 and 3 hours for SK-ES 1 cells, and 3 hours for RD-ES cells (Fig. 1e).

---

**Fig. 1 should be inserted here**

---

Next, we verified whether inhibition of HDAC activity by NaB would change cell cycle distribution. HDAC inhibition resulted in a significant alteration in EWS cell cycle featuring an accumulation of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase 35 h after NaB exposure. In the SK-ES1 EWS cell line, we also observed a significant decrease in the S and G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle, whereas in the RD-ES cell line there was a significant reduction in polyploidy (Fig. 2a).

To determine whether HDAC inhibition disrupts histone 3 phos-S10, a chromosome condensation marker during mitosis, we immunostained EWS cell lines exposed to NaB for 72 h against anti-H3 phos-S10 plus anti-Alexa488, measured by laser confocal microscopy. As expected, H3 phos-S10 immunolocalized to the nucleus in both EWS cell lines (Fig. 2b). In addition, we observed that both EWS cell lines exposed to higher doses of NaB (2 and 5 mM) showed a reduced level of H3 phos-S10, whereas there was no significant change at lower doses (0.5 and 1 mM) compared to untreated cells (Fig. 2c). Given that Cyclin D1 is a G1-phase regulator protein overexpressed in EWS, we investigated whether HDAC could regulate Cyclin D1 expression after 72 h of NaB exposure. SK-ES 1 cells exposed to 0.5 or 1 mM of NaB showed an approximately 1.5-fold change decrease in Cyclin D1 levels, and 1 mM NaB also decreased Cyclin D1 levels also in RD-ES cells (Fig. 2d). The results suggest that HDAC activity inhibition induces growth arrest in EWS cells.

---

**Fig. 2 should be inserted here**

---

### **HDAC Inhibition Abrogates Cell Proliferation and Survival Pathways in EWS Cells**

To investigate molecular mechanisms associated with the NaB-induced decrease in EWS cell growth, we examined the expression of key proteins that control cell survival and proliferation. After exposure to either 0.5 or 1.0 mM NaB, a decrease in the levels of survival-promoting neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) were

observed (Fig. 3a). We also immunostained tropomyosin receptor kinase B (TrkB) in EWS cell lines against anti-TrkB, plus anti-Rhodamine. As expected, TrkB immunoreactivity was detected in the cytoplasm. In addition, we observed that TrkB levels were reduced in a dose-dependent manner in both cell lines after NaB exposure (Fig. 3b, 3c). Consistently with this finding, we also observed a decrease in protein levels of downstream targets, phosphorylated extracellular-regulated kinase (pERK), but not total ERK1 levels, pAKTS473, and total AKT. A significant reduction of AKT was observed only in RD-ES cells treated with 1.0 mM NaB when pAKTS473 over total AKT levels were considered (Fig. 3d). Essentially similar effects were observed in RD-ES cells, however only at the 1.0 mM dose of NaB (Fig. 3d). Analysis of relative densitometric units related to the immunoblots is depicted in Fig. 3e. These results support the possibility that signaling mediated by neurotrophins, ERK and AKT are involved in mediating the inhibitory effects of NaB in EWS cells.

---

**Fig. 3 should be inserted here**

---

### **Persistence of the Anti-Proliferative Effect Induced by HDAC Inhibition in EWS Cells**

We performed a cumulative population doubling (CPD) of EWS cells to examine the persistence of the anti-proliferative effect of NaB. After 72 h of treatment, cells were maintained for 16 days in drug free media, as shown in Fig. 4a. Significant delays in cell proliferation rate were found with 2 and 5 mM of NaB (Fig. 4b). Because the number of cells



was too small, we modeled the growth from day 19 to day 35 using a mathematical prediction as described by Silva et al. [25]. We were able to predict whether EWS cells exposed to the higher doses of NaB over 35 days would have a persistent reduction in the ability to proliferate. Lower doses (0.5 and 1 mM) of NaB resulted in a gain in cell proliferation by day 20 which by 35 days was even higher than our prediction (Fig. 4b). It is possible that only a resistant subset of EWS cells could restore cell proliferative ability to an equal or higher degree compared to controls.

We then went on to perform a CPD profile analysis that examines long-term changes in cell population size. On the basis of CPD graphs from cell counting we calculated four different parameters: relative end CPD (RendCPD) to quantitatively assess the end point of cell proliferation analysis; relative area under curve (rAUC) to determine a global effect after treatment intervention; relative time to cross a threshold (RTCT) to measure the delay of the cell population that recovers growth after treatment; and relative proliferation rate (RPR) to quantify the relative regrowth velocity of the cells which survived after treatment intervention. The average of all parameters described above is termed the long-term survival index (LSI). HDAC activity inhibition in both cell lines, particularly after treatment with 5 mM NaB, resulted in a robust decrease in RPR and RTCT parameters (Fig. 4c), except the RPR parameter in which there was no significant change in SK-ES 1 cells (data not shown). These findings indicate that the effects of NaB can persist in the long-term to delay the regrowth of the EWS cell population.

Finally, we performed a colony formation assay for 10 days in drug free media, after a 72-h exposure to NaB. There was a significant reduction in the number of colonies in both cell lines after exposure to NaB. Moreover, there was a significant decrease in the size of the

colonies in SK-ES 1 cells after exposure to 5 mM NaB (Fig. 4d). These results indicate that the decrease in cell growth is also associated with the cells' colony-forming capability.

---

**Fig. 4 should be inserted here**

---

### **HDAC inhibition reduces the expression of pluripotency-associated genes**

Previous studies have shown that the EWSR1/FLI-1 oncoprotein stimulates the pluripotency gene BMI-1, thus influencing EWS cell self-renewal [7]. We sought to evaluate by immunoblot analysis whether the expression of key pluripotency transcriptional regulators NANOG, c-MYC, OCT3/4, KLF4, BMI-1 and ALDH1A1 were altered because of HDAC inhibition by NaB. Both SK-ES 1 and RD-ES cells showed a 2–3-fold reduction in the levels of pluripotency-associated genes OCT3/4, c-MYC and BMI-1 compared to untreated control cells. The levels of KLF4, NANOG and ALDH1A1 decreased in SK-ES 1 cells but were relatively unchanged or increased in RD-ES cells (Fig. 5a, 5b; Supplementary Fig. S2, S3). Thus, SK-ES 1 cells show higher sensitivity to NaB regarding inhibition of pluripotency-associated genes.

Given that we observed morphological changes in EWS cells after NaB exposure, we asked whether the SSC-A parameter that measure complexity and granularity in flow cytometry is altered in EWS cell population after the pharmacological intervention by NaB. Interestingly, both EWS cell lines exposed to NaB showed an approximately 2-fold increase in

complexity or granularity measured by the SSC-A mean parameter in flow cytometry (Fig. 6a, 6b). These data provide a measurement parameter related to cell morphology alterations along EWS cell population. In addition, this alteration was accompanied by cell morphology changes with formation of neurite-like extensions (Fig. 6c). Furthermore, we assessed the expression level of the neural differentiation marker  $\beta$ -III Tubulin (TUBB3) (Fig. 6d). We observed an increase in TUBB3 in cells exposed to HDAC activity inhibition by NaB, with a 2-fold enhancement in protein levels compared to controls. These findings suggest that HDAC activity inhibition may act to reduce the expression of a set of genes related to pluripotency in EWS cells.

---

**Fig. 5 should be inserted here**

---

---

**Fig. 6 should be inserted here**

---

### **HDAC Inhibition Impairs EWS Tumorsphere Formation**

Cancer stem cells displaying tumor-initiating properties and treatment resistance ability have been identified and characterized in EWS [27]. Tumorsphere (TS)-forming assays have been

widely used as models to study cancer stem cell-enriched cultures [28]. To verify whether HDAC inhibition altered TS-forming ability of EWS *in vitro*, we measured TS-formation efficiency (TFE) and size through optical microscopy after exposure of cells to NaB in a serum-free TS-inducing medium for 7 days (Fig. 7a). The contents of the stem cell marker OCT3/4 and TrkB were increased in cells from TS compared to ML (Fig. 7b, 7e). NaB significantly reduced TFE in both cell lines. In addition, NaB reduced the size of EWS tumorspheres (Fig. 7c, 7d; Supplementary Fig. S4). It is noteworthy that the higher dose of NaB (5 mM) fully impaired the cells' ability to produce tumorspheres. Interestingly, the levels of BMI-1 were also increased in TS compared to cells in the ML, and NaB significantly reduced the levels of c-MYC in TS cells (Fig. 7d, 7e). These findings indicate that OCT3/4, TrkB, and BMI-1 are increased in EWS TS cultures, and suggest that HDIs can repress c-MYC expression in EWS cancer stem cells and decrease their ability to expand and survive.

---

**Fig. 7 should be inserted here**

---

## **Discussion**

Inhibition of HDAC activity has become an increasingly investigated experimental approach, given its potential to ameliorate the aberrant epigenetic state that underlies a variety of cancers and allow the expression of silenced genes that can promote cell death or differentiation. We

found that NaB efficiently inhibits HDAC global activity in EWS cells and decreases EWS-FLI1 mRNA expression, cell growth, long-term proliferation, and colony formation. Similar IC<sub>50</sub> values for HDAC inhibition and cell growth impairment were observed in both cell lines, leading to G1-phase accumulation. These findings support previous reports of NaB arresting cell cycle, particularly at G1-phase, and inducing cell differentiation and apoptosis in multiple cell lines [29-31].

SK-ES-1 and RD-ES cells are both derived from male patients of similar ages (18 and 19 years, respectively), and both share features including the type of fusion to the exons 7 from EWS and 5 from FLI1 (type 2), p53 missense mutation that result in a nonfunctional p53 protein, lack of p21, and high p16<sup>INK4a</sup> expression [32, 33]. Overexpression of cyclins D (cyclin D1, D2, and D3) can drive aberrant cell cycle regulation and signaling in many human malignant tumors, including EWS tumors and RD-ES cells [34, 35]. Inhibition of HDAC by NaB resulted in a decrease of cyclin D1 protein levels in both cell lines, similarly to what was previously reported in neuroblastoma [36]. Expression levels of cyclin D1, a G1- phase regulator protein, may represent an important component that controls growth arrest prior to cell differentiation in EWS cells.

Polyploidy induction is a proposed mechanism by which HDIs control tumor cell growth. For instance, SAHA induced polyploidy in human colon cancer and breast cancer cells, leading to senescence, particularly in cells harboring defective p21WAF1 or p53 [37]. In contrast, we observed a significant reduction in the proportion of cells showing polyploidy after NaB exposure. HDAC inhibition induced changes in pathways related to cell proliferation and survival in EWS cells, including components of neurotrophin signaling. In other types of pediatric and neuroendocrine cancers, differential neurotrophin and Trk

expression is associated with patient prognosis and tumor properties including angiogenesis, metastasis, and chemosensitivity [38]. In EWS, we have recently shown enhanced expression of Trk in tumors, and reduced cell growth and increased chemosensitivity after Trk inhibition [39]. Here we show that NaB exposure in EWS cells resulted in a decrease in NGF and BDNF protein levels, accompanied by reductions in components of the ERK and AKT pathways. Given that neurotrophins are known to mediate neuronal survival via activation of ERK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phospholipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) [40], the findings are consistent with the possibility that inhibition of global HDAC activity suppresses Trk-mediated survival pathways in EWS cells.

We also observed a NaB-induced decrease in the levels of the mitotic marker H3 phos-S10. During mitosis in late G2 and M phase of cell cycle, post-translational modification phosphorylation on serine 10 of histone 3 (H3 phos-S10) is taken as a hallmark of condensed chromatin [41]. High levels of H3 phos-S10 in oncogene-transformed cells and human cancer cells are associated with amplified activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK)-MSK1 pathway [42]. Moreover, H3 phos-S10 overexpression is associated with chromosome instability that plays a role in the maintenance of ploidy [43] and carcinogenesis [44]. There is a crucial role of phosphorylation on serine 10 of histone 3 at the p21 promoter to activate p21 gene through HDAC inhibition by trichostatin A [45]. Moreover, the application of the mathematical modeling from CPD data described by Silva et al. [26], to evaluate the long-term effects of NaB in the EWS population size, provided a relevant information about the behavior of EWS cells after HDAC inhibition by NaB cells, once we observed a delay in the regrowth of the EWS cell population. In this sense, this mathematical modeling not only contributed to understand the acute effect but also the dynamic of growth kinetic of the

surviving population that were not eliminated by the treatment, representing an important tool to study anticancer activities of HDAC inhibitors [19, 20, 26].

Carcinogenesis mediated by cancer stem cells may be considered a sort of epigenetic reprogramming where there is loss of expression of specific genes that control differentiation and reactivation of genes specifying stemness [46]. Consistent with this rationale, our results indicated that HDAC inhibition can reduce the expression of several pluripotency-associated genes and this is associated with neurite outgrowth and expression of the neuronal differentiation marker  $\beta$ -III tubulin. Some of the genes which had their expression reduced by NaB in our experiments, including c-MYC and BMI-1, can be upregulated by transcriptional changes induced by EWS/FLI [7, 10, 13, 15, 16, 47-49]. A microarray analysis report revealed that HDAC inhibition by TSA suppresses pluripotency genes including as Nanog, Klf4, Sox2 and Sall4 in embryonic stem cells while activating differentiation-related genes [50].  $\beta$ -III tubulin is a neuron-specific marker and is expressed in early postmitotic and differentiated neurons [51], hence this differentiation neuronal marker has been used to evaluate neural differentiation in EWS [52, 53]. Our findings provide early evidence consistent with the possibility that HDIs can reprogram EWS cells towards neural differentiation, although further experiments are required to characterize the possible neural phenotype of HDi-treated EWS cells.

Sphere formation in cancer cell cultures is a widely used platform for cancer stem cell expansion. Cells from tumorspheres had higher levels of pluripotency-related genes such as OCT3/4 and BMI-1, supporting a stem cell phenotype. In addition, tumorspheres showed higher levels of TrkB compared to cells grown in monolayer, suggesting a possible increase in

neurotrophin signaling in EWS stem cells [54]. Importantly, NaB reduced sphere formation, indicating that it is capable of targeting EWS stem cells.

Mechanisms other than histone acetylation may be involved in the effects of NaB in cancer cells. Histone lysine butyrylation is another type of epigenetic post-translational mark that can cooperate or compete with acetylation to promote gene expression programs [55-57]. Increases in butyrylation in neuroblastoma cells after exposure to SAHA have been reported [58]. It should also be noted that NaB has been shown to enhance cAMP levels and stimulate the activation of multiple protein kinase pathways through mechanisms at least partially mediated by effects independent of epigenetic influences, through direct interactions with cAMP/PKA signaling in the cytoplasm [59-61]. Thus, we cannot exclude the possibility that NaB-induced effects on cell machinery components other than HDACs are involved in our findings.

This study has several limitations that will need to be addressed by further experiments. For instance, the mechanistic relationship among the actions of NaB, the reduction in EWS-FLI1 expression, and the reduced expression of the other target genes remains highly speculative. In addition, histone acetylation changes after HDi treatment should be measured. Furthermore, the effects of different HDIs should be compared, and confirmed in *in vivo* models.

A schematic model of the biological actions of NaB in EWS is depicted in Fig. 8. This model proposes a mechanism by which NaB acts through HDAC inhibition on transcriptional regulators to change the differentiation status of EWS cells. Together, our results indicate that HDIs can reduce EWS growth and survival and lead to a more differentiated state. It is noteworthy that these data are consistent with our previous findings indicating that HDIs can



impair cell growth and modulate differentiation of cells from other types of childhood pediatric tumors possibly originating from neural stem cells, medulloblastoma and neuroblastoma [62, 63].

---

**Fig. 8 should be inserted here**

---

### **Acknowledgements**

This research was supported by PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21); the Children's Cancer Institute (ICI); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 303276/2013-4 to R.R.); the Rio Grande do Sul State Research Foundation (FAPERGS; grant number 17/2551-0001 to R.R.); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; to B.K.S.); the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA); and the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health (C.J.T.).

## REFERENCES

1. Balamuth NJ, Womer RB (2010) Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 11: 184–192.
2. 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 (2015) Ewing sarcoma: Current management and future approaches through collaboration. *J Clin Oncol* 33: 3036–3046.
3. Ross KA, Smyth NA, Murawski CD, Kennedy JG (2013) The biology of Ewing sarcoma. *ISRN Oncol* 2013:759725.
4. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ (1987) Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127: 507–518.
5. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, Meyer WH, Horowitz M, Tzen CY, Wexler LH, Tsokos M (1999) Neuroectodermal differentiation in ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol* 30: 911–918.
6. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE (2004) DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64: 8213–8221.
7. von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, Hsu JH, Lawlor ER (2011) Modeling initiation of ewing sarcoma in human neural crest cells.

PLoS One 6: 1–10.

8. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N (2008) Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* 28: 2125–2137.
9. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I (2005) Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65: 11459–11468.
10. Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I (2008) EWS-FLI-1 expression triggers a ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 2176–2185.
11. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11: 421–429.
12. Straessler KM, Jones KB, Hu H, Jin H, van de Rijn M, Capecchi MR (2013) Modeling clear cell sarcomagenesis in the mouse: cell of origin differentiation state impacts tumor characteristics. *Cancer Cell* 23: 215–227.
13. Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, Kiezun A, Carter SL, Shukla SA, Mehta SS, Thorner AR, de Torres C, Lavarino C (2014) The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* 4: 1326–1341.
14. Lawlor ER, Thiele CJ (2012) Epigenetic changes in pediatric solid tumors: Promising new targets. *Clin Cancer Res* 18: 2768–2779.

15. 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 (2014) EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 26: 668-681.
16. 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 (2017) DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat Med* 23: 386-395.
17. Gomez NC, Hepperla AJ, Dumitru R, Simon JM, Fang F, Davis IJ (2016) Widespread chromatin accessibility at repetitive elements links stem cells with human cancer. *Cell Rep* 17: 1607-1620.
18. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.
19. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5: 769–784.
20. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G (2015) Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 20: 3898–3941.
21. Candido EPM, Reeves R, Davie JR (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14: 105–113.

22. dos Santos MP, de Farias CB, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL (2014) In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: A paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma. *Oncol Rep* 31: 955–968.
23. Unland R, Clemens D, Heinicke U, Potratz JC, Hotfilder M, Fulda S, Wardelmann E, Frühwald MC, Dirksen U (2015) Suberoylanilide hydroxamic acid synergistically enhances the antitumor activity of etoposide in Ewing sarcoma cell lines. *Anticancer Drugs* 26: 843–851.
24. Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, Palani CD, Hong le TT, Klier U, Bröker B, Völker U, Beck JF (2007) Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 847–858.
25. Silva AO, Felipe KB, Villodre ES, Lopez PLC, Lenz G (2016) A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumour Biol* 37: 13743-13749.
26. Leuchte K, Altvater B, Hoffschlag S, Potratz J, Meltzer J, Clemens D, Luecke A, Hardes J, Dirksen U, Juergens H, Kailayangiri S, Rossig C (2014) Anchorage-independent growth of ewing sarcoma cells under serum-free conditions is not associated with stem-cell like phenotype and function. *Oncol Rep* 32: 845–852.
27. 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 (2009) Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 69: 1776-1781.
28. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 486-498.

29. Barnard JA, Warwick G (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ* 4: 495–501.
30. Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6791–6796.
31. Jiang W, Guo Q, Wu J, Guo B, Wang Y, Zhao S, Lou H, Yu X, Mei X, Wu C, Qiao S, Wu Y (2012) Dual effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells. *Mol Biol Rep* 39: 6235–6242.
32. Brohl AS, Solomon DA, Chang W, Wang J, Song Y, Sindiri S, Patidar R, Hurd L, Chen L, Shern JF, Liao H, Wen X, Gerard J, Kim JS, Lopez Guerrero JA, Machado I, Wai DH, Picci P, Triche T, Horvai AE, Miettinen M, Wei JS, Catchpool D, Llombart-Bosch A, Waldman T, Khan J (2014) The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet* 10: e1004475.
33. Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Nakamura T, Matsumoto Y, Iwamoto Y (2005) Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer* 116: 784-792.
34. Hunter T, Pines J (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573–582.
35. Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PHB, Triche TJ (2004) Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 64: 6026–6034.
36. Lorenz V, Hessenkemper W, Rödiger J, Kyrylenko S, Kraft F, Baniahmad A (2011) Sodium butyrate induces cellular senescence in neuroblastoma and prostate cancer cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* 7: 265–272.

37. Xu WS, Perez G, Ngo L, Gui CY, Marks PA (2005) Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. *Cancer Res* 65: 7832-7839.
38. Thiele CJ, Li Z, McKee AE (2009) On Trk - the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15: 5962–5967.
39. 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 (2016) Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7: 34860-34880.
40. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361: 1545–1564.
41. Hans F, Dimitrov S (2001) Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20: 3021–3027.
42. Strelkov IS, Davie JR (2002) Ser-10 phosphorylation of histone H3 and immediate early gene expression in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *Cancer Res* 62: 75-78.
43. Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M (2002) Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 62: 5168–5177.
44. Espino PS, Pritchard S, Heng HH, Davie JR (2009) Genomic instability and histone H3 phosphorylation induction by the Ras-mitogen activated protein kinase pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 124: 562–567.
45. Simboeck E, Sawicka A, Zupkovitz G, Senese S, Winter S, Dequiedt F, Ogris E, Di Croce L, Chiocca S, Seiser C (2010) A phosphorylation switch regulates the

- transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 285: 41062–41073.
46. Shukla S, Meeran SM (2014) Epigenetics of cancer stem cells: Pathways and therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1840: 3494–3502.
  47. Sankar S, Bell R, Stephens B, Zhuo R, Sharma S, Bearss DJ, Lessnick SL (2013) Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma. *Oncogene* 32: 5089-5100.
  48. Svoboda LK, Harris A, Bailey NJ, Schwentner R, Tomazou E, von Levetzow C, Magnuson B, Ljungman M, Kovar H, Lawlor ER (2014) Overexpression of HOX genes is prevalent in Ewing sarcoma and is associated with altered epigenetic regulation of developmental transcription programs. *Epigenetics* 9: 1613-1625.
  49. Zwerner JP, Joo J, Warner KL, Christensen L, Hu-Lieskovan S, Triche TJ, May WA (2008) The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene* 27: 3282-3291.
  50. Karantzali E, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Hatzopoulos A, Kretsovali A (2008) Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. *Genome Biol* 9: R65.
  51. Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG (2004) Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* 76: 282–295.
  52. Rocchi A, Manara M (2010) CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 120: 668–680.
  53. Ventura S, Aryee DN, Felicetti F, De Feo A, Mancarella C, Manara MC, Picci P,



- Colombo MP, Kovar H, Carè A, Scotlandi K (2016) CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF- $\kappa$ B signaling. *Oncogene* 35: 3944-3954.
54. Chopin V, Lagadec C, Toillon RA, Le Bourhis X (2016) Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci* 73: 1859–1870.
55. Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, Falck JR, Peng J, Gu W, Zhao Y (2007) Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* 6: 812-819.
56. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M (2014) The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 536-550.
57. Goudarzi A, Zhang D, Huang H, Barral S, Kwon OK, Qi S, Tang Z, Buchou T, Vitte AL, He T, Cheng Z, Montellier E, Gaucher J, Curtet S, Debernardi A, Charbonnier G, Puthier D, Petosa C, Panne D, Rousseaux S, Roeder RG, Zhao Y, Khochbin S (2016) Dynamic competing histone H4 K5K8 acetylation and butyrylation are hallmarks of highly active gene promoters. *Mol Cell* 62: 169-180.
58. Xu G, Wang J, Wu Z, Qian L, Dai L, Wan X, Tan M, Zhao Y, Wu Y (2014) SAHA regulates histone acetylation, butyrylation, and protein expression in neuroblastoma. *J Proteome Res* 13: 4211-4219.
59. Prasad KN, Sinha PK (1976) Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro* 12: 125-132.
60. Rivero JA, Adunyah SE (1996) Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. *Biochem Biophys Res*

Commun 224: 796-801.

61. Rivero JA, Adunyah SE (1998) Sodium butyrate stimulates PKC activation and induces differential expression of certain PKC isoforms during erythroid differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 664-668.
62. Nör C, Sassi FA, de Farias CB, Schwartzmann G, Abujamra AL, Lenz G, Brunetto AL, Roesler R (2013) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol. Neurobiol* 48: 533–543.
63. Almeida VR, Vieira IA, Buendia M, Brunetto AT, Gregianin LJ, Brunetto AL, Klamt F, de Farias CB, Abujamra AL, Lopez PL, Roesler R (2017) Combined treatments with a retinoid receptor agonist and epigenetic modulators in human neuroblastoma cells. *Mol Neurobiol* 54: 7610-7619.

## Figure Legends

**Fig. 1** HDAC Inhibition by NaB hinders the growth of EWS cells. **a** HDAC activity (%) in EWS cell lines SK-ES 1 and RD-ES after 1 h of exposure to NaB;  $N = 4$  independent experiments. **b** Percent of viable SK-ES 1 and RD-ES cells after 72 h of exposure to NaB;  $N = 4$  independent experiments. **c** Morphology of EWS SK-ES 1 (upper panel) and RD-ES (lower panel) cells after 72 h of NaB exposure; black arrows indicates neurite-like extensions (NE). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . **d** Heat map showing the target  $\text{IC}_{50}$  calculated by the percentage of HDAC activity in cells exposed to NaB for 1 h, and biological  $\text{IC}_{50}$  calculated by the percent of viable cells exposed to NaB for 72 h. **e** *EWS-FLII* mRNA levels in EWS cell lines SK-ES 1 and RD-ES after 1.5 mM of NaB exposure for 1 and 3 h. Gene expression levels were normalized by *gapdh* mRNA level and corrected by untreated EWS cells;  $N = 3$  independent experiments. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. controls.

**Fig. 2** Cell cycle changes induced by HDAC inhibition in EWS cells. **a** Cell cycle distribution of EWS SK-ES 1 (upper panel) and RD-ES (lower panel) cells after 35 h of NaB exposure;  $N = 3$  independent experiments. **b** Representative images of H3 phos-S10 level (immunofluorescence) from SK-ES 1 (upper panel) and RD-ES (lower panel) cells exposed to NaB for 72 h. **c** Percent of H3 phos-S10 mean intensity (immunofluorescence) from EWS cell lines exposed to NaB for 72 h;  $N = 3$  independent experiments. **d** Western blot (upper panel) of Cyclin D1 protein levels in EWS cells exposed to NaB for 72 h, and Relative Densitometric

Unit (RDU) analysis (lower panel) normalized by ACTB, and corrected by control. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. controls.

**Fig. 3** HDAC activity inhibition decreases components of signaling pathways related to proliferation and survival in EWS cells. **a** Western Blot of BDNF and NGF from SK-ES 1 (left) and RD-ES (right) cells exposed to NaB for 72 h. **b** Percent of TrkB mean intensity (immunofluorescence). **c** Representative images of TrkB level (immunofluorescence) from SK-ES 1 (upper panel) and RD-ES (lower panel) cells exposed to NaB for 72 h. **d** Western Blot analysis of pERK, ERK1, pAKT(Ser473), AKT in SK-ES 1 (left panel) and RD-ES (right panel) cells. **e** Radar graph showing Relative Densitometric Unit (RDU) analysis were normalized by ACTB, except for pERK and pAKT(Ser473), which were normalized by total ERK1 and AKT, respectively, and corrected relative to control cells. Data in the graph are shown as mean  $\pm$  SEM from three independent experiments; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. controls.

**Fig. 4** Persistent inhibition of cell proliferation rate and colony formation ability in EWS cells treated with NaB. **a** Cumulative Population Doubling (CPD) *in vitro* assay schematic and timeline. **b** Cumulative CPD from SK-ES1 (upper panel) and RD-ES (lower panel) EWS cells after 72 h of NaB treatment plus 16 days in a drug free media, plus 19 days of a mathematical prediction (total 35 days);  $N = 3$  independent experiments. **c** CPD profile from SK-ES1 (upper) and RD-ES (lower) EWS cells after 72 h of NaB (5 mM). (Green square – RendCPD, Blue diamond – rAUC, yellow circle – RPR, red triangle – RTCT, black line – LSI). **d** Colony

formation in SK-ES1 (left panel) and RD-ES (right panel) cells after 72h of NaB exposure plus 10 days in a drug free media, measured by percent of colony number and size;  $N = 3$  independent experiments. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  S.E.M; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. controls.

**Fig. 5** Changes in the expression of pluripotency-associated genes induced by HDAC inhibition in EWS cells. **a** Western Blot analysis of pluripotency-associated genes in SK-ES 1 (left panel) and RD-ES (right panel) cells after 72 h of exposure to NaB. **b** Radar graph showing Relative Densitometric Unit (RDU) analyses normalized by ACTB level, and corrected by control; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. controls.

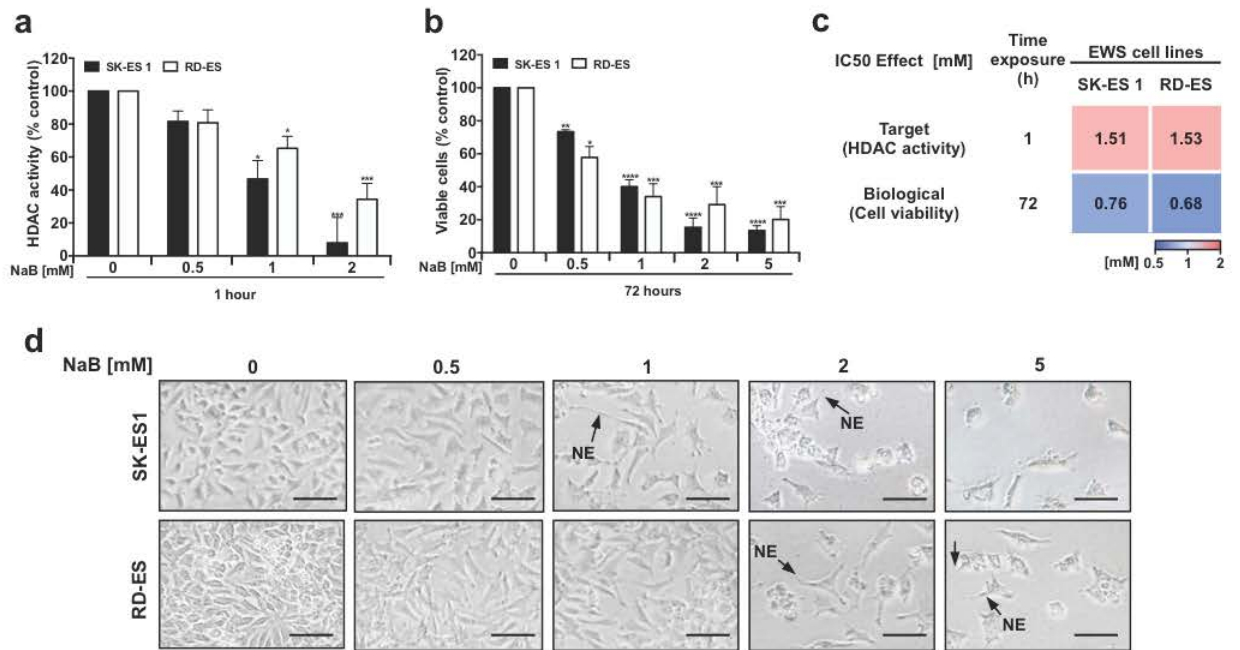
**Fig. 6** Cell complexity and differentiation of EWS cells after HDAC inhibition. **a** Representative scatter plot from SK-ES 1 (upper) and RD-ES (lower) exposed to NaB for 72 h, measured by cytometric analysis. **b** Percent of SSC-A mean from EWS cells exposed with the indicated concentrations of NaB for 72 h;  $N = 4$  independent experiments. **c** Morphology of SK-ES 1 (upper panel) and RD-ES cells (lower panel) after 72 h of NaB exposure; black arrows indicate neurite-like extensions (NE). Scale bar: 50 $\mu$ m. **d** Western Blot analysis of the differentiation neural marker TUBB3 (upper panel);  $N = 3$  independent experiments, and Relative Densitometric Unit (RDU) analyses (lower panel) normalized by ACTB, and corrected by control. Data in the graph are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. controls.

**Fig. 7** Reduced tumorsphere formation in EWS cells after HDAC inhibition. **a** Percent of number and size of EWS tumorspheres from SK-ES 1 induced with a serum-free tumorspheres medium compared with 10% FBS medium for 9 days;  $N = 3$  independent experiments. **b** OCT3/4 and TrkB mRNA levels in SK-ES 1 cells grown in monolayer (10% FBS medium) and tumorspheres (serum-free tumorspheres medium) induced for 9 days. Gene expression levels were normalized by gapdh level and corrected by monolayer;  $N = 3$  independent experiments. **c** Representative images from EWS tumorspheres from SK-ES1 (upper left panel) and RD-ES (upper right panel) cells after 7 days of NaB exposure. The percentage of EWS tumorsphere formation efficiency (TFE; i.e., number of tumorspheres normalized by the number of plated single cells and corrected by control – shown in the lower panel - and the size of EWS tumorspheres is shown. Only tumorspheres  $\geq 80 \mu\text{m}$  were analyzed. Scale bars:  $200 \mu\text{m}$  (upper),  $100 \mu\text{m}$  (lower);  $N = 3$  independent experiments. **d** Western blot of c-MYC, BMI-1 and TrkB in SK-ES 1 cells in monolayer (ML), Tumospheres (TS) induced for 7 days, and tumorspheres exposed to 1 mM of NaB for 7 days (TS + N);  $N = 3$  independent experiments. **e** Relative Densitometric Unit (RDU) analyses were normalized by coomassie loading control, and corrected by monolayer. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. controls.

**Fig. 8** Schematic model depicting biological actions HDAC inhibition by NaB in EWS. **a** Unbalance between the activities of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) results in an aberrant epigenetic state that occurs often in EWS cells. HDAC inhibitors such as NaB have been employed to revert this setting by increasing histone acetylation and gene transcription. **b** As a result of epigenetic dysregulation, EWS cells present

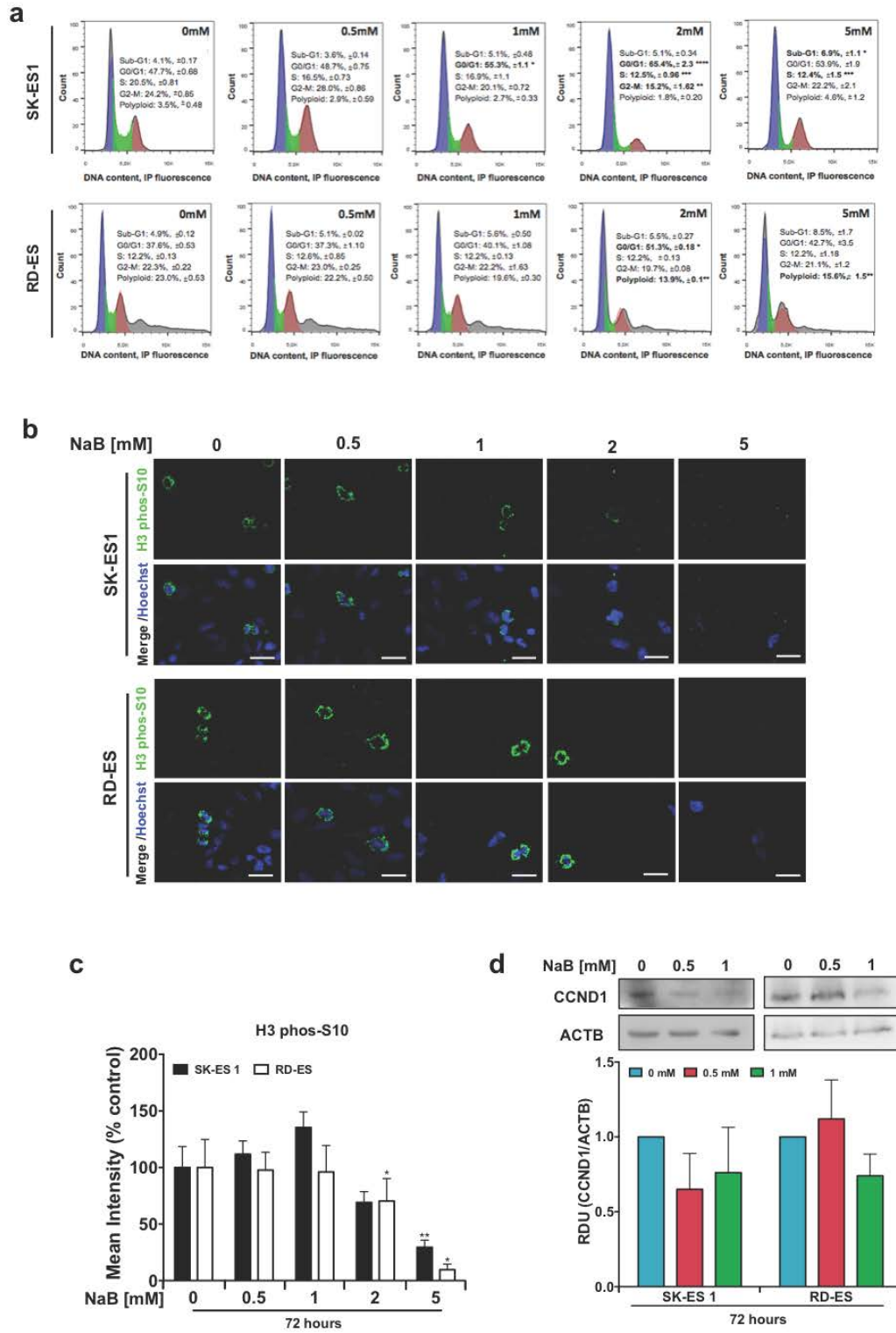
an aberrant expression of genes associated cell cycle, proliferation, survival, and pluripotency pathways. HDAC inhibition by NaB leads to transcriptional change by suppressing cell cycle, proliferation, survival, and pluripotency-associated genes, whereas de-repressing expression of the neural differentiation protein TUBB3. **c** A poor differentiated phenotype is a feature of EWS. HDAC inhibition change cell fate towards increased cellular complexity, arrested cell growth by G1-phase accumulation, decreased long-term clonal repopulation and reduced tumorsphere formation. **d** Inhibiting HDAC might epigenetically reprogram EWS cells from an undifferentiated to a more differentiated state associated with a better prognosis.

**Fig. 1**

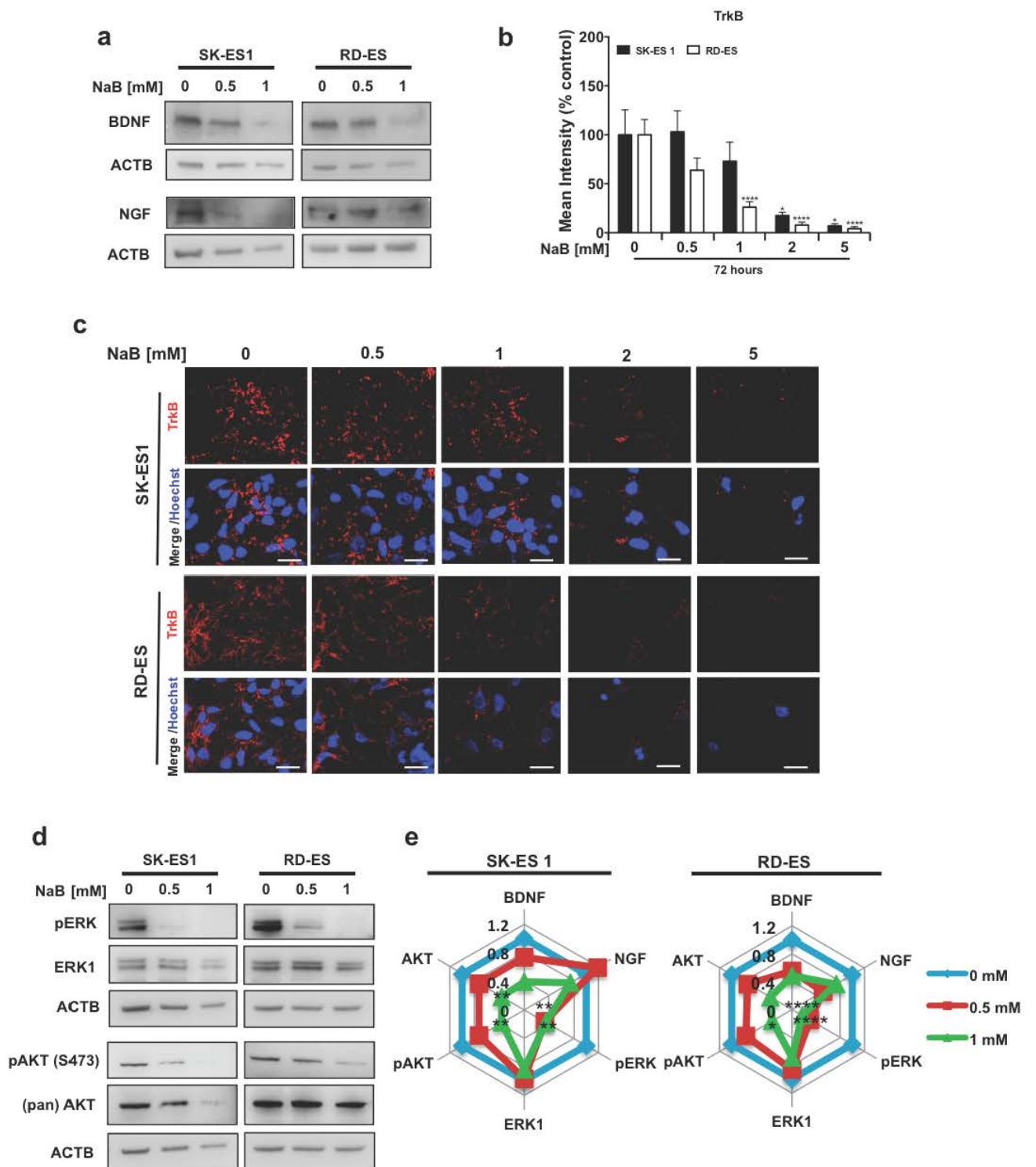




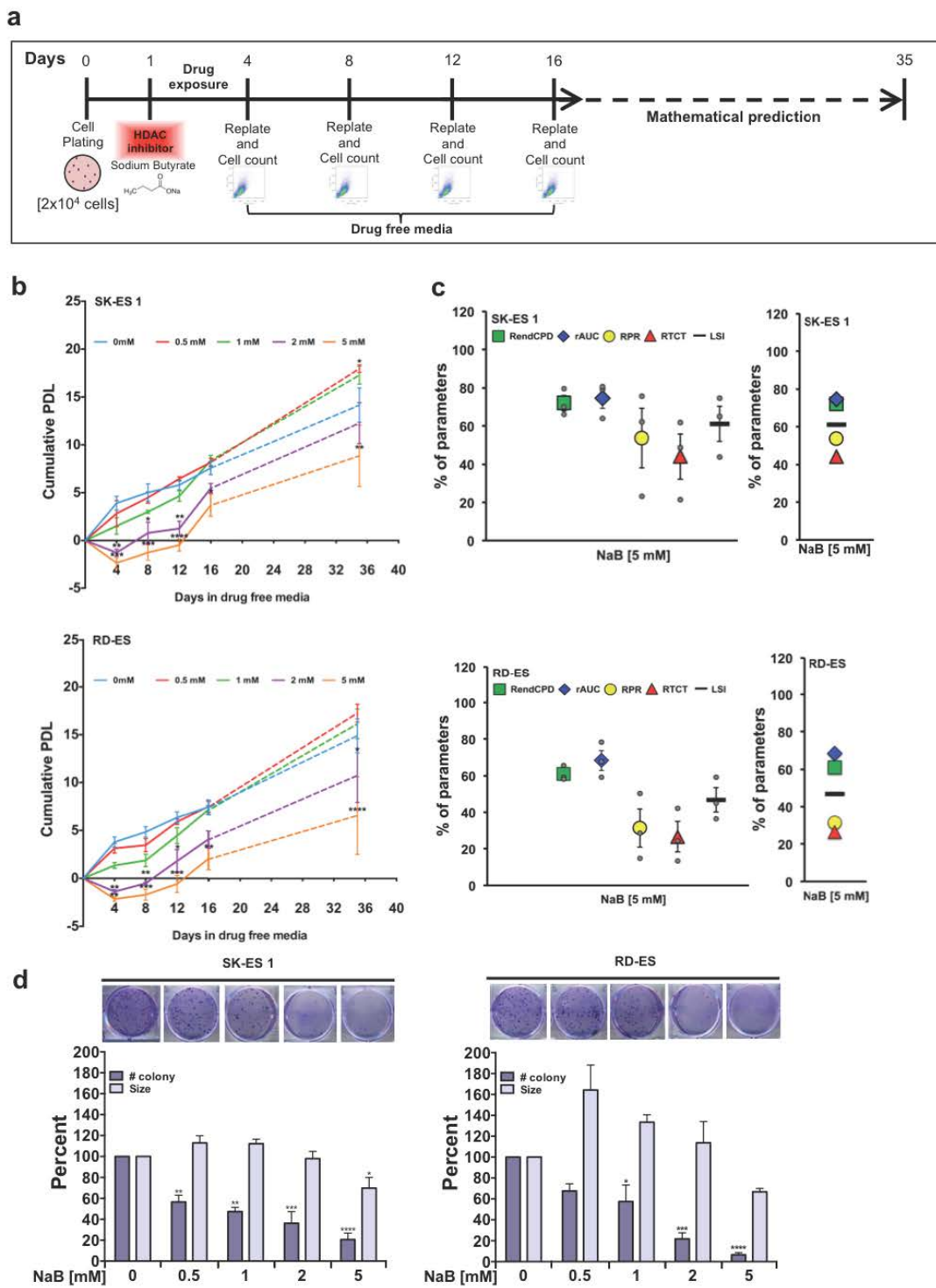
**Fig. 2**



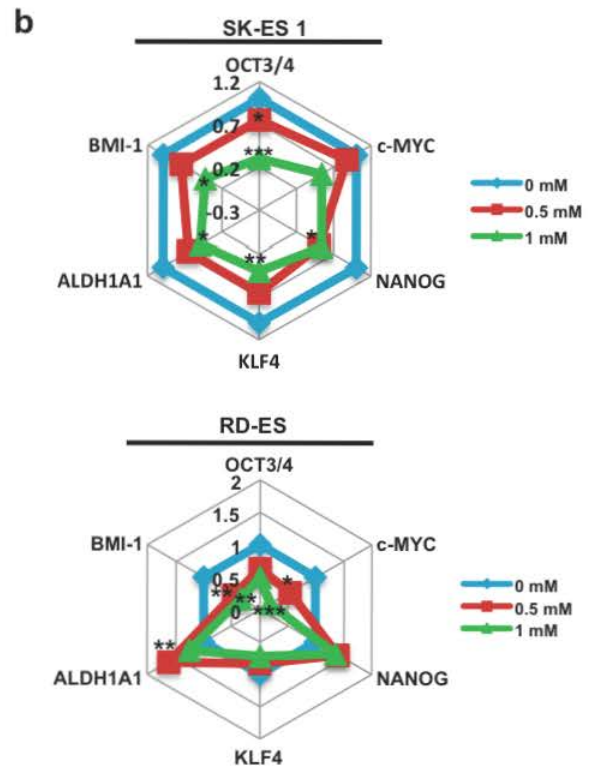
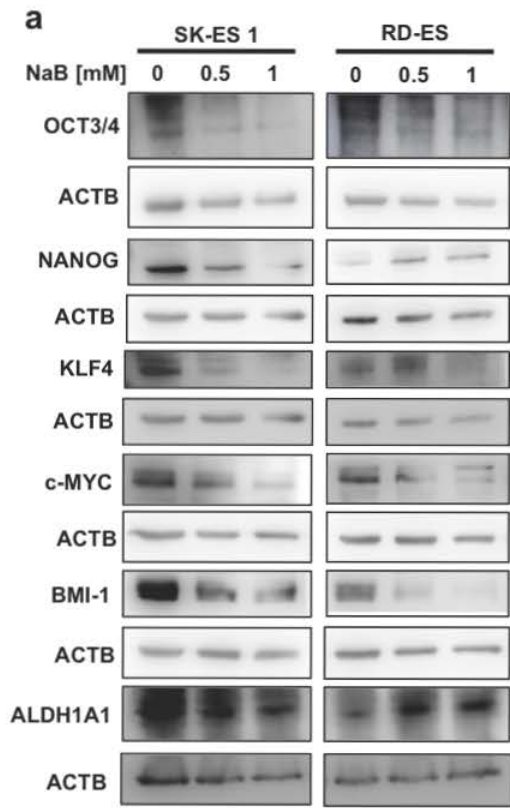
**Fig. 3**



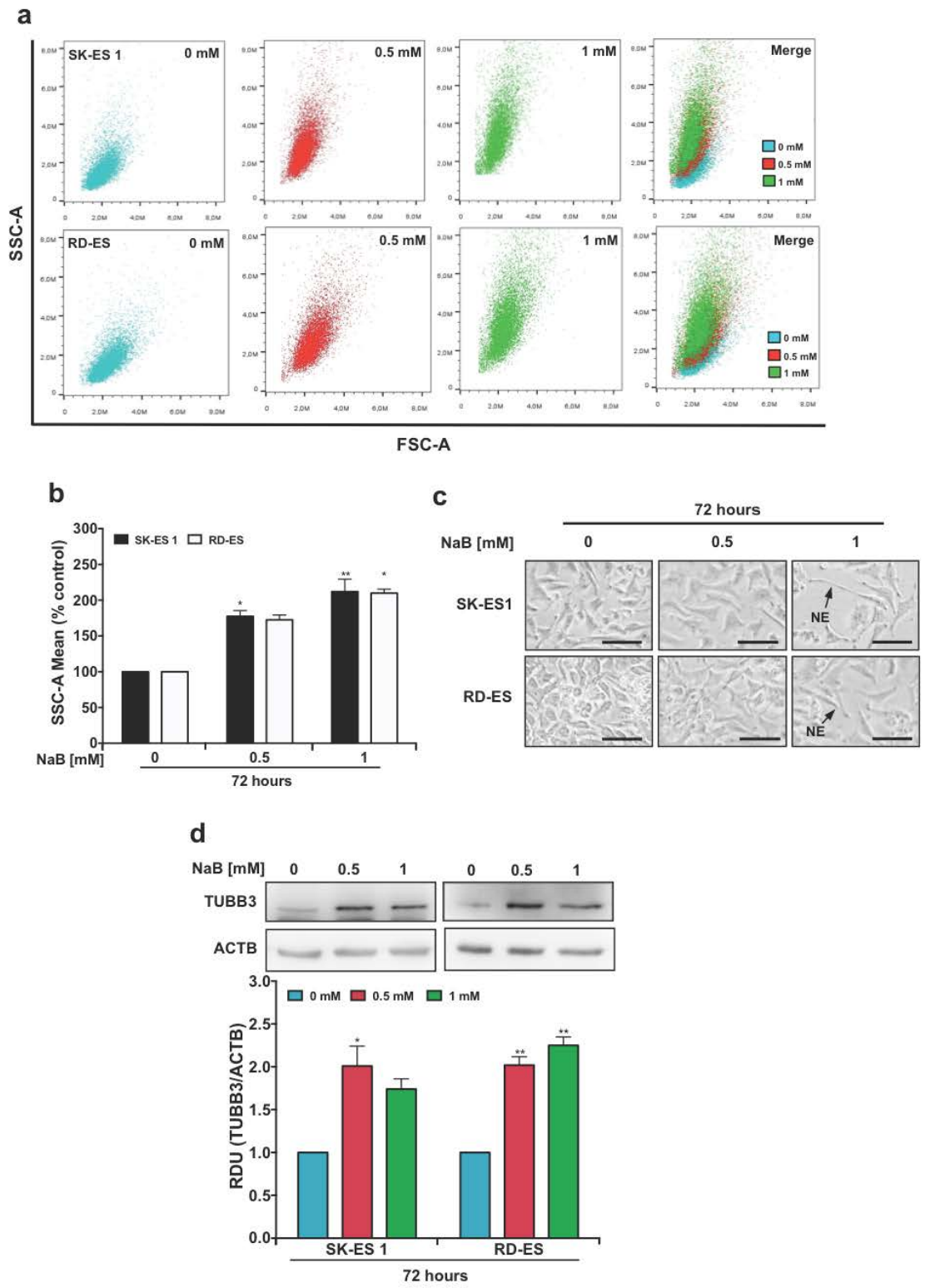
**Fig. 4**



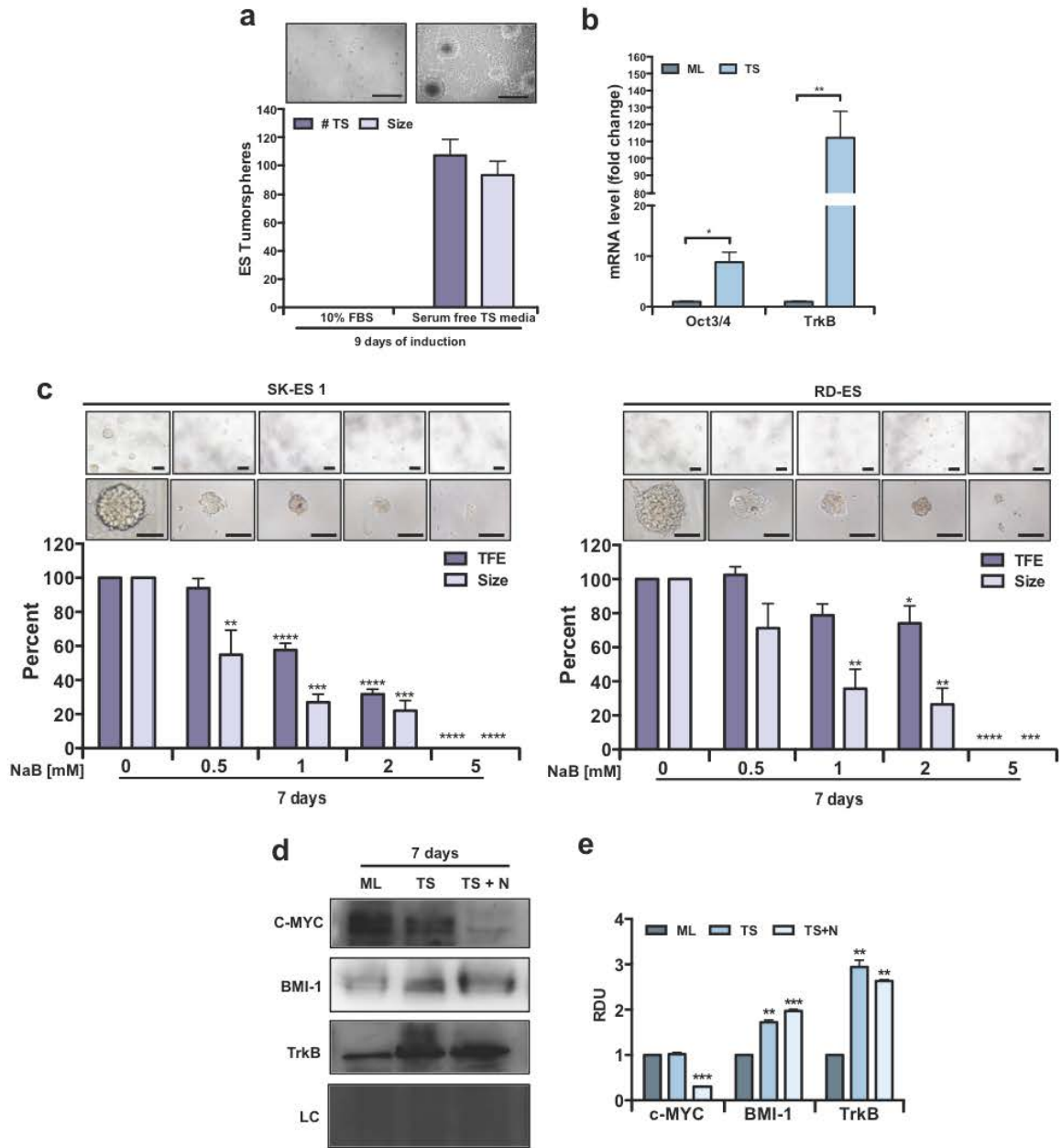
**Fig. 5**



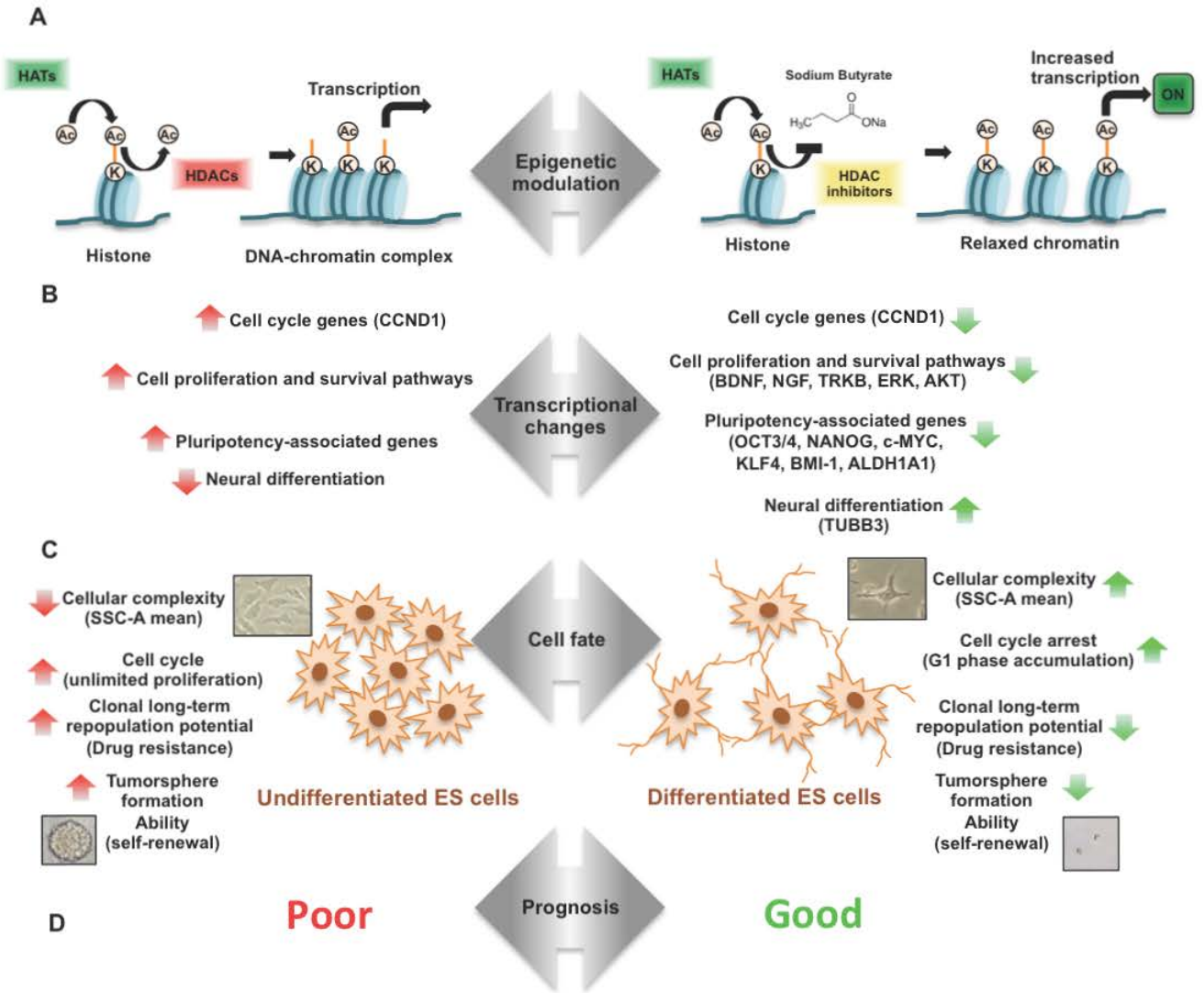
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Supplementary Tables and Figures for:**

**Targeting histone deacetylase activity to arrest cell growth and promote neural differentiation in Ewing sarcoma**

**Bárbara Kunzler Souza**<sup>1,2</sup> • **Patrícia Luciana da Costa Lopez**<sup>3</sup> • **Pâmela Rossi Menegotto**<sup>1,2</sup> • **Igor Araujo Vieira**<sup>4</sup> • **Nathalia Kersting**<sup>1</sup> • **Ana Lúcia Abujamra**<sup>1,5</sup> • **André T. Brunetto**<sup>1,5</sup> • **Algemir L. Brunetto**<sup>1,5</sup> • **Lauro Gregianin**<sup>1,6,7</sup> • **Caroline Brunetto de Farias**<sup>1,5</sup> • **Carol J. Thiele**<sup>8</sup> • **Rafael Roesler**<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute, 90620-110 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>6</sup> Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil



<sup>7</sup> Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>8</sup> Cell & Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, 20892, MD, USA

**Correspondence:** Rafael Roesler

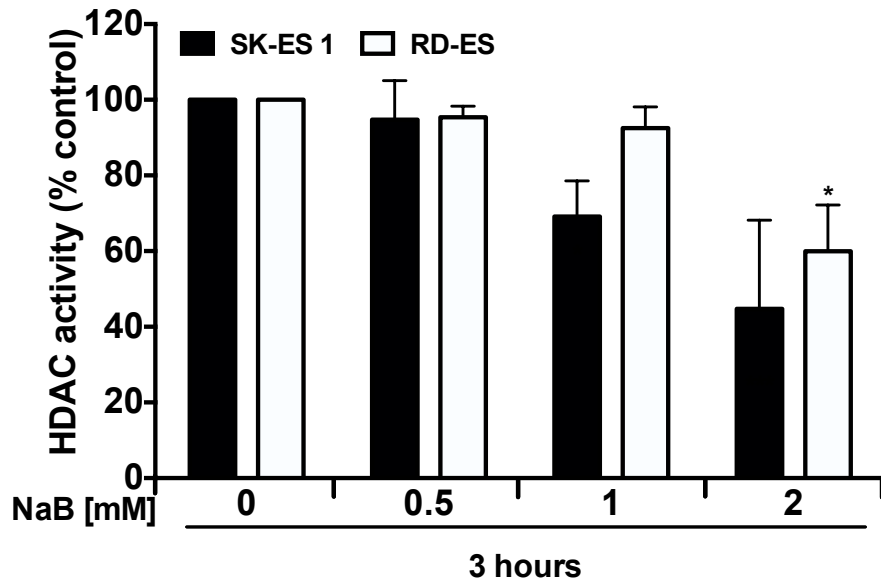
Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +5551 33083183; fax: +5551 33083121.

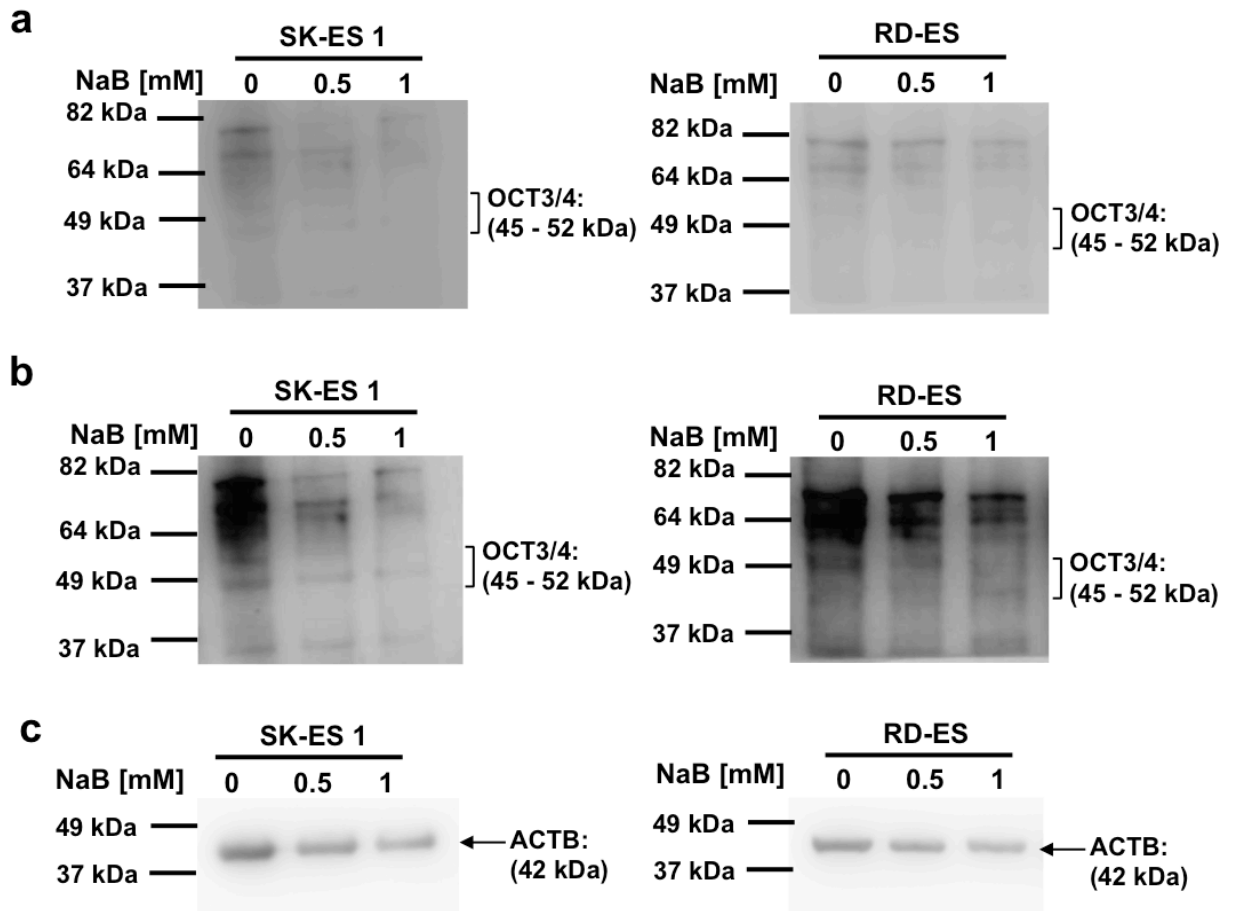
E-mail: [rafaelroesler@hcpa.edu.br](mailto:rafaelroesler@hcpa.edu.br)

**Supplementary Table S1:** Primer sequences used for qRT-PCR analysis.

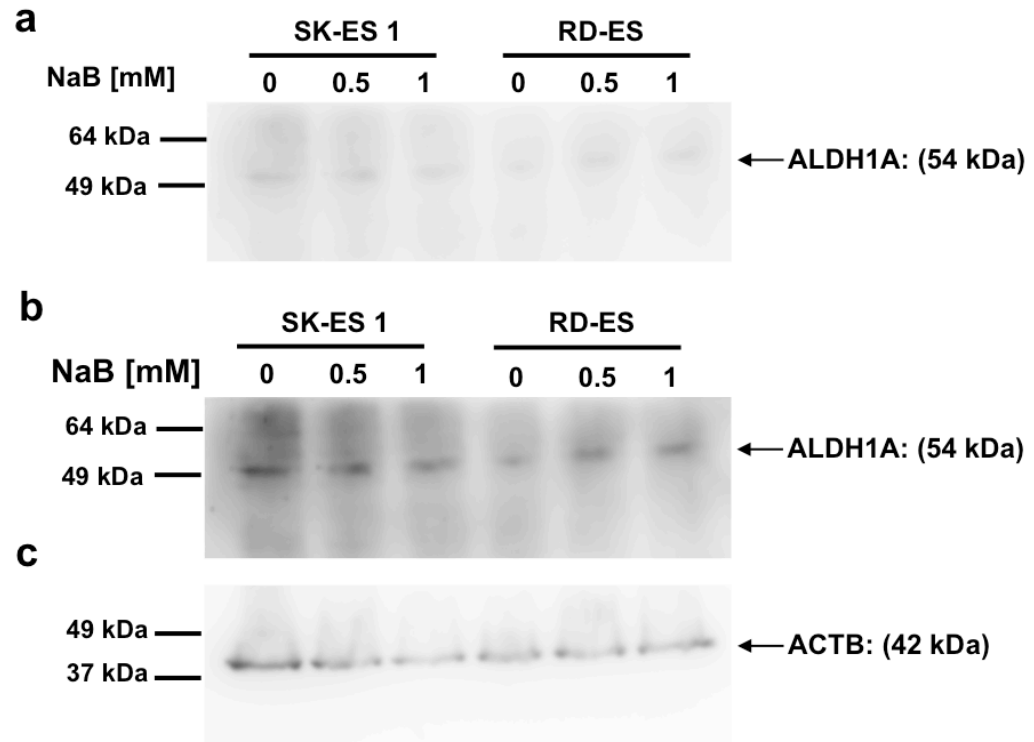
Gene	Primer sequence (5' - 3')	Product size (bp)
<i>EWS-FLI1</i>	F: CCAAACCTGGATCCTACAGCCA	120
	R: AATCGTGAGGATTGGTCGGTG	
Oct3/4	F: ATGGAGAGGCAACCTGGAGA	110
	R: ACACTCGGACCACATCCTTC	
TrkB	F: TGGTGCATTCCATTCCTGT	130
	R: CGTGGTACTCCGTGTGATTG	
Gapdh	F: GGAAGATTGAGTCGCTGGAG	103
	R: AACTGGCGGATCTCTT	



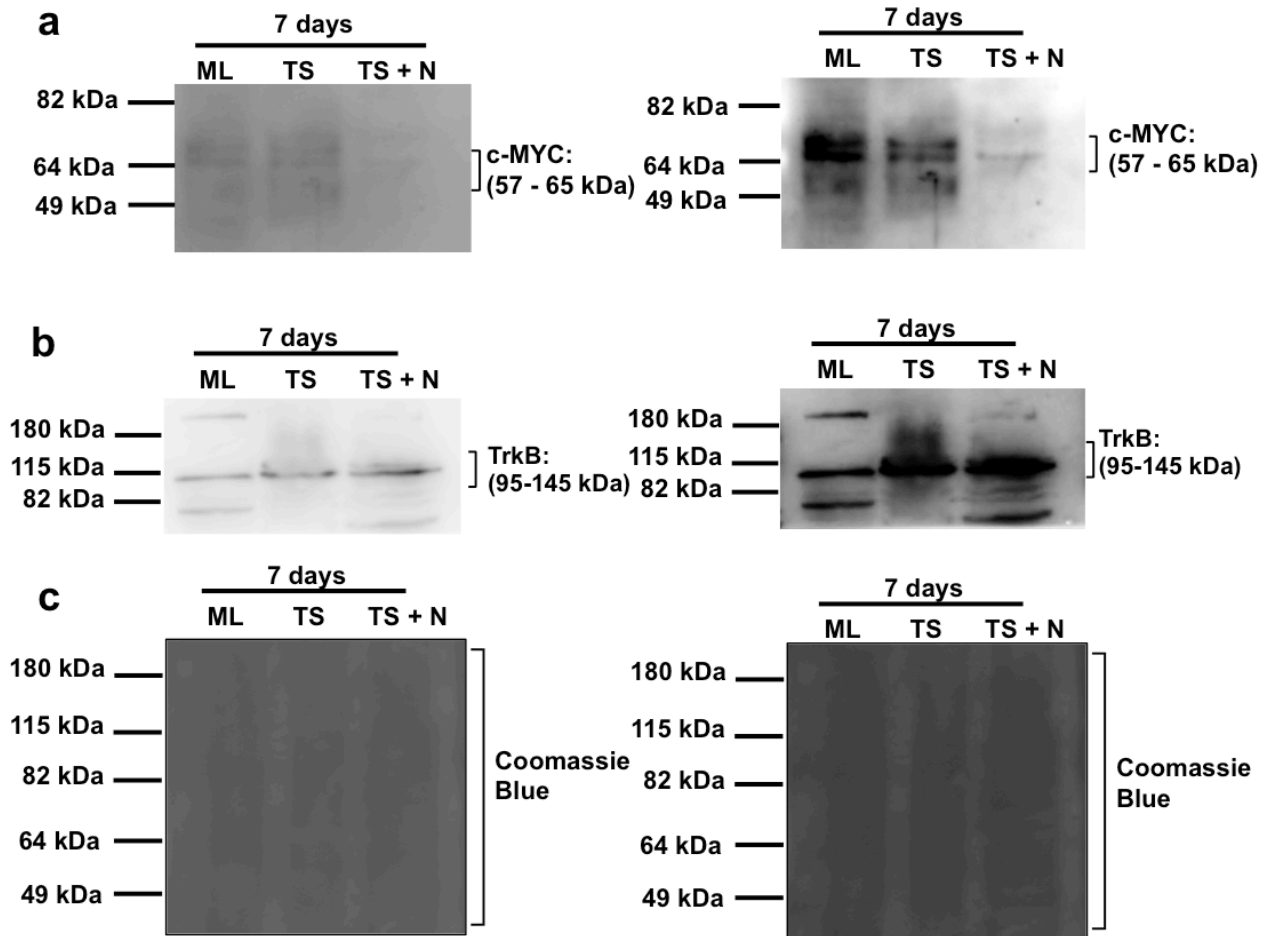
**Supplementary Fig. S1** HDAC activity (percent) in EWS cell lines after 3 h of exposure to NaB;  $N = 4$  independent experiments. Data in the graph is shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ .



**Supplementary Fig. S2** Effect of HDAC activity inhibition on OCT3/4 protein level in EWS cells. Multiple exposure time of a representative immunoblot showing OCT3/4 protein level in SK-ES 1 (left panel) and RD-ES (right panel) cells after 72 h of exposure to NaB. **a** 7 min of exposure time. **b** 20 min of exposure time. **c** ACTB as loading control;  $N = 3$  independent experiments.



**Supplementary Fig. S3** Effect of HDAC activity inhibition on ALDH1A1 protein level in EWS cells. Multiple exposure time of a representative immunoblot showing ALDH1A1 protein level in SK-ES 1 and RD-ES cells after 72 h of exposure to NaB. **a** Five min exposure. **b** Thirteen min exposure. **c** ACTB as loading control;  $N = 3$  independent experiments.



**Supplementary Fig. S4** c-MYC and TrkB protein levels in tumorspheres of SK-ES 1 EWS cells. Multiple exposure time of a representative immunoblot showing **a** c-MYC protein level in SK-ES 1 cells in monolayer (ML), Tumorspheres (TS) induced for 7 days, and tumorspheres exposed to 1 mM of NaB for 7 days (TS + N); 2 min (left panel) and 5 min (right panel) of exposure time. **b** TrkB protein level at the same conditions described above; 5 min (left panel) and 15 min (right panel) of exposure. **c** Coomassie blue as loading control;  $N = 3$  independent experiments.

### **3.2 Manuscrito II – Dual EZH2 and EZH1 catalytic depletion suppress tumor growth and re-establishes transcriptional activation of tumor suppressor genes in neuroblastoma**

Bárbara Kunzler Souza • Veronica Veschi • Chunxi Wang • Caroline Brunetto de Farias • Rafael Roesler • Carol J Thiele

Periódico: Cancer Research

Situação: Em preparação

**Dual EZH2 and EZH1 catalytic depletion suppress tumor growth and re-establishes transcriptional activation of tumor suppressor genes in neuroblastoma**

**Bárbara Kunzler Souza<sup>1,2</sup>, Veronica Veschi<sup>1</sup>, Chunxi Wang<sup>1</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>2,4</sup>, Rafael Roesler<sup>2,3</sup>, Carol J Thiele<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Cell & Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

<sup>2</sup>Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center – Clinical Hospital of Porto Alegre (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute, 90620-110 Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to: Carol J. Thiele, PhD, Cell and Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, CRC, 1-3940, 10 Center Drive MSC-1105, Bethesda, MD 20892. Phone: 1-301-496-1543; fax: 1-301-451-7052 e-mail: [thielec@mail.nih.gov](mailto:thielec@mail.nih.gov)



## Abstract

Polycomb repressive complex 2 (PRC2) catalytic subunit is composed by EZH2 and its related EZH1, which catalyze trimethylation of histone 3 H3 lysine 27 (H3K27). EZH2 is overexpressed in undifferentiated or poor-stroma neuroblastoma (NB) tumors, and related to worse prognosis, here, we characterized cellular and molecular effects of PRC2-EZH2 inhibition using pharmacological and genetic interventions on NB cell growth. We have found that UNC-1999, a dual EZH2 and EZH1 inhibitor, was more effective to inhibit NB cell growth than EZH2-selective inhibitors. A significant decrease in H3K27me3 global level mediated by EZH2 catalytic depletion, re-establishes transcriptional activation of CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  and CHD5, tumor suppressor genes that control differentiation in NB. In an *ex vivo* experiment, UNC-1999 showed a robust capability to reduce oncogenic activity of NB xenografts tumors and prolonged murine survival. We further examined the effects of chronic EZH2 genetic ablation (by gene silencing using a constitutive shRNA targeting EZH2 gene) on NB tumor growth. The effect of chronic EZH2 genetic ablation, surprisingly, led to an increase in the oncogenic activity of NB cells, followed by a significant tumor progression observed in NB xenograft tumors. Therefore, these results suggest that NB tumor growth probably does not rely on the PRC2-EZH2 function alone. However, dual catalytic inhibition of EZH2 and EZH1 showed to be an effective therapeutic strategy for suppressing NB tumor growth and reactivating differentiation gene programs.

**Keywords:** polycomb repressive complex 2, neuroblastoma, differentiation.

## Introduction

Aberrant activity of chromatin encoding genes, by consequence of mutation or changes in gene expression, has been found to drive the disruption of developmental programs in pediatric cancers (1). Resulting from a failure of normal developmental, neuroblastoma (NB) tumors is thought to arise from neural-crest derived precursors of the peripheral sympathetic nervous system which incompletely differentiated (2). NB is the most common extracranial solid tumor, and is responsible for 15% of all pediatric oncology – related deaths (3,4). Despite the current multimodal therapy have increased overall survival rates, patients diagnosed with high risk NB (metastatic form of disease) is still poorly effective resulting in survival rates less than 50%, furthermore the intensity and toxicity of the treatment is responsible by morbidity in NB patients (3). Aside from structural genomic variations, such as MYCN amplification (20% of NB high-risk cases), hemizygous deletions of chromosomes 1p and 11q (5), and ALK receptor tyrosine kinase activating mutations (6), genome-wide sequence studies have revealed few recurrent somatic mutations in NB compared with adult tumors, which include loss of function mutations and deletions in genes that encode chromatin modifier proteins, such as ATRX (22%) and ARID1A/ARID1B (11%) in high-risk NB patients with an older age (6–9). Recently, pharmacological inhibition targeting the chromatin modifier enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) has been proposed as a novel synthetic lethal therapy for cancer cells carrying ARID1A mutations (10).

Extensive evidences have correlated deregulation of polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a variety of cancers, including neuroblastoma. Polycomb repressive complex 2 (PRC2), that promotes tri-methylation of histone 3 at lysine 27 (H3K27) mediated by catalytic subunit (EZH2) or related EZH1, has been identified as key enzymatic machinery in gene silencing (11), controlling different cellular processes such as proliferation, differentiation, maintenance of cell identity and plasticity (12). Gain-of-function mutations or overexpression of EZH2 is often correlated with metastasis and poor prognosis of malignant hematopoietic diseases, as well as solid tumors such as Ewing sarcoma, glioblastoma, rhabdomyosarcoma (13–16), including neuroblastoma (17). In NB tumors, EZH2 is overexpressed and is correlated with an undifferentiated tumor phenotype, and also with a poor prognosis. We previously revealed that EZH2 mediates the repression of a number of tumor suppressor genes, which control differentiation, such as CASZ1 and NGFR. Moreover, a reduction of EZH2 expression level in NB cells, by genetic silencing or pharmacologic intervention with 3-deazaneplanocin A (DZNep), resulted in de-repression of CASZ1, growth arrest induction and neurite extension (17). Curiously, loss-of-function of EZH2 has been also reported to drive cancer in a context-dependent manner, suggesting that EZH2 may play a role also as a tumor suppressor for some types of malignancies (18–20). It has been shown that missense mutations or mutations that generate substitutions of lysine to methionine at position 27 (K27M) in genes encoding H3.3 and H3.1 variants in pediatric brain tumors, result in reduced EZH2 catalytic activity mediated by H3K27me3 global level (21,22). Therefore, the opposite roles of EZH2 found among cancers raises a concern about the effects of

EZH2 inhibition followed by H3K27me3 depletion as a therapeutic strategy for cancer treatment in the clinic.

Despite EZH2 and EZH1 show high homology, they not appear to be functionally redundant, because they show different gene expression patterns depending on cellular context. Furthermore, EZH1 shows a compensatory functional role, in which may restore cellular H3K27me2/3 levels that could have been lost after histone exchange or through demethylase activity (12,23). Recently, a series of highly selective small molecule EZH2 inhibitors has been developed aiming to disrupt EZH2 dependent cancer. Although EZH2 inhibitors have shown high potency against lymphomas that carrying EZH2 mutations (14,24,25), they demonstrate low efficiency to inhibit proliferation in lymphomas carrying wild-type EZH2 (14,24,26). It may raise a concern about the effective of EZH2 inhibitors for tumors dependent on both wild-types EZH2 and EZH1. Among EZH2-selective inhibitors, GSK-126, GSK-343 and an EZH2 and EZH1 dual inhibitor UNC-1999, show high selectivity for EZH2 (1,000-fold) versus other HMTs. However, only UNC-1999 is orally bioavailable and is highly selective also for EZH1 (approximately 10-fold) compared with GSK-343 and GSK-126. UNC2400, an analogue of UNC1999, exhibits >1,000-fold less potency and has been used as a control for off-target effects (14,27,28). UNC-1999 showed a potent capability to inhibit enzymatically PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1, in which revealed as a novel targeted therapy to inhibit MLL-rearranged leukemia (29).

Recently, using siRNA and chemical probes targeting chromatin remodelers in a high throughput screen assay, we identified EZH2 as one of the major druggable targets in NB cells, in which revealed a high potency to suppress NB cell growth and

also to induce neurite extension (30). To better understand the functional role of EZH2 in NB, we therefore have characterized cellular and molecular effects of EZH2-selective inhibitors GSK-126, GSK-343 and an EZH2 and EZH1 dual inhibitor UNC-1999 on cell growth of NB cells. Notably, EZH2 and EZH1 inhibitor (UNC-1999) potently reduced NB cell growth, and proliferation, compared with GSK-343 and GSK-126. Overall, all EZH2-selective inhibitors did not affected growth of control cells (immortal non-transformed cells). In addition, UNC-1999 showed a higher potency to decrease in H3K27me3 global level of NB cells in a time and dose dependent manner. All EZH2-selective inhibitors and EZH2 and EZH1 inhibitor greatly depressed tumor suppressor genes which control differentiation in NB cells, such as CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  and CHD5. *Ex vivo* EZH2 and EZH1 catalytic depletion resulted in reduction of the oncogenic activity of NB cells, which decreased tumor growth of NB xenografts and a prolonged murine survival. Importantly, we have demonstrated that EZH2 subunit ablation, by genetic silencing, may induce NB growth arrest. However, chronic EZH2 ablation, when EZH1 level is intact, intriguingly, recovered NB cell proliferative ability which resulted in an enhanced oncogenic activity, followed by a tumor progression of NB xenografts.

## Results

### Dual EZH2 and EZH1 catalytic depletion, by UNC-1999, reduces potently NB cell growth

To assess the effect of EZH2 catalytic depletion on NB cell growth, we evaluated the inhibitory potential of three small molecule EZH2-selective inhibitors (UNC-1999, GSK-343 and GSK-126) in NB cell growth. JQ-1, a known potent inhibitor of the BET family of bromodomain proteins (30), was used as a control for growth inhibition. The cell growth assay was performed using two immortal but non-transformed cell lines as control cells (Arpe-19 and 293T) and six human NB cell lines, in which four of them are MYCN amplified (NGP, KCNR, IMR-32, SAN) and two are MYCN-wt (SY5Y, NB69). Particularly, the NB cell lines SAN and NB69 harbor ARID1A and ARID1B mutations, respectively (7).

The half maximal inhibitory concentration of the EZH2-selective inhibitors was determined from 12 points dose response curves (0.01 – 30  $\mu$ M) during exponential growth phase (3 days of treatment), through the confluence mean measured by Incucyte zoom (EssenBioscience). After 7 days of EZH2-selective inhibitors exposure, control and NB cell lines were stained with EdU and Sytox AAD to assess cell proliferation (Figure 1A). In general, all NB cell lines showed a higher sensitivity response to UNC-1999, dual EZH2 and EZH1 catalytic inhibitor, approximately 5-fold more potent, with a half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) average of 5.36  $\mu$ M,

whereas GSK-343 and GSK-126 showed 22.07  $\mu\text{M}$ , and 27.70  $\mu\text{M}$ , respectively, as represented in the heatmap (Fig. 1B).

Notably, NB cell lines with MYCN amplified and non-mutated for ARID1A/B showed higher resistance to EZH2-selective inhibitors, compared with MYCN-wt NB cell lines. In contrast, ARID1A/B mutated NB cell lines (SAN and NB69) demonstrated a higher sensitivity to EZH2-selective inhibitors compared with ARID1A/B non-mutated cell lines, except for the cell line NB69 which presented a high growth  $\text{IC}_{50}$  (38.50  $\mu\text{M}$ ) when exposed to GSK-343. Furthermore, UNC-1999 inhibitor was approximately 5-fold stronger in potency to inhibit NB cell growth, compared with GSK-343 and GSK-126 inhibitors (Fig. 1B). EZH2-selective inhibitors showed a low cytotoxicity against control cell lines compared with NB cells, which is an advantage to reach a higher level of specificity in NB treatment (Fig. 1C). Mean of cell growth  $\text{IC}_{50}$  values of control and NB cell lines are shown in Fig. 1D, following 72 -96 hours of UNC-1999 exposure.

To explore NB cell proliferation ability upon EZH2 catalytic depletion, we performed EdU/Sytox ADD incorporation assay after 7 days of EZH2-selective inhibitors exposure. We found that even in a relatively low dose (3.8  $\mu\text{M}$ ) of EZH2-selective inhibitors showed a potential to reduce cell proliferation of NB cells compared with control cells (Fig. 1E). NGP and SY5Y showed a more pronounced reduction on the capability to proliferate after 7 days of EZH2 inhibitors exposure as shown in the heatmap (Fig. 1E). A representative experiment depicting the effect of EZH2 and EZH1 catalytic depletion by UNC-1999 on the cell growth and proliferation of NGP cells is shown in Figs. 1F – H. Collectively, these results indicate that, overall,

NB cell growth is more dependent on PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1, than PRC2-EZH2 catalytic function alone.

---

**Fig. 1 should be inserted here**

---

### **EZH2 or dual EZH2 and EZH1 inhibitors selectively reduces H3K27me3 global level in NB cells**

Next, we sought investigate the selectivity potential of the small molecule EZH2 inhibitors (UNC-1999, and its inactive analog UNC-2400, GSK-343 and GSK126) to inhibit EZH2 HKMT activity mediated by H3K27me3 in NB cells. H3K27me3 global level was evaluated in NGP cells treated in a range of dose with EZH2 inhibitors and UNC-2400, for 24, 48 and 72 hours. In addition, to determine target half maximal inhibitory concentration  $IC_{50}$  we performed a relative densitometric analysis from the immunoblots, measured by Image j software. As expected, EZH2 inhibitors efficiently decreased H3K27me3 global level in NGP cells in a time and dose dependent manner (Fig. 2A – B). However, in comparison to GSK-343 and GSK-126, UNC-1999, EZH2 and EZH1 inhibitor, led to an earlier effectiveness (24 hours) with an approximate  $IC_{50}$  0.18  $\mu$ M to reduce the global level of H3K27me3 repressive mark in NB cells (Fig. 2C), followed by an approximate  $IC_{50}$  of 0.03  $\mu$ M upon 48 and 72 hours. UNC-2400 did not alter cell growth and H3K27me3 global level in NGP cells (Fig. 2A



– B). The effectiveness of GSK-343 was intermediate with an approximate  $IC_{50}$  of 0.60, 0.07, 0.02  $\mu$ M upon the tested time points, respectively. GSK-126 had a delayed effectiveness to suppress H3K27me3 compared with UNC-1999 and GSK-343, showing no change in H3K27me3 level within 24 hours, and with a higher  $IC_{50}$  0.30 and 0.23  $\mu$ M upon 48 and 72 hours (Fig. 2C). Collectively, these data implicate directly in the mechanism of EZH2-selective inhibitors to suppress the levels of H3K27me3, which demonstrate to be dose and time-dependent.

---

**Fig. 2 should be inserted here**

---

### **Depletion of EZH2 catalytic function de-repress tumor suppressor genes that control differentiation programs in NB**

We further investigate whether four tumor suppressor genes that control differentiation in NB are repressed by PRC2-EZH2 catalytic function. Quantitative mRNA expression analysis revealed a significant increase in gene expression of at least two tumor suppressor genes after 7 days of EZH2 catalytic depletion in NB cells, as shown in the heatmap (Fig. 2D). Both NGP and IMR-32 cells, MYCN amplified, as already shown presented less susceptibility to EZH2-selective inhibitors in the growth assay, compared with SY5Y. However, IMR-32 cells had a robust upregulation in the mRNA levels of CASZ1, RAR $\beta$ , NTRK1, and CHD5 with a  $\geq$  2.5, 9.0, 6.0, 1.3-fold

increase, respectively, after 7 days of exposure to EZH2 inhibitors. We were not able to use the samples in which NB cells were treated with 10  $\mu$ M UNC-1999 due to very low cell viability. GSK343 and GSK-126 in doses of 1 or 10  $\mu$ M were also effective to increase CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  mRNA levels in at least  $\geq 1.5$ -fold change in IMR-32 cells, however no transcriptional change was observed in CHD5 level (Fig. 2D).

In contrast, NGP cells showed a less pronounced overall transcriptional response, in which only CASZ1 mRNA level were changed by all the EZH2-selective inhibitors with  $\geq 1.5$ -fold change. Furthermore, RAR $\beta$  mRNA level were significantly altered  $\geq 1.5$ -fold increase only with 10  $\mu$ M of GSK-126. SY5Y, MYCN-wt and more sensitive to EZH2-selective inhibitors in growth assay compared with IMR-32 and NGP cell lines, particularly, showed an increased sensitivity to 10  $\mu$ M GSK-343 to de-repress CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  genes with a  $\geq 1.5$ -fold mRNA change. Additionally, 10  $\mu$ M of GSK-126 potently increased NTRK1, RAR $\beta$  mRNA levels with  $\geq 2$ -fold mRNA change. These data demonstrate that EZH2 catalytic function mediates transcriptional activity of EZH2 target genes that control differentiation in NB, and it may represent a therapeutic strategy to reprogram undifferentiated NB tumors.

---

**Fig. 3 should be inserted here**

---

## **Long-term *in vitro* EZH2 and EZH1 catalytic depletion impairs anchorage-independent growth ability of NB cells**

To determine whether a long-term depletion of EZH2 catalytic function regulates the oncogenic activity of NB cells, we evaluated the *in vitro* ability of NGP cells to grow in an anchorage independent manner for 3 weeks exposed to EZH2-selective inhibitors. EZH2 and EZH1 catalytic depletion by UNC-1999, in a dose of 5  $\mu$ M, significantly reduced approximately 80% of NGP anchorage independent growth whereas UNC-2400 did not alter. In contrast, doses of UNC-1999 and GSK-343 lower than 5  $\mu$ M resulted in a significant gain of ability to grow in an anchorage independent manner. Similar long-term effect was observed even in the higher dose (5  $\mu$ M) of the EZH2-selective GSK-126 in NGP cells (Fig. 3A – B). These results suggest that EZH2 and EZH1 catalytic depletion is potentially effective to reduce *in vitro* oncogenic activity of NB cells.

---

**Fig. 4 should be inserted here**

---

## ***Ex-vivo* EZH2 and EZH1 catalytic depletion reduces oncogenic activity of NB xenografts tumors**

Based on the potent effect in NB cellular context, we explored UNC-1999 in mice using subcutaneous xenografts of NGP cells previously *ex-vivo* exposed to the

EZH2 and EZH1 inhibitor (UNC-1999). NGP NB xenografts tumors that underwent *ex-vivo* depletion of EZH2 and EZH1 catalytic function presented a statistically significant ( $p < 0.05$ ) reduction in growth, compared with vehicle control (DMSO) (Fig. 3C). In addition, we observed a significant improve in survival in mice carrying NGP xenografts *ex-vivo* EZH2 and EZH1 catalytic depleted compared with vehicle control (Fig. 3D). These results indicate EZH2 and EZH1 catalytic depletion by UNC-1999 may represent a potential therapy to suppress NB tumors.

### **Chronic EZH2 ablation enhances the oncogenic activity of NB xenografts tumors**

Next, we sought to investigate whether the dependence on PRC2-EZH2 function persists for a long-term in NB cells. Thus, we generated NB NGP cells carrying constitutive lentiviral shRNA targeting EZH2 or target control, to evaluate the effect of chronic EZH2 ablation on the cell growth, proliferation and oncogenic activity of NB. Chronic EZH2 ablation in NGP cells (carrying constitutive shRNA<sub>EZH2</sub>) resulted in reduction of approximately 70% of EZH2 protein level, as well as 80% reduction of H3K27me3 repressive mark. EZH1 protein level did not altered (Fig. 5A – B). Chronic EZH2 ablation resulted in reduction of only 30% of cell proliferation in NB cells, assessed by EdU incorporation (Fig. 5C). At this point, the subset of NB cells which is probably resistant to PRC2-EZH2 ablation or do not rely on PRC2-EZH2 function were able to proliferate. Chronic EZH2 ablation in NGP cells did not significantly changed mRNA levels of CASZ1, NTRK1 and RAR $\beta$  (Fig. 5D).

To assess the *in vitro* effect of chronic EZH2 ablation on the oncogenic activity of NGP cells, we performed an anchorage-independent growth assay culturing NGP cells carrying constitutive shRNAEZH2 and shRNATRC (target control) in soft agar for 3 weeks. Notably, chronic EZH2 ablation in NGP cells enhanced anchorage independent growth ability compared with control (Fig. 5E). We further exploited the *in vivo* effect of chronic EZH2 ablation in NGP cells, and we observed that NB xenografts tumors with chronic EZH2 ablation presented an enhanced oncogenic activity in tumor growth (Fig. 5F), as well as a statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) in tumor weight (Fig. 5G). A significant decrease in EZH2 and H3K27me3 protein levels and an aggressive phenotype after chronic EZH2 ablation was observed in NB xenografts tumors. Consistent with this tumor phenotype we observed no change in the levels of CyclinD1, H3 phos-S10 and Ki67, assessed by positive stained cells in the immunohistochemistry analysis (Fig. 5H – I). These findings suggest that NB tumor growth may not only depend on PRC2-EZH2 function, in which may not fully suppress oncogenic activity.

## Discussion

Based on evidence that EZH2 is overexpressed in a variety of cancers, including NB, a number of chemical probes have been developed to disrupt PRC2 function. Here, we demonstrate cellular and molecular effects of PRC2-EZH2 function depletion in NB cell growth and differentiation. In our pharmacological screen using small molecule highly selective inhibitors targeting EZH2, or dual EZH2 and EZH1 catalytic function revealed that NB cells are more responsive to EZH2 and EZH1 than solely EZH2 catalytic depletion. The dual EZH2 and EZH1 inhibitor, UNC-1999, and not its inactive analog UNC-2400, potently suppressed NB cell growth, anchorage-independent growth and NB xenografts tumor growth, assessed by *in vitro* and *ex vivo* models. Earlier study has shown that EZH2 is overexpressed in undifferentiated NB tumors, which is correlated with poor prognosis. In accordance, we found antitumor effect of DZNep (17), the first EZH2 inhibitor that potently interferes with S-adenosylhomocysteine hydrolase that depletes PRC2 function via unclear mechanism (32), nonetheless, poor specificity and toxicity in animal models have been reported (33,34).

In order to improve tumor suppressive activity, selectivity and reduce toxicity, recently, small molecule inhibitors highly selectivity to EZH2 (14,24,25) or to EZH2 and EZH1 (28) have been developed, and have shown as promising therapies for cancers that rely on catalytic function of PRC2-EZH2 or PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1 both. Among the EZH2-selective inhibitors, GSK-126 and EPZ6438 showed high potency to suppress lymphoma carrying EZH2-activating mutations (14) and

rhabdoid tumors harboring SNF5-inactivating mutations, respectively (35). UNC-1999, the first orally bioavailable EZH2 and EZH1 dual inhibitor, has been revealed as a novel promising therapy for MLL-rearranged leukemia (29). Additionally, SAH-EZH2, a hydrocarbon-stapled peptide, is a pharmacological approach that disrupt EED interaction with EZH2 and EZH1 leading PRC2 to degradation, and has been proposed as a novel targeted therapy to suppress EZH2-dependent cancers (36).

When we evaluated the global level of H3K27me3 repressive mark in NB cellular-context upon EZH2 catalytic depletion, UNC-1999, showed higher potency to reduce H3K27me3 in a time and dose dependent manner compared with GSK-126 and GSK-343 EZH2-selective inhibitors. In accordance to these, it has been found that UNC-1999 is more efficient to suppress H3K27me3 repressive mark or proliferation of MLL-rearranged Leukemia cells, whereas GSK-126 failed (29). UNC-2400, a close analog of UNC-1999, showed inactivity to modulate global level of H3K27me3 repressive mark (29). Contrary to DZNep (32) or SAH-EZH2 (35), UNC-1999, GSK-343 and GSK126 do not promote PRC2 degradation, thus, they act via PRC2 catalytic function de-repressing EZH2 target genes which are likely silenced.

In NB cells, EZH2 binds at promoters and, consequently, causes repression of tumor suppressor genes that control differentiation, such as CASZ1 and NGFR (17). In the present study, a robust transcriptional activation of the tumor suppressor genes CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  and CHD5, mediated by EZH2 catalytic depletion through EZH2-selective inhibitors or EZH2 and EZH1 dual inhibitor was observed in NB cells. Substantial evidences show that CASZ1, a gene frequently deleted in different types of cancers localized in 1p36, plays a role as tumor suppressor gene in NB. Low

expression of CASZ1 is correlated poor prognosis, whereas high expression of CASZ1 is found in NB tumors with differentiated phenotype. CASZ1 overexpression in NB cells resulted in growth arrest, differentiation induction, reduced cell migration and anchorage-independent growth, and suppression of NB xenografts tumor growth (37). Likewise, low or absence expression of CHD5, a powerful candidate tumor suppressor gene, is associated with a 1p36 deletion and inactivation of the second allele through epigenetic mechanism, in NB high risk (38). Moreover, it has been found that loss of RAR $\beta$  (39), NTRK1 (40) expression in patients with NB is correlated with poor prognosis. Thus, our findings indicate that EZH2 or EZH2 and EZH1 catalytic depletion may re-establish transcriptional activation of tumor suppressor genes that control differentiation in NB, which may represent a powerful strategy to reprogram undifferentiated NB tumors.

In this study, we demonstrate that EZH2 ablation may initially affect cell proliferation, however, chronic EZH2 ablation may robustly enhance oncogenic activity of NB cells. Although we had observed a significant decrease in H3K27me3 global level, EZH2 ablation showed no potency to de-repress EZH2 target genes in NB cells. Many studies have been targeted PRC2 catalytic function mediated by trimethylation of H3 lysine 27 (H3K27me3), however, the EZH2 oncogenic function may modulate gene expression individually and independent of H3K27me3. The functional switch dependent on EZH2 phosphorylation may occur, since EZH2 catalytic subunit, without its methyltransferase activity, act as a transcriptional coactivator for transcriptional factors, as observed in breast (41) and prostate (42) cancers. In addition to these findings, in which chronic EZH2 ablation appears to enhance NB



oncogenic activity, may also be explained by a high frequency of activating mutations in RAS-MAPK pathway found in relapsed NBs (43), and the loss of PRC2 subunits cooperates with RAS activation to drive tumor progression in peripheral nervous system tumors (44). Moreover, it has been shown that co-occurrence of activating RAS pathway mutations and SWI-SNF mutations can abrogate EZH2 dependence and even lead to EZH2 resistance (45).

Furthermore, earlier studies have shown that loss of function of EZH2 can also cooperate to cancer development in a context-dependent manner. In glioblastoma EZH2 is frequently overexpressed, however a prolonged EZH2 ablation causes a robust switch in cell fate, marked by a significant enhanced proliferation, DNA damage repair and activation of part of the pluripotency network, which resulted in tumor cell identity change and tumor progression (46). These findings raise a concern about the use of EZH2 inhibition as a therapeutic strategy to treat cancers.

On the other hand, a feasible compensatory PRC2-EZH1 function may also be another hypothesis to be addressed in NB cell context, since EZH1 remains intact after solely EZH2 ablation, or when more selectively EZH2 methyltransferase activity is inhibited by GSK-343 or GSK-126. A number of studies have evidenced compensatory or divergent functions of PRC2-EZH1 and PRC2-EZH2 catalytic subunits. As shown in embryonic stem cells, EZH1 appears to play a compensatory role for EZH2, in which cooperates for transcriptional repression (23,47), whereas in neurogenesis and myogenesis EZH1 and EZH2 play an opposite role, in which EZH1 have a transcriptional activation function by further RNA Pol II elongation (48–50). Another recent study showed that relative changes in the expression levels of the

PRC2 catalytic subunits EZH2 and EZH1, and a switch in master lineage regulators, from GATA2 to GATA1, regulates EZH1/2 switch, are crucial during erythroid differentiation. Furthermore, the study also provide evidence that EZH1 together with SUZ12 forms a non-canonical PRC2 complex, in which occupies active chromatin domains, and consequently, modulates the gene expression in a positive manner. And particularly, EZH2 loss expression resulted in repositioning of EZH1 chromatin occupancy and transcriptional activity (51).

In conclusion, we show that the depletion of PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1 functions appears to be more effective to inhibit NB cell growth rather than solely PRC2-EZH2. In addition, decrease in H3K27me3 global level mediated by EZH2 or EZH2 and EZH1 catalytic depletion re-establishes transcriptional activation of tumor suppressor genes, CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  and CHD5, that control differentiation in NB. *Ex vivo* experiments show that EZH2 and EZH1 catalytic depletion, by UNC-1999, reduces oncogenic activity of NB xenografts tumors and prolong murine survival. However, chronic EZH2 ablation did not fully impairs NB cell proliferation ability, and enhances anchorage-independent growth and tumor growth of NB xenografts. These findings suggest that NB tumor growth may not rely on PRC2-EZH2 function exclusively. Together, these results have important implications regarding the effects of EZH2 inhibition in NB cells, in which raise concerns about the use of EZH2 inhibition as a therapeutic strategy in clinic to treat NB. Further, we demonstrate that a careful investigation on PRC2-EZH2 functions in NB is needed to ensure beneficial effects for NB patients.

**Fig. 5 should be inserted here**

---

## **Materials and Methods**

### **Cell culture and EZH2 inhibitors**

NB cell lines used in this study are listed in Supplementary Table S1. NB cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Immortal but non-transformed cell lines were used as a control for cytotoxicity (Supplementary Table S1). For EZH2 catalytic depletion experiments, the small molecule specific EZH2 inhibitors (GSK126, Millipore Inc.; GSK343, UNC1999 from Structural Genomics Consortium; and its inactive analog UNC2400, Tocris Bioscience) were diluted in DMSO to the indicated concentrations in cell culture media. JQ1 inhibitor was used as a control for growth inhibition. NB cells lines were seeded onto 384-well plate in an initial confluence of 10 – 15%, after 24 hours the cells were treated with EZH2 inhibitors for 7 days. IncuCyte Zoom (ESSENBioSCIENCE, Ann Arbor, MI, USA) was used to measure the NB cell growth using an integrated confluence algorithm.

## **shRNAi transduction**

To assess the chronic effect of EZH2 genetic ablation on NB cell growth, NGP cell line were plated onto 100-mm dishes at a density of 5 million cells per dish. After 24 hours, NGP cells were infected by constitutive lentiviral shRNA targeting EZH2 or shRNA target control (Sigma-Aldrich Corp) lentivirus particles following the manufacturer's protocol. The cell viability was checked using the trypan blue exclusion method.

## **Cell proliferation assay**

For cell proliferation assay, NB cells seeded in 96 or 384-well were incubated at 10 $\mu$ M final concentration of EdU in complete media for 4 hours. Then, NB cells were fixed for 5 min with fixative solution and added 2X Click-it reaction cocktail according to manufacturer's protocol (Invitrogen, CA, USA). After 25 min at RT incubation (protected from light) the cells were washed 2 or 3 times with cold 1X PBS. For DNA staining, SYTOX AADvanced Dead Cell Stain was used according manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). After the double staining (EdU/SYTOX AAD), NB fixed cells were washed for 2 or 3 times with cold 1X PBS and the number of EdU and SYTOXAAD-positive cells was measured using the integrated cell count / well algorithm of IncuCyte Zoom (ESSENBioSCIENCE, Ann Arbor, MI, USA). The ratio of the number of the cells in proliferative state (EdU-positive stained) by the total number of cells (SYTOX AAD-positive stained) was calculated.

### **Anchorage independent growth assay**

To assess the effect of EZH2 catalytic or non-catalytic depletion on NB anchorage independent cell growth ability, NGP cells were cultured in 0.5% top agarose media plated on a layer of 1.0% bottom agar/RPMI to prevent the adhesion of cells to the culture plates. Medium containing EZH2 inhibitors or puromycin or tetracycline was changed 2 or 3 times per week, during 3 weeks. NB colonies were stained with crystal violet and the number of colonies was analyzed through Image J software.

### **RNA isolation and qRT-PCR**

NB cells were detached by trypsinization, washed 2 times with ice-cold 1X PBS, and processed for RNA extraction using the RNeasy Kit (Qiagen Inc., MD, USA). cDNA synthesis was performed with High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) was performed on CFX384 Touch Real Time PCR Detection System (Bio-rad Inc., CA, USA) to evaluate NGFR, CASZ1, RAR $\beta$ , CHD5 gene expression using Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies Inc., CA, USA). The samples were normalized to the levels of  $\beta$ -actin.

## **Protein assays**

Protein lysates were prepared from cells cultured and harvested as described above. Immunologic detection of protein expression was performed using the following antibodies: EZH2, H3 (Active Motif, CA, USA), CASZ1, EZH1 (Abcam, CAMBS, UK), H3K27me3 (Millipore, DE) and GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) as loading control. For protein immunoreactivity detection, we used enhanced chemiluminescence method (Thermo-Fisher Scientific Inc., MA, USA). Images with different exposures of the membrane were analyzed by densitometry using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) and the relative densitometric units were normalized to timed control and the ratio shown under each time point and condition.

## **Xenograft model**

To assess the *in vivo* effect of EZH2 catalytic depletion on tumorigenesis of NB, NGPwt cells were *ex-vivo* treated with 0.2  $\mu$ M with UNC-1999, its analog negative control UNC-2400, and the vehicle control DMSO for 48h, and after NB cells were resuspended in Hank's balanced salt solution and Matrigel (Trevigen) and a 100 $\mu$ L cell suspension containing  $2 \times 10^6$  cells was placed in the subcutaneous tissue of the right flanks of 4- to 5-week-old nude mice (Taconic). Three cohorts of mice (10 per group) were used for the *ex-vivo* EZH2 catalytic depletion experiments. For chronic

EZH2 genetic ablation, NGP NB cell lines carrying constitutive shEZH2 and shTRC (target control), were injected in nude mice as described above. Two cohorts of mice (20 per group) were used for the experiments. All mice received regular food. Tumors were excised when tumors reached approximately 1.5 - 2 cm<sup>3</sup>. The dimensions [length (L) and width (W)] of the tumors were assessed 3 times a week and the volume was calculated as  $(L \times W^2)/2$ .

### **Immunohistochemistry**

Paraffin-embedded (5 micron) sections from tumor xenograft samples were deparaffinized, and stained with either hematoxylin and eosin (H&E) or immunohistochemistry stains as specified. Heat-induced epitope retrieval was performed for 36 minutes at 98°C in target retrieval buffer. Immunohistochemistry staining was performed using antibodies specific for EZH2, Ki67, pH3 (ser10), Cyclin-D1 (Cell Signaling) and H3K27me3 (Abcam). The image analysis of protein intensity was performed with at least 3 fields of each xenograft tumor sample using Image J software with the Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox.

### **Statistical Analysis**

For statistical analysis, GraphPad Prism version 6.0 was used. Each assay was performed two or three times in biologically independent assays. The significance of differences mean  $\pm$  S.E.M. values was analyzed by one-way ANOVA followed by

Tukey's multiple comparison test or Student's *t*-test. *P* values of  $< 0.05$  were considered statistically significant.



## References

1. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: Promising new targets. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2768–79.
2. Ratner N, Brodeur GM, Dale RC, Schor NF. The “neuro” of neuroblastoma: Neuroblastoma as a neurodevelopmental disorder. *Ann Neurol.* 2016;80:13–23.
3. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;362:2202–11.
4. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Seminar Neuroblastoma. *Lancet.* 2007;369:2106–20.
5. Oberthuer A, Theissen J, Westermann F, Hero B, Fischer M. Molecular characterization and classification of neuroblastoma. *Future Oncol.* 2009;5:625–39.
6. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* Nature Publishing Group; 2013;45:279–84.
7. Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet.* 2012;45:12–7.
8. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg D a, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature.* Nature Publishing Group;

- 2012;483:589–93.
9. Cheung N-KV, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2012;307:1062–71.
  10. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov A V., et al. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2015;21:231–8.
  11. Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* 2002;111:185–96.
  12. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011;469:343–9.
  13. Richter GHS, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:5324–9.
  14. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* Nature Publishing Group; 2012;492:108–12.
  15. Li G, Warden C, Zou Z, Neman J, Krueger JS, Jain A, et al. Altered expression of polycomb group genes in glioblastoma multiforme. *PLoS One.* 2013;8:e80970.
  16. Ciarapica R, De Salvo M, Carcarino E, Bracaglia G, Adesso L, Leoncini PP, et

- al. The Polycomb group (PcG) protein EZH2 supports the survival of PAX3-FOXO1 alveolar rhabdomyosarcoma by repressing FBXO32 (Atrogin1/MAFbx). *Oncogene*. 2014;33:4173–84.
17. Wang C, Liu Z, Woo CW, Li Z, Wang L, Wei JS, et al. EZH2 mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res*. 2012;72:315–24.
  18. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones A V, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42:722–6.
  19. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2010;42:181–5.
  20. Simon C, Chagraoui J, Kros J, Gendron P, Wilhelm B, Lemieux S, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes Dev*. 2012;26:651–6.
  21. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, et al. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*. 2013;340:857–61.
  22. Chan K, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*. 2013;27:985–90.
  23. Shen X, Liu Y, Hsu Y-J, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, et al. EZH1 mediates

- methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. 2008;32:491–502.
24. Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol*. 2012;8:890–6.
  25. Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:21360–5.
  26. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang K-C, Xiao Y, et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:842–54.
  27. Verma SK, Tian X, Lafrance L V., Duquenne C, Suarez DP, Newlander KA, et al. Identification of potent, selective, cell-Active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett*. 2012;3:1091–6.
  28. Konze KD, Ma A, Li F, Barsyte-Lovejoy D, Parton T, MacNevin CJ, et al. An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem Biol*. 2013;8:1324–34.
  29. Xu B, On DM, Ma A, Parton T, Konze KD, Pattenden SG, et al. Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia. *Blood*. 2015.
  30. Veschi V, Liu Z, Voss TC, Ozbun L, Gryder B, Yan C, et al. Epigenetic siRNA and Chemical Screens Identify SETD8 Inhibition as a Therapeutic Strategy for p53 Activation in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Cell*. Elsevier Inc.;

- 2017;31:50–63.
31. Puissant A, Frumm SM, Alexe G, Bassil CF, Qi J, Chanthery YH, et al. Targeting MYCN in Neuroblastoma by BET Bromodomain Inhibition. *Cancer Discov.* 2013;3:308–23.
  32. Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Puay LL, et al. Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007;21:1050–63.
  33. Lee J, Kim K. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438:647–52.
  34. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1579–88.
  35. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:7922–7.
  36. Kim W, Bird GH, Neff T, Guo G, Kerenyi MA, Walensky LD, et al. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat Chem Biol.* 2013;9:643–50.
  37. Liu Z, Yang X, Li Z, McMahon C, Sizer C, Barenboim-Stapleton L, et al. CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. *Cell Death Differ.* 2011;18:1174–83.

38. Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:940–9.
39. Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM. Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene.* 1998;17:751–9.
40. Light JE, Koyama H, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, et al. Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59:226–32.
41. Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RKM, et al. Context-specific regulation of NF- $\kappa$ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell.* 2011;43:798–810.
42. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science.* 2012;338:1465–9.
43. Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, Koster J, Daage LC, Diskin SJ, et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet.* 2015;47:864–71.
44. De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H, Ortonne N, et al. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature.* 2014;514:247–51.
45. Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, et al. SWI/SNF-

- mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med.* 2015;21:1491–6.
46. deVries NA, Hulsman D, Akhtar W, deJong J, Miles DC, Blom M, et al. Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. *Cell Rep. The Authors;* 2015;10:383–97.
  47. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008;32:503–18.
  48. Stojic L, Jasencakova Z, Prezioso C, Stützer A, Bodega B, Pasini D, et al. Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. *Epigenetics Chromatin.* 2011;4:16.
  49. Mousavi K, Zare H, Wang AH, Sartorelli V. Polycomb Protein Ezh1 Promotes RNA Polymerase II Elongation. *Mol Cell.* 2012;45:255–62.
  50. Henriquez B, Bustos FJ, Aguilar R, Becerra A, Simon F, Montecino M, et al. Ezh1 and Ezh2 differentially regulate PSD-95 gene transcription in developing hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2013;57:130–43.
  51. Xu J, Shao Z, Li D, Xie H, Kim W, Huang J, et al. Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. *Mol Cell. Elsevier Inc.;* 2015;57:304–16.

## **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

The authors declare no competing financial interests.

## **Acknowledgements**

This research was supported and funded by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research; the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); the Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute (ICI); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).



## Figure Legends

**Figure 1. EZH2 catalytic depletion in neuroblastoma cells.** A, *In vitro* experimental methodology scheme of EZH2 catalytic depletion in NB cells. B, Heatmap of the inhibitory potential of the small molecule EZH2 inhibitors on the growth of control and NB cell lines during 72 hours. JQ1 was used as a control for growth inhibition. Growth  $IC_{50}$  values are determined from 12 points dose response curves ( $n = 2$ ). C, Average of growth  $IC_{50}$  of EZH2 inhibitors between control and NB cells. D, Average of growth  $IC_{50}$  between control and NB cells after 72 and 96 hours of UNC-1999 exposure. E, Heatmap of the inhibitory potential of EZH2 inhibitors on the cell proliferation of control or NB cells exposed to a dose of 3.75  $\mu$ M for 7days, assessed by double staining EdU/Sytox AAD. The ratio was calculated through the number of EdU-positive cells by the total number of cells Sytox AAD-positive ( $n = 2$ ). F, Growth curves of NGP cells upon EZH2 catalytic depletion by UNC-1999 during 120 hours (error bars represent the SDs). G, Representative field of phase-contrast (upper panel) and EdU/Sytox AAD stained (lower panel) of NGP cells exposed for 7 days to 3.75  $\mu$ M of UNC-1999 (Scale bar: 300 $\mu$ m). H, Growth  $IC_{50}$  curves of NGP cells exposed to UNC-1999 during 120 hours. Data in graphs are shown  $\pm$ S.E.M.; \* $p < 0.05$  vs. control.

**Figure 2. Effect of EZH2 catalytic depletion on the levels of H3K27me3 and tumor suppressor genes in neuroblastoma cells.** A, H3K27me3 global level in a time and dose course on indicated EZH2 inhibitors in NGP cells, total histone 3 H3 is shown as loading control, assessed by western blot analysis. B, Curves of relative densitometric analysis (RDU) of H3K27me3 global level in NGP cells exposed to EZH2 inhibitors for 24, 48, and 72 hours. C, Determination of the inhibitory potential of the EZH2 inhibitors on the EZH2 catalytic function by the H3K27me3 global level in NGP cells. Target IC<sub>50</sub> values are determined from 5 point dose response curves. D, Heatmap showing CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$ , CHD5 mRNA levels in NGP, SY5Y and IMR-32 NB cell lines exposed to EZH2 inhibitors for 7 days, assessed by qRT-PCR. The expression of the indicated genes was normalized to the expression level of  $\beta$ -actin. All treated samples were corrected by the vehicle control (DMSO).

**Figure 3. Long-term EZH2 or EZH2 and EZH1 catalytic depletion on the oncogenic activity of neuroblastoma cells.** A, Representative image of long-term *in vitro* effect of EZH2 inhibitors on the anchorage independent growth ability of NGP cells upon 3 weeks. B, Percent colony number, measured by Image J software. EZH2 treated samples were corrected by the vehicle control (DMSO), \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. vehicle control. C, Tumor growth curve of NGP cells previously exposed for 48 hours to 0.2  $\mu$ M of UNC-1999, UNC-2400 or DMSO was injected into the flanks of Nude mice randomly segregated into 3 cohorts as indicated in the graph (10 mice per group), the tumor volume measurements were performed from the day 7. The time points with significant differences (\*p < 0.01 vs. vehicle control, DMSO). D, The

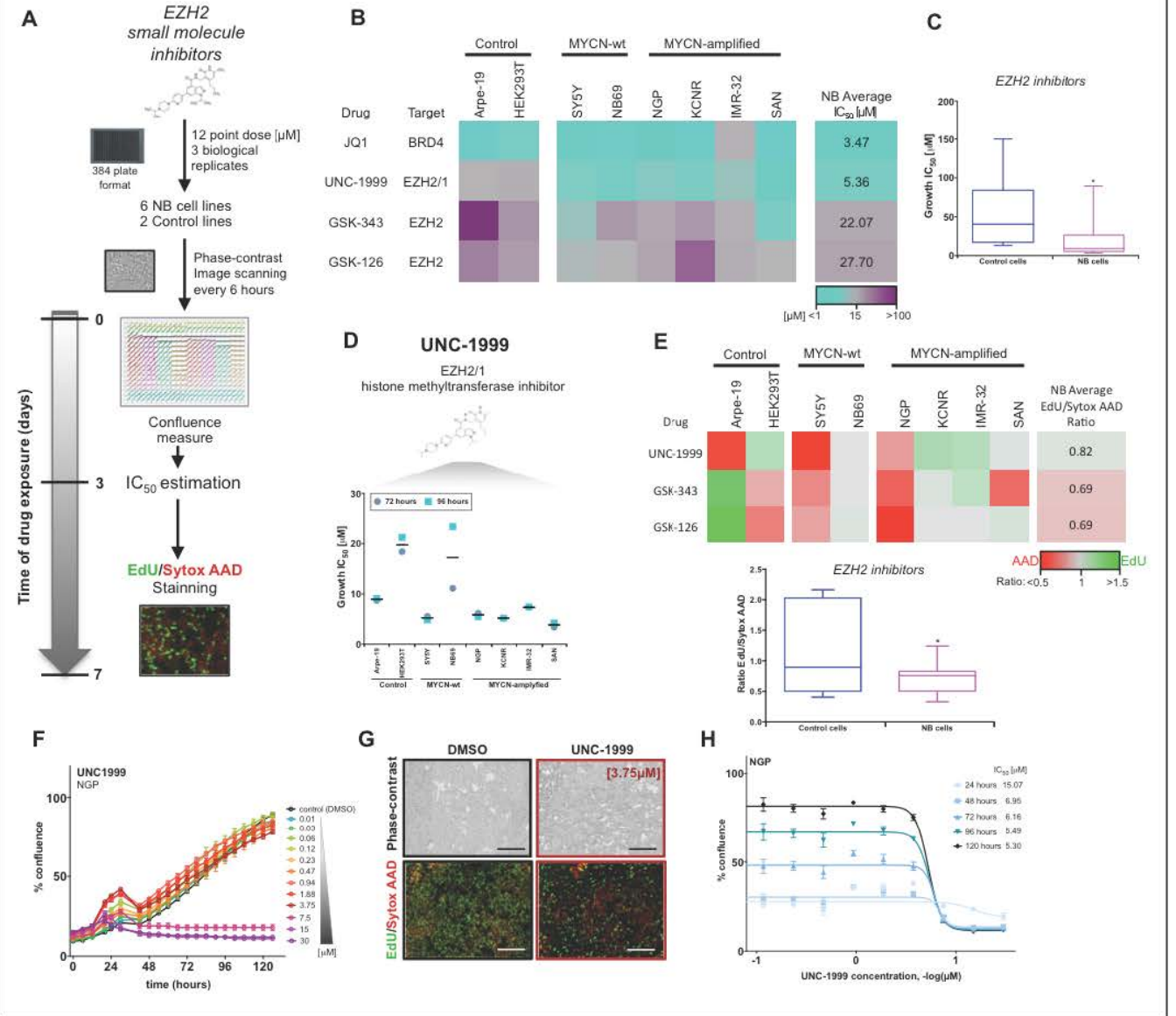
survival curve represents the animal group survival time from the beginning of tumor measurements, (\*p = 0.0491, UNC-1999 vs. vehicle control). Data in the graphs are shown as mean ± S.E.M.

**Figure 4. Chronic EZH2 genetic ablation in neuroblastoma cells.** A, Protein expression of EZH2, EZH1 and H3K27me3 in NGP cells expressing constitutively siRNA against EZH2 (NGPshEZH2) and no target (NGPshTRC). GAPDH and total Histone 3 H3 were used as loading control. B, Relative densitometric analysis of EZH2 and H3K27me3. C, Representative images of NGP cells expressing constitutively shRNA against EZH2 (NGPshEZH2) and no target (NGPshTRC), double-stained for EdU/Sytox AAD. Scale bar: 300µm. D, Ratio between the number of EdU-positive cells by the total number of cells Sytox AAD-positive. (\*\*p = 0.01, is related to NGPshEZH2 compared with NGPshTRC. (E) CASZ1, NTRK1, RARβ, CHD5 mRNA levels. The expression of the indicated genes was normalized to the expression level of β-actin. All treated samples were corrected by NGPshTRC. E, Chronic *in vitro* effect of EZH2 genetic ablation on the anchorage independent growth ability of NGPshEZH2 cells upon 3 weeks in culture. F, Tumor growth curves of chronic EZH2 genetic ablation in NGP cells expressing constitutively shRNA against EZH2 (NGPshEZH2) and no target (NGPshTRC). The mutated NGP cell lines were injected into the flanks of Nude mice randomly segregated into 2 cohorts as indicated in the graph (20 mice per group), the tumor volume measurements were performed from the day 7. G, Tumor weight (g). H, Percent of protein intensity of EZH2, H3K27me3, CyclinD1, H3 phos-S10, Ki67 in NGP xenograft tumors from NGPshTRC

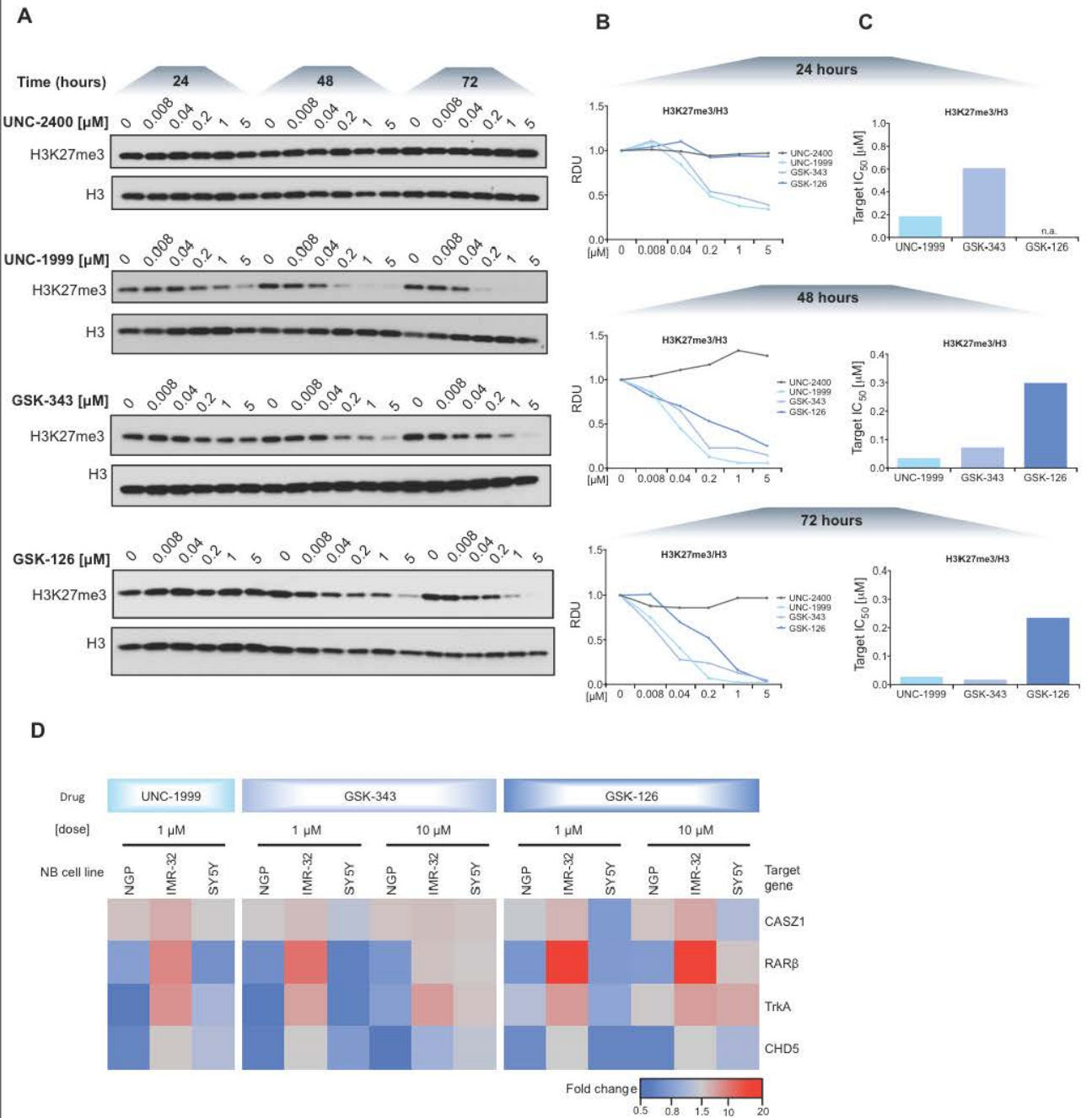
and NGPshEZH2 cell lines, assessed by immunohistochemistry. (\*p > 0.05, \*\*p > 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. target control). I, Representative fields of immunohistochemistry (scale bar: 100µm). Data in the graphs are shown as mean ± S.E.M.

**Figure 5. Model of PRC2-EZH2 functional role in Neuroblastoma.** A, As a result of overexpression, the aberrant activity of PRC2-EZH2 function may result in increased levels of H3K27me3 that is associated with repression of transcriptional activity. In NB, EZH2 overexpression is highly correlated with undifferentiated NB tumors and poor prognosis. Furthermore, low levels of tumor suppressor genes (TSGs) that control differentiation, such as CASZ1, NTRK1, and high levels of cell cycle genes are found in these poor prognosis-related NB tumors, whereas the opposite molecular and cellular features are found in good prognosis-related NB tumors. B, Pharmacological intervention by UNC-1999 depletes PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1 catalytic function, by decreasing H3K27me3, re-establishing transcriptional activity of TSGs, reduces cell growth and oncogenic activity of NB cells. C, Genetic intervention by PRC2-EZH2 ablation depletes solely EZH2 level, whereas EZH1 level remains intact, resulting in a decreasing of H3K27me3. Acute PRC2-EZH2 ablation initially reduces NB cell growth, however, chronic PRC2-EZH2 ablation, intriguingly recovers NB cell growth and the remaining NB cells appear to have enhanced oncogenic activity which may result in tumor progression. Although a significant decrease in H3K27me3 upon PRC2-EZH2 ablation, no change in TSGs is observed.

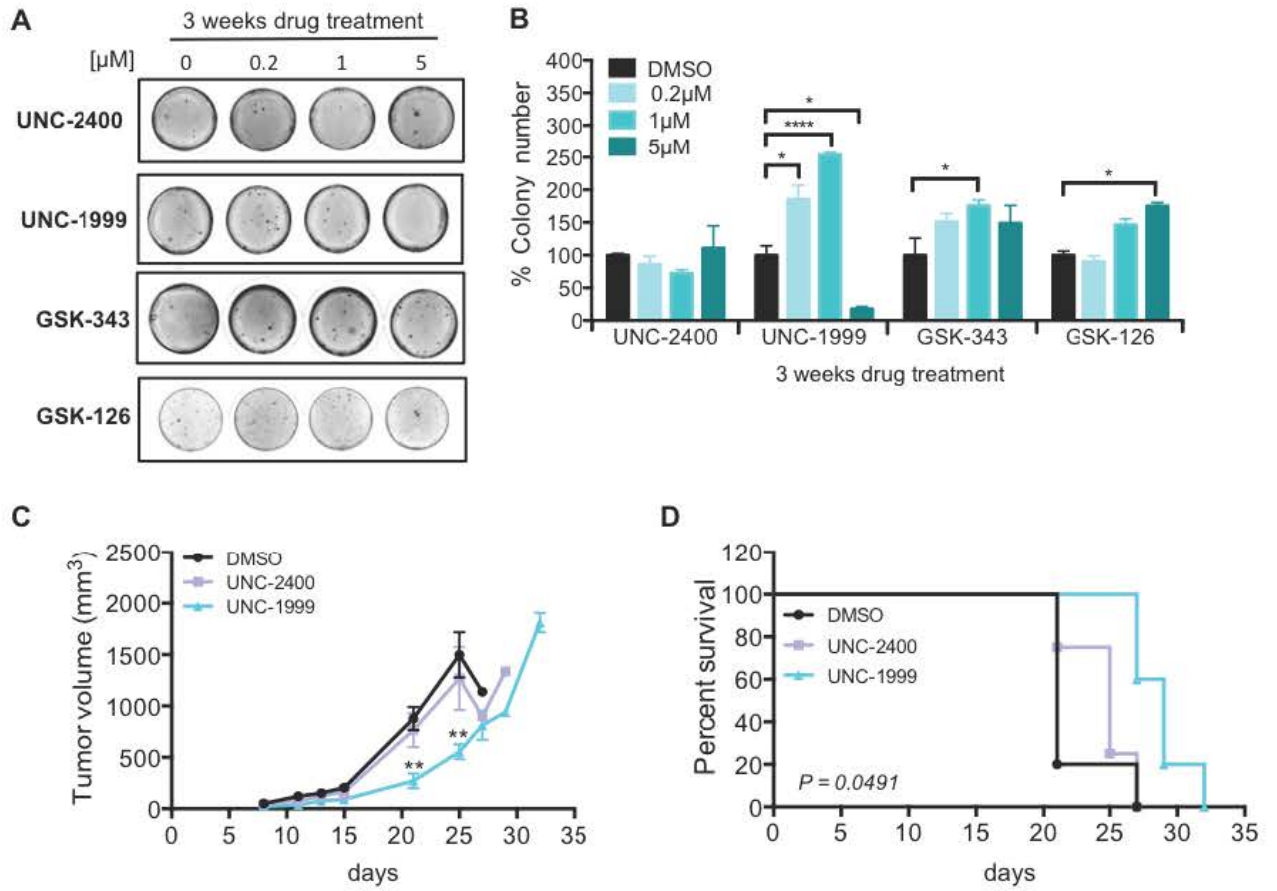
**Figure 1.**



**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**

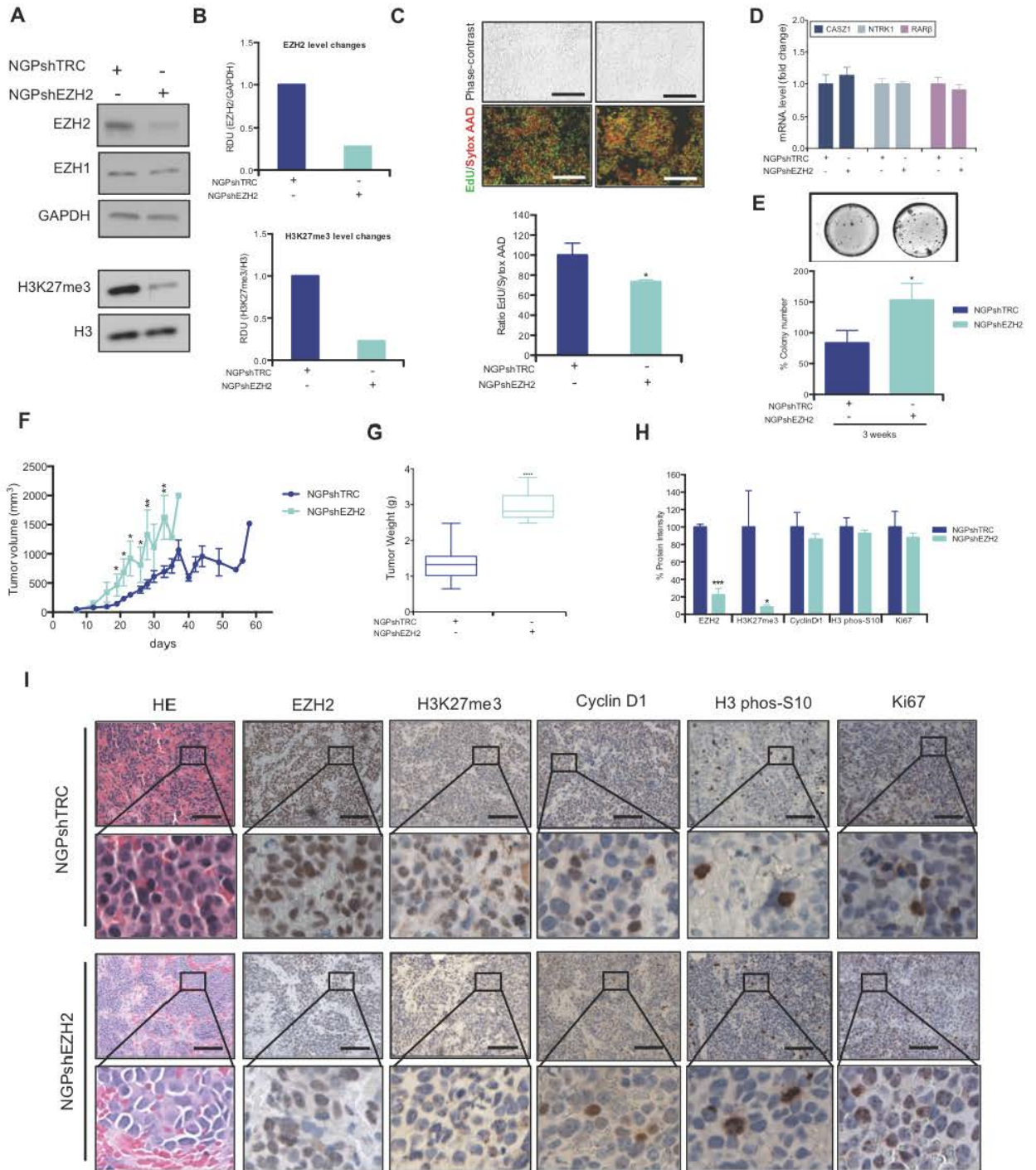
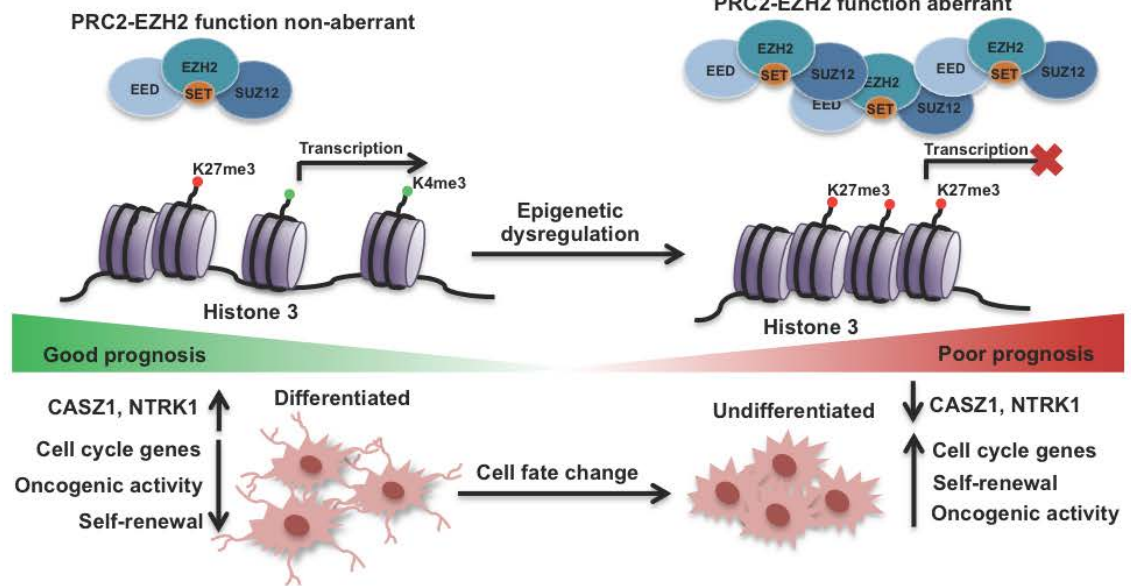


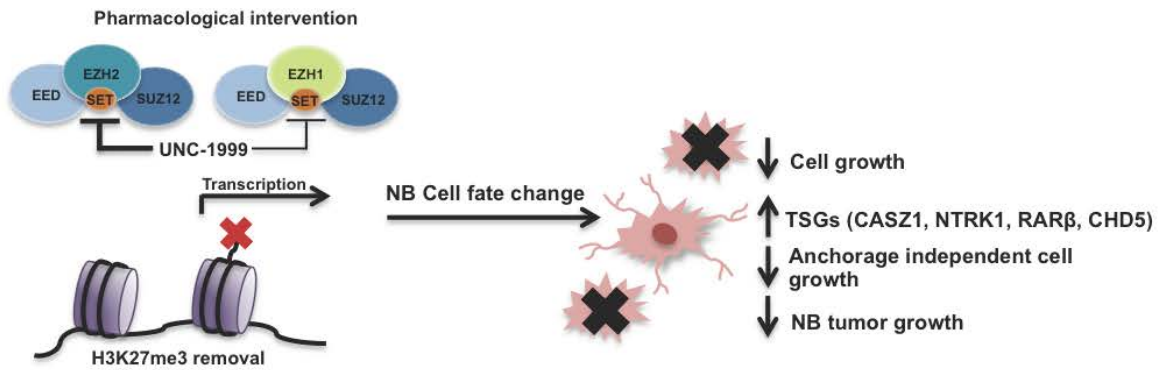


Figure 5.

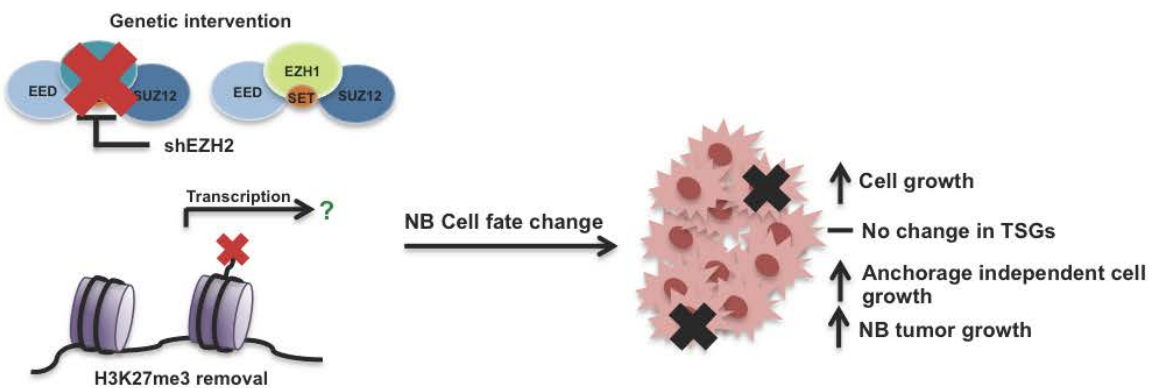
**A** PRC2-EZH2 function in NB



**B** PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1 catalytic depletion



**C** Solely PRC2-EZH2 ablation



## 4. DISCUSSÃO

A acetilação e metilação (modificações pós-traducionais de histonas) são componentes abundantes do epigenoma que regulam os estados da cromatina influenciando diretamente diversos processos celulares críticos como transcrição, proliferação, apoptose, e reparo do DNA. Padrões aberrantes de modificações de histonas têm sido associados a um grande número de tumores malignos humanos (ARROWSMITH et al., 2012; FEINBERG; TYCKO, 2004; JONES; BAYLIN, 2002). Com o potencial de reverter esse padrão epigenético aberrante encontrado no câncer, atualmente diversas enzimas modificadoras da cromatina têm sido alvo de estudo e de desenvolvimento para novas estratégias terapêuticas (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016).

Considerando que tumores pediátricos apresentam baixo ou nenhum grau de diferenciação, uma abordagem farmacológica utilizando a modulação de enzimas modificadoras da cromatina tem sido uma estratégia para reverter o estado epigenético aberrante desses tumores, que por consequência inibe o crescimento celular e leva a um estado mais diferenciado. Em nosso primeiro estudo (apresentado na seção 3.1) o principal objetivo foi avaliar o efeito *in vitro* da inibição da atividade de HDAC por NaB sobre o crescimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular em linhagens de SE (SK-ES1 e RD-ES). Observamos que NaB inibe eficientemente a atividade global de HDAC em duas linhagens celulares de SE, bem como o crescimento celular, proliferação a longo prazo e formação de colônias. Foram observados valores semelhantes de IC<sub>50</sub> para a inibição da atividade de HDAC e para diminuição do crescimento celular em ambas as linhagens celulares. Além disso, NaB provocou parada no ciclo celular marcada por um acúmulo na fase G1, o que dá suporte a estudos anteriores que demonstraram o efeito de NaB na indução de parada no ciclo celular particularmente na fase G1, acompanhado de apoptose e/ou diferenciação em diversos tipos de células tumorais (incluindo, células

de linfoma, câncer de mama, câncer de colorretal, osteossarcoma) (ARCHER et al., 1998; BARNARD; WARWICK, 1993; CHOPIN et al., 2004; JIANG et al., 2012; WANG et al., 2006; XIE et al., 2016).

A regulação aberrante do ciclo celular em diversos tumores malignos humanos é impulsionada pela superexpressão das ciclinas D (ciclina D1, D2 e D3) (CASIMIRO et al., 2012; HUNTER; PINES, 1994; MUSGROVE et al., 2011). A ciclina D1 é superexpressa em tumores de SE, assim como nas células de SE RD-ES (ZHANG et al., 2004). Em nosso estudo, a inibição de HDAC por NaB resultou numa diminuição do nível da proteína ciclina D1 em ambas as linhagens celulares de SE, o que é semelhante ao que foi reportado em células neuroblastoma (LORENZ et al., 2011). Dessa forma, o nível de expressão da ciclina D1, uma proteína reguladora da fase G1, pode representar um componente importante para controlar a parada no crescimento celular antes da diferenciação em células de SE.

A indução do acúmulo de células poliploides é um mecanismo proposto pelo qual HDIs controlam o crescimento de células tumorais, através da síntese de DNA continuada e falha na citocinese (XU et al., 2005). Como por exemplo, SAHA induziu o aumento de células poliploides em linhagens de câncer de cólon e mama, resultando em indução de senescência celular. Além disso, este efeito é mais pronunciado em células que carregam p21WAF1 ou p53 defeituosos (XU et al., 2005). Além desses estudos foi demonstrado que NaB pode afetar a distribuição cromossômica, resultando em poliploidia e erros de distribuição numérica cromossômica (aneuploidia) de linhagens celulares transformadas (GOMEZ-VARGAS; VIG, 2002). Ao contrário do que a grande maioria dos estudos propõem na literatura, no presente trabalho, nós observamos uma significativa redução da proporção de células poliploides na linhagem RD-ES após exposição ao NaB.

A inibição de HDAC induziu uma redução nos níveis transcricionais da proteína oncogênica *EWS-FLI1*, bem como alterações em vias que controlam proliferação e sobrevivência em células de SE, incluindo componentes da via de sinalização de neurotrofinas. Em outros tipos de cânceres pediátricos e neuroendócrinos, a expressão diferencial de neurotrofinas e dos receptores Trk estão

associados ao prognóstico do paciente assim como propriedades do tumor, que incluem angiogênese, metástase e quimiossensibilidade (THIELE; LI; MCKEE, 2009). Recentemente, demonstramos que os tumores de SE expressam os receptores de Trk e a inibição da sinalização de Trk resultou em um crescimento celular reduzido e em uma maior quimiossensibilidade (HEINEN et al., 2016). No presente trabalho, observamos que os níveis de proteína NGF e BDNF são reduzidos em células SE expostas ao NaB, e isto foi acompanhado por reduções nos componentes das vias ERK e AKT. Dado que as neurotrofinas medeiam a sobrevivência neuronal através da ativação de ERK, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e fosfolipase C $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ ) (REICHARDT, 2006) os nossos dados são consistentes com um modelo em que a inibição da atividade global de HDAC suprime a sobrevivência mediada por Trk em células SE.

Além disso, nós observamos uma redução nos níveis proteicos do marcador mitótico H3 phos-S10 após a inibição da atividade de HDAC por NaB em células de SE. Durante a mitose, em estágios tardios de G2 e mitose do ciclo celular, a modificação pós-traducional, fosforilação na serina 10 da histona 3 (H3 phos-S10), é identificada como uma marca característica de cromatina condensada (HANS; DIMITROV, 2001). Níveis elevados de H3 phos-S10 em células transformadas com oncogenes e em células tumorais estão associados com a ativação amplificada da via de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno via RAS (MAPK-MSK1) (STRELKOV; DAVIE, 2002). Além disso, a superexpressão da H3 phos-S10 está relacionada com instabilidade cromossômica desempenhando um papel na manutenção da ploidia e carcinogênese (ESPINO et al., 2009; OTA et al., 2002). Também foi demonstrado um papel indispensável da fosforilação na serina 10 da histona 3 para ativar o promotor do gene p21 em resposta a inibição da atividade de HDAC por tricostatina A (SIMBOECK et al., 2010).

Em nossas avaliações sobre o efeito antiproliferativo de NaB a longo prazo, nós observamos uma robusta redução na taxa de proliferação das células de SE por um longo período (16 d) após a exposição das células de SE ao NaB. Além disso, estas análises demonstraram que NaB produziu um significativo atraso na

recuperação do crescimento da população de células de SE, através da análise do perfil das curvas de duplicação cumulativa da população (*CPD – cumulative population doubling*) (SILVA et al., 2016). Consistente com esses dados, estudos em diferentes células tumorais (neuroblastoma, glioma) já demonstraram um potencial antiproliferativo de NaB sozinho ou combinado a outros agentes químicos (ATRA, quercitina, resveratrol) que é persistente por um longo período (ALMEIDA et al., 2016; VARGAS et al., 2014) Além desses efeitos antiproliferativos de NaB, nós verificamos que NaB reduziu significativamente a capacidade das células de SE crescerem em colônias, estando de acordo com o estudo que demonstrou um alto potencial NaB para reduzir a capacidade de formação de colônias de três linhagens de meduloblastoma ao longo de 7 a 10 dias (NÖR et al., 2013). Estas análises sugerem que a inibição da atividade de HDAC pode representar uma estratégia terapêutica promissora para reduzir o potencial proliferativo de células de SE. E a partir destes dados é possível determinar em que ponto intervir para evitar a reativação do crescimento celular exponencial o que é crucial para eliminar completamente as células de SE.

A carcinogênese mediada por células tronco tumorais pode ser considerada uma espécie de reprogramação epigenética na qual a expressão de genes específicos que controlam a diferenciação é perdida e a expressão de genes que controlam características celulares mais imaturas ou tronco (*stemness*) é reativada (SHUKLA; MEERAN, 2014). Em concordância com esse racional, nossos resultados demonstraram que a inibição da atividade global de HDAC por NaB possui um grande potencial para suprimir genes associados à pluripotência, e isto está associado a um aumento da complexidade celular e da expressão do marcador de diferenciação neuronal  $\beta$ -III tubulina, e conseqüentemente uma alteração na morfologia das células de SE marcada pelo aparecimento de extensões curtas do tipo neuríticas. Uma análise de microarranjo revelou que a inibição de HDAC por TSA suprime genes associados à pluripotência, tais como Nanog, Klf4, Sox2 e Sall4, em células tronco embrionárias, e coordenadamente ativa genes que controlam a diferenciação (KARANTZALI et al., 2008). O marcador neuronal de diferenciação  $\beta$ -III

tubulina tem sido empregado para avaliar a diferenciação neural em células de SE, devido a sua expressão presente em estágios pós-mitóticos e em neurônios recém-diferenciados (YANG et al., 2004), portanto, este marcador neuronal de diferenciação tem sido utilizado para avaliar a diferenciação neural em SE (ROCCHI; MANARA, 2010; VENTURA et al., 2015). Estes resultados suportam a hipótese de que a inibição da atividade de HDAC por NaB pode reprogramar epigeneticamente as células de SE para um estado de diferenciação neural.

A formação de esferas em culturas de células de câncer é uma plataforma amplamente utilizada para a expansão de células-tronco tumorais. Em nosso estudo, nós observamos que as células das tumoresferas apresentaram níveis mais elevados de genes relacionados à pluripotência, tais como Oct3/4 e BMI-1, suportando um fenótipo de células tronco. Além disso, as tumoresferas apresentaram níveis mais elevados de TrkB em comparação com células cultivadas em monocamada, sugerindo um possível aumento na sinalização de neurotrofina em células tronco tumorais de SE (CHOPIN et al., 2016). Adicionalmente, NaB apresentou um consistente efeito para reduzir a formação de tumoresferas, indicando uma potente capacidade para eliminar células tronco tumorais de SE.

Outra hipótese é a possibilidade de que outros mecanismos de modificações de histonas, diferentes da acetilação, possam estar envolvidos nos efeitos de NaB em células de câncer. Recentemente, a butirilação da lisina em histonas foi descrita como uma nova marca epigenética (modificação pós-translacional de histonas) que pode cooperar ou competir com acetilação para promover a expressão gênica (CHEN et al., 2007; CHOUDHARY et al., 2014; GOUDARZI et al., 2016). Aumentos na butirilação foram relatados em células de neuroblastoma após exposição ao HDi SAHA (XU et al., 2014). Deve-se observar também que NaB provocou aumento nos níveis de cAMP e estimulou a ativação de múltiplas vias de proteína cinase através de mecanismos de interações diretas com a sinalização de cAMP/PKA no citoplasma, mostrando que os efeitos de NaB são pelo menos parcialmente mediados por efeitos independentes de modificações epigenéticas (PRASAD; SINHA, 1976; RIVERO; ADUNYAH, 1996, 1998). Por essa razão, não podemos

excluir a possibilidade de que os efeitos induzidos por NaB também afetem outros componentes do epigenoma e da maquinaria celular em SE.

Contudo, nosso estudo propõe que o mecanismo de NaB através da inibição da atividade de HDAC suprime reguladores transcricionais que controlam o estado de pluripotência em células de SE e reestabelece a atividade transcricional do marcador de diferenciação neural TUBB3. Juntos, nossos resultados indicam que os HDIs podem reduzir o crescimento e a sobrevivência, e direcionar células de SE para um estado diferenciado, representando assim uma estratégia potencialmente útil para tratar tumores de SE.

Na segunda parte deste trabalho (apresentado na seção 3.2), nós demonstramos os efeitos celulares e moleculares da depleção da função PRC2-EZH2 no crescimento, diferenciação e atividade oncogênica de células NB. O complexo repressivo polycomb 2 (PRC2), que promove a trimetilação da histona 3 na lisina 27 (H3K27) mediada pela subunidade catalítica EZH2 ou seu homólogo EZH1, foi identificado como um mecanismo enzimático que está associado ao silenciamento gênico (CZERMIN et al., 2002). PRC2-EZH2 controla diferentes processos celulares críticos como proliferação, diferenciação, manutenção da identidade celular e plasticidade (MARGUERON; REINBERG, 2011).

Diversos estudos correlacionaram a desregulação de PRC2-EZH2 com uma variedade de cânceres. Mutações de ganho de função ou superexpressão de EZH2 estão associadas a metástases e pior prognóstico em doenças hematopoiéticas malignas, bem como em tumores sólidos, tais como, sarcoma de Ewing, glioblastoma, rabdomiossarcoma (CIARAPICA et al., 2014; LI et al., 2013; MCCABE et al., 2012; RICHTER et al., 2009). Os tumores de NB são altamente agressivos e possuem características histopatológicas com pouca ou nenhuma evidência de diferenciação, nesse sentido, é pensado que estes tumores são o resultado de uma falha do desenvolvimento normal, e que se originam de precursores derivados da crista neural do sistema nervoso simpático periférico, os quais sofreram uma diferenciação incompleta (LAWLOR; THIELE, 2012; RATNER et al., 2016). Foi demonstrado que a superexpressão de EZH2, proteína de PRC2 que limita a

diferenciação em diversos tecidos, é crítica para manter o estado indiferenciado de tumores de NB através da repressão epigenética de múltiplos genes supressores tumorais, e além disso está associada com pior prognóstico (WANG et al., 2012).

Com base na evidência de que EZH2 é superexpresso em uma variedade de cânceres, diversas sondas químicas para inibir a função PRC2-EZH2 têm sido desenvolvidas. DZNep, um inibidor hidrolase S-adenosilhomocisteína, foi o primeiro descrito na literatura que demonstrou atividade para inibir a função PRC2-EZH2, no entanto o mecanismo pelo qual inibe PRC2-EZH2 é ainda desconhecido (TAN et al., 2007). Em NB, foi demonstrado um potente efeito antitumoral por DZNep, marcado pela redução nos níveis proteicos de EZH2, e da marca repressiva H3K27me3, e pela redução do crescimento de tumores de xenoenxerto de NB (WANG et al., 2012). Em contrapartida, DZNep demonstrou pouca especificidade, pois apresenta atividade para inibir outras histonas metiltransferases, tal como SETDB1 (H3K9me3); e além disso demonstrou alta toxicidade em modelos animais (LEE; KIM, 2013; MIRANDA et al., 2009).

Com o intuito de melhorar a atividade antitumoral, seletividade e reduzir a toxicidade, recentemente, diversos inibidores de pequenas moléculas altamente seletivos para EZH2 (KNUTSON et al., 2012b; MCCABE et al., 2012; QI et al., 2012) ou para EZH2 e EZH1 (KONZE et al., 2013) foram desenvolvidos. Estes inibidores têm sido apresentados como terapias promissoras para cânceres que dependem da função catalítica de PRC2-EZH2 ou de ambas subunidades PRC2-EZH2 e PRC2-EZH1. Em nossa triagem farmacológica utilizando inibidores de pequenas moléculas altamente seletivos para a função catalítica de EZH2 (GSK-126 e GSK-343), e para ambos EZH2 e EZH1 (UNC-1999) nós observamos que as células NB são mais responsivas a dupla depleção catalítica de EZH2 e EZH1 (UNC-1999) em comparação a depleção catalítica de EZH2 exclusivamente. Além disso, o duplo inibidor de EZH2 e EZH1, UNC-1999, e não o seu análogo inativo UNC-2400, suprimiu potentemente o crescimento de células NB, bem como o crescimento independente de ancoragem e o crescimento de tumores de xenoenxertos de NB, avaliado por modelos *in vitro* e *ex vivo*. UNC-1999, o primeiro inibidor duplo para



EZH2 e EZH1 oralmente biodisponível, foi revelado como uma nova e promissora terapia para leucemias do subtipo MLL – rearranjadas. Consistente com os nossos resultados, UNC-1999 demonstrou uma potente inibição do crescimento de células de leucemia de subtipo MLL-rearranjadas e prolongou a sobrevivência murina em modelo animal com MLL-AF9 (KONZE et al., 2013). Outros estudos utilizando a depleção da função de PRC-EZH2 como estratégia terapêutica demonstraram que os inibidores GSK-126 e EPZ6438 têm um potente efeito antitumoral na supressão de linfomas que carregam mutações ativadoras de EZH2 (MCCABE et al., 2012), e de tumores rabdóides que carregam mutações inativadoras de SNF5 (subunidade do complexo remodelador da cromatina SWI-SNF) (KNUTSON et al., 2013), respectivamente. Além desses, o peptídeo com hidrocarbonetos em forma de grampo, SAH-EZH2, que degrada o complexo PRC2 pela interrupção da interação entre a proteína EED com EZH2 ou EZH1, foi proposto como nova terapia para supressão de cânceres dependentes da função PRC2-EZH2 (KIM et al., 2013).

Quando nós avaliamos o nível global da marca repressiva H3K27me3 no contexto celular de NB após a depleção catalítica de EZH2, UNC-1999, demonstrou maior potência para reduzir H3K27me3 de um modo dependente de dose e de tempo em comparação com GSK-126 e GSK-343. UNC-2400, análogo inativo de UNC-1999, não alterou os níveis da marca repressiva H3K27me3. Consistente com esses resultados foi demonstrado que UNC-1999, e não UNC-2400, apresenta maior eficiência para suprimir H3K27me3 ou a proliferação de células de leucemia do subtipo MLL – rearranjada ao passo que GSK-126 falhou (XU et al., 2015a). Ao contrário do DZNep ou SAH-EZH2, os inibidores UNC-1999, GSK-343 e GSK-126 não promovem a degradação de PRC2, o mecanismo envolve a inibição da atividade enzimática de PRC2-EZH2 através de uma via competitiva S-adenosil-l-metionina; o que provoca redução nos níveis de H3K27me3, e conseqüentemente restabelece a expressão de genes alvos de EZH2, que possivelmente estavam silenciados (KONZE et al., 2013; MCCABE et al., 2012; VERMA et al., 2012).

Em NB, já foi demonstrado que EZH2 se liga aos promotores, e conseqüentemente, causa a repressão de genes supressores tumorais que

controlam diferenciação, tais como CASZ1, NGFR, CLU, RUNX3 (WANG et al., 2012). No presente trabalho, nós observamos uma robusta ativação transcricional dos genes supressores tumorais CASZ1, NTRK1, RAR $\beta$  e CHD5, mediada pela depleção catalítica de EZH2. Evidências substanciais mostram que CASZ1, um gene frequentemente deletado em 1p36 em diferentes tipos de cânceres, desempenha um papel de gene supressor tumoral controlando a diferenciação em NB. A baixa expressão de CASZ1 está correlacionada a um pior prognóstico, enquanto que a alta expressão é encontrada em tumores de NB com fenótipo diferenciado. Além disso, a superexpressão de CASZ1 em células de NB resultou em redução no crescimento celular, migração celular, crescimento independente de ancoragem, indução de diferenciação, e supressão do crescimento de tumores de xenoinxerto de NB (LIU et al., 2011). CHD5, um poderoso gene supressor tumoral candidato, apresenta uma baixa ou ausente expressão em NB de alto risco, e isto também está associado à deleção em 1p36 e a uma inativação do segundo alelo através do mecanismo epigenético (FUJITA et al., 2008). Além disso, verificou-se que a perda da expressão de RAR $\beta$  (CHEUNG et al., 1998) e NTRK1 (LIGHT et al., 2012) em pacientes com NB está correlacionada a um pior prognóstico. Portanto, nossos resultados indicam que a depleção catalítica de EZH2 ou de ambas subunidades EZH2 e EZH1 pode restabelecer a atividade transcricional de genes supressores tumorais que controlam a diferenciação em NB.

Embora, uma diminuição significativa no nível global de H3K27me3 tenha sido observada após a ablação genética crônica de EZH2 (utilizando shRNA constitutivo para EZH2), curiosamente isto não reestabeleceu transcionalmente os genes supressores tumorais, alvos de EZH2 utilizados neste estudo. Grande parte dos estudos tem sido dirigido para a inibição da função catalítica de PRC2-EZH2, mediada pela trimetilação de H3K27, no entanto, alguns estudos demonstraram que EZH2 pode apresentar uma função independente de sua atividade como histona metiltransferase. Como alternativa, EZH2, dependendo do contexto celular, pode agir como um coativador transcricional interagindo com fatores de transcrição críticos na

oncogênese, sendo esta uma mudança funcional dependente de fosforilação (LEE et al., 2011; XU et al., 2012).

A ablação genética crônica de EZH2 não aboliu completamente a proliferação celular, e interessantemente, induziu um aumento substancial no crescimento independente de ancoragem (*in vitro*) e um aumento nos tumores de xenoenxerto de NB (*ex vivo*). Uma possível hipótese para explicar estes resultados é demonstrada em estudos que correlacionaram a presença de mutações ativadoras da via RAS-MAPK (encontradas com alta frequência em tumores de NBs recidivados) com a perda de subunidades de PRC2, pois estas cooperam para a ativação de RAS resultando em progressão tumoral em tumores do sistema nervoso periférico (DE RAEDT et al., 2014; ELEVELD et al., 2015). Além disso, a coocorrência de mutações ativadoras da via RAS com mutações em SWI-SNF está associada à resistência a inibição de EZH2 (DE RAEDT et al., 2014; ELEVELD et al., 2015; KIM et al., 2015). Consistente com esta hipótese, foi demonstrado que a perda de função de EZH2 a longo prazo também pode cooperar para o desenvolvimento do câncer dependendo do contexto celular. Em glioblastoma, EZH2 é frequentemente superexpresso, no entanto, a ablação genética prolongada de EZH2 provocou uma robusta mudança na identidade dessas células, marcada por um aumento significativo na proliferação celular, reparo de danos no DNA e ativação de genes associados à pluripotência, o que levou a uma progressão tumoral (DEVRIES et al., 2015). Estes resultados levantam uma importante preocupação sobre o uso da inibição de EZH2 como uma estratégia terapêutica para tratar cânceres.

Por outro lado, uma possível função complementar de PRC2-EZH1 também pode ser considerada como hipótese a ser abordada no contexto das células NB, uma vez que os níveis de EZH1 permanecem intactos após a ablação de EZH2 ou quando a inibição da atividade catalítica é seletivamente maior para EZH2 do que para EZH1 pelos inibidores GSK-343 ou GSK-126. De acordo com essa hipótese, diversos estudos evidenciaram funções compensatórias ou divergentes das subunidades catalíticas PRC2-EZH1 e PRC2-EZH2. Apesar de seu papel compensatório fraco quando a expressão de EZH2 é perdida no contexto celular de

células tronco embrionárias (SHEN et al., 2008), na literatura atual não está claro se a função primária de EZH1 é semelhante ou distinta da função de EZH2 no controle da transcrição durante o desenvolvimento (EZHKOVA et al., 2011; MARGUERON et al., 2008). Em outro contexto celular como na neurogênese e miogênese EZH1 e EZH2 desempenham papéis opostos, em que EZH1 apresenta a função de promover a alongação transcricional uma vez que interage com o complexo RNA Pol II (HENRIQUEZ et al., 2013; MOUSAVI et al., 2012; STOJIC et al., 2011). Mais recentemente, foi demonstrado que durante a diferenciação eritroide, as subunidades catalíticas EZH1 e EZH2 sofrem uma mudança de expressão controlada por reguladores mestre linhagem específicos. E além disso, EZH1 juntamente com SUZ12 formam um complexo PRC2 não canônico, no qual ocupa domínios ativos da cromatina e, conseqüentemente, modula a expressão gênica positivamente. A perda da expressão de EZH2, através de shRNA, resulta no reposicionamento global de EZH1 em promotores com a marca repressiva H3K27me3 que previamente foram ocupados por EZH2, tais como o conjunto de genes *HOXA* e *HOXD* (alvos conhecidos de PRC2) (XU et al., 2015b).

Em resumo, nossos dados indicam que a inibição catalítica de EZH2 e EZH1 é uma estratégia terapêutica efetiva para suprimir o crescimento das células e tumores de xenoenxerto de NB. Além disso, a inibição catalítica de EZH2 ou de ambas subunidades EZH2 e EZH1 reativaram programas gênicos envolvidos na diferenciação, o que corrobora com a hipótese de que o complexo PRC2-EZH2 medeia o silenciamento epigenético de genes supressores tumorais que controlam diferenciação em NB (WANG et al., 2012). Assim, é importante ressaltar que no contexto celular de NB é possível que EZH1 desempenhe uma função importante, podendo esta ser complementar quando a expressão de EZH2 é perdida, assim como observado por Xu e col. (2015b). Adicionalmente, estes resultados apresentaram implicações importantes sobre os efeitos da inibição catalítica exclusiva de EZH2 em células NB, nas quais levantam ressalvas sobre o uso de inibidores mais seletivos para EZH2 como uma estratégia terapêutica na clínica para tratar NB. Portanto, a compreensão das funcionalidades das subunidades EZH2 e

EZH1, dependentes ou não do complexo repressivo PRC2 no contexto celular de NB, é crucial para que, assim, possamos garantir efeitos benéficos para os pacientes com NB.

# 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- **Conclusões**

## **Manuscrito I**

a. A inibição da atividade global de HDAC por NaB potentemente suprime a atividade transcricional de *EWS-FLI1*, bem como vias de proliferação, sobrevivência e pluripotência, provocando uma mudança na identidade das células de SE para um estado mais diferenciado (observado pelo aumento da complexidade celular, TUBB3 e alteração morfológica característica de extensão neurítica);

b. O efeito da inibição da atividade de HDAC por NaB é persistente por um longo período, causando um atraso significativo no recrescimento de células de SE;

c. A inibição da atividade de HDAC (5 mM NaB) suprime completamente o crescimento e sobrevivência de tumoresferas de SE;

d. Portanto, a inibição da atividade de HDAC por NaB pode representar uma estratégia farmacológica efetiva para reverter o estado epigenético aberrante de células de SE.

## **Manuscrito II**

a. UNC-1999, um inibidor de ambas subunidades catalíticas EZH2 e EZH1 de PRC2 representa uma nova e promissora estratégia terapêutica para a supressão do crescimento de tumores de NB, uma vez que potentemente

suprimiu a proliferação celular, o crescimento independente de ancoragem e o crescimento de tumores de xenoenxerto de NB;

**b.** A inibição catalítica de EZH2 (GSK-343 ou GSK-126) ou de ambas subunidades EZH2 e EZH1 (UNC-1999) reativaram programas gênicos envolvidos na diferenciação de NB, através de uma robusta redução na marca repressiva H3K27me3;

**c.** A ablação genética crônica de EZH2 provavelmente alterou a identidade das células de NB, conferindo a elas uma maior capacidade de crescerem independente de ancoragem, bem como uma maior atividade oncogênica promovendo progressão tumoral, observada pelo aumento no crescimento de tumores de xenoenxerto de NB;

**d.** Estes resultados apresentam implicações importantes sobre os efeitos da inibição exclusiva de EZH2 em células NB, nas quais levantam ressalvas sobre o uso de inibidores mais seletivos para EZH2 como uma estratégia terapêutica na clínica para tratar NB.

- **Perspectivas**

- **Manuscrito I**

- **a.** Avaliar os níveis de expressão de proteínas-chave das vias associadas às CTTs (Wnt, shh, Notch);

- **b.** Investigar o efeito da inibição da atividade de HDAC na capacidade de proliferação ilimitada, autorrenovação e recapitulação de tumores da

subpopulação de células tronco tumorais de SE através do ensaio de diluição limitante *in vivo*;

**c.** Acessar o perfil global do transcriptoma de células e tumores de xenoenxerto de SE após a inibição da atividade de HDAC.

## **Manuscrito II**

**a.** Acessar o perfil global do transcriptoma em células e tumores de xenoenxerto de NB após a inibição catalítica de EZH2 ou de ambos EZH2 e EZH1 por intervenção farmacológica;

**b.** Acessar o perfil global do transcriptoma em células e tumores de xenoenxerto de NB após a ablação genética crônica de EZH2;

**c.** Avaliar o efeito da ablação genética crônica de EZH2 por silenciamento gênico em linhagens de NB que carregam mutações em SWI-SNF (NB69, NB16, SMS-SAN);

**d.** Investigar o papel funcional da subunidade catalítica EZH1, no crescimento, proliferação, diferenciação celular e no perfil transcricional de diferentes linhagens de NB através do silenciamento gênico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARRATEGI, A. et al. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. **Stem cells international**, v. 2016, p. 3631764, 2016.

ACHESON, A. et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**, v. 374, n. 6521, p. 450–3, 30 mar. 1995.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–8, 1 abr. 2003.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 1938, p. 786–94, maio 1964.

ALMEIDA, V. R. et al. Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells. **Molecular neurobiology**, p. 1–10, 10 nov. 2016.

ANDERSON, J. L. et al. Pediatric sarcomas: translating molecular pathogenesis of disease to novel therapeutic possibilities. **Pediatric Research**, v. 72, n. 2, p. 112–121, 2012.

ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 823–6, 17 ago. 2006.

ARCHER, S. Y. et al. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6791–6796, 1998.

ARROWSMITH, C. H. et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 5, p. 384–400, 2012.

ATTIYEH, E. F. et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 21, p. 2243–53, 2005.

AVIGAD, S. et al. The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors. **Cancer**, v. 100, n. 5, p. 1053–8, 1 mar. 2004.

BAKER, D. L. et al. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 14, p. 1313–23, 30 set. 2010.

BALAMUTH, N. J.; WOMER, R. B. Ewing's sarcoma. **The Lancet. Oncology**, v. 11, n. 2, p. 184–92, fev. 2010.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–60, 7 dez. 2006.

BARKER, L. M. et al. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 19, p. 4354–62, 1 jul. 2005.

BARNARD, J. A.; WARWICK, G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. **Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 495–501, jun. 1993.

BECK, B.; BLANPAIN, C. Unravelling cancer stem cell potential. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 727–738, 2013.

BEDFORD, D. C. et al. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. **Epigenetics**, v. 5, n. 1, p. 9–15, 2010.

BERNSTEIN, B. E. et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315–326, 2006a.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–81, 23 fev. 2007.

BERNSTEIN, M. et al. Pediatric Oncology Ewing ' s Sarcoma Family of Tumors : Current Management. **The Oncologist**, v. 11, n. C, p. 503–519, 2006b.

BIELECKA, Z. F. et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. **Biol. Rev**, p. 0–0, 2016.

BOGAERTS, E. et al. The roles of transforming growth factor- $\beta$ , Wnt, Notch and hypoxia on liver progenitor cells in primary liver tumours (Review). **International journal of oncology**, v. 44, n. 4, p. 1015–22, abr. 2014.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 769–84, 2006.

BOLÓS, V. et al. Notch signalling in cancer stem cells. **Clinical and Translational Oncology**, v. 11, n. 1, p. 11–19, 2009.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–7, jul. 1997.

BOSSE, K. R.; MARIS, J. M. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. **Cancer**, v. 122, n. 1, p. 20–33, 1 jan. 2016.

BOWN, N. et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 25, p. 1954–61, 24 jun. 1999.

BRENNER, C.; FUKS, F. A methylation rendezvous: reader meets writers.

**Developmental cell**, v. 12, n. 6, p. 843–4, jun. 2007.

BRIEN, C. A. O.; KRESO, A.; JAMIESON, C. H. M. Cancer Stem Cells and Self-renewal. p. 3113–3120, 2010.

BRODEUR, G. M. et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4653, p. 1121–4, 8 jun. 1984.

BRODEUR, G. M. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 11, n. 8, p. 1466–77, ago. 1993.

BRODEUR, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 3, p. 203–216, 2003.

BRODEUR, G. M.; BAGATELL, R. Mechanisms of neuroblastoma regression. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 11, n. 12, p. 704–713, 2014.

BROHL, A. S. et al. The Genomic Landscape of the Ewing Sarcoma Family of Tumors Reveals Recurrent STAG2 Mutation. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 7, 2014.

CARÉN, H. et al. Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. **British journal of cancer**, v. 97, n. 10, p. 1416–24, 19 nov. 2007.

CASIMIRO, M. C. et al. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. **Genes & cancer**, v. 3, n. 11–12, p. 649–57, 2012.

CAVAZZANA, A. O. et al. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. **The American journal of pathology**, v. 127, n. 3, p. 507–18, 1987.

CHANG, S. et al. An expression screen reveals modulators of class II histone deacetylase phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**

**of the United States of America**, v. 102, n. 23, p. 8120–5, 7 jun. 2005.

CHEN, X.; PAPPO, A.; DYER, M. A. Pediatric solid tumor genomics and developmental plasticity. **Oncogene**, v. 34, n. 41, p. 5207–15, 2015.

CHEN, Y. et al. Lysine Propionylation and Butyrylation Are Novel Post-translational Modifications in Histones. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 812–819, 9 fev. 2007.

CHEN, Y. et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 971–974, 16 out. 2008.

CHENG, L. Y. et al. Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. **Cell**, v. 146, n. 3, p. 435–47, 5 ago. 2011.

CHEUNG, B. et al. Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. **Oncogene**, v. 17, n. 6, p. 751–9, 13 ago. 1998.

CHOI, E. K. et al. Ewing sarcoma. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 39–47, 2014.

CHOPIN, V. et al. P21(WAF1/CIP1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF7 breast cancer cells. **Oncogene**, v. 8, n. 231, p. 21–9, 2004.

CHOPIN, V. et al. Neurotrophin signaling in cancer stem cells. p. 1859–1870, 2016.

CHOUDHARY, C. et al. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 536–550, 2014.

CIARAPICA, R. et al. The Polycomb group (PcG) protein EZH2 supports the survival of PAX3-FOXO1 alveolar rhabdomyosarcoma by repressing FBXO32 (Atrogin1/MAFbx). **Oncogene**, v. 33, n. 32, p. 4173–84, 7 ago. 2014.

CIRONI, L. et al. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2634, 9 jul. 2008.

COHN, S. L. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 289–97, 10 jan. 2009.

COLE, K. A. et al. A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 5, p. 735–42, maio 2008.

COLLINS, A. T. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer research**, v. 65, n. 23, p. 10946–51, 1 dez. 2005.

COTTERILL, S. J. et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 18, n. 17, p. 3108–14, set. 2000.

CUI, H.; SCHROERING, A.; DING, H. p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 9, p. 679–86, jul. 2002.

CZERMIN, B. et al. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. **Cell**, v. 111, n. 2, p. 185–96, 18 out. 2002.

DAUPHINOT, L. et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. **Oncogene**, v. 20, n. 25, p. 3258–65, 31 maio 2001.

DAVIDOFF, A. M. Neuroblastoma. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 21, n. 1, p. 2–14, 2012.

DE BERNARDI, B. et al. Excellent outcome with reduced treatment for infants with

disseminated neuroblastoma without MYCN gene amplification. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 7, p. 1034–40, 1 mar. 2009.

DE BROUWER, S. et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 17, p. 4353–62, 1 set. 2010.

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275–84, abr. 2005.

DE PRETER, K. et al. No evidence for involvement of SDHD in neuroblastoma pathogenesis. **BMC cancer**, v. 4, p. 55, 2004.

DE RAEDT, T. et al. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 247–51, 9 out. 2014.

DEATON, A.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & development**, v. 25, n. 10, p. 1010–1022, 2011.

DEFFERRARI, R. et al. Influence of segmental chromosome abnormalities on survival in children over the age of 12 months with unresectable localised peripheral neuroblastic tumours without MYCN amplification. **British journal of cancer**, v. 112, n. 2, p. 290–5, 20 jan. 2015.

DELA CRUZ, F. S. Cancer stem cells in pediatric sarcomas. **Frontiers in oncology**, v. 3, n. June, p. 168, 2013.

DELATTRE, O. et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature**, v. 359, n. 6391, p. 162–5, 10 set. 1992.

DESAI, S. S.; JAMBHEKAR, N. A. Pathology of Ewing's sarcoma/PNET: Current opinion and emerging concepts. **Indian journal of orthopaedics**, v. 44, n. 4, p. 363–

8, out. 2010.

DEVRIES, N. A. et al. Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. **Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 383–397, 2015.

DIMEO, T. A. et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. **Cancer research**, v. 69, n. 13, p. 5364–73, 1 jul. 2009.

DJOS, A. et al. Aneuploidy in neuroblastoma tumors is not associated with inactivating point mutations in the STAG2 gene. **BMC medical genetics**, v. 14, n. 1, p. 102, 2013.

DUPIN, E. et al. Neural crest progenitors and stem cells. **Comptes rendus biologies**, v. 330, n. 6–7, p. 521–9, 2007.

ELEVELD, T. F. et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. **Nature genetics**, v. 47, n. 8, p. 864–71, ago. 2015.

ELLIS, L.; ATADJA, P. W.; JOHNSTONE, R. W. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 1409–20, 1 jun. 2009.

ESIASHVILI, N.; GOODMAN, M.; MARCUS, R. B. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 30, n. 6, p. 425–30, 2008.

ESKELAND, R. et al. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. **Molecular cell**, v. 38, n. 3, p. 452–64, 14 maio 2010.

ESPINO, P. S. et al. Genomic instability and histone H3 phosphorylation induction by the Ras-mitogen activated protein kinase pathway in pancreatic cancer cells.



**International journal of cancer**, v. 124, n. 3, p. 562–7, 1 fev. 2009.

ESTÉCIO, M. R. H.; ISSA, J.-P. J. Dissecting DNA hypermethylation in cancer. **FEBS Letters**, v. 585, n. 13, p. 2078–2086, 7 jul. 2011.

EZHKOVA, E. et al. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. **Genes & development**, v. 25, n. 5, p. 485–98, 1 mar. 2011.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 9, p. 673–91, 2014.

FARRIA, A.; LI, W.; DENT, S. KATs in cancer: functions and therapies. **Oncogene**, v. 34, n. October 2014, p. 4901–4913, 2015.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143–153, 2004.

FENG, Q. et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. **Current biology : CB**, v. 12, n. 12, p. 1052–8, 25 jun. 2002.

FILIPPAKOPOULOS, P.; KNAPP, S. The bromodomain interaction module. **FEBS letters**, v. 586, n. 17, p. 2692–704, 14 ago. 2012.

FINKEL, T.; DENG, C.-X.; MOSTOSLAVSKY, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. **Nature**, v. 460, n. 7255, p. 587–591, 2009.

FRIEDMAN, G. K.; GILLESPIE, G. Y. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. p. 298–318, 2011.

FUJITA, T. et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 13, p. 940–9, 2 jul. 2008.

FUKUMA, M. et al. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is

mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. **Oncogene**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 9 jan. 2003.

FURUMAI, R. et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. **Cancer research**, v. 62, n. 17, p. 4916–21, 1 set. 2002.

GAMAZON, E. R. et al. Trans-population analysis of genetic mechanisms of ethnic disparities in neuroblastoma survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 4, p. 302–9, 20 fev. 2013.

GARCÍA-ARAGONCILLO, E. et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. **Oncogene**, v. 27, n. 46, p. 6034–43, 9 out. 2008.

GARNER, E. F.; BEIERLE, E. A. Cancer Stem Cells and Their Interaction with the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma. **Cancers**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 31 dez. 2015.

GEORGE, R. E. et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 975–8, 2008.

GLAZER, R. I. et al. 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 135, n. 2, p. 688–94, 13 mar. 1986.

GOLDSCHNEIDER, D. et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 19, p. 5603–12, 2006.

GOMEZ-VARGAS, P.; VIG, B. K. Differential induction of numerical chromosome changes by sodium butyrate in two transformed cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 138, n. 1, p. 56–63, 2002.

GORDON, D. J.; MOTWANI, M.; PELLMAN, D. Modeling the initiation of Ewing sarcoma tumorigenesis in differentiating human embryonic stem cells. **Oncogene**, n.

August, p. 1–11, 2015.

GOUDARZI, A. et al. Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters. **Molecular Cell**, v. 62, n. 2, p. 169–180, 2016.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 192, n. 1, p. 70–87, 2008.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012.

GRIER, H. E. et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 8, p. 694–701, 20 fev. 2003.

GUZMAN, M. L. et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4427–35, 15 dez. 2007.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 1, p. 32–42, jan. 2009.

HADNAGY, A. et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. **Experimental cell research**, v. 312, n. 19, p. 3701–10, 15 nov. 2006.

HAHM, K. B. et al. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. **Nature genetics**, v. 23, n. 2, p. 222–7, out. 1999.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. **Genes & development**, v. 20, n. 21, p. 2913–21, 1 nov. 2006.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3021–3027, 2001.

HARRISON, H. et al. Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. R21, 2013.

HAYDEN, A. et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. **Breast cancer research and treatment**, v. 127, n. 1, p. 109–19, maio 2011.

HEINEN, T. E. et al. **Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma** *Oncotarget Impact Journals*, , 2016.

HENIKOFF, S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 1, p. 15–26, 2008.

HENRICH, K.-O.; SCHWAB, M.; WESTERMANN, F. 1p36 tumor suppression--a matter of dosage? **Cancer research**, v. 72, n. 23, p. 6079–88, 1 dez. 2012.

HENRIQUEZ, B. et al. Ezh1 and Ezh2 differentially regulate PSD-95 gene transcription in developing hippocampal neurons. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 57, p. 130–43, nov. 2013.

HERO, B. et al. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 9, p. 1504–10, 20 mar. 2008.

HERRERO-MARTIN, D. et al. Factors Affecting EWS-FLI1 Activity in Ewing's Sarcoma. **Sarcoma**, v. 2011, p. 352580, 2011.

HEUKAMP, L. C. et al. Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma

in transgenic mice. **Science translational medicine**, v. 4, n. 141, p. 141ra91, 4 jul. 2012.

HO, R. et al. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. **Cancer letters**, v. 305, n. 1, p. 76–85, 1 jun. 2011.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5528–40, 13 ago. 2007.

HOLLIDAY, R. Mechanisms for the control of gene activity during development. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 65, n. 4, p. 431–71, nov. 1990.

HOLYOAKE, T. L. et al. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 4, p. 549–58, abr. 2002.

HÖLZEL, M. et al. NF1 Is a Tumor Suppressor in Neuroblastoma that Determines Retinoic Acid Response and Disease Outcome. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 218–229, 2010.

HOSHI, M. et al. Detailed deletion mapping of chromosome band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. **British journal of cancer**, v. 82, n. 11, p. 1801–7, jun. 2000.

HU-LIESKOVAN, S. et al. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. **Cancer research**, v. 65, n. 11, p. 4633–44, 1 jun. 2005.

HU, E. et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, n. 2, p. 720–8, nov. 2003.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

HUANG, G.-H. et al. Medulloblastoma stem cells: Promising targets in medulloblastoma therapy. **Cancer science**, v. 107, n. 5, p. 583–9, maio 2016.

HUANG, M.; WEISS, W. A. Neuroblastoma and MYCN. 2013.

HUNTER, T.; PINES, J. Cyclins and Cancer .2. Cyclin-D and Cdk Inhibitors Come of Age. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 573–582, 1994.

ICHIKAWA, H. et al. An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. **Cancer research**, v. 54, n. 11, p. 2865–8, 1 jun. 1994.

IEHARA, T. et al. Successful treatment of infants with localized neuroblastoma based on their MYCN status. **International journal of clinical oncology**, v. 18, n. 3, p. 389–95, jun. 2013.

ILLINGWORTH, R. S.; BIRD, A. P. CpG islands - “A rough guide”. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1713–1720, 2009.

IWAMOTO, Y. Diagnosis and Treatment of Ewing’s Sarcoma. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 2, p. 79–89, 2 fev. 2007.

JABOIN, J. et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3’-kinase pathway. **Cancer research**, v. 62, n. 22, p. 6756–63, 15 nov. 2002.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature genetics**, v. 33 Suppl, n. march, p. 245–254, 2003.

JANOUEIX-LEROSEY, I. et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 967–70, 16 out. 2008.

JAWAD, M. U. 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**, v. 115, n. 15, p. 3526–36, 1 ago. 2009.

JIANG, W. et al. Dual effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 6235–6242, 2012.

JIANG, X. et al. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. **BMC Cancer**, v. 10, p. 116, 2010.

JOHNSTONE, R. W. Histone-Deacetylase Inhibitors : Novel Drugs for the Treatment of Cancer. v. 1, n. April, 2002.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683–92, 23 fev. 2007.

JONES, P. A.; ISSA, J.-P. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 10, p. 630–641, 2016.

JONES, P. A; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415–28, jun. 2002.

JOSHI, P. et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. **Molecular systems biology**, v. 9, n. 672, p. 672, 2013.

JÜRGENS, H. et al. Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. **Cancer**, v. 61, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 1988.

KANEKO, Y. et al. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. **Cancer research**, v. 47, n. 1, p. 311–8, 1 jan. 1987.

KARANTZALI, E. et al. Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. **Genome biology**, v. 9, n. 4, p. R65, 2008.

KAWAGUCHI, Y. et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 727–738,

2003.

KAZANTSEV, A. G.; THOMPSON, L. M. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 10, p. 854–68, out. 2008.

KELLY, T. K.; DE CARVALHO, D. D.; JONES, P. A. Epigenetic modifications as therapeutic targets. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1069–78, out. 2010.

KEMP, C. D. et al. Polycomb repressor complex-2 is a novel target for mesothelioma therapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 77–90, 1 jan. 2012.

KIKUCHI, R. et al. Ewing's sarcoma fusion protein, EWS/Fli-1 and Fli-1 protein induce PLD2 but not PLD1 gene expression by binding to an ETS domain of 5' promoter. **Oncogene**, v. 26, n. 12, p. 1802–10, 15 mar. 2007.

KIM, K. H. et al. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. **Nature medicine**, v. 21, n. 12, p. 1491–6, dez. 2015.

KIM, K. H.; ROBERTS, C. W. M. Targeting EZH2 in cancer. **Nature Medicine**, v. 22, n. 2, p. 128–134, 2016.

KIM, M.-A. et al. Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome-wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. **Experimental & molecular medicine**, v. 39, n. 2, p. 205–212, 2007.

KIM, S.; DENNY, C. T.; WISDOM, R. Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 7, p. 2467–78, abr. 2006.

KIM, W. et al. Targeted disruption of the EZH2–EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 10, p. 643–650, 25 ago. 2013.

KINGSTON, R. E. et al. Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase



Enzymes Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. p. 1–26, 2014.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 2, p. 89–97, fev. 2006.

KNUTSON, S. K. et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. **Nature chemical biology**, v. 8, n. 11, p. 890–6, nov. 2012a.

KNUTSON, S. K. et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. **Nature chemical biology**, v. 8, n. 11, p. 890–6, 30 nov. 2012b.

KNUTSON, S. K. et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 19, p. 7922–7, 7 maio 2013.

KNUTSON, S. K. et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 842–54, abr. 2014.

KOGNER, P. et al. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. **Cancer research**, v. 53, n. 9, p. 2044–50, 1 maio 1993.

KOHLER, J. A. et al. Treatment of children over the age of one year with unresectable localised neuroblastoma without MYCN amplification: Results of the SIOPEN study. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 17, p. 3671–3679, 2013.

KOMURO, H.; HAYASHI, Y.; KAWAMURA, M. Mutations of the p53 Gene Are Involved in Ewing ' s Sarcomas but not in Neuroblastomas Mutations of the p53 Gene Are Involved in Ewing ' s Sarcomas but not in. **Cancer Research**, p. 5284–5288,

1993.

KONZE, K. D. et al. An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 1324–1334, 2013.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KU, M. et al. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 10, 2008.

LACAYO, N. J. **Pediatric Neuroblastoma**. Disponível em:  
<<http://emedicine.medscape.com/article> Acesso em: 5 out. 2016.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.

LAWLOR, E. R.; THIELE, C. J. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: Promising new targets. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 10, p. 2768–2779, 2012.

LEDER, A.; LEDER, P. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. **Cell**, v. 5, n. 3, p. 319–22, jul. 1975.

LEDER, A.; ORKIN, S.; LEDER, P. Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 190, n. 4217, p. 893–4, 28 nov. 1975.

LEE, J. et al. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. **Cancer**, v. 116, n. 8, p. 1964–73, 15 abr. 2010.

LEE, J.; KIM, K. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 438, n. 4, p. 647–52, 6 set. 2013.

LEE, S. T. et al. Context-specific regulation of NF- $\kappa$ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. **Molecular cell**, v. 43, n. 5, p. 798–810, 2 set. 2011.

LESSNICK, S. L.; DACWAG, C. S.; GOLUB, T. R. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. **Cancer cell**, v. 1, n. 4, p. 393–401, maio 2002.

LESSNICK, S. L.; LADANYI, M. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. **Annual review of pathology**, v. 7, p. 145–59, 2012.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565–70, 7 dez. 1978.

LI, G. et al. Altered expression of polycomb group genes in glioblastoma multiforme. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80970, 2013.

LIGHT, J. E. et al. Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 59, n. 2, p. 226–232, 2012.

LIN, P. P.; WANG, Y.; LOZANO, G. Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. **Sarcoma**, v. 2011, 2011.

LINSEMAN, D. A. et al. Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41472–81, 17 out. 2003.

LIU, Z. et al. CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 7, p. 1174–83, 2011.

LORENZ, V. et al. Sodium butyrate induces cellular senescence in neuroblastoma and prostate cancer cells. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 7, n. 1, p. 265–272, 2011.

MARACHELIAN, A. et al. The significance of serial histopathology in a residual mass for outcome of intermediate risk stage 3 neuroblastoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 58, n. 5, p. 675–81, maio 2012.

MARGUERON, R. et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. **Molecular cell**, v. 32, n. 4, p. 503–18, 21 nov. 2008.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 343–9, 2011.

MARIS, J. M. et al. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. **Cancer research**, v. 62, n. 22, p. 6651–8, 15 nov. 2002.

MARIS, J. M. Recent advances in neuroblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 23, p. 2202–11, 10 jun. 2010.

MARIS, J. M.; DENNY, C. T. Focus on embryonal malignancies. **Cancer Cell**, v. 2, n. 6, p. 447–450, 2002.

MARKS, P. A. et al. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. **Current opinion in oncology**, v. 13, n. 6, p. 477–83, nov. 2001.

MARKS, P. A. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 19, n. 9, p. 1049–66, set. 2010.

MARKS, P. A.; XU, W.-S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **Journal of cellular biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 600–8, 1 jul. 2009.

MARSHALL, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 4, p. 277–89, abr. 2014.

MARTIN, M.; KETTMANN, R.; DEQUIEDT, F. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5450–67, 13 ago. 2007.

MASON, I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in

neural development. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 583–596, 2007.

MATSUMOTO, K. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells.

**Cancer research**, v. 55, n. 8, p. 1798–806, 15 abr. 1995.

MATTHAY, K. K. et al. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children’s Cancer Group study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 4, p. 1256–64, abr. 1998.

MATTHAY, K. K. et al. Neuroblastoma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16078, 10 nov. 2016.

MCCABE, M. T. et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 108–112, 2012.

MCKINSEY, T. A et al. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 106–11, 2 nov. 2000.

MEDEMA, J. P.; VERMEULEN, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 318–326, 15 jun. 2011.

MEYERS, P. A. et al. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing’s sarcoma does not improve prognosis. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 11, p. 2812–20, 1 jun. 2001.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 2, p. 234–54, fev. 2014.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 38–51, 2006.

MIRANDA, T. B. et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 1579–88, jun. 2009.

MISER, J. S. et al. Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy--a report from the Children's Oncology Group. **Pediatric blood & cancer**, v. 49, n. 7, p. 894–900, dez. 2007.

MOBLEY, B. C. et al. Expression of MYCN in multipotent sympathoadrenal progenitors induces proliferation and neural differentiation, but is not sufficient for tumorigenesis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–17, 2015.

MOSSE, Y.; LAUDENSLAGER, M. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. **American journal of ...**, v. 75, n. Mim 142623, p. 727–730, 2004.

MOSSE, Y. P. et al. High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 43, n. 4, p. 390–403, ago. 2005.

MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 930–5, 16 out. 2008a.

MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 930–935, 16 out. 2008b.

MOSSÉ, Y. P. et al. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 4, p. 627–35, abr. 2014.

MOTTAMAL, M. et al. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates

for new anticancer agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 3, p. 3898–941, 2015.

MOUSAVI, K. et al. Polycomb Protein Ezh1 Promotes RNA Polymerase II Elongation. **Molecular Cell**, v. 45, n. 2, p. 255–262, 2012.

MUELLER, M.-T. et al. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 1102–13, set. 2009.

MUSGROVE, E. A. et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 558–572, 7 jul. 2011.

NAKAGAWARA, A. et al. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. **Cancer research**, v. 52, n. 5, p. 1364–8, 1 mar. 1992.

NAKAGAWARA, A. et al. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 12, p. 847–54, 25 mar. 1993.

NAKAGAWARA, A. et al. Expression and Function of TRK-B and BDNF in Human Neuroblastomas. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 1, p. 759–767, 1994.

NAKAGAWARA, A.; BRODEUR, G. M. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 33, n. 12, p. 2050–3, out. 1997.

NAKAMURA, K. et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 66, n. 8, p. 4249–55, 15 abr. 2006.

NAKAMURA, Y. et al. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 354, n. 4, p. 892–8, 23 mar. 2007.

NAKATANI, F. et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 15105–15115, 2003.

NDLOVU, 'MATLADI N.; DENIS, H.; FUKS, F. Exposing the DNA methylome iceberg. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 7, p. 381–387, abr. 2011.

NG, H. H. et al. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. **Genes & development**, v. 16, n. 12, p. 1518–27, 15 jun. 2002.

NG, T. L. et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 9, n. 4, p. 459–63, set. 2007.

NÖR, C. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 533–543, 2013.

NOVOGRODSKY, A. et al. Effect of polar organic compounds on leukemic cells. Butyrate-induced partial remission of acute myelogenous leukemia in a child. **Cancer**, v. 51, n. 1, p. 9–14, 1 jan. 1983.

NUCHTERN, J. G. et al. A prospective study of expectant observation as primary therapy for neuroblastoma in young infants: a Children's Oncology Group study. **Annals of surgery**, v. 256, n. 4, p. 573–80, out. 2012.

O'BRIEN, C. A. et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 106–10, 4 jan. 2007.

OKAWA, E. R. et al. Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. **Oncogene**, v. 27, n. 6, p. 803–10, 31 jan. 2008.

ORDÓÑEZ, J. L. et al. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now



and what lies ahead? **Cancer research**, v. 69, n. 18, p. 7140–50, 15 set. 2009.

OTA, T. et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. **Cancer research**, v. 62, n. 18, p. 5168–77, 15 set. 2002.

PAL, S. et al. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 21, p. 9630–45, nov. 2004.

PALMA, V.; RUIZ I ALTABA, A. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 2, p. 337–45, jan. 2004.

PANDEY, U. B. et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 859–863, 2007.

PARK, J. R. et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 60, n. 6, p. 985–93, jun. 2013.

PARK, J. R.; EGGERT, A.; CARON, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 65–86, fev. 2010.

PARTHUN, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5319–28, 13 ago. 2007.

PAULUSSEN, M. et al. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 9, n. 3, p. 275–81, mar. 1998.

PAULUSSEN, M. et al. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1818–29, 15 mar. 2001.

PETERS, A. H. F. M. et al. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. **Molecular cell**, v. 12, n. 6, p. 1577–89, dez. 2003.

PICCIRILLO, S. G. M. et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 761–5, 7 dez. 2006.

PINTO, N. R. et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 3008–17, 20 set. 2015.

POLO, S. E.; ALMOUZNI, G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. **Cancer letters**, v. 220, n. 1, p. 1–9, 18 mar. 2005.

PRASAD, K. N.; SINHA, P. K. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. **In vitro**, v. 12, n. 2, p. 125–32, 1976.

PRIEUR, A. et al. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7275–83, ago. 2004.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 973–8, 2007.

PUGH, T. J. et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. **Nature Genetics**, v. 45, n. 3, p. 279–284, 2013.

QI, W. et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 52, p. 21360–5, 26 dez. 2012.

RAABE, E. H. et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in

neuroblastoma. **Oncogene**, v. 27, n. 4, p. 469–76, 2008.

RABIZADEH, S. et al. Neurotrophin dependence mediated by p75NTR: contrast between rescue by BDNF and NGF. **Cell death and differentiation**, v. 6, n. 12, p. 1222–7, dez. 1999.

RATNER, N. et al. The “neuro” of neuroblastoma: Neuroblastoma as a neurodevelopmental disorder. **Annals of Neurology**, v. 80, n. 1, p. 13–23, 2016.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.

REIFF, T. et al. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 21, p. 4699–708, nov. 2011.

REPHAELI, A.; ZHUK, R.; NUDELMAN, A. Prodrugs of butyric acid from bench to bedside: Synthetic design, mechanisms of action, and clinical applications. **Drug Development Research**, v. 50, n. 3–4, p. 379–391, 2000.

RICHTER, G. H. S. et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 13, p. 5324–9, 2009.

RIGGI, N. et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. **Genes & development**, v. 24, n. 9, p. 916–32, maio 2010.

RIGGI, N.; SUVA, M. L.; STAMENKOVIC, I. Ewing’s sarcoma origin: from dual to duality. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 9, n. 8, p. 1025–1030, 2009.

RIGGS, M. G. et al. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. **Nature**, v. 268, n. 5619, p. 462–4, 4 ago. 1977.

RIVERA, C. M.; REN, B. Mapping human epigenomes. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 39–55, 26 set. 2013.

RIVERO, J. A.; ADUNYAH, S. E. Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 3, p. 796–801, 25 jul. 1996.

RIVERO, J. A.; ADUNYAH, S. E. Sodium butyrate stimulates PKC activation and induces differential expression of certain PKC isoforms during erythroid differentiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 248, n. 3, p. 664–8, 30 jul. 1998.

ROCCHI, A.; MANARA, M. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. **The Journal of clinical**, v. 120, n. 3, p. 668–680, 2010.

RODOLFO, M. et al. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. **Cancer research**, v. 63, n. 20, p. 6948–55, 15 out. 2003.

RODRÍGUEZ-PAREDES, M.; ESTELLER, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 330–9, mar. 2011.

RORIE, C. J. et al. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. **Cancer research**, v. 64, n. 4, p. 1266–77, 15 fev. 2004.

ROSS, K. A. et al. The biology of ewing sarcoma. **ISRN Oncol**, v. 2013, p. 759725, 2013.

ROSSETTO, D.; AVVAKUMOV, N.; CÔTÉ, J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1098–1108, 2012.

ROTH, S. Y.; DENU, J. M.; ALLIS, C. D. Histone acetyltransferases. **Annual review**

**of biochemistry**, v. 70, p. 81–120, 2001.

RUBIE, H. et al. Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: Results of the prospective INES 99.1. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 449–455, 2011.

RUDOLPH, T.; BEUCH, S.; REUTER, G. Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. **Biological chemistry**, v. 394, n. 8, p. 1019–28, ago. 2013.

RUNDLETT, S. E. et al. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14503–8, 10 dez. 1996.

SAILER, S. L. et al. Ewing's sarcoma: surgical resection as a prognostic factor. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 15, n. 1, p. 43–52, jul. 1988.

SAITO, D. et al. The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6088, p. 1578–81, 22 jun. 2012.

SAUSEN, M. et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 12–17, 2 dez. 2012.

SCHILLING, F. H. et al. Neuroblastoma screening at one year of age. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 14, p. 1047–53, 4 abr. 2002.

SCHLEIERMACHER, G. et al. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical**

**Oncology**, v. 21, n. 1, p. 85–91, 1 jan. 2003.

SCHLEIERMACHER, G.; JANOUEIX-LEROSEY, I.; DELATTRE, O. Recent insights into the biology of neuroblastoma. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 10, p. 2249–2261, 2014.

SCHOEFTNER, S. et al. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. **The EMBO journal**, v. 25, n. 13, p. 3110–22, 12 jul. 2006.

SCHONES, D. E.; ZHAO, K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 3, p. 179–91, mar. 2008.

SCHOR, N. F. Aiming at neuroblastoma and hitting other worthy targets. **Journal of child neurology**, v. 28, n. 6, p. 768–73, jun. 2013.

SCHREIBER, S. L. et al. Signaling network model of chromatin. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 771–8, 2002.

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. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 55, n. 1, p. 168–77, 1 jan. 2003.

SCHUETTENGRUBER, B.; CAVALLI, G. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. **Development**, v. 136, n. 21, p. 3531–3542, 2009.

SCHULTE, J. H. et al. MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. **Oncogene**, v. 32, n. 8, p. 1059–65, 2013.

SCHWAB, M. et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. **Nature**, v. 305, n. 5931, p. 245–8, 15 set. 1983.

SELVI, B. R. et al. Tuning acetylation levels with HAT activators: Therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 840–853, 2010.

SHAVER, S. et al. Origin of the polycomb repressive complex 2 and gene silencing by an E(z) homolog in the unicellular alga *Chlamydomonas*. **Epigenetics**, v. 5, n. 4, p. 301–12, 16 maio 2010.

SHEN, X. et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. **Molecular cell**, v. 32, n. 4, p. 491–502, 21 nov. 2008.

SHI, Y. et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941–53, 29 dez. 2004.

SHIN, K. et al. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 110–4, 7 abr. 2011.

SHING, D. C. et al. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. **Cancer research**, v. 63, n. 15, p. 4568–76, 1 ago. 2003.

SHOJAEI-BROSSEAU, T. et al. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. **Pediatric blood & cancer**, v. 42, n. 1, p. 99–105, jan. 2004.

SHUKLA, S.; MEERAN, S. M. Epigenetics of cancer stem cells: Pathways and therapeutics. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 12, p. 3494–3502, dez. 2014.

SILIGAN, C. et al. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. **Oncogene**, v. 24, n. 15, p. 2512–2524, 2005.

SILVA, A. O. et al. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 13743–13749, 31 out. 2016.

SIMBOECK, E. et al. A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 52, p. 41062–41073, 2010.

SIMON, J. A; KINGSTON, R. E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 10, p. 697–708, out. 2009.

SING, A. et al. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 885–97, 4 set. 2009.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 18 nov. 2004a.

SINGH, V. et al. DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 23, n. 47, p. 7761–71, 14 out. 2004b.

SMITH, R. et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. **Cancer cell**, v. 9, n. 5, p. 405–16, maio 2006.

SNEPPEN, O.; HANSEN, L. M. Presenting Symptoms and Treatment Delay in Osteosarcoma and Ewing's Sarcoma. **Acta Radiologica: Oncology**, v. 23, n. 2–3, p. 159–162, 1984.

SOLLAZZO, M. R. et al. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. **Tumori**, v. 85, n. 3, p. 167–73, 1999.

SPENGLER, B. A. et al. Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells. **Oncology research**, v. 9, n. 9, p. 467–76, 1997.

SRIVATSAN, E. S.; YING, K. L.; SEEGER, R. C. Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 7, n. 1, p. 32–7, maio 1993.



STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. International variations in the incidence of childhood renal tumours. **British journal of cancer**, v. 62, n. 6, p. 1026–30, dez. 1990.

STOJIC, L. et al. Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. **Epigenetics & chromatin**, v. 4, n. 1, p. 16, 2011.

STRAUSSMAN, R. et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. **Nature Struct. Mol. Biol.**, v. 16, n. 5, p. 564–571, 2009.

STRELKOV, I. S.; DAVIE, J. R. Ser-10 phosphorylation of histone H3 and immediate early gene expression in oncogene-transformed mouse fibroblasts. **Cancer research**, v. 62, n. 1, p. 75–8, 1 jan. 2002.

STROTHER, D. R. et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 15, p. 1842–8, 20 maio 2012.

SU, I.-H. et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. **Nature immunology**, v. 4, n. 2, p. 124–31, fev. 2003.

SUH, C.-H. et al. Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. **Ultrastructural pathology**, v. 26, n. 2, p. 67–76, 2002.

SUVÀ, M.-L. et al. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. **Cancer research**, v. 69, n. 24, p. 9211–8, 15 dez. 2009.

SUZUKI, T. et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. **Cancer research**, v. 49, n. 5, p. 1095–8, 1 mar. 1989.

SUZUKI, T. et al. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 5, p. 377–84, 3 mar. 1993.

TACCONELLI, A. et al. TrkA alternative splicing: A regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 347–360, 2004.

TAN, J. et al. Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. **Genes and Development**, v. 21, n. 9, p. 1050–1063, 2007.

TEICHER, B. A. et al. Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models. **Annals of Saudi medicine**, v. 31, n. 2, p. 174–82, 2011.

TEITELL, M. A. et al. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 79, n. 12, p. 1535–43, dez. 1999.

TESSAROLLO, L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 2, p. 125–37, jun. 1998.

THIAGALINGAM, S. et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 983, n. 1, p. 84–100, mar. 2003.

THIELE, C. J.; LI, Z.; MCKEE, A. E. On Trk - the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 5962–5967, 2009.

THOMPSON, P. M. et al. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. **Medical and pediatric oncology**, v. 36, n. 1, p. 28–31, jan. 2001.

TIRODE, F. et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. **Cancer discovery**, v. 4, n. 11, p. 1342–53, nov. 2014.

TJEERTES, J. V; MILLER, K. M.; JACKSON, S. P. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. **The EMBO journal**, v. 28, n. 13, p. 1878–89, 8 jul. 2009.

TOOMEY, E. C.; SCHIFFMAN, J. D.; LESSNICK, S. L. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. **Oncogene**, v. 29, n. 32, p. 4504–16, 12 ago. 2010.

TROCHET, D. et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 4, p. 761–4, abr. 2004.

TSUCHIDA, R. et al. Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side-population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling. **Oncogene**, v. 27, n. 28, p. 3923–34, 2008.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 726–736, 2008.

VALENT, P. et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 11, p. 767–775, 11 out. 2012.

VAN MAERKEN, T. et al. Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. **Cancer research**, v. 66, n. 19, p. 9646–55, 1 out. 2006.

VAN NOESEL, M. M.; VERSTEEG, R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic “danse macabre”. **Gene**, v. 325, n. 1–2, p. 1–15, 21 jan. 2004.

VARGAS, J. E. et al. Inhibition of HDAC increases the senescence induced by natural polyphenols in glioma cells. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 92, n. 4, p. 297–304, 2014.

VENTURA, S. et al. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF- $\kappa$ B signaling. **Oncogene**, n. October, p. 1–11, 2015.

VERDIN, E.; OTT, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 4, p. 258–64, abr. 2015.

VERMA, S. K. et al. Identification of potent, selective, cell-Active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 12, p. 1091–1096, 2012.

VERMEULEN, L. et al. Cancer stem cells--old concepts, new insights. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 6, p. 947–58, jun. 2008.

VIDAL, M.; GABER, R. F. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 12, p. 6317–27, dez. 1991.

VIDANES, G. M.; BONILLA, C. Y.; TOCZYSKI, D. P. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 973–6, 1 jul. 2005.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755–68, 2008.

VO, K. T. et al. Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 28, p. 3169–76, 1 out. 2014.

VON LEVETZOW, C. et al. Modeling initiation of ewing sarcoma in human neural crest cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–10, 2011.

WADDINGTON, C. H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1654–5, 13 jun. 1959.

WANG, C. et al. EZH2 mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. **Cancer Research**, v. 72, n. 1, p. 315–324, 2012.

WANG, L. et al. Undifferentiated Small Round Cell Sarcomas with Rare EWS Gene Fusions. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 4, p. 498–509, set. 2007.

WANG, L. et al. Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 16, p. 7317–22, 2010.

WANG, Y.-F. et al. Sodium butyrate induces apoptosis and cell cycle arrest in primary effusion lymphoma cells independently of oxidative stress and p21(CIP1/WAF1) induction. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 285, n. 1–2, p. 51–9, abr. 2006.

WARD, E. et al. Childhood and Adolescent Cancer Statistics , 2014. **Ca Cancer J Clin**, v. 64, n. 2, p. 83–103, 2014.

WEINREICH, M.; PALACIOS DEBEER, M. A.; FOX, C. A. The activities of eukaryotic replication origins in chromatin. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1677, n. 1–3, p. 142–157, 2004.

WEISS, V. H. et al. The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. **Nature structural biology**, v. 7, n. 12, p. 1165–71, dez. 2000.

WEISS, W. A. et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. **The EMBO journal**, v. 16, n. 11, p. 2985–95, 2 jun. 1997.

WHITCOMB, S. J. et al. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 10, p. 494–502, 2007.

WIDHE, B.; WIDHE, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 82, n. 5, p. 667–74, maio 2000.

WITT, O. et al. HDAC family: What are the cancer relevant targets? **Cancer Letters**, v. 277, n. 1, p. 8–21, 2009.

WOODS, W. G. et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. **Lancet (London, England)**, v. 348, n. 9043, p. 1682–7, 1996.

WYLIE, L. A. et al. Ascl1 phospho-status regulates neuronal differentiation in a Xenopus developmental model of neuroblastoma. **Disease models & mechanisms**, v. 8, n. 5, p. 429–41, maio 2015.

XIE, C. et al. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells by regulation of the MDM2–p53 signaling. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 4005–4013, 2016.

XU, B. et al. **Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia**. [s.l: s.n.]. v. 125

XU, G. et al. SAHA regulates histone acetylation, butyrylation, and protein expression in neuroblastoma. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 10, p. 4211–4219, 2014.

XU, J. et al. Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. **Molecular cell**, v. 57, n. 2, p. 304–16, 22 jan. 2015b.

XU, K. et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6113, p. 1465–9, 14 dez. 2012.

XU, W. S. et al. Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: A pathway for antitumor effects. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 7832–7839, 2005.

XU, W. S.; PARMIGIANI, R. B.; MARKS, P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5541–52, 13 ago. 2007.

YAMASHIRO, D. J. et al. Expression and function of trk-C in favourable human neuroblastomas. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 12, p. 2054–2057, 1997.

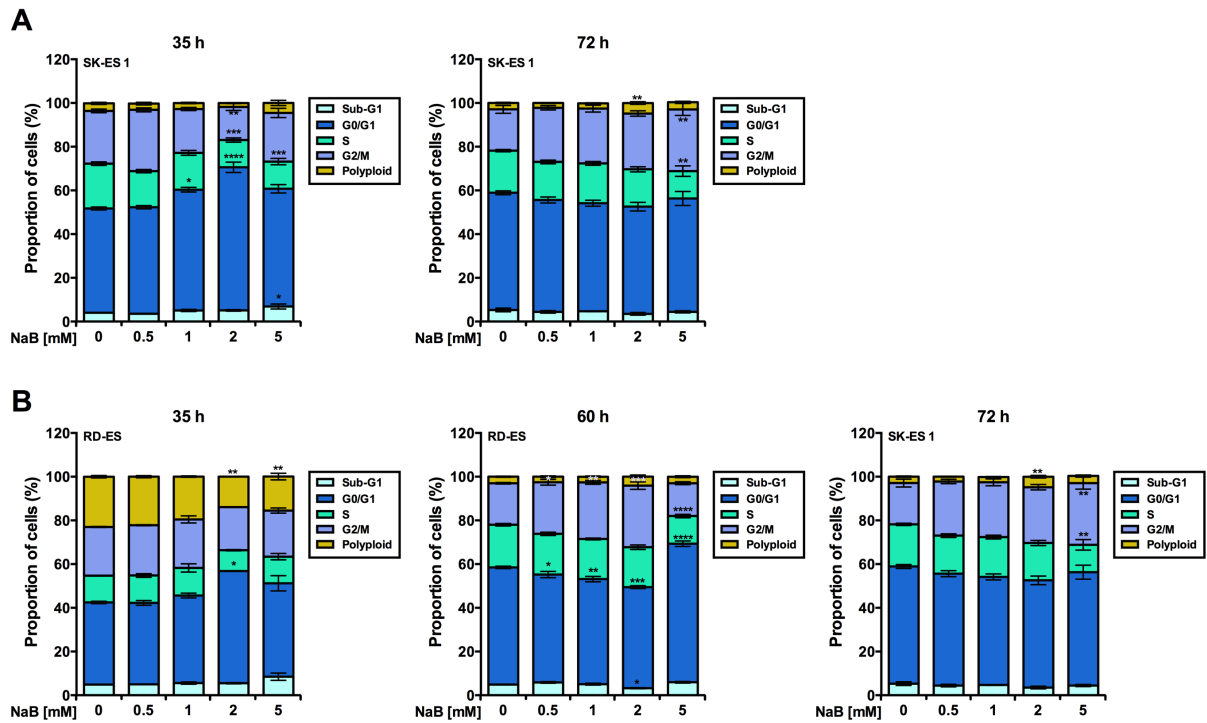
YANG, H. K. C. et al. Distribution of Doublecortin Expressing Cells Near the Lateral Ventricles in the Adult Mouse Brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 76, n. 3, p. 282–295, 2004.

- YANG, W. M. et al. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 12845–50, 1996.
- YANG, X.-J.; SETO, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5310–5318, 2007.
- YANG, X.-J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 206–18, mar. 2008.
- YIN, S. et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 7, p. 1444–1450, 2007.
- YOUNG, J. L. et al. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. **Cancer**, v. 58, n. 2 Suppl, p. 598–602, 15 jul. 1986.
- ZEE, B. M. et al. In vivo residue-specific histone methylation dynamics. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 5, p. 3341–50, 29 jan. 2010.
- ZHANG, J. et al. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. **Cancer research**, v. 64, n. 17, p. 6026–34, 1 set. 2004.
- ZHANG, L. et al. In Vivo Antitumor and Antimetastatic Activity of Sunitinib in Preclinical Neuroblastoma Mouse Model 1. **Neoplasia**, v. 11, n. 5, p. 426–435, 2009.
- ZHANG, N. et al. Molecular Heterogeneity of Ewing Sarcoma as Detected by Ion Torrent Sequencing. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. e0153546, 2016.
- ZWERNER, J. P. et al. The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. **Oncogene**, v. 27, p. 3282–3291, 2008.

# ANEXO I

## Dados suplementares

Nesta parte da tese são apresentados dados adicionais relativos a seção de manuscrito 3.1.



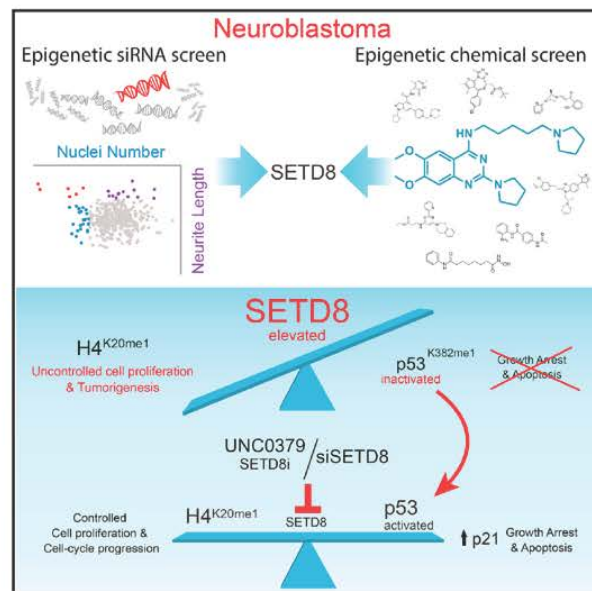
**Figure 19** Distribuição do ciclo celular das linhagens de sarcoma de Ewing em diferentes tempos de exposição a NaB. (A) Ciclo celular da linhagem SK-ES 1 exposta a NaB por 35 h (à esquerda) e 72 h (à direita). (B) Ciclo celular da linhagem RD-ES exposta a NaB por 35 h (à esquerda), 60 h (ao meio) e 72 h (à direita).



# Cancer Cell

## Epigenetic siRNA and Chemical Screens Identify SETD8 Inhibition as a Therapeutic Strategy for p53 Activation in High-Risk Neuroblastoma

### Graphical Abstract



### Authors

Veronica Veschi, Zhihui Liu,  
Ty C. Voss, ..., Javed Khan,  
Ettore Appella, Carol J. Thiele

### Correspondence

ct47a@nih.gov

### In Brief

Veschi et al. perform both genetic and chemical screening to identify histone methyltransferase SETD8 as a potential target in neuroblastoma (NB). Chemical or genetic inhibition of SETD8 in NB leads to increased p53 activity and reduced tumor cell growth, resulting in prolonged survival in mouse models of NB.

### Highlights

- We identified 53 epigenetic regulators that control NB growth and/or differentiation
- SETD8 inhibition activates the p53 pathway by decreasing p53<sup>K382me1</sup> levels
- UNC0379 is a small-molecule inhibitor of SETD8 that activates the p53 pathway
- SETD8 is validated as a druggable therapeutic target in NB

### Accession Numbers

GSE81626



Veschi et al., 2017, *Cancer Cell* 31, 50–63  
January 9, 2017 Published by Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.002>

CellPress

# Epigenetic siRNA and Chemical Screens Identify SETD8 Inhibition as a Therapeutic Strategy for p53 Activation in High-Risk Neuroblastoma

Veronica Veschi,<sup>1</sup> Zhihui Liu,<sup>1</sup> Ty C. Voss,<sup>2</sup> Laurent Ozbun,<sup>2</sup> Berkley Gryder,<sup>3</sup> Chunhua Yan,<sup>4</sup> Ying Hu,<sup>4</sup> Anqi Ma,<sup>5</sup> Jian Jin,<sup>5</sup> Sharlyn J. Mazur,<sup>7</sup> Norris Lam,<sup>1</sup> Barbara K. Souza,<sup>1</sup> Giuseppe Giannini,<sup>9</sup> Gordon L. Hager,<sup>8</sup> Cheryl H. Arrowsmith,<sup>6</sup> Javed Khan,<sup>3</sup> Ettore Appella,<sup>7</sup> and Carol J. Thiele<sup>1,10,\*</sup>

<sup>1</sup>Cell and Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, CRC, 1-3940, 10 Center Drive MSC-1105, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>2</sup>High-Throughput Imaging Facility

<sup>3</sup>Oncogenomics Section, Genetics Branch

Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>4</sup>Center for Biomedical Informatics and Information Technology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Rockville, MD 20850, USA

<sup>5</sup>Department of Structural and Chemical Biology, Oncological Sciences, Pharmacology and Systems Therapeutics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

<sup>6</sup>Structural Genomics Consortium, University of Toronto, Toronto, ON M5G 1L7, Canada

<sup>7</sup>Chemical Immunology Section, Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>8</sup>Laboratory of Receptor Biology and Gene Expression, Center for Cancer Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>9</sup>Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, Department of Molecular Medicine, University La Sapienza, 00161 Rome, Italy

<sup>10</sup>Lead Contact

\*Correspondence: ct47a@nih.gov

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.002>

## SUMMARY

Given the paucity of druggable mutations in high-risk neuroblastoma (NB), we undertook chromatin-focused small interfering RNA and chemical screens to uncover epigenetic regulators critical for the differentiation block in high-risk NB. High-content Opera imaging identified 53 genes whose loss of expression led to a decrease in NB cell proliferation and 16 also induced differentiation. From these, the secondary chemical screen identified SETD8, the H4<sup>K20me1</sup> methyltransferase, as a druggable NB target. Functional studies revealed that SETD8 ablation rescued the pro-apoptotic and cell-cycle arrest functions of p53 by decreasing p53<sup>K382me1</sup>, leading to activation of the p53 canonical pathway. In pre-clinical xenograft NB models, genetic or pharmacological (UNC0379) SETD8 inhibition conferred a significant survival advantage, providing evidence for SETD8 as a therapeutic target in NB.

## INTRODUCTION

Alterations in epigenetic machinery, including mutations or over-expression of chromatin remodelers and modifiers, as well as DNA hypermethylation, can disrupt normal development, resulting in pathologies, including cancer (Arrowsmith et al., 2012; Jones and Baylin, 2007). Neuroblastoma (NB) is a neural crest-derived tumor and, based on its histology, transcriptome, and

propensity to differentiate, is thought to arise from a failure of sympathoadrenal progenitors to differentiate (Schulte and Eggert, 2015). Genetic and epigenetic regulators have been implicated in the undifferentiated status of high-risk NB (HR-NB) tumors (Lawlor and Thiele, 2012).

NB accounts for 15% of all deaths in children due to cancer. Despite intense multimodality treatment, the current therapy for NB is still inadequate for 50% of HR-NB patients and has

### Significance

The functional significance of alterations in epigenetic enzymes is incompletely understood in NB. Here, we identify epigenetic regulators critical for NB proliferation and differentiation. Specifically, combined genetic and chemical screens reveal the protein lysine methyltransferase SETD8 as a crucial regulator of growth and differentiation in NB. The role of SETD8 has not been intensively studied in tumorigenesis. We demonstrate that inhibition of SETD8 activates the p53 pathway particularly in MYCN-WT NBs, which account for the majority of high-risk NBs (60%–70%), and we show that SETD8 ablation impairs tumor growth in pre-clinical xenograft NB models.

significant toxicities and morbidities (Maris, 2010). *MYCN* amplification is a powerful independent marker of adverse outcome in HR-NB (Bagatell et al., 2009; Canete et al., 2009). While *TP53* is rarely (<2%) mutated in primary HR-NB, its functional activity is attenuated in *MYCN*-amplified (*MYCN*-amp) NB by a variety of mechanisms (Petroni et al., 2012; Van Maerken et al., 2006; Van Maerken et al., 2009). However, the majority (60%–70%) of HR-NBs do not have *MYCN* amplification, and mechanisms that attenuate the activity of p53 in these tumors have not been intensively studied. So the challenge is to identify novel targeted therapies for HR-NB patients.

Aside from the anaplastic lymphoma kinase *ALK*, NexGen sequencing revealed few druggable, recurrent somatic mutations in NBs (Pugh et al., 2013). In older HR-NB patients, studies identified mutations in the chromatin remodelers *ATRX* (22%) and *ARID1A/ARID1B* (11%) (Alexandrov et al., 2013; Cheung et al., 2012; Molenaar et al., 2012; Pugh et al., 2013; Sausen et al., 2013), which are not directly druggable but may exhibit synthetic lethality in drug combinations (Bitler et al., 2015; Wilson et al., 2010). Studies showing overexpression of BMI-1 and KDM1A (LSD1), and our work showing dysregulation of EZH2 and sensitivity to EZH2 inhibitors, indicate a linkage between aberrations in epigenetic regulators and NB (Cui et al., 2006; Lawlor and Thiele, 2012; Schulte et al., 2009; Wang et al., 2012). This led us to hypothesize that epigenetic dysregulation in sympathoadrenal progenitors contributes to the initiation and progression of NB.

The goal of this study is to survey the epigenetic landscape of NB in order to identify those regulators that block NB terminal differentiation. By characterizing critical epigenetic pathways regulating cell proliferation and differentiation that are altered in NB tumor cells, we may identify therapeutically relevant targets.

## RESULTS

### siRNA Screen of Chromatin Modifiers Identifies Regulators of NB Cell Proliferation and Differentiation

To identify epigenetic regulators of NB cell proliferation and differentiation, we performed a cell-based high-throughput small interfering RNA (siRNA) screen of almost 400 genes (a pool of four siRNAs per gene) encoding modulators of chromatin structure and function (including ~55% of the known epigenetic enzymes, writers, and erasers) in two NB cell lines, SY5Y (*MYCN*-wild-type [WT]) and SK-N-BE2C (*MYCN*-amp). Nuclei number (NN) and neurite length (NL) were used as measures of cell proliferation and morphologic differentiation, respectively (Figure 1A and Table S1). The primary screen identified 53 genes whose knock down significantly and substantially reduced cell proliferation in one or both cell lines (Table S2). Of these, 16 genes also induced differentiation (increased NL) (Figure 1B, red dots, and Table S2). The reproducibility of replicates was assessed by Pearson correlation and permutation tests (Figures S1A–S1D and Supplemental Experimental Procedures). Four of the top candidates in the screen, *CENPE* (Balamuth et al., 2010), *BRD4* (Puissant et al., 2013), *CHAF1A* (Barbieri et al., 2014), and *KDM4B* (Yang et al., 2015), were already characterized as required for NB cell survival. We performed a validation screen using individual siRNAs against select candidate genes

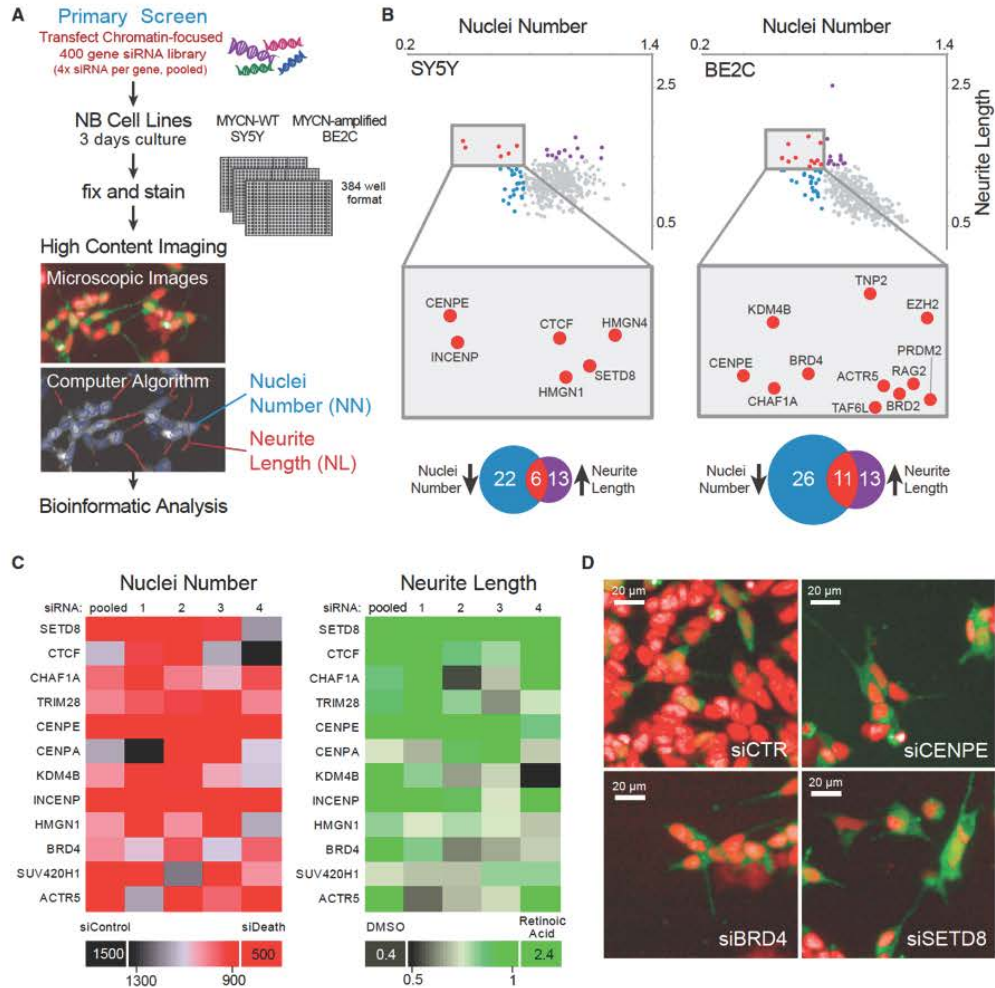
in SY5Y and BE2C (Figure 1C, for selection and validation criteria, see Supplemental Experimental Procedures). For all selected genes, silencing led to a statistically significant reduction in NN. Silencing of *SETD8*, *CTCF*, *CENPE*, *INCENP*, and *ACTR5* also significantly increased NL (Table S3). Representative images showing decreased cell number and increased neurite formation after silencing of selected hits are shown (Figure 1D). Thus, we identified 16 genes whose silencing led to significant reduction in NB cell proliferation and induction of morphologic differentiation, nine of which were validated for NN and five for NL.

### A Chemical Screen Confirms Inhibition of SETD8 Activity as a Vulnerability in NB

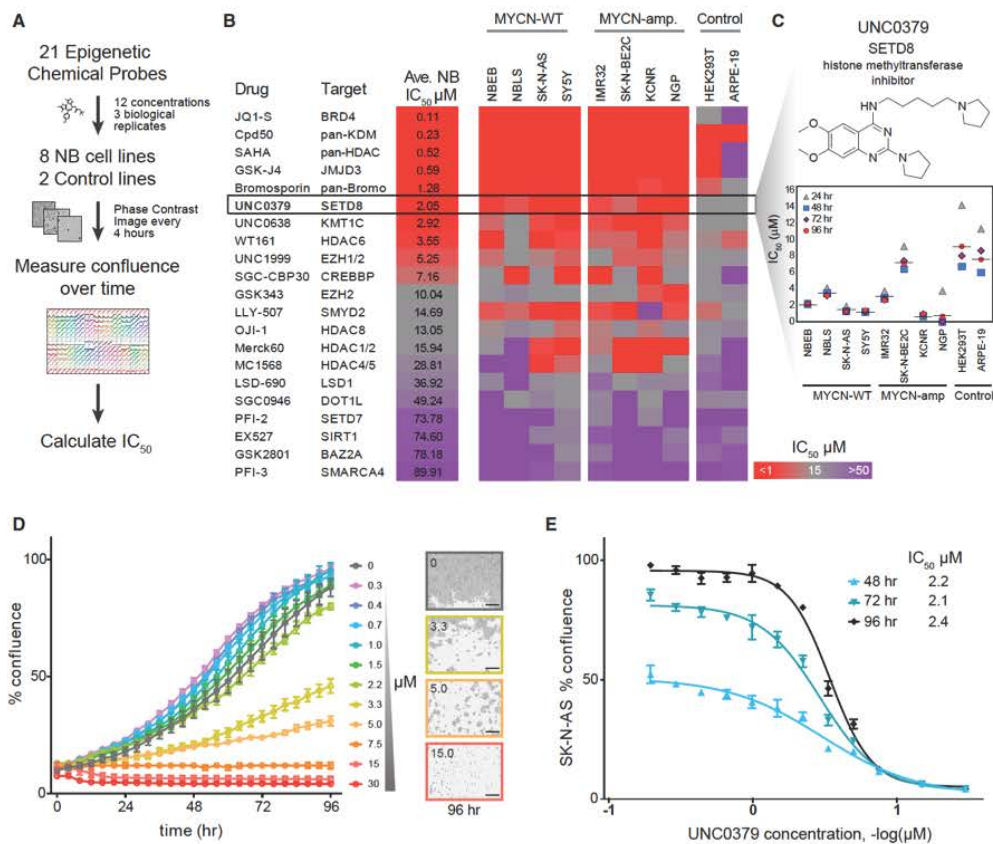
We next performed a chemical screen using 21 epigenetic chemical probes, provided by the Structural Genomics Consortium, and targeting 90% of proteins with enzymatic activity that were targeted by the siRNA library. This chemical library includes pharmaceutical tool compounds in the drug-development pipeline. Each compound was evaluated in eight NB (four *MYCN*-WT and four *MYCN*-amp) and two immortal but non-transformed (HEK293T and ARPE-19) cell lines using 12 concentrations (0.1–30  $\mu$ M). Cell viability was assessed over 7 days (Figures 2A and 2B). JQ1-S, a BRD4 inhibitor (Puissant et al., 2013), was the most potent and showed the expected difference in sensitivity between *MYCN*-WT and *MYCN*-amp cells (Table S4). Pan-lysine demethylase, pan-histone acetyltransferase, and pan-bromodomain inhibitors also showed high potency. The targets of JQ1 (*BRD4*, *BRD2*) and Cpd50 (*KDM4B*) were among the genes whose siRNAs inhibited cell growth and induced differentiation in the genetic screen (Figure 1B). Interestingly, a selective, substrate-competitive inhibitor of *SETD8*, *UNC0379* (Ma et al., 2014a), was one of the most active compounds, exhibiting a relatively low average half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) (2  $\mu$ M) (Figure 2B) and a highly significant *p* value for the in vitro therapeutic index (VTI) (Figure S2 and Table S4) across the 8 NB cell lines compared with control cell lines. Median  $IC_{50}$  values for the NB cell lines following *UNC0379* treatment at 24–96 hr are depicted in Figure 2C, with 96-hr  $IC_{50}$  values ranging from 0.64 to 7  $\mu$ M (95% confidence interval 0.98, 3.82). A representative experiment shows the effects of *UNC0379* on the NB cell growth (Figures 2D and 2E). Together, the genetic and chemical-based screens suggest that *SETD8* regulates NB cell growth and differentiation.

### SETD8 Is Overexpressed in NB Cells and High SETD8 Expression Correlates with Poor Outcome in MYCN-WT HR-NB Patients

*SETD8* is a histone methyltransferase that specifically catalyzes monomethylation of K20 on histone H4 ( $H4^{K20me1}$ ). Levels of *SETD8* and its target  $H4^{K20me1}$  are increased during mitosis and required for cell proliferation in human cell models (Wu and Rice, 2011; Wu et al., 2010). To assess the expression of *SETD8* in NB, we cultured NB cells and harvested them during exponential growth. We found elevated levels of both *SETD8* (3.6-fold) and its target  $H4^{K20me1}$  (2.6-fold) in NB cells compared with non-transformed normal cell lines. *SETD8* levels were higher when normalized to the M-phase fraction (Figure 3A). This is consistent with previous studies showing overexpression



**Figure 1. Epigenetic-Focused High-throughput RNAi Screen of NB Cells Reveals 16 Vulnerability Genes**  
 (A) A flow chart of the high-throughput imaging assay identified key steps. A library of siRNAs against ~400 chromatin-focused genes was reverse transfected into NB cell lines. After 3 days of culture, the cells were fixed and stained. A high-throughput imaging assay was used to determine nuclei number (NN) and neurite length (NL). NB cells driven to differentiate by retinoic acid treatment (upper panel) were visualized using stably expressed GFP and a nuclear stain (Hoechst 33342). Nuclei (blue outline) and neurite outgrowths (red line segment) were detected by an automated image analysis algorithm (lower panel).  
 (B) Scatterplots showing statistically significant genes in SY5Y (left panel) and SK-N-BE2C (right panel). siRNAs that met both parameters: decrease of NN and increase of NL (red dots). Venn diagrams showing statistically significant genes for which siRNAs decreased NN (blue) or increased NL (purple) or both (red).  
 (C) Heatmaps showing the results of the secondary screen performed with a siRNAs library with four deconvoluted sequences and smartpool siRNAs (pooled): 12 statistically significant genes were analyzed in SY5Y on the basis of NN (red heatmap) and NL (green heatmap). The positive controls used were an siRNA that induced cell death (NN) and retinoic acid (NL).  
 (D) Stably expressed GFP and Hoechst 33342 (pseudocolored as red) were used to label SY5Y cells. Representative images show effects on cell number and morphology after silencing of CENPE, SETD8, and BRD4 compared with non-targeting siRNA.  
 See also Tables S1, S2, and S3 and Figure S1.



**Figure 2. Chemical Screen of 21 Epigenetic Probes Identifies SETD8 Inhibitor as One of the Top Compounds with the Lowest  $IC_{50}$**   
(A) Flow chart of the chemical screen: 21 epigenetic probes were tested in the indicated cell lines and images were recorded by an IncuCyte Zoom System in order to calculate  $IC_{50}$  values.

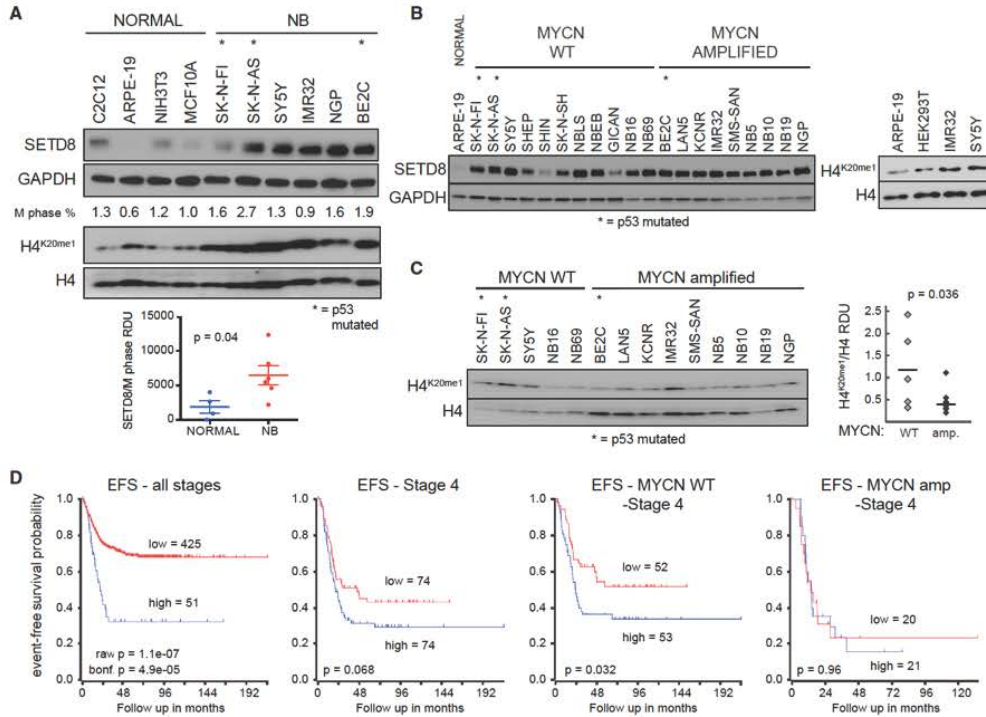
(B) Heatmap showing the average  $IC_{50}$  values of the indicated epigenetic chemical probes at 96 hr in four MYCN-WT and four MYCN-amp NB cell lines compared with two control cell lines (ARPE-19 and 293T). The color key represents the average  $IC_{50}$  values ( $\mu$ M): red indicates low  $IC_{50}$ , whereas purple represents high  $IC_{50}$ . Cell confluence was recorded by an IncuCyte Zoom System. The average  $IC_{50}$  values were calculated based on the cell confluence values of three biological replicates across eight NB cell lines at 96 hr using GraphPad Prism. For in vitro therapeutic index (IVI) and p values, see Figure S2 and Table S4.

(C) In vitro UNC0379 treatment of NB cell lines and control cell lines ARPE-19 and 293T (average of three biological replicates).

(D and E) A representative experiment showing effects of in vitro treatment of SK-N-AS cells with UNC0379 at indicated times (D) and concentrations (E). Bars show the average of three replicates  $\pm$  SD. In (D) the images were captured by an IncuCyte Zoom. Scale bars, 300  $\mu$ m. See also Table S4 and Figure S2.

of SETD8 in various types of cancer (Takawa et al., 2012). Although the levels of SETD8 expression were not significantly different between MYCN-WT and MYCN-amp NB cells (Figures 3B, S3A, and S3B), the levels of H4<sup>K20me1</sup> were higher in MYCN-WT compared with MYCN-amp NB cell lines in vitro (Figure 3C). This may be due to higher levels of PHF8, the demethylase for H4<sup>K20me1</sup>, in MYCN-amp HR-NBs (database: R2 <http://r2.amc.nl/> Kocak stage 4 tumors,  $p = 1.3 \times 10^{-4}$ ). In primary NB tumors (database: R2 Kocak NB;  $n = 476$  tumors), elevated levels

of SETD8 mRNA are significantly correlated with poor prognosis (Figure 3D; Bonferroni  $p = 4.9 \times 10^{-5}$ ). In addition, stage 4 HR-NB patients whose tumors had high levels of SETD8 tend to do worse, although the correlation does not reach statistical significance ( $p = 0.068$ ) (Figure 3D, middle left panel). However, elevated levels of SETD8 are associated with worse prognoses in stage 4 MYCN-WT tumors ( $p = 0.032$ ) (Figure 3D, middle right panel), but not MYCN-amp tumors ( $p = 0.96$ ) (Figure 3D, right panel). The prognostic significance of SETD8 in MYCN-WT



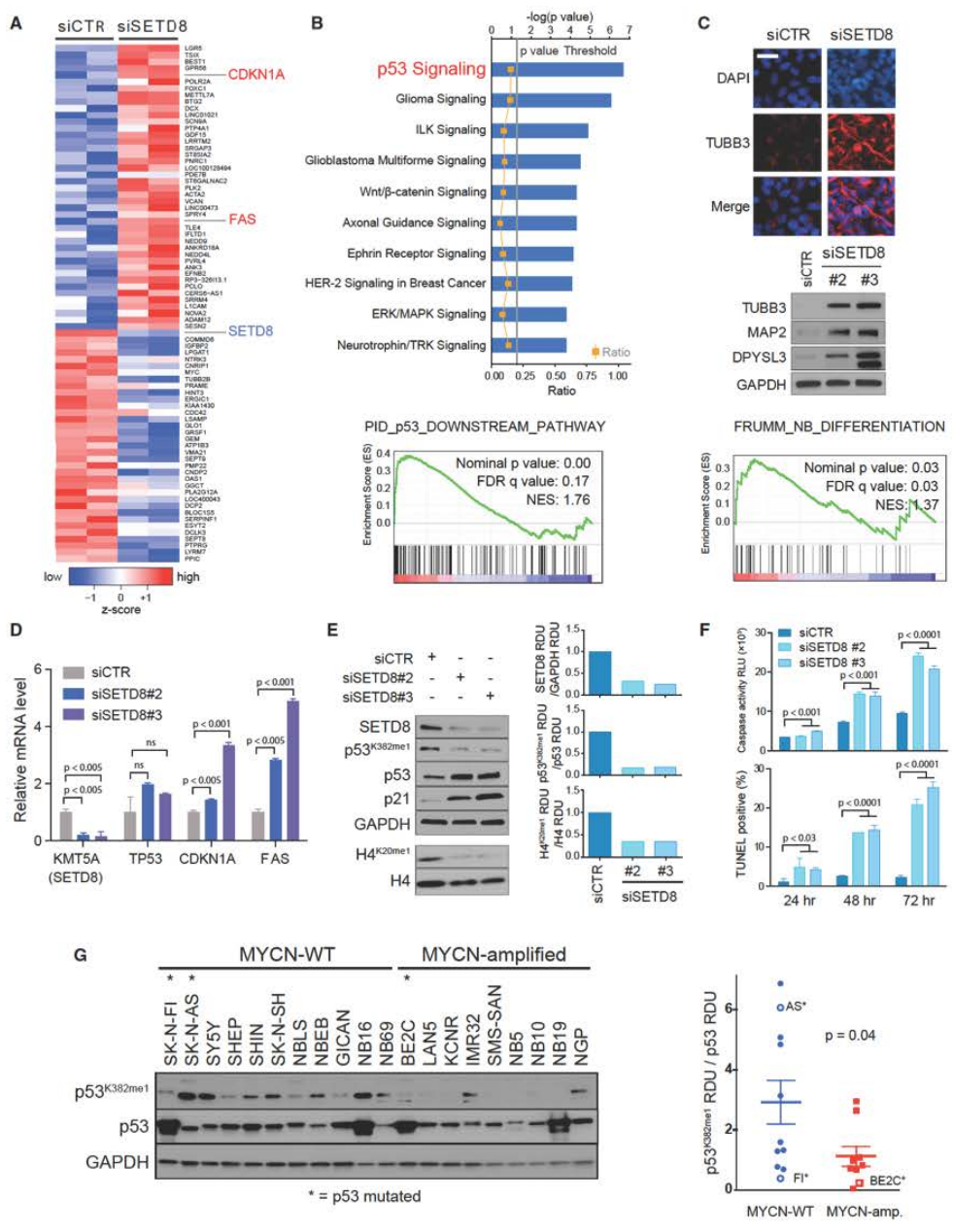
**Figure 3. SETD8 Is Overexpressed in NB Cells and High SETD8 Expression Is Associated with Worse Prognosis in MYCN-WT Tumors**  
 (A) Immunoblots show SETD8 and H4<sup>K20me1</sup> levels in NB cells compared with control cells. SETD8 protein levels normalized to M phase % in NB compared with normal cells were calculated as relative densitometric units (RDU) ( $p = 0.04$ ). Bars show the mean  $\pm$  SEM.  
 (B) Immunoblot showing SETD8 protein levels in MYCN-WT and MYCN-amp NB cells.  
 (C) Western blot (left) and densitometric analysis (right) of H4<sup>K20me1</sup> protein levels normalized to H4 protein levels in 14 NB cell lines were calculated as RDU ( $p = 0.036$ ) using ImageJ software.  
 (D) Kaplan-Meier plots based on the expression of SETD8 in tumors from NB patients at all stages (left panel) or in tumors from stage 4 (middle left panel) NB patients (R2 database: Kocak raw,  $p = 1.1 \times 10^{-7}$ , Bonferroni,  $p = 4.9 \times 10^{-5}$ ;  $p = 0.068$ ). Kaplan-Meier plots based on the expression of SETD8 in MYCN-WT (middle right panel) or MYCN-amp (right panel) tumors from stage 4 NB patients (R2 database: Kocak,  $n = 105$ , MYCN-WT, stage 4 NB tumors,  $p = 0.032$ ;  $n = 41$ , MYCN-amp, stage 4 NB tumors,  $p = 0.96$ ).  
 See also Figure S3.

primary tumors was replicated in two additional R2 databases: SEQC-498 and Seeger (Figures S3C–S3E). Focal amplifications of Chr12q24 occur in a region that encompasses *KMT5A* (SETD8) in almost 22% of MYCN-WT and 6% of MYCN-amp HR-NB tumors (Schnepp et al., 2015; Wolf et al., 2010) and may contribute to the association of elevated SETD8 mRNA levels with poor outcome in NBs.

**SETD8 Silencing Rescues p53 Function by Decreasing p53<sup>K382me1</sup> Levels**

Since SETD8 activity has been implicated in multiple biologic processes, including control of cell division and modulation of transcription, RNA-sequencing (RNA-seq) transcriptome analyses after SETD8 silencing were performed in order to gain

insights into potential mechanisms contributing to the SETD8-mediated growth inhibition and differentiation in NB cells. Preliminary studies established conditions for effective silencing of SETD8 while minimizing effects on cell viability (Figures S4A–S4G and Supplemental Experimental Procedures). The top differentially up- and downregulated genes, ranked by statistical significance based on edgeR software analysis and a false discovery rate (FDR)  $< 0.001$ , are depicted as a clustered heatmap in Figure 4A (see also Table S5). Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com) of the differentially expressed genes identified p53 signaling and neuronal differentiation-associated pathways among the most significantly upregulated (Figure 4B). Gene set enrichment analysis (GSEA) showed enrichment in several p53 pathways (Figure 4B and Table S6). SETD8 silencing



(legend on next page)

resulted in increased expression of biochemical markers of neural differentiation (TUBB3, MAP2, and DPYSL3) (Choi et al., 2005), and GSEA showed an enrichment in the Frumm NB differentiation signature (Frumm et al., 2013) (Figure 4C and Table S7), supporting the morphological differentiation noted in the siRNA screen (Figures 1B–1D). The alteration in the expression of selected genes following silencing of SETD8 was confirmed (Figure 4D). These data suggest that SETD8 ablation leads to increased differentiation and activation of the p53 canonical pathway.

In tumor and normal cell lines, SETD8 attenuates the pro-apoptotic and cell-cycle arrest functions of p53 through methylation of lysine 382 (p53<sup>K382me1</sup>) (Shi et al., 2007). To test whether the elevated levels of SETD8 in NB may inhibit the activity of p53 through increased p53<sup>K382me1</sup> levels, we evaluated p53 expression and activity in SETD8-silenced SY5Y cells. Decreased expression of SETD8 was associated with reduced H4<sup>K20me1</sup> and p53<sup>K382me1</sup> levels, and increased p53 and p21 protein levels (Figures 4E, S4A, and S4D). Depletion of SETD8 led to increased apoptosis (Figure 4F).

Analysis of p53 methylation levels across a panel of NB cell lines showed higher p53<sup>K382me1</sup> levels in MYCN-WT compared with MYCN-amp NB cells (Figure 4G). Among the p53-mutated NB cell lines, SK-N-BE2C and SK-N-FI were less sensitive to the SETD8 inhibitor (UNC0379) and showed relatively low p53<sup>K382me1</sup> levels compared with SK-N-AS, which was sensitive to UNC0379 (Figure 4G). These observations demonstrate that SETD8 silencing decreased p53<sup>K382me1</sup> levels and rescued the pro-apoptotic and growth-arrest functions of p53 through activation of the p53 canonical pathway.

#### Comparison of Pharmacologic and Genetic Inhibition of SETD8 in MYCN-WT NB

To determine the molecular mechanisms of NB cell growth inhibition by a small-molecule SETD8 inhibitor, we treated SY5Y cells with UNC0379 and examined effects on target levels, cell cycle, and cell growth for up to 48 hr (Figures S5A–S5C and Supplemental Experimental Procedures). UNC0379 is a substrate-competitive inhibitor selective for SETD8 (Ma et al., 2014a) compared to five other methyltransferases in SY5Y

cells (Figure S5D). Analysis of protein lysates harvested after 12 hr indicated a dose-dependent decrease in the SETD8 targets H4<sup>K20me1</sup> and p53<sup>K382me1</sup> (Figure 5A). The decrease in p53<sup>K382me1</sup> levels was accompanied by an increase in p53 levels and induction of p21 (Figures 5A and S5A). Activation of the p53 pathway was accompanied by a dose-dependent increase in apoptotic cells (Figures 5B and S5E). UNC0379-induced cell death was blocked by pre-incubation with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, indicating a caspase-dependent mode of cell death (Figure 5B). UNC0379 treatment led to increased expression of neural differentiation markers and increased NL (Figure 5C). These functional studies suggest that the pharmacologic inhibition of SETD8 led to a similar decrease in p53<sup>K382me1</sup> levels, activation of the p53 pathway, and increased differentiation, as had been detected after genetic silencing of SETD8.

Transcriptional changes in SY5Y cells treated with 4  $\mu$ M UNC0379 for 12 hr were investigated using RNA-seq as both histone and non-histone targets were inhibited with minimal cell death. The top 50 differentially up- and downregulated genes are depicted as a clustered heatmap (Figure 5D and Table S5). At least 10% of the upregulated genes were involved in the p53 pathway, including *CDKN1A* (p21) as the most upregulated p53 target gene (Figure 5D, red marked genes). IPA of the RNA-seq data revealed that, among the top ten pathways, p53 signaling was the most significantly upregulated (Figures 5E and S5F). Interestingly, cholesterol biosynthetic and mevalonate pathways were the most differentially regulated (Figures 5E and S5F). GSEA showed enrichment in several p53 pathways (Figures 5F and S5G, Table S6) after SETD8 pharmacologic inhibition. qRT-PCR analysis confirmed upregulation of several of the identified p53 target genes (Figure 5G).

Activation of the p53 pathway was common to both the genetic and pharmacologic inhibition of SETD8: approximately half of the differentially expressed p53 target genes identified following SETD8 silencing overlapped with those affected by UNC0379 treatment (Figure 5H). Interestingly, the eight p53 target genes differentially expressed only after genetic silencing of SETD8 included oncosuppressors and oncogenes such as *BRCA1*, *E2F1*, and *JUN*, suggesting that UNC0379 treatment only partially recapitulates the effects of SETD8-specific genetic

#### Figure 4. Genetic Inhibition of SETD8 Leads to Activation of the p53 Canonical Pathway by Decreased p53<sup>K382me1</sup> Levels

(A) Heatmap showing the top up- and downregulated genes ranked by statistical significance following 36 hr of SETD8 silencing in SY5Y cells. Data are presented as normalized expression values of two biological replicates based on edgeR software analysis and FDR <0.001. The color key represents the normalized expression values: blue (low) to red (high).

(B) The top ten differentially expressed canonical pathways after SETD8 silencing in SY5Y cells defined by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) based on edgeR software analysis and FDR <0.001 (upper panel). Gene set enrichment analysis (GSEA) of the p53 downstream pathway (lower panel, nominal  $p = 0.00$ , FDR = 0.17, normalized enrichment score [NES] = 1.76) after SETD8 silencing.

(C) Immunofluorescence analysis showing the expression of TUBB3 (red) after SETD8 silencing for 72 hr in SY5Y cells counterstained with DAPI (blue). Scale bars, 100  $\mu$ m (upper panel). Immunoblot of proteins from SY5Y cells 72 hr after transfection with control siRNA and SETD8 siRNAs and blotted with antibodies detecting TUBB3, MAP2, and DPYSL3 proteins (middle panel). GSEA of the Frumm NB differentiation signature (lower panel, nominal  $p = 0.03$ , FDR = 0.03, NES = 1.37) after SETD8 silencing.

(D) qRT-PCR analysis showing relative mRNA levels of the indicated genes after SETD8 silencing for 36 hr. Bars show the mean  $\pm$  SEM of three replicates. ns, not significant.

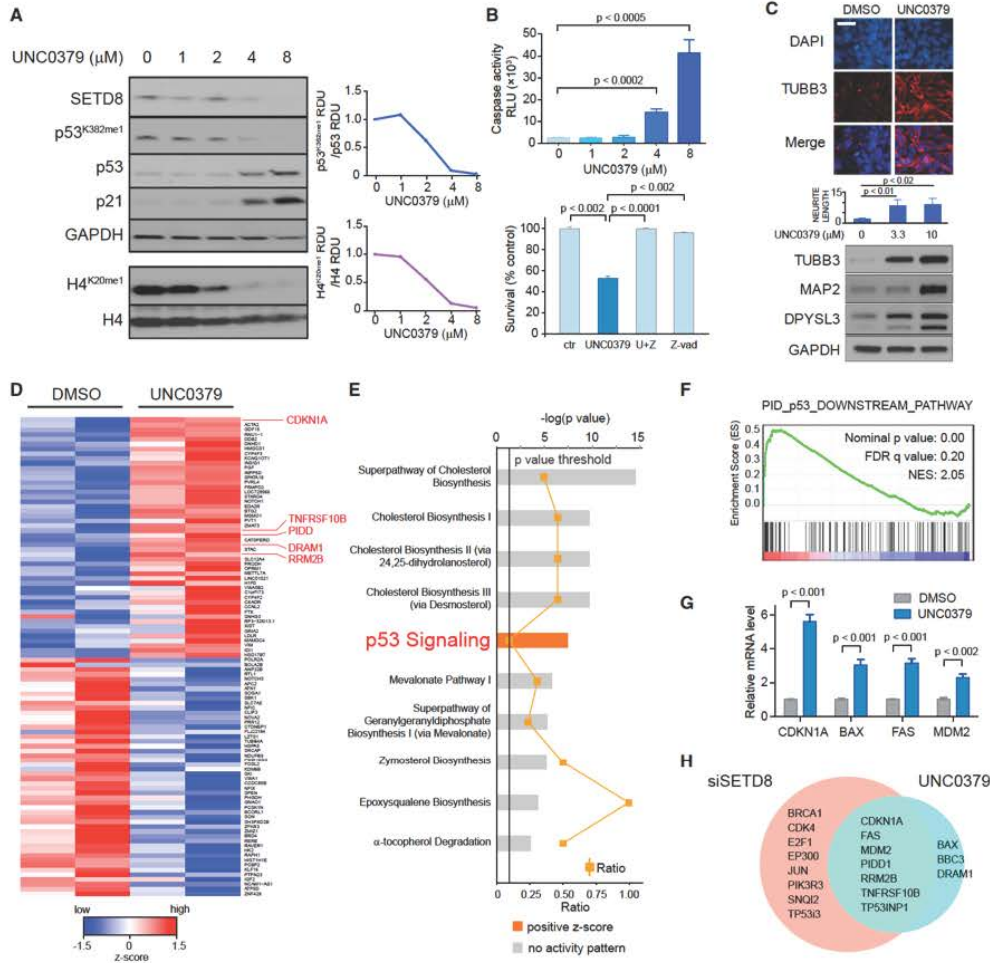
(E) Immunoblot analysis of SY5Y (MYCN-WT) cells upon treatment with either of two different siRNAs targeting SETD8 for 72 hr. Densitometric analysis of SETD8 protein levels normalized to GAPDH (upper right panel), of p53<sup>K382me1</sup> protein levels normalized to p53 (middle right panel) and of H4<sup>K20me1</sup> protein levels normalized to H4 (lower right panel) after SETD8 silencing calculated as RDU using ImageJ software.

(F) Caspase-3/7 activity and number of TUNEL-positive cells upon SETD8 silencing in SY5Y cells. Bars show the average of three replicates  $\pm$  SD.

(G) Immunoblot (left) and densitometric analysis (right) of p53<sup>K382me1</sup> protein levels normalized to p53 protein levels in 20 NB cell lines were calculated as RDU ( $p = 0.04$ ) using ImageJ software. Bars show the mean  $\pm$  SEM.

See also Tables S5, S6, and S7 and Figure S4.





**Figure 5. SETD8 Pharmacological Inhibition Reduces Cell Growth and Activates p53 Pro-apoptotic and Growth-Arrest Functions in SY5Y Cells**

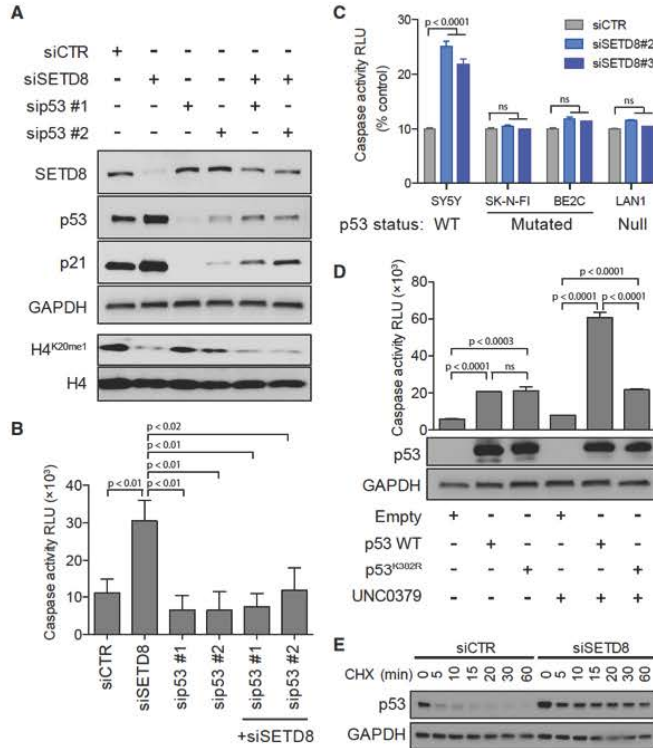
(A) Western blot of SY5Y (MYCN-WT) cells treated with UNC0379 at the indicated concentrations (left panel). Densitometric analysis of p53<sup>K382me1</sup> levels normalized to p53 protein levels (upper right) and of H4<sup>K20me1</sup> levels normalized to H4 protein levels (lower right) after treatment with the SETD8 inhibitor, UNC0379, for 12 hr calculated as RDU using ImageJ software.

(B) Caspase-3/7 activity upon SETD8 pharmacological inhibition for 12 hr in SY5Y cells. Bars show the mean  $\pm$  SD of three replicates (upper graph). The effects of caspase inhibitor Z-VAD-FMK on UNC0379-treated SY5Y cells (lower graph). SY5Y cells were pretreated with 10  $\mu\text{M}$  Z-VAD for 3 hr, followed by treatment with 10  $\mu\text{M}$  UNC0379 for 48 hr, or treated with UNC0379 or Z-VAD alone for 48 hr. An MTS assay was used to detect cell survival. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments ( $p < 0.001$ ).

(C) Immunofluorescence analysis showing the expression of TUBB3 (red) after treatment with 4  $\mu\text{M}$  UNC0379 for 72 hr in SY5Y cells. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars, 100  $\mu\text{m}$  (upper panel). NL in SY5Y treated with 3.3 and 10  $\mu\text{M}$  UNC0379 for 72 hr, measured by the Opera microscope. Bars represent the mean  $\pm$  SD of three replicates (middle panel). Immunoblot of proteins from SY5Y cells treated with 3.3 and 10  $\mu\text{M}$  UNC0379 for 72 hr and immunoblotted with antibodies to TUBB3, MAP2, and DPYSL3 (lower panel).

(D) Heatmap of the top 50 up- and downregulated genes in SY5Y cells ranked by statistical significance following 12 hr of treatment with 4  $\mu\text{M}$  (IC<sub>50</sub>) UNC0379. Data are presented as normalized expression values of two biological replicates based on edgeR software analysis and FDR  $< 0.001$ . The color key represents the normalized expression values: blue (high) to red (low).

(legend continued on next page)



**Figure 6. SETD8 Inhibition-Mediated Cell Death Is p53 Dependent**

(A) Immunoblot analysis showing p53 and/or SETD8 protein levels upon treatment with two different siRNAs targeting p53 alone or in combination with siSETD8 #3 for 48 hr in SY5Y cells.

(B) Caspase-3/7 activity calculated as RLU (relative luminescence units) upon treatment with two different siRNAs targeting p53 alone or in combination with siSETD8 #3 for 72 hr in SY5Y cells. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments ( $p < 0.001$ ).

(C) Caspase-3/7 activity calculated as RLU after SETD8 knock down for 72 hr in two p53 mutated (SK-N-FI and BE2C) and in one p53 null (LAN1) NB cells compared with p53 WT SY5Y. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments ( $p < 0.001$ ). ns, not significant.

(D) Caspase-3/7 activity calculated as RLU with overexpression of p53 WT or p53<sup>K382R</sup> and treatment with UNC0379 8  $\mu$ M for 24 hr in LAN1, p53 null NB cells. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments ( $p < 0.001$ ) (upper panel). Immunoblot analysis showing p53 levels under indicated conditions (lower panel). ns, not significant.

(E) Immunoblot analysis for p53 with siCTR or siSETD8 in SY5Y cells. Cells were collected after treatment with 50  $\mu$ g/mL CHX at the indicated time. See also Figure S6.

ablation (Figure 5H). These observations indicate that either genetic or pharmacological inhibition of SETD8 leads to activation of p53 canonical transcriptional pathways.

#### SETD8 Inhibition Induces p53-Dependent Cell Death in NB Cells

To evaluate whether SETD8 inhibition-mediated cell death was p53 dependent, we silenced SETD8 alone or in combination with different siRNAs targeting p53 (Figures 6A and S6A). The silencing of SETD8 induced increases in caspase-dependent cell death that were blocked upon p53 inhibition (Figures 6B and S6A). SETD8 silencing led to increased caspase-3/7 activity in p53 WT NB cells (SY5Y), while the levels were relatively unchanged in p53 mutant (SK-N-FI and BE2C) or p53 null (LAN1) NB cell lines (Figures 6C and S6B). In addition, the p53 mutant and null NB cell lines were less sensitive to UNC0379 compared

and Supplemental Experimental Procedures). These results indicate that SETD8 inhibition leads to increases in p53 stability and that SETD8-induced cell death is p53 dependent.

#### Genetic Inhibition of SETD8 and Ex Vivo Treatment with SETD8 Inhibitor Impairs Tumor Growth and Significantly Prolongs Murine Survival in In Vivo Models of NB

We evaluated the effects of SETD8 inhibition on in vivo tumor growth. Bioavailability and animal toxicology precluded treatment of mice with the SETD8 inhibitor UNC0379 (Ma et al., 2014a). We therefore performed an ex vivo tumorigenicity assay by exposing NB cells to 2  $\mu$ M UNC0379 or control solvent for 24 hr in vitro, then subcutaneously implanting treated NB cells into nude mice and monitoring tumor growth. Pharmacologic inhibition of SETD8 showed decreased NB tumor growth in vivo and significantly reduced SY5Y ( $p \leq 0.01$ ) and NGP

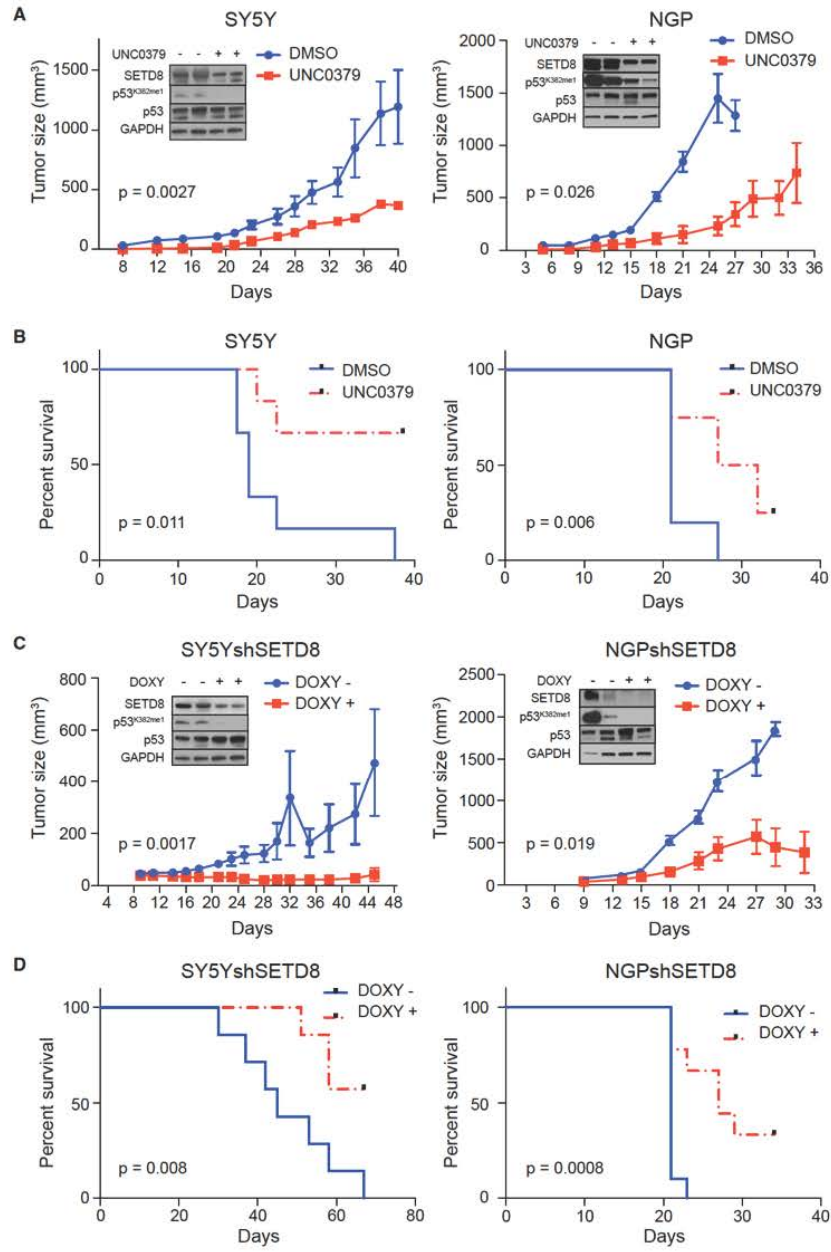
(E) The top ten differentially expressed canonical pathways after SETD8 pharmacologic inhibition defined by IPA based on edgeR software analysis and FDR  $< 0.001$ . Pathways related to p53 signaling are among the top differentially expressed pathways.

(F) GSEA of the p53 downstream pathway (nominal  $p = 0.00$ , FDR = 0.20, NES = 2.05) after UNC0379 treatment.

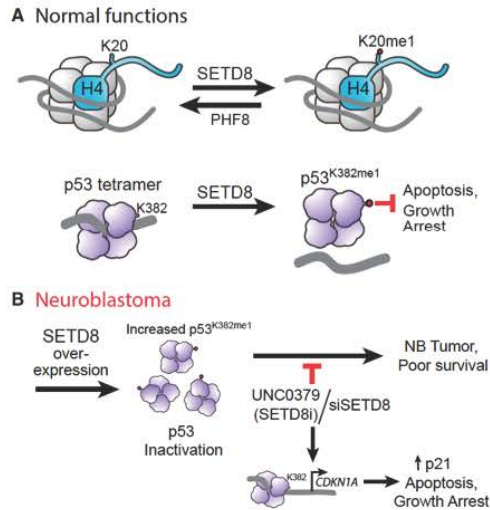
(G) qRT-PCR analysis showing relative mRNA levels of the indicated genes after SETD8 pharmacologic inhibition. Bars show mean  $\pm$  SEM of three replicates.

(H) Venn diagram showing numbers of differentially expressed p53 target genes from genetic and pharmacologic inhibition of SETD8.

See also Tables S5 and S6 and Figure S5.



(legend on next page)



**Figure 8. Model of SETD8 Normal Function and Role in NB**  
 (A) Model showing H4<sup>K20me1</sup> and p53<sup>K382me1</sup> as major targets of SETD8. Monomethylation of p53 K382 by SETD8 attenuates p53 pro-apoptotic and growth-arrest function.  
 (B) In NB, SETD8 may be overexpressed, resulting in increased levels of p53<sup>K382me1</sup> and inactivation of p53. Genetic or pharmacologic inhibition of SETD8 rescues p53 function by decreasing p53<sup>K382me1</sup> and activating p53 canonical pathways.

( $p = 0.026$ ) tumor growth (Figure 7A). Assessment of tumor lysates indicated that UNC0379 treatment reduced levels of p53<sup>K382me1</sup> modification in xenografts (Figure 7A, insets). Kaplan-Meier survival curves revealed a statistically significant survival advantage for mice bearing ex vivo UNC0379-treated NGP or SY5Y NB cells compared with control-treated NB cells (Figure 7B). These results suggest that a small-molecule inhibitor of SETD8 may have therapeutic relevance.

To determine whether inhibition of SETD8 affected the growth of established NB tumors, we generated stable TET-inducible shRNAs targeting SETD8 in SY5Y (SY5Y-Tet-shSETD8) and NGP (NGP-Tet-shSETD8) NB cell lines. SY5Y-TET-shSETD8 or

NGP-TET-shSETD8 cells were implanted subcutaneously into nude mice. SY5Y-Tet-TRIPZ control and NGP-Tet-TRIPZ control cell lines showed that doxycycline-containing chow (DOXY-chow) did not significantly affect tumor growth (Figures S7A and S7B). When tumors reached  $\sim 100 \text{ mm}^3$ , animals were stratified into cohorts that received DOXY-chow or regular chow. Tumor growth was monitored at least three times a week. Assessment of tumor protein lysates showed reduced levels of SETD8 protein, decreased levels of the p53<sup>K382me1</sup> (Figure 7C, insets), and increases in neural differentiation markers (Figure S7C) in tumors taken from mice receiving DOXY-chow compared with those receiving normal chow. Tumor RNA (qRT-PCR) showed upregulated p53 and its targets after SETD8 genetic inhibition (Figure S7D). Mice receiving DOXY-chow had significantly reduced tumor size in both the SY5Y ( $p \leq 0.001$ ) and the NGP cell lines ( $p \leq 0.01$ ) (Figure 7C) and increased overall survival (Figure 7D) compared with those receiving normal chow.

We propose a model in which, in NB, SETD8 may be overexpressed, resulting in increased levels of p53<sup>K382me1</sup> and inactivation of p53. Genetic or pharmacologic inhibition of SETD8 rescues p53 function by decreasing p53<sup>K382me1</sup> and activating p53 canonical pathways (Figures 8A and 8B). These studies demonstrate that targeting SETD8 expression in NB cells significantly inhibited tumor xenograft growth and prolonged survival of mice. Thus, the biochemical, cell, and animal model data support SETD8 as a bona fide target in NB.

## DISCUSSION

Our genetic and chemical screens revealed vulnerabilities in NB tumor cells that are relevant to HR-NB patients and are potentially druggable. The siRNA screen identified 53 genes whose silencing reduced NB tumor cell growth, 16 of which also induced differentiation. We focused on the role of SETD8 based on the siRNA screen and the results of the chemical screen involving the recently developed small-molecule inhibitor of SETD8, UNC0379. Mechanistically, our studies show that genetic or pharmacological inhibition of SETD8 results in activation of the p53 pathway in NB cell lines. Moreover, pre-clinical tumor models showed pharmacologic or genetic ablation of SETD8 inhibits tumor xenograft growth and extends murine survival.

DNA replication, recombination, repair, and cell cycle were the major pathways (IPA) implicated after downregulation of the 53 growth-inhibiting genes. Some 60% of these genes had never

**Figure 7. Genetic and Pharmacologic Inhibition of SETD8 Impairs Tumor Growth and Prolongs Murine Survival in an In Vivo Model of NB**  
 (A) SY5Y (left) and NGP (right) cells were treated ex vivo for 24 hr with  $2 \mu\text{M}$  UNC0379, SETD8 inhibitor, and then injected into nude mice. Day 0 indicates the day of cell implantation. Immunoblot of proteins from two tumors randomly chosen from each group (untreated and ex vivo UNC0379 treated) collected 20 days after the injection and blotted with antibodies to SETD8, p53<sup>K382me1</sup>, p53, and GAPDH (insets). Bars show the tumor size average of 15 mice/group  $\pm$  SEM. Slopes of the growth rate were compared by t test.  
 (B) Kaplan-Meier graphs showing the murine survival upon ex vivo treatment of SY5Y (left) and NGP (right) with UNC0379. The statistical significance between two treatment groups was evaluated using a log rank test.  
 (C) SY5Y-NB (left) and NGP-NB (right) xenograft tumor size in mice treated with doxycycline (DOXY) after tumors reached 75–100 mm<sup>3</sup>. Day 0 indicates the day of cell implantation. After 9 days, mice were divided into two groups: untreated and DOXY-treated. Immunoblot of proteins from two tumors randomly chosen from each group 20 days after the injection and blotted with antibodies to SETD8, p53<sup>K382me1</sup>, p53, and GAPDH (insets). Bars show the tumor size average of 15 mice/group  $\pm$  SEM. Slopes of the growth rate were compared by t test.  
 (D) Kaplan-Meier graphs showing the murine survival upon SETD8 silencing in SY5Y-NB (left) and NGP-NB (right) tumor-bearing mice. The statistical significance between two treatment groups was evaluated using a log rank test.  
 See also Figure S7.

before been implicated in limiting NB tumor cell growth and, importantly, more than 30% have enzymatic activities that are potentially druggable. Of the 16 genes whose silencing also induced NB differentiation, over half have not been described in NB, with TAF6L and SETD8 having enzymatic activities. The potential relevance of these genes is supported by the findings that expression of high levels of 9 out of the 16 genes (EZH2, ACTR5, CTCF, BRD4, TAF6L, CHAF1A, CENPE, INCENP, and SETD8) are associated with poor prognosis in primary NB tumors (database: R2 <http://r2.amc.nl>, Kocak). Furthermore, high-level expression of TAF6L, CENPE, INCENP, and SETD8 is significantly associated with poor prognosis in MYCN-WT stage 4 patients.

Our finding that high-level expression of SETD8 is associated with poor prognosis in NB may be due in part to focal DNA copy-number gains at chr12q24, in the region including SETD8 (Schnepp et al., 2015; Wang et al., 2011; Wolf et al., 2010). Chr12q24 gain is significantly associated with the high-risk MYCN-WT subset, and several genes in this region, including SETD8, are significantly differentially expressed when compared with MYCN-amp NB tumors (Schnepp et al., 2015). However, only 33% of MYCN-WT HR-NB tumors harbor Chr12q24 gains (Schnepp et al., 2015; Wolf et al., 2010), indicating that other mechanisms contribute to elevated levels of SETD8. Increased SETD8 expression has been found in lung cancers and this may reflect the tight regulation of SETD8 during the cell cycle (Takawa et al., 2012). During anaphase through early G1, SETD8 protein levels are negatively regulated by the APC<sup>cdh1</sup> E3-ubiquitin ligase (Beck et al., 2012). In NB, DNA hypermethylation of *CDH1* (Hoebeek et al., 2009) and low-level expression of CDH1 are associated with poor prognosis (database: R2 Kocak NB). As CDH1 is required for recognition and recruitment of SETD8 to the APC E3-ubiquitin ligase complex, low levels of CDH1 in NB may impair appropriate cell-cycle regulation of SETD8. CDH1 is implicated as a tumor and metastasis suppressor as well as a regulator of genomic stability (Garcia-Higuera et al., 2008). Interestingly other APC<sup>cdh1</sup> E3-ubiquitin ligase substrates (Aurora B kinase and BARD1) have been shown to have a role in NB susceptibility or tumorigenesis (Bosse et al., 2012; Schnepp et al., 2015).

Our functional siRNA and chemical screens indicated that inhibition of SETD8 led to decreased NB cell growth and induction of differentiation. The transcriptome data indicate that a major driver is SETD8-mediated methylation and inactivation of the p53 pathway. SETD8 is the sole monomethyltransferase of lysine 20 on histone H4 (H4<sup>K20me1</sup>) and this histone mark is critical in regulating DNA replication and chromosome condensation during mitosis. In many studies (Beck et al., 2012), loss of SETD8 leads to DNA damage, which may also contribute to the p53 activation we detect in NB cells. SETD8 also methylates non-histone proteins including proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the p53-stabilizing factor NUMB, as well as the p53 tumor suppressor (Dhami et al., 2013; Takawa et al., 2012), which are critical for cell-cycle progression. Dysregulation of SETD8 mostly has been implicated as a driver of oncogenesis. SETD8-mediated methylation of PCNA promotes tumor cell proliferation (Takawa et al., 2012), and its interaction with TWIST leads to H4<sup>K20me1</sup> of the N-cadherin promoter, a TWIST target stimulating invasiveness (Yang et al., 2012). SETD8 methyltransferase decreases the ac-

tivity of the p53 tumor suppressor by two distinct mechanisms: monomethylation of NUMB, which inhibits NUMB-dependent stabilization of p53, and the K382 monomethylation of p53, which decreases the transcriptional activity of p53 in non-damaged cells (Shi et al., 2007). In NB, our findings are consistent with a model in which SETD8-mediated cell death is p53 dependent and p53<sup>K382</sup> is important for this activity.

In primary NBs, TP53 is rarely mutated (<2%) and this study identifies SETD8 methylation as a mechanism that attenuates the activity of p53 in NB cells. Previous studies, primarily in MYCN-amp NB cells, have implicated cytosolic sequestration and deregulation of the p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 axis as mechanisms contributing to p53 inactivation (Tweddle et al., 2003). Aside from mutations in p14<sup>ARF</sup>, mechanisms that attenuate the activity of p53 in MYCN-WT NB have not been well described, even though MYCN-WT tumors comprise almost 60% of stage 4 HR-NB patients (Van Maerken et al., 2009). Here, we find that SETD8 inhibition leads to decreased levels of p53<sup>K382me1</sup>, decreased cell growth, and increased p53 activity in both MYCN-WT and MYCN-amp cell lines in vitro and in vivo. Since SETD8 methylation activity is part of the normal cell-cycle progression, it is expected that SETD8 would play a role in both HR-NB subsets. However, SETD8-mediated mechanisms of p53 inactivation may be more relevant in MYCN-WT NB tumors because: (1) MYCN-WT NB cell lines have relatively higher levels of p53<sup>K382me1</sup> compared with those in MYCN-amp NB; (2) the levels of SETD8 are associated with a poor prognosis in both subsets, but this association is statistically significant only in stage 4 MYCN-WT tumors; (3) Chr12q24 gain is significantly associated with MYCN-WT HR-NB (Schnepp et al., 2015); and (4) low mRNA levels of SETD8-ubiquitin ligases, CHD1, and BTRC (Wang et al., 2015) are associated with poor prognosis in stage 4 MYCN-WT tumors (database: R2 Kocak).

Pharmacologic approaches that lead to activation of p53 have been a long-term goal of cancer therapeutics ever since its tumor suppressor function was identified. Most studies have been focused on Nutlin-3 in NB (Van Maerken et al., 2011; Zawacka-Pankau and Selivanova, 2015). Here, we identify that UNC0379, a small-molecule inhibitor of SETD8, leads to activation of p53 in NB tumor cells. UNC0379 is a recently discovered substrate-competitive SETD8 inhibitor with preferential selectivity for SETD8 compared with 15 other methyltransferases (Ma et al., 2014a). In our study, UNC0379 demonstrated in vitro and in vivo efficacy at low micromolar concentrations in both MYCN-WT and MYCN-amp NB cell lines, although p53 mutant cell lines exhibited lower sensitivity compared with p53 WT cell lines. The IVTI of UNC0379 in NB cells was highly significant when compared with normal cells, suggesting that its characteristics warrant further development. The recent elucidation of structure-activity relationships among SETD8 inhibitors (Ma et al., 2014b) and the identification of other small-molecule inhibitors of SETD8 (Blum et al., 2014) should lead to compounds with increased activity and selectivity (A.M., unpublished data). As with many targeted compounds, combination studies may prove more efficacious, and further studies of inhibitors of SETD8 with Nutlin-3 or DNA damaging conventional cytotoxic agents will be explored.

By integrating a high-content imaging siRNA screen with a chemical screen we identified SETD8 as a crucial regulator of

NB proliferation and differentiation, and UNC0379 as a small-molecule inhibitor with anti-tumor growth activity. This study reveals inhibition of SETD8 as a mechanism in NB to activate p53 by decreasing p53<sup>K382me1</sup>. A few studies have implicated SETD8 as a putative target, but this study also shows that genetic targeting of SETD8 in pre-clinical xenograft tumor models affects in vivo growth and confers a significant survival advantage. Collectively, our work sheds light on the chromatin modifier SETD8 and its role in NB tumorigenesis, providing evidence for a therapeutic strategy to activate p53 function in HR-NBs.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

##### Cell Culture

NB cell lines were cultured in RPMI-containing media; ARPE-19 and HEK293T were grown in DMEM/Nutrient Mixture F12. Further details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

##### Real-Time PCR Analysis

Total RNA extraction was carried out using an RNeasy Plus Kit (QIAGEN) and qRT-PCR was performed as described previously (Veschi et al., 2014). For primer sequences, see Supplemental Experimental Procedures.

##### siRNA Transfection in a 384-Well Format and Automated Imaging

siGENOME pools and ONTARGETplus pools of four siRNA oligos per gene were purchased from Dharmacon. The epigenetic-focused siRNA library targets 395 known modulators of chromatin structure and function. siRNA oligos targeting genes in the primary screening are described in Table S1. Automated imaging was performed using an Opera high-throughput confocal microscope (PerkinElmer). The methodology is detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

##### Animal Experiments

All xenograft studies were approved by the Animal Care and Use Committee of the National Cancer Institute, and all mouse treatments, including their housing, were in accordance with the institutional guidelines (PB-023). The methodology used is detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

##### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Microsoft Excel, standard two-tailed Student's t test, and the software GraphPad Prism 6.0. Statistical methodology for gene expression profiling, for siRNA and chemical screens, and for the animal experiments is described in the Supplemental Experimental Procedures. ImageJ software was used for quantification of selected immunoblots.

##### ACCESSION NUMBERS

The RNA-seq data were deposited in the GEO repository at the NCBI (GEO: GSE81626).

##### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, eight figures, and seven tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.002>.

##### AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.V., C.J.T., and Z.L. designed the experiments. V.V. and C.J.T. drafted the manuscript. C.J.T., V.V., T.C.V., L.O., G.H., and Z.L. developed and/or performed the high-content imaging screen. V.V. and B.G. performed the chemical screen and figure generation. A.M., J.J., and C.A. provided chemical probes and technical advice. V.V. and N.L. generated stable shSETD8 NB lines and qRT-PCR. V.V. and B.K.S. performed western blotting, experiments for RNA-seq analysis, and animal studies. C.Y., Y.H., Z.L., and B.G. performed

bioinformatic analyses. S.J.M. and E.A. provided unique reagents, and, with C.A., G.G., and J.K. critically edited the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. G. Pegoraro (High-Throughput Imaging Facility, CCR) and D. Wei (Urologic Oncology Branch, CCR) for technical assistance, to Dr. N. Caplen for her critical review, and to Drs. M. Aladjem and D. Banerjee for insightful discussions. Studies on the epigenetic siRNA screen were funded by a grant from the St. Baldrick's Foundation to C.J.T. and Z.L. SGC is a registered charity (1097737) that receives funds from AbbVie, Bayer Pharma AG, Boehringer Ingelheim, Canada Foundation for Innovation, Eshelman Institute for Innovation, Genome Canada through the Ontario Genomics Institute, the Innovative Medicines Initiative (EU/EFPIA) (ULTRA-DD grant no. 115766), Janssen, Merck, Novartis Pharma AG, the Ontario Ministry of Economic Development and Innovation, Pfizer, São Paulo Research Foundation-FAPESP, Takeda, and the Wellcome Trust. G.G. was funded by AIRC IG17734; MIUR PRIN 2015. This work is supported by the Center for Cancer Research, NCI, as part of the Intramural Research Program, NIH.

Received: June 15, 2016

Revised: September 26, 2016

Accepted: December 5, 2016

Published: January 9, 2017

#### REFERENCES

- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Arrowsmith, C.H., Bountra, C., Fish, P.V., Lee, K., and Schapira, M. (2012). Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 384–400.
- Bagatell, R., Beck-Popovic, M., London, W.B., Zhang, Y., Pearson, A.D., Matthay, K.K., Monclair, T., Ambros, P.F., and Cohn, S.L. (2009). Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *J. Clin. Oncol.* 27, 365–370.
- Balamuth, N.J., Wood, A., Wang, Q., Jagannathan, J., Mayes, P., Zhang, Z., Chen, Z., Rappaport, E., Courtright, J., Pawel, B., et al. (2010). Serial transcriptome analysis and cross-species integration identifies centromere-associated protein E as a novel neuroblastoma target. *Cancer Res.* 70, 2749–2758.
- Barbieri, E., De Preter, K., Capasso, M., Chen, Z., Hsu, D.M., Tonini, G.P., Lefever, S., Hicks, J., Versteeg, R., Pession, A., et al. (2014). Histone chaperone CHAF1A inhibits differentiation and promotes aggressive neuroblastoma. *Cancer Res.* 74, 765–774.
- Beck, D.B., Oda, H., Shen, S.S., and Reinberg, D. (2012). PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* 26, 325–337.
- Bitler, B.G., Aird, K.M., Garipov, A., Li, H., Amatangelo, M., Kossenkov, A.V., Schultz, D.C., Liu, Q., Shih, Ie, M., Conejo-Garcia, J.R., et al. (2015). Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat. Med.* 21, 231–238.
- Blum, G., Ibanez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J.C., and Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS Chem. Biol.* 9, 2471–2478.
- Bosse, K.R., Diskin, S.J., Cole, K.A., Wood, A.C., Schnepf, R.W., Norris, G., Nguyen, B., Jagannathan, J., Laquaglia, M., Winter, C., et al. (2012). Common variation at BARD1 results in the expression of an oncogenic isoform that influences neuroblastoma susceptibility and oncogenicity. *Cancer Res.* 72, 2068–2078.
- Canete, A., Gerrard, M., Rubie, H., Castel, V., Di Cataldo, A., Munzer, C., Ladenstein, R., Brichard, B., Bermudez, J.D., Couturier, J., et al. (2009). Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite

- intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J. Clin. Oncol.* 27, 1014–1019.
- Cheung, N.K., Zhang, J., Lu, C., Parker, M., Bahrami, A., Tickoo, S.K., Heguy, A., Pappo, A.S., Federico, S., Dalton, J., et al. (2012). Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 307, 1062–1071.
- Choi, Y.L., Kim, C.J., Matsuo, T., Gaetano, C., Falconi, R., Suh, Y.L., Kim, S.H., Shin, Y.K., Park, S.H., Chi, J.G., and Thiele C.J. (2005). HULip, a human homologue of unc-33-like phosphoprotein of *Caenorhabditis elegans*; immunohistochemical localization in the developing human brain and patterns of expression in nervous system tumors. *J. Neurooncol.* 73, 19–27.
- Cui, H., Ma, J., Ding, J., Li, T., Alam, G., and Ding, H.F. (2006). Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of l-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 281, 34696–34704.
- Dhami, G.K., Liu, H., Galka, M., Voss, C., Wei, R., Muranko, K., Kaneko, T., Cregan, S.P., Li, L., and Li, S.S. (2013). Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis. *Mol. Cell* 50, 565–576.
- Frumm, S.M., Fan, Z.P., Ross, K.N., Duvall, J.R., Gupta, S., VerPlank, L., Suh, B.C., Holson, E., Wagner, F.F., Smith, W.B., et al. (2013). Selective HDAC1/HDAC2 inhibitors induce neuroblastoma differentiation. *Chem. Biol.* 20, 713–725.
- García-Higuera, I., Manchado, E., Dubus, P., Canamero, M., Mendez, J., Moreno, S., and Malumbres, M. (2008). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 10, 802–811.
- Hoebeek, J., Michels, E., Pattyn, F., Combaret, V., Vermeulen, J., Yigit, N., Hoyoux, C., Laureys, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2009). Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 273, 336–346.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.
- Lawlor, E.R., and Thiele, C.J. (2012). Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin. Cancer Res.* 18, 2768–2779.
- Ma, A., Yu, W., Li, F., Bleich, R.M., Herold, J.M., Butler, K.V., Norris, J.L., Korboukh, V., Tripathy, A., Janzen, W.P., et al. (2014a). Discovery of a selective, substrate-competitive inhibitor of the lysine methyltransferase SETD8. *J. Med. Chem.* 57, 6822–6833.
- Ma, A., Yu, W., Xiong, Y., Butler, K.V., Brown, P.J., and Jin, J. (2014b). Structure-activity relationship studies of SETD8 inhibitors. *MedChemComm* 5, 1892–1898.
- Maris, J.M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 362, 2202–2211.
- Molenaar, J.J., Koster, J., Zwijnenburg, D.A., van Sluis, P., Valentijn, L.J., van der Ploeg, I., Hamdi, M., van Nes, J., Westerman, B.A., van Arkel, J., et al. (2012). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 483, 589–593.
- Petroni, M., Veschi, V., Gulino, A., and Giannini, G. (2012). Molecular mechanisms of MYCN-dependent apoptosis and the MDM2-p53 pathway: an Achilles' heel to be exploited for the therapy of MYCN-amplified neuroblastoma. *Front Oncol.* 2, 141.
- Pugh, T.J., Morozova, O., Attiyeh, E.F., Asgharzadeh, S., Wei, J.S., Auclair, D., Carter, S.L., Cibulskis, K., Hanna, M., Kiezun, A., et al. (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45, 279–284.
- Puissant, A., Frumm, S.M., Alexe, G., Bassil, C.F., Qi, J., Chanthery, Y.H., Nekritz, E.A., Zeid, R., Gustafson, W.C., Greninger, P., et al. (2013). Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov.* 3, 308–323.
- Sausen, M., Leary, R.J., Jones, S., Wu, J., Reynolds, C.P., Liu, X., Blackford, A., Parmigiani, G., Diaz, L.A., Jr., Papadopoulos, N., et al. (2013). Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45, 12–17.
- Schnepf, R.W., Khurana, P., Attiyeh, E.F., Raman, P., Chodosh, S.E., Oldridge, D.A., Gagliardi, M.E., Conkrite, K.L., Asgharzadeh, S., Seeger, R.C., et al. (2015). A LIN28B-RAN-AURKA signaling network promotes neuroblastoma tumorigenesis. *Cancer Cell* 28, 599–609.
- Schulte, J.H., and Eggert, A. (2015). Neuroblastoma. *Crit. Rev. Oncogenesis* 20, 245–270.
- Schulte, J.H., Lim, S., Schramm, A., Friedrichs, N., Koster, J., Versteeg, R., Ora, I., Pajtler, K., Klein-Hitpass, L., Kuhfittig-Kulle, S., et al. (2009). Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res.* 69, 2065–2071.
- Shi, X., Kachirskaia, I., Yamaguchi, H., West, L.E., Wen, H., Wang, E.W., Dutta, S., Appella, E., and Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol. Cell* 27, 636–646.
- Takawa, M., Cho, H.S., Hayami, S., Toyokawa, G., Kogure, M., Yamane, Y., Iwai, Y., Maejima, K., Ueda, K., Masuda, A., et al. (2012). Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res.* 72, 3217–3227.
- Tweddle, D.A., Pearson, A.D., Haber, M., Norris, M.D., Xue, C., Flemming, C., and Lunec, J. (2003). The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 197, 93–98.
- Van Maerken, T., Speleman, F., Vermeulen, J., Lambert, I., De Clercq, S., De Smet, E., Yigit, N., Coppens, V., Philippe, J., De Paepe, A., et al. (2006). Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Res.* 66, 9646–9655.
- Van Maerken, T., Vandesompele, J., Rihani, A., De Paepe, A., and Speleman, F. (2009). Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ.* 16, 1563–1572.
- Van Maerken, T., Rihani, A., Dreidax, D., De Clercq, S., Yigit, N., Marine, J.C., Westermann, F., De Paepe, A., Vandesompele, J., and Speleman, F. (2011). Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Mol. Cancer Ther.* 10, 983–993.
- Veschi, V., Petroni, M., Bartolazzi, A., Altavista, P., Dominici, C., Capalbo, C., Boldrini, R., Castellano, A., McDowell, H.P., Pizer, B., et al. (2014). Galectin-3 is a marker of favorable prognosis and a biologically relevant molecule in neuroblastoma tumors. *Cell Death Dis.* 5, e1100.
- Wang, K., Diskin, S.J., Zhang, H., Attiyeh, E.F., Winter, C., Hou, C., Schnepf, R.W., Diamond, M., Bosse, K., Mayes, P.A., et al. (2011). Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 469, 216–220.
- Wang, C., Liu, Z., Woo, C.W., Li, Z., Wang, L., Wei, J.S., Marquez, V.E., Bates, S.E., Jin, Q., Khan, J., et al. (2012). EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res.* 72, 315–324.
- Wang, Z., Dai, X., Zhong, J., Inuzuka, H., Wan, L., Li, X., Wang, L., Ye, X., Sun, L., Gao, D., et al. (2015). SCF(beta-TRCP) promotes cell growth by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Nat. Commun.* 6, 10185.
- Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.J., Koelthoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., and Roberts, C.W. (2010). Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 316–328.
- Wolf, M., Korja, M., Karhu, R., Edgren, H., Kilpinen, S., Ojala, K., Mousseis, S., Kallioniemi, A., and Haapasalo, H. (2010). Array-based gene expression, CGH and tissue data defines a 12q24 gain in neuroblastoma tumors with prognostic implication. *BMC Cancer* 10, 181.
- Wu, S., and Rice, J.C. (2011). A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle* 10, 68–72.
- Wu, S., Wang, W., Kong, X., Congdon, L.M., Yokomori, K., Kirschner, M.W., and Rice, J.C. (2010). Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes Dev.* 24, 2531–2542.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* 31, 110–123.
- Yang, J., AITahan, A.M., Hu, D., Wang, Y., Cheng, P.H., Morton, C.L., Qu, C., Nathwani, A.C., Shohet, J.M., Fotsis, T., et al. (2015). The role of histone demethylase KDM4B in Myc signaling in neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, djv080.
- Zawacka-Pankau, J., and Selivanova, G. (2015). Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer. *J. Intern. Med.* 277, 248–259.

## **ANEXO III**

**Bárbara Kunzler Souza**

**Curriculum Vitae**

Janeiro/2018



# Bárbara Kunzler Souza

## Curriculum Vitae

---

### Dados pessoais

**Nome** Bárbara Kunzler Souza

**Endereço eletrônico**

e-mail para contato: [barbarakunzler@yahoo.com.br](mailto:barbarakunzler@yahoo.com.br)

---

### Formação acadêmica/titulação

**2012 - Atual** Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Título: Regulação epigenética de enzimas modificadoras da cromatina em tumores sólidos pediátricos.

Orientador: Rafael Roesler

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2009 - 2011** Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Título: *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: ESTUDO FUNCIONAL DO GENE emp1 E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR,

Ano de obtenção: 2011

Orientador: Augusto Schrank

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2003 - 2009**      Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo,  
Brasil  
Título: Identificação de genes diferencialmente expressos em  
*Metarhizium anisopliae*  
Orientador: Augusto Schrank  
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico.

---

### **Formação complementar**

**2015 - 2015**      Curso de curta duração em Guidelines for Animal Users.  
(Carga horária: 3h).  
National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Estados Unidos.

**2015 - 2015**      Curso de curta duração em Writing and Publishing a Scientific Paper.  
(Carga horária: 12h).  
National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Estados Unidos.

**2009 - 2009**      Curso de curta duração em How to write a good english language  
paper. (Carga horária: 15h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,  
Brasil.

**2007 - 2007**      Extensão universitária em Curso de Introdução a Biologia Molecular  
Computacional.  
(Carga horária: 35h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,

Brasil.

- 2003 - 2007** Técnico em Química. Escola Técnica da UFRGS, ETC, Brasil.
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Controle Microbiano de Vetores e Pragas: Bactérias. (Carga horária: 20h).  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil.
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Fundamentos de Virologia Patogênica. (Carga horária: 24h).  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil.
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Genética na UFRGS: Pesquisa e Ensino ao Alcance de Todos. (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Neurociências: Efeito das Drogas sobre o Cérebro -. (Carga horária: 30h).  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil.
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Biologia Molecular Básica. (Carga horária: 20h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

#### Vínculo institucional

- 2012 - Atual** Vínculo: Bolsista de doutorado, Enquadramento funcional: Estudante de doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Outras informações: Bolsista de doutorado da CAPES, no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.
- 2014 – 2015** Vínculo: Bolsista de doutorado, Enquadramento funcional: Estudante de doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Outras informações: Bolsista de doutorado da CAPES – Ciências sem fronteiras, no *Cell and Molecular Biology Section, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA*.
- 2009 – 2011** Vínculo: Bolsista de mestrado, Enquadramento funcional: Estudante de mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Outras informações: Bolsista de mestrado da CAPES, no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.
- 2008 - 2008** Vínculo: Estágio Curricular, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 12, Regime: Parcial. Outras informações: Estágio Curricular na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS). Controle de Qualidade: Controle Biológico de Esterilização.

- 2007 - 2009** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial. Outras informações: Bolsista de iniciação científica do CNPq - Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos, Centro de Biotecnologia – UFRGS.
- 2007 - 2007** Vínculo: Estágio Voluntário, Enquadramento funcional: estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial. Outras informações: Estagiário voluntário no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica - Centro de Biotecnologia da UFRGS.

---

## Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. Veschi V, Liu Z, Voss TC, Ozbun L, Gryder B, Yan C, Hu Y, Ma A, Jin J, Mazur SJ, Lam N, **Souza BK**, Giannini G, Hager GL, Arrowsmith CH, Khan J, Appella E, Thiele CJ. Epigenetic siRNA and Chemical Screens Identify SETD8 Inhibition as a Therapeutic Strategy for p53 Activation in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Cell*, v.31, p.50 - 63, 2017.
2. Heinen TE, Dos Santos RP, Da Rocha A, Dos Santos MP, Da Costa Lopez PL, Filho MA Silva, **Souza BK**, Da Rosa 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*, v.7, p.34860 - 80, 2016.
3. Menegotto PR, Da Costa Lopez PL, **Souza BK**, De Farias CB, Filippi-Chiela EC, Vieira IA, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Knockdown Induces Senescence in Glioblastoma Cells. *Molecular*

Neurobiology, v.1, p.1 - 7, 2016.

4. Junges A, Boldo JT, **Souza BK**, Guedes RLM, Sbaraini N, Kmetzsch L, Thompson CE, Staats CC, De Almeida LGP, De Vasconcelos ATR, Vainstein MH, Schrank A. Genomic Analyses and Transcriptional Profiles of the Glycoside Hydrolase Family 18 Genes of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. Plos One, v.9, p.e107864, 2014.
5. Lubeck I, Arruda W, **Souza BK**, Stanisçuaski F, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. Fungal ecology, v.1, p.78 - 88, 2008.

### **Artigos completos aceitos para publicação**

1. **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. Molecular Neurobiology, 2018. DOI: 10.1007/s12035-018-0874-6.
2. Kersting N, **Souza BK**, Vieira IA, Pereira dos Santos R, Olguins DB, Gregianin LJ, Brunetto AT, Brunetto AL, Roesler R, De Farias CB, Schwartzmann G. EGFR regulation of Ewing sarcoma cell function. Oncology, 2018.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. **SOUZA, B. K.**; STAATS, C. C.; Carvalho, R. M. L.; SCHRANK, A. Identificação de genes diferencialmente expressos em blastosporos de *Metarhizium anisopliae* In: XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.

2. **SOUZA, B. K.**; CARVALHO, L. R. M.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.  
Isolamento e caracterização do gene ortólogo emp1 of *Metarhizium anisopliae* In:  
Mostra de Iniciação Científica - UNISINOS, 2008, São Leopoldo.

3. **SOUZA, B. K.**; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; Vainstein, M. H.  
Análise da secreção de *Metarhizium anisopliae* sob diferentes fontes de carbono In:  
XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. **SOUZA, B. K.**; CARVALHO, L. R. M.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.  
Construção de um cassete de inativação para o gene emp1 of *Metarhizium anisopliae*  
In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre.

### **Eventos**

#### **Participação em eventos**

1. Apresentação de Pôster / Painel na **36ª Semana Científica do HCPA**, 2016.  
(Encontro)

HDAC activity inhibition abolishes pluripotency, proliferation and survival pathways leading Ewing sarcoma cells to a differentiated state.

2. Apresentação de Pôster / Painel no **XV Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**, 2016. (Congresso)

INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE DE HDAC COMO UMA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA POTENCIAL DE REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS DE SARCOMA DE EWING PARA UM ESTADO DIFERENCIADO.

3. Apresentação Oral no **15th CCR-FYI Colloquium (NCI-NIH, USA)** 2015. (Simpósio)

Targeting EZH2 to reprogram Neuroblastoma cells for differentiation.

4. Apresentação de Pôster / Painel no **XIV Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**, 2014. (Congresso)

EFFECT OF BDNF COMBINED WITH AN HDAC INHIBITOR ON THE GROWTH OF EWING SARCOMA CELLS.

5. Apresentação de Pôster / Painel no **10th International Congress on Cell Biology**, 2012. (Congresso)

THE INFLUENCE OF A SELECTIVE INHIBITOR OF THE TYROSINE PROTEIN KINASE ACTIVITY OF THE TRK FAMILY ON THE VIABILITY OF SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS.

6. Apresentação de Pôster / Painel no **10th International Congress on Cell Biology**, 2012. (Congresso)

EFFECTS OF A GASTRIN-RELEASING PEPTIDE RECEPTOR ANTAGONIST ON THE VIABILITY OF SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS.

7. Apresentação de Pôster / Painel no (a) **XIV Encontro Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS**, 2012. (Encontro)

Avaliação da expressão dos receptores GRP (peptídeo liberador de gastrina) e TrkB (tirosina cinase B) e efeitos de agonistas e antagonistas dos receptores alvos sobre a viabilidade das células SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

8. **Simpósio Novas Fronteiras da Biologia Celular**, 2011. (Simpósio)

9. **XXII Encontro Nacional de Virologia**, 2011. (Congresso)



**10.** Apresentação de Pôster / Painel no (a) **X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2010. (Encontro)

Análises transcricionais de quitinases em estágios iniciais de germinação, formação de apressório e blastosporos e caracterização do gene *emp1* no fungo *Metarhizium anisopliae*.

**11.** **Simpósio sobre Terapias Inovadoras**, 2009. (Simpósio)

**12.** Apresentação de Pôster / Painel no (a) **XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2009. (Encontro)

Estudo da função do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*.

**13.** Apresentação de Pôster / Painel no (a) **XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2009. (Encontro)

Análise transcricional de quitinases em corpos hifais de *Metarhizium anisopliae*.

**14.** **IX Reunião Acadêmica da Biologia da Unisinos - XI RABU**, 2007. (Encontro)

**15.** **I Jornada Acadêmica de Biomedicina da FFFCMPA**, 2005. (Encontro)

**16.** **X Reunião Acadêmica da Biologia da UNISINOS**, 2005. (Encontro)

**17.** Apresentação de Pôster / Painel no (a) **4º Mostra de Trabalhos de Iniciação Técnico-Científica - UFRGS**, 2004. (Encontro)

Análise de Cloreto em água de Caldeira.

18. Apresentação de Pôster / Painel no (a) **XXIV Encontro de Debates sobre o Ensino de Química - Saberes e Fazeres do Educador em Química: Fenômeno de Múltiplas Áreas - UCS**, 2004. (Encontro)

Projeto-Piloto: Empresa Chemie-Elf (Domissanitários).

19. **IX Reunião da Biologia da UNISINOS - RABU**, 2003. (Encontro)

### **Organização de evento**

1. **Souza, Bárbara K.**

**Best of ASCO Annual Meeting' 12**, 2012. (Congresso, Organização de evento)

---

### **Totais de produção**

#### **Produção bibliográfica**

Artigos completos publicados em periódico.....	5
Artigos aceitos para publicação.....	2
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	4

#### **Produção técnica**

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	2
Curso de curta duração ministrado (outro).....	1

#### **Eventos**

Participações em eventos (congresso).....	5
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (encontro).....	11
Organização de evento (congresso).....	1