

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Nicole Borgmann de Oliveira

**EFEITO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE BMI-1 EM CÉLULAS TRONCO
TUMORAIS DE SARCOMA DE EWING**

Porto Alegre

2023

Nicole Borgmann de Oliveira

**EFEITO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE BMI-1 EM CÉLULAS TRONCO
TUMORAIS DE SARCOMA DE EWING**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Mariane da Cunha Jaeger
Coorientadora: Msc. Natália Hogetop Freire

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Borgmann de Oliveira, Nicole
EFEITO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE BMI-1 EM
CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE SARCOMA DE EWING / Nicole
Borgmann de Oliveira. -- 2023.
41 f.
Orientador: Mariane da Cunha Jaeger.

Coorientador: Natália Hogetop Freire.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Sarcoma de Ewing. 2. células-tronco tumorais. 3.
BMI-1. I. da Cunha Jaeger, Mariane, orient. II.
Hogetop Freire, Natália, coorient. III. Título.

Nicole Borgmann de Oliveira

**EFEITO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE BMI-1 EM CÉLULAS TRONCO
TUMORAIS DE SARCOMA DE EWING**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 16 de Setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Eduardo C. Filippi-Chiela -UFRGS

Lauro José Gregianin - UFRGS

Dra. Mariane da Cunha Jaeger – Instituto do Câncer Infantil

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Mariane Jaeger e à minha coorientadora Msc. Natália Hogetop, obrigada pela confiança e orientação dentro e fora do laboratório. Sou muito feliz por ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês, as admiro muito;

Ao Instituto de Câncer Infantil (ICI) por oportunizar a realização do projeto;

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudaram nas várias contagens e tornaram este período mais leve com as conversas e doces compartilhados;

À minha família, que esteve do meu lado por toda essa trajetória, especialmente minha mãe, Camila, minha irmã, Luísa, meu pai, Éder, meus avós, Paulo e Suzana, e meus tios, Paula e Fernando;

Ao meu amor, Daniel por ser meu principal suporte nos últimos anos;

A todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui, obrigada!

RESUMO

O Sarcoma de Ewing (SE) é o segundo tumor ósseo mais comum em crianças e adolescentes. Apesar de avanços em relação ao diagnóstico e tratamento do SE, um dos principais desafios é o tratamento de pacientes com doença recorrente ou metastática, que apresentam taxas de sobrevivência global de 5 anos de aproximadamente 10%. Casos de resistência e recorrência tumoral podem ser associados a uma subpopulação de células, conhecida como células-tronco tumorais (CTT). CTTs apresentam potencial de autorrenovação e diferenciação que contribuem para a heterogeneidade tumoral e consequentemente resistência a tratamentos. BMI-1 é um importante fator do Complexo Repressivo Policomb 1 (PRC1) que regula epigeneticamente a expressão gênica. BMI-1 já foi relacionada à manutenção do estado tronco tumoral em outros tumores, mas seu envolvimento com a tumorigênese de SE e o papel de BMI-1 nas CTTs de SE ainda não foi elucidado. O presente trabalho encontrou que a inibição de BMI-1 foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células em monocamada e CTTs de SE. Os resultados obtidos sugerem que a inibição farmacológica de BMI-1 causa uma redução da viabilidade, possivelmente por meio da indução de morte celular. Além disso, apesar dos níveis de BMI-1 não serem alterados no modelo de CTTs utilizados, BMI-1 parece ser relevante para a manutenção de CTTs de SE, visto que sua inibição reduziu o número e a viabilidade de esferas de SE e nas esferas de RD-ES essa diminuição foi acompanhada por uma redução nos níveis do marcador de *stemness* *PROM1*. Dessa forma, o presente trabalho trouxe dados preliminares que sugerem que BMI-1 possa ser uma potencial terapia para Sarcoma de Ewing.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing; células-tronco tumorais; BMI-1.

ABSTRACT

Ewing's Sarcoma (ES) is the second most common bone tumor in children and adolescents. Despite advances in the diagnosis and treatment of ES, one of the main challenges is the treatment of patients with recurrent or metastatic disease, who have 5-year overall survival rates of approximately 10%. Cases of tumor resistance and recurrence can be associated with a subpopulation of cells known as cancer stem cells (CSCs). CSCs have the potential for self-renewal and differentiation, which contribute to tumor heterogeneity and consequently resistance to treatments. BMI-1 is an important Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) factor that epigenetically regulates gene expression. BMI-1 has already been linked to the maintenance of the tumor stem state in other tumors, but its involvement in SE tumorigenesis and the role of BMI-1 in SE CSCs has not yet been elucidated. The present study found that BMI-1 inhibition was able to reduce the cell viability of monolayer cells and SE CSCs. The results obtained suggest that pharmacological inhibition of BMI-1 causes a reduction in viability, possibly through the induction of cell death. In addition, although BMI-1 levels were not altered in the CSCs model used, BMI-1 seems to be relevant for the maintenance of SE CSCs since its inhibition reduced the number and viability of SE spheres and in RD-ES spheres this decrease was accompanied by a reduction in the levels of the stemness marker *PROM1*. Thus, this study has provided preliminary data suggesting that BMI-1 may be a potential therapy for Ewing's Sarcoma.

Keywords: Ewing's sarcoma; cancer stem cells; BMI-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fusões gênicas características do Sarcomas de Ewing.

12

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1. SARCOMA DE EWING	11
1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS	13
1.3 BMI-1	14
1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	16
1.5 OBJETIVOS	17
1.5.1 Objetivo geral	18
1.5.2 Objetivos específicos	18
2 ARTIGO CIENTÍFICO	19
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA Molecular and Cellular Biochemistry	36

1 INTRODUÇÃO

1.1. SARCOMA DE EWING

O Sarcoma de Ewing (SE) é um tumor maligno que acomete principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, com pico de incidência aos 15 anos. Ocorre predominantemente em ossos e tecidos moles, sendo a segunda causa mais comum de tumores ósseos em adultos jovens (INCA, 2022).

Os tumores pertencentes à família do SE são caracterizados por translocações nos braços longos dos cromossomos 11 e 22, $t(11;22)(q24;q12)$, que levam à fusão dos genes da família das proteínas FET com os genes da família de fatores de transcrição ETS (DELATTRE *et al*, 1992). Assim, as proteínas quiméricas originadas da fusão gênica atuam como fatores transcricionais alterados, cujo papel tem sido relacionado à patogênese do tumor (GANGWAL *et al* 2008). A principal proteína quimérica é a originada da fusão do EWSR1, da família FET, à FLI1, da família ETS, correspondendo a 85% da origem genética dos tumores SE (Figura 1). A segunda translocação mais comum é $t(21;22)(q22;q12)$, que resulta na fusão do gene EWSR1 com ERG, representando 15% dos casos. Outras translocações descritas são $t(7;22)(p22;q12)$, $t(17;22)(q21;q12)$ e $t(2;22)(q33;q12)$, onde EWSR1 é fundido aos genes ETV1, E1AF e FEV, respectivamente, e que correspondem a menos de 1% dos casos (BURCHILL, 2003) (ARVAND; DENNY, 2001). Do mesmo modo foram descritas fusões entre genes ETS e outros genes pertencentes à família FET, como FUS e TAF15 (WATSON *et al*, 2018). Não há evidências de que o tipo de fusão contribua para o prognóstico, resultando em desfechos clínicos similares (GINSBERG *et al*, 1999).

Outras alterações genéticas são pouco frequentes, sendo as mutações mais comuns em TP53 (5-7%), STAG2 (15-21%) e CDKN2A (10-12%) (TIRODE *et al*, 2014). A falta de subtipos genéticos sugere que o tumor é derivado de uma única linhagem celular. Modelos experimentais apontam que o SE é originado de células progenitoras mesenquimais ou da crista neural (RICHTER *et al*, 2009), contudo, sua célula de origem não foi completamente elucidada (RIGGI; STAMENKOVIC, 2007).

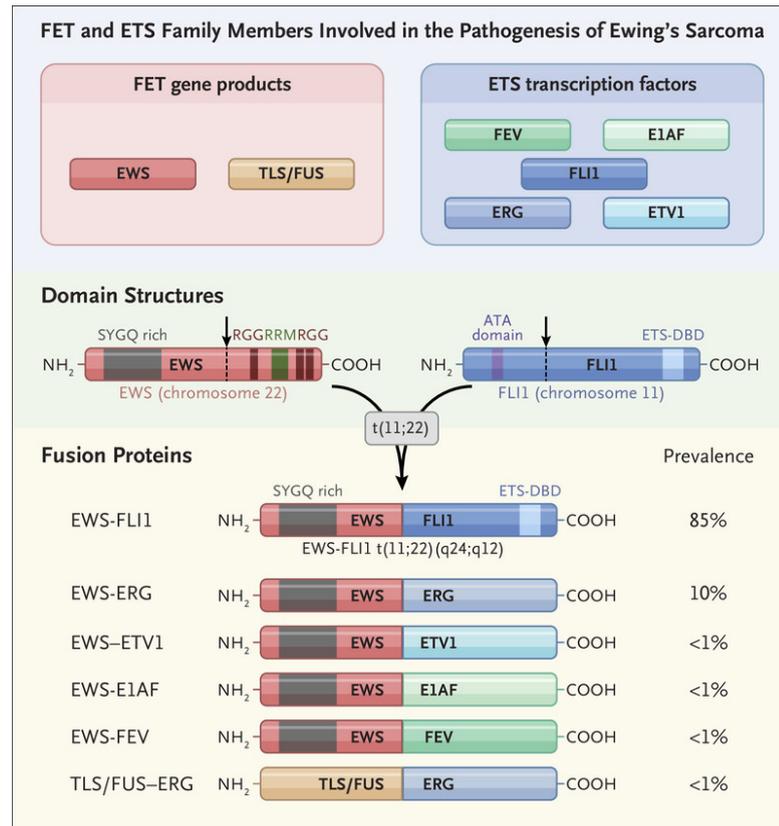


Figura 1- Fusões gênicas características do Sarcomas de Ewing.
Fonte: Riggi, Nicólo. (2021)

O SE pode ser caracterizado morfológicamente como tumor de células pequenas, redondas e pouco diferenciadas, de citoplasma eosinofílico e abundante em glicogênio e grânulos de degradação. A alta expressão do marcador CD99 é demonstrada em mais de 80% dos casos, todavia, é pouco específico por ser detectado em outros tipos tumorais. Tumores com diferenciação neuroectodérmica podem expressar S-100, desmina, vimentina e Enolase Neurônio Específica (NSE), mas que também são detectados em outros tipos tumorais (RIGGI; STAMENKOVIC, 2007). Dessa forma, faz-se necessário o diagnóstico diferencial pela exclusão de outros tumores, contudo, a distinção definitiva pode ser obtida pela investigação das translocações cromossômicas específicas do SE por técnicas moleculares, como hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou reação em cadeia da polimerase (PCR). (KIM; PARK, 2016) (GAMBERI *et al*, 2011).

Como é um tumor extremamente agressivo, o tratamento para SE consiste em regime multimodal, incluindo poliquimioterapia intensiva e controle local - ressecção cirúrgica e radioterapia (INCA, 2022). Cerca de 25% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico, que comumente ocorrem nos pulmões, ossos e medula óssea (ESIASHVILI; GOODMAN; 2008). Pacientes com doença localizada têm sobrevida global de 5 anos em 70

a 80% dos casos e em menos de 30% para pacientes que apresentam metástases já no momento do diagnóstico (GASPAR *et al*, 2015). A terapia é relacionada a eventos de toxicidade aguda e de longo prazo, como cardiomiopatias, doenças renais e redução da fertilidade. Também há risco de desenvolvimento de tumores secundários devido a quimioterapia e/ou radioterapia, tratamentos causadores de lesão celular exuberante, que podem gerar mutações que promovam o desenvolvimento de um novo tumor (GRÜNEWALD *et al*, 2018). Pacientes recidivados ou metastáticos têm sobrevida global de 10% (HUANG; LUCAS, 2011). Para estes pacientes, o tratamento ainda permanece um desafio, devido à resistência ou ineficiência da terapia padrão (STAHL *et al*, 2011).

Dessa forma, identificar e compreender as principais rotas moleculares ou subpopulações celulares tumorais implicadas em metástases e resistência à terapia no SE pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

É crescente o número de estudos que sugerem que a persistência de uma subpopulação de células tronco tumorais (CTTs) pode ser parcialmente responsável pela resistência, invasão e recorrência geral em muitos cânceres. As células-tronco tumorais possuem propriedades distintas como autorrenovação e capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens. A propriedade de autorrenovação é especialmente relevante para a oncogênese e malignidade, pois o aumento aberrante da autorrenovação, combinado com o potencial intrínseco de crescimento das células-tronco tumorais, pode explicar grande parte do que é considerado um fenótipo tumoral maligno (JORDAN; GUZMAN; NOBLE 2006). A propriedade de diferenciação em múltiplas linhagens confere às CTTs a capacidade de geração de progênie com vários níveis de diferenciação, tumorigênicas e não tumorigênicas, contribuindo para o povoamento e heterogeneidade do tumor (HERREROS-POMARES, 2022).

A identificação de CTTs é realizada através da detecção de marcadores específicos. A glicoproteína de superfície celular CD133 é um marcador tronco tumoral bastante discutido, uma vez que células CD133 positivas de diversos tumores sólidos demonstram capacidade aumentada de invasão, tumorigenicidade e quimiorresistência (GLUMAC; LEBEAU, 2018). Os marcadores de superfície celular CD34, CD44, CD90, CD117, CD20 também foram apontados como marcadores de CTTs em uma variedade de tumores sólidos, dentre os quais incluiu-se os sarcomas (PRINCE *et al* 2007).

A formação de esferóides tumorais é um dos modelos de validação do fenótipo tronco tumoral *in vitro*. (BIELECKA *et al*, 2016). O modelo consiste no cultivo de células em baixas quantidades sob condições não aderentes, utilizando meio livre de soro suplementado com fatores de crescimento. Para linhagens de SE, Wahl *et al* (2010) descreve as condições de cultivo e suplementos. Outros modelos descritos são a avaliação da capacidade de repopulação ou iniciação tumoral a partir de xenoenxerto em camundongos imunossuprimidos e o também modelo *in vitro* de crescimento de colônias em condições de cultura de células não aderentes (VISVADER; LINDEMAN, 2012).

No SE, as CTTs foram descritas pela primeira vez por Suvá *et al* em 2009, que isolaram uma subpopulação tumoral positiva para CD133 capaz de formar esferas *in vitro* e de iniciar e manter crescimento tumoral em animais injetados com essas células. Cornaz-Buros *et al* (2014) descrevem que as CTTs constituem de 3-15% da maioria dos tumores da família Ewing e possuem características tronco como plasticidade, clonogenicidade e capacidade de iniciação tumoral. No mesmo artigo foi demonstrado que a população tronco tumoral (CD133 positiva) não responde da mesma forma à terapia antitumoral de primeira linha para SE, tendo pouco efeito *in vitro* nas esferas enriquecidas em CTTs, em contraste ao efeito citotóxico extensivo nas células aderentes (TACAR; DASS, 2013).

Tratamentos antitumorais que falham em eliminar as CTTs podem permitir a repopulação tumoral, resistência à terapia, disseminação e crescimento em outros sítios. Estratégias terapêuticas que têm as CTTs como alvo podem ser mais efetivas na erradicação do tumor, reduzindo risco de reincidência e metastatização. Portanto, identificar alvos terapêuticos que estejam associados ao tratamento do câncer e às CTTs aparenta ser promissor para o tratamento de SE.

1.3 BMI-1

Nesse contexto, BMI-1 pode representar um alvo para a prevenção e terapia de SE, uma vez que tem sido associado à manutenção das propriedades tronco tumorais. BMI-1 é uma proteína que pertence ao Complexo Repressivo Policombo 1 (PRC1), do Grupo Policombo (PcG), e está envolvida na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e a diferenciação (GENG; GAO, 2020). Junto a RING1B, faz parte da subunidade catalítica de PRC1, que tem função de mono ubiquitina ligase. Assim, catalisa a mono-ubiquitinação da lisina 119 da histona H2a (H2AK119ub), promovendo modificações na cromatina e repressão da transcrição gênica (WANG *et al*, 2004).

Diversos estudos indicaram um papel importante da proteína na patogênese de diferentes tipos tumorais, sendo relacionado ao comportamento biológico maligno do câncer por meio da promoção da proliferação celular, inibição da apoptose e manutenção das CTTs. (ZHAO *et al*, 2023). Níveis aumentados de BMI-1 foram ligados à persistência de uma população tronco tumoral em diferentes cânceres, sendo indispensável para a regulação da autorrenovação e do estado indiferenciado em tumores hematológicos e sólidos (WANG *et al*, 2015). Lukacs *et al* (2010) mostraram que BMI-1 em níveis elevados resultam no aumento do número e tamanho de esferas no modelo *in vitro* de câncer de próstata. Além disso, inibe a apoptose da população CD133 positiva em glioblastoma multiforme, conforme Abdouh *et al* (2009). Por outro lado, o *knockdown* de BMI-1 causa perda da capacidade de iniciação tumoral em modelo xenográfico de câncer de mama em camundongos (MA *et al*, 2012).

O SE é um dos diversos tumores que superexpressam BMI-1: segundo o Children's Oncology Group (COG) (2011), cerca de 80% dos tumores de SE têm superexpressão da proteína. No tumor, BMI-1 tem papel no crescimento independente de contato *in vitro* (DOUGLAS, 2008), na sobrevivência ao estresse induzido por hipóxia (RYLAND *et al*, 2015) e no controle de vias de sinalização de crescimento celular (BENNANI *et al*, 2011). Além disso, a expressão de EWS-FLI1 em células tronco mesenquimais, prováveis células de origem de SE, induz a expressão de BMI-1, indicando um possível efeito de BMI-1 na tumorigênese de SE (VON LEVETZOW *et al* 2011). Apesar da descrição do envolvimento de BMI-1 na manutenção de um estado indiferenciado em outros tumores e seu envolvimento com a tumorigênese de SE, o papel de BMI-1 nas CTTs de SE ainda não foi elucidado, demonstrando a importância de melhor investigação sobre sua contribuição para a malignidade do tumor.

1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O Sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico altamente agressivo. Considerando os riscos de recorrência e metastatização e a baixa taxa de sobrevida nesses casos, a busca pelo melhor conhecimento da biologia do tumor e por novos alvos terapêuticos se torna relevante ao oportunizar avanços na intervenção e na eficácia de tratamento dos pacientes. Por sua vez, a proteína BMI-1 está relacionada ao caráter maligno de diversos cânceres, sendo atribuída à manutenção de propriedades tronco tumorais devido à regulação da autorrenovação e diferenciação. Dada a ausência da investigação do papel da proteína BMI-1 nas células tronco tumorais de SE, seu estudo pode contribuir para o melhor entendimento da patogênese do tumor e assim contribuir na busca por novos alvos terapêuticos.

A hipótese desse trabalho é que o uso do inibidor de BMI-1, PTC-209, será capaz de reduzir *in vitro* a viabilidade de células tronco tumorais de Sarcoma de Ewing.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Determinar o efeito da inibição farmacológica de BMI-1 em células de Sarcoma de Ewing, incluindo células tronco tumorais.

1.5.2 Objetivos específicos

1.5.2.1 Avaliar níveis de BMI-1 em linhagens e culturas enriquecidas em células tronco tumorais de SE;

1.5.2.2 Estabelecer relação dose-efeito do inibidor de BMI-1 nos níveis de BMI-1 em células de SE;

1.5.2.3 Avaliar o efeito da inibição de BMI-1 em células tronco tumorais de SE;

1.5.2.4 Avaliar possíveis vias associadas aos efeitos da inibição farmacológica de BMI-1, como vias associadas à pluripotência.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Molecular and Cellular Biochemistry

ARTIGO EXPERIMENTAL

Efeito da Inibição Farmacológica de BMI-1 em Célula Tronco Tumerais de Sarcoma de EwingNicole Borgmann de Oliveira ¹ • Natália Hogetop Freire ¹ • Mariane da Cunha Jaeger ¹¹ Instituto do Câncer Infantil, Porto Alegre, RS, Brazil

Autor correspondente:

Mariane da Cunha Jaeger

labpesquisa1@ici.org

Instituto do Câncer Infantil, Porto Alegre, RS, Brasil

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto do Câncer Infantil.

Abstract

O Sarcoma de Ewing (SE) é um tumor maligno que acomete principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, com pico de incidência aos 15 anos. Um dos principais desafios no tumor é o tratamento de pacientes com doença recorrente ou metastática, que apresentam taxas de sobrevida global de 5 anos de aproximadamente 10 %. Estudos têm associado casos de resistência e recorrência tumoral a uma subpopulação de células conhecida como células tronco tumorais (CTTs). Esta subpopulação celular apresenta potencial de autorrenovação e diferenciação, propriedades que contribuem para a heterogeneidade tumoral e consequentemente resistência a tratamentos. Relacionada às CTTs, a proteína BMI-1 foi ligada ao comportamento biológico maligno do câncer por meio da autorrenovação e diferenciação destas células. Apesar da descrição do envolvimento de BMI-1 na manutenção de um estado indiferenciado em outros tumores e seu envolvimento com a tumorigênese de SE, o papel de BMI-1 nas CTTs de SE ainda não foi elucidado, demonstrando a importância de melhor investigação sobre sua contribuição para a malignidade do tumor. Assim, o presente estudo buscou entender o papel de BMI-1 nas células em monocamada e CTTs de SE. Obteve-se como resultado da inibição farmacológica de BMI-1 a redução do número e a viabilidade de esferas de SE, que foi acompanhada por uma redução nos níveis do marcador de stemness *PROM1* nas esferas de RD-ES. Estes resultados sugerem que a proteína tem papel na manutenção no estado tronco tumoral nas células de SE, se mostrando possível alvo terapêutico para SE a ser melhor investigado.

Palavras chave: Sarcoma de Ewing; Células Tronco Tumorais; BMI-1.

Introdução

O Sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico altamente agressivo que acomete ossos e tecidos moles. O tumor é caracterizado geneticamente pela translocação dos cromossomos 11 e 22, $t(11;22)(q24;q12)$, que leva à fusão dos genes da família das proteínas FET com os genes da família de fatores de transcrição ETS. A principal proteína de fusão é EWSR1-FLI1, que ocorre em cerca de 85% dos casos [1]. Modelos experimentais sugerem que a origem histogenética do SE seria de células progenitoras mesenquimais ou da crista neural, contudo, sua célula de origem não foi completamente elucidada [2].

O pico de incidência do SE é aos 15 anos de idade. É o segundo tumor ósseo mais comum em pacientes pediátricos, atrás apenas do osteossarcoma. Pacientes com doença localizada têm sobrevida global de 5 anos em cerca de 75%, que cai para 30% em pacientes que apresentam metástases ao diagnóstico [3]. Menor ainda é a sobrevida global para pacientes recidivados ou metastáticos, que é de 10% [4]. Para estes, o tratamento ainda é um desafio, visto a resistência ou ineficiência da terapia padrão [5].

É crescente o número de estudos que sugerem que a persistência de uma subpopulação de células tronco tumorais (CTTs) podem ser parcialmente responsáveis pela resistência e invasão e recorrência geral em muitos cânceres. Seu papel tem sido relacionado ao comportamento biológico maligno no câncer visto suas propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, que seriam responsáveis pelas características de iniciação e manutenção tumoral [6]. Nesse sentido, BMI-1 pode representar um alvo para terapia de SE, uma vez que tem sido associado à manutenção das propriedades tronco tumorais. BMI-1 é uma proteína que pertence ao Grupo Policombo (PcG), envolvida na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e na diferenciação [7]. Diversos estudos indicaram que a inibição de BMI-1 pode reduzir o comportamento biológico maligno do câncer por meio da regulação da autorrenovação e diferenciação das CTTs [8]. No SE, já foi relacionada a eventos tumorigênicos [9], mas não especificamente às propriedades tronco tumorais, demonstrando a importância de melhor investigação sobre sua contribuição para a malignidade do tumor.

Neste trabalho foi investigado o efeito da inibição farmacológica de BMI-1 em SE. Os resultados obtidos mostraram redução na viabilidade de células de SE, incluindo uma subpopulação tronco tumoral caracterizada pelo modelo de esferas e por marcadores

moleculares. Tais resultados suportam a hipótese de que BMI-1 tem papel importante na patogênese de SE e na manutenção de CTTs no tumor.

Materiais e Métodos

Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

Foram utilizadas duas linhagens celulares de SE obtidas originalmente do *American Tissue Type Collection* (ATCC): RD-ES (ATCC® HTB-166TM) e SK-ES-1 (ATCC® HTB-86TM). As células foram cultivadas com meio RPMI 1640 suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e 0,1% de anfotericina B (0,25 µg/mL) e mantidas a 37°C em ambiente umidificado, na presença de 5% de CO₂.

Tratamento

Para esse projeto foi utilizado o inibidor seletivo para BMI-1, PTC-209, diluído em DMSO (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 10 mM. Baseado no estudo que verificou a inibição de BMI-1 com PTC-209 em osteossarcoma, foi escolhido um tempo de tratamento de 48 horas e concentração 0,5, 1,0 e 5 µM de PTC-209 para células de SE [10].

Viabilidade

As células foram plaqueadas e tratadas com PTC-209 nas doses de 0,5, 1 e 5 µM por um período de 48 horas. A fim de verificar a viabilidade celular nas diferentes doses, as células foram quantificadas em hemocítmetro pelo método de exclusão por azul de tripan. Foi realizado controle com DMSO para descartar efeito de citotoxicidade do veículo. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

Ensaio de Formação de Esferas

O ensaio de formação de esferas é um ensaio utilizado como modelo de CTTs [11]. As células de SE foram tripsinizadas e ressuspensas em meio indutor de esferas DMEM/F12 suplementado com 20 ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Sigma-Aldrich), 2% suplemento B-27 (Gibco, Life Technologies), 20 ng/mL fator inibitório da leucemia humano (LIF) (Sigma-Aldrich), 2,5 UI/mL heparina e antibióticos. Para esse ensaio foram utilizadas placas de 24 poços em uma concentração de 7 células a cada uL. Após 5 dias de indução da formação das esferas, foi adicionado novo meio indutor. Nas condições para avaliação da inibição de BMI-1 foi adicionado meio indutor com PTC-209 (em uma concentração final de 1 μ M). Após 48 horas, foram obtidas imagens utilizando microscópio *Leica Microsystems* em amplificação de 5X para avaliar o número de esferas formadas; a contagem das esferas foi realizada com auxílio do *plugin multipoint tool* no software ImageJ. Também foi realizada a digestão enzimática das esferas com Tripsina (Thermo Fisher) e as células foram quantificadas em hemocítmetro com azul de Tripán para verificar o número de células viáveis nas diferentes condições. Também foi possível coletar pellet das esferas de SE a fim de verificar o nível transcricional de genes alvo.

RT-qPCR

Para verificar os níveis de mRNA dos genes *BMI1*, *SOX2*, *PROM1* foi realizada a técnica de RT-qPCR. Foram obtidos pellets de células de SE e esferas de SE não tratadas e tratadas com PTC-209 em concentração final de 1 μ M por um período de 48 horas. A extração de RNA foi realizada com o kit de extração de RNA ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega), e as amostras foram quantificadas por espectrofotômetro NanoDrop em 260 nm de comprimento de onda. Para a síntese do cDNA, foi utilizado o GoScript™ Reverse Transcription System (A5000, Promega Corporation); A etapa de qPCR foi realizada utilizando PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (A25742, Thermo Fisher Scientific) no equipamento QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado um input de 10 ng e a sequência dos primers para *BMI1*, *SOX2*, *PROM1*, *ACTB* encontra-se na tabela 1. O nível do gene Beta-actina (*ACTB*) foi usado como controle interno. O experimento foi realizado em triplicata biológica e o nível transcricional foi avaliado pelo método de delta CT.

Tabela 1. Sequência de Primers

Gene	<i>Foward</i> (5'-3')	<i>Reverse</i> (3'-5')
<i>BMI1</i>	TGCTTTGTGGAGGGTACTTC	GTCTGGTCT TGTGAACTTGGA
<i>SOX2</i>	CAGTCTGCAGACCTACATGA	GGGAGGAAGAGGTAACCACAG
<i>PROM1</i>	AGTCGGAAACTGGCAGATAGC	GGTAGTGTGTACTGGGCCAAT
<i>ACTB</i>	AAACTGGAACGGTGAAGGTG	AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT

Imunofluorescência

Para avaliar os níveis proteicos de BMI-1 foi realizada a técnica de imunofluorescência. As células foram cultivadas em lamínulas previamente preparadas com poli-l-lisina 0,01% e então tratadas com PTC-209 (1 μ M) por um período de 48 horas. Após o tempo estipulado, as células foram fixadas e permeabilizadas em metanol 100%. As lamínulas foram bloqueadas com solução de 1% de BSA em PBS-0,3 % Triton-X (PBST) por 30 min, em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário anti- BMI1 (1:600 D20B7, Cell Signaling Technology) overnight a 4° C. Em seguida, foram incubadas em temperatura ambiente por 1h com anticorpos secundários fluorescentes Alexa Fluor 488-*conjugated goat anti-rabbit* (1:1000; ab150077 Abcam). As lamínulas foram montadas com *Flourished* com DAPI (Sigma Aldrich) para marcação do núcleo. Imagens foram adquiridas em microscópio invertido *Leica Microsystems* em amplificação de 20X.

Análise Estatística

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A comparação entre grupos foi avaliada no teste T de Student ou por ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Bonferroni. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8. Foram considerados estatisticamente significativos valores de * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Resultados

Expressão de BMI-1 em Células de SE

Para esse trabalho foram utilizadas as linhagens de SE: RD-ES e SK-ES-1 (Figura 1A). A fim de melhor caracterizar a expressão de BMI-1 nas linhagens de SE, foi verificado o nível transcricional *BMI1* por meio da técnica de RT-qPCR. Os resultados obtidos indicam que a linhagem SK-ES-1 apresenta maiores níveis de *BMI1* em comparação com RD-ES (0,73-fold, $p=0,0103$) (Figura 1B). Os resultados de imunofluorescência também demonstram uma diferença qualitativa no nível proteico de BMI-1 entre as linhagens de SE (Figura 1C).

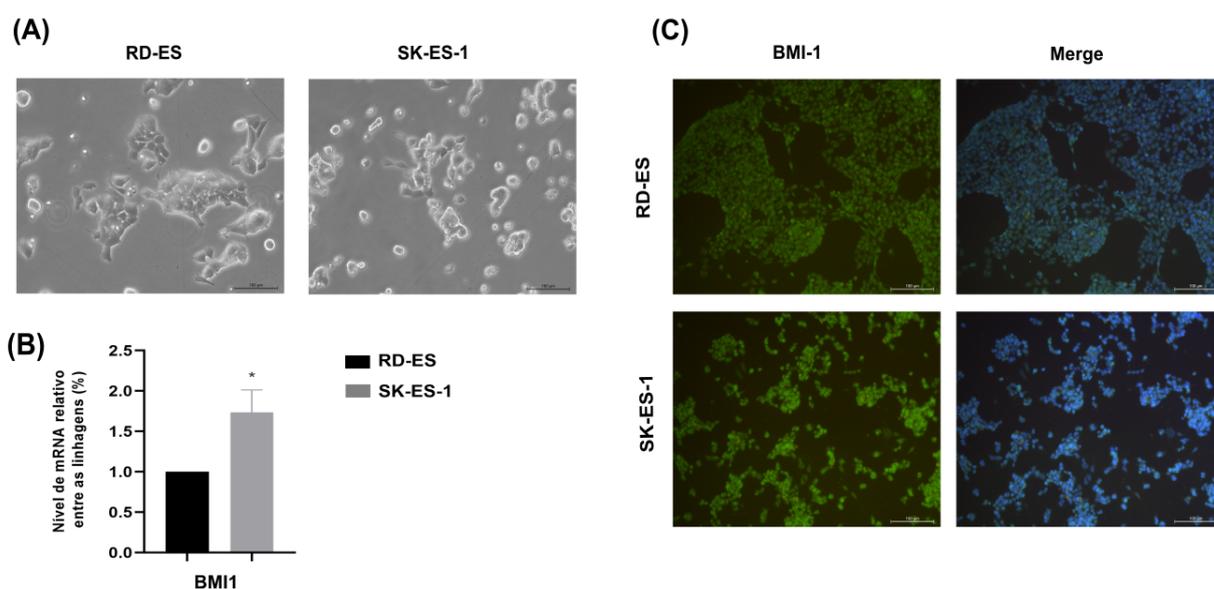


Figura 1 - Expressão de BMI1 nas linhagens de SE. (A). Imagens representativas das linhagens celulares RD-ES e SK-ES-1. (B). Nível relativo de mRNA de *BMI1* nas linhagens de SE foi verificado pela técnica de RT-qPCR. (C). Ensaio de imunofluorescência foi realizado para verificar o nível proteico de BMI-1 nas linhagens de SE. DAPI foi utilizado como marcador nuclear e imagens de microscopia foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 20X. Para análise estatística foi realizado Teste T e resultados representam média \pm DP de três experimentos independentes; * $p < 0.05$.

Inibição Farmacológica de BMI-1 por PTC-209 Diminui a Viabilidade de Linhagens de SE

O fármaco PTC-209 foi utilizado para avaliar o efeito da inibição de BMI-1 sobre as linhagens de SE. Células de SE foram tratadas com PTC-209 nas doses de 0,5, 1 e 5 μM por 48 horas e as células viáveis e as células mortas foram verificadas pelo método de exclusão de tripan. Os resultados demonstram que a inibição farmacológica por PTC-209 diminui significativamente a viabilidade e aumenta o número de células mortas nas células de SE de forma dose dependente (Figura 2B). Além disso, foi realizado ensaio de imunofluorescência

para avaliar os níveis proteicos de BMI-1: os resultados obtidos sugerem que o tratamento com 1 μM de PTC-209 reduz a expressão de BMI-1 nas linhagens de SE após 48 horas (Figura 2C).

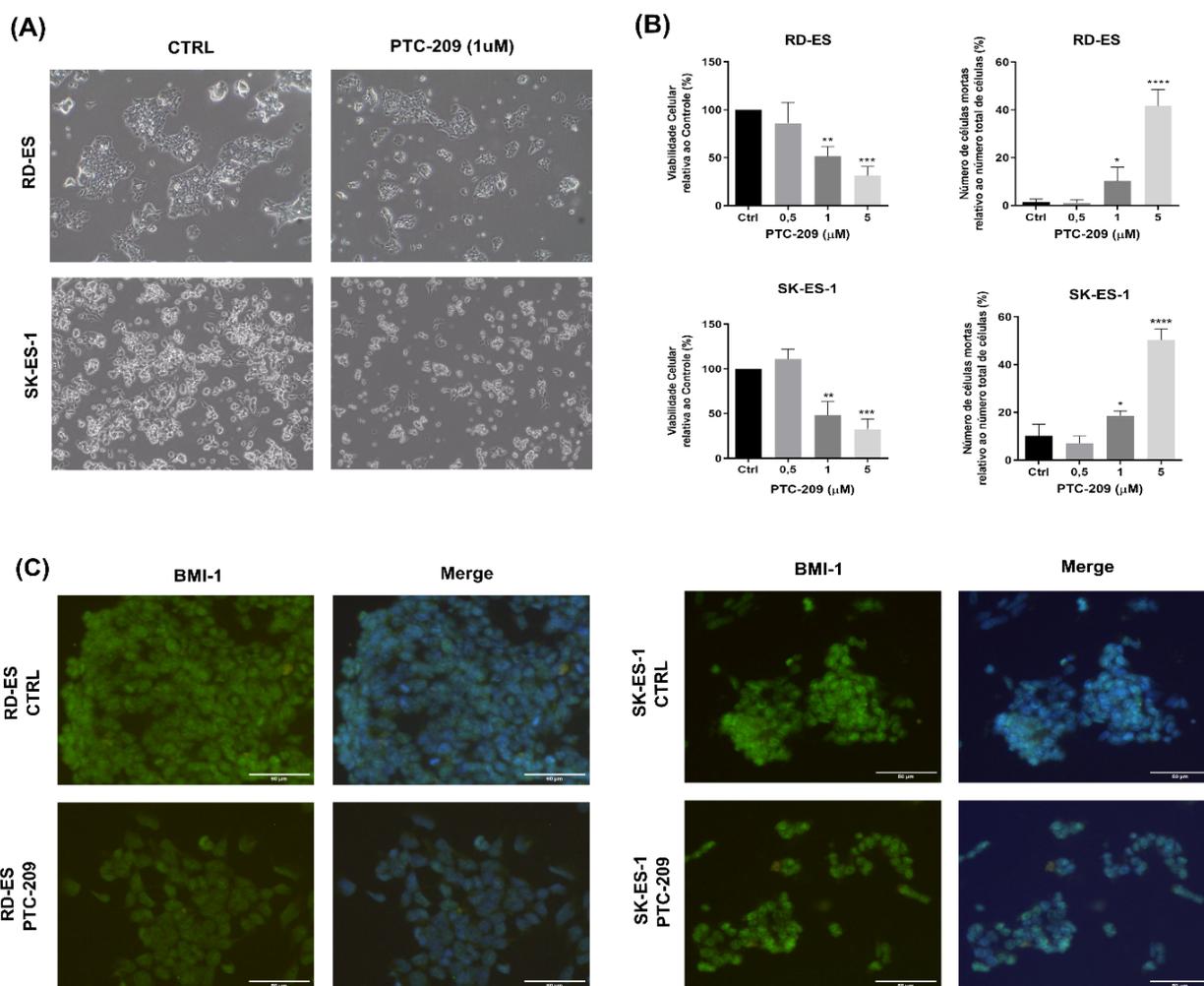


Figura 2 - Inibição farmacológica de BMI-1 por PTC-209 diminui viabilidade de linhagens de SE. (A). Imagens representativas das células nas condições de controle e tratadas com PTC-209 (1 μM) por 48 horas. Imagens de microscopia em campo claro foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 10 X. (B). Viabilidade celular e o número de células mortas relativos ao número total de células foram verificados por exclusão de azul de tripan. (C). Ensaio de imunofluorescência foi realizado para verificar o nível protéico de BMI-1 nas células nas condições de controle e tratadas. DAPI foi utilizado como marcador nuclear e imagens de microscopia foram capturadas em microscópio invertido. Barra de escala em 50 μm . Para análise estatística foi realizado ANOVA de uma via e resultados representam média \pm DP de três experimentos independentes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Inibição Farmacológica de BMI-1 diminui número e viabilidade de esferas SE

Com o intuito de melhor entender o papel de BMI-1 na população tronco tumoral de SE foi utilizado o modelo de formação de esferas conforme protocolo descrito por Wahl et al (2010) como modelo *in vitro* enriquecido em CTT. Análises do nível transcricional de *PROM1* (gene que codifica a proteína CD133) e *SOX2* demonstram que o modelo de formação de esferas aumenta a expressão de genes de *stemness* em esferas de RD-ES e SK-ES-1 em comparação com células em monocamada, respectivamente (0,85-fold, $p=0,00478$; 1,17-fold, $p=0,0013$ e 7,3-fold; 0,54-fold, $p=0,0098$) (Figura 3B). Contudo, não houve alteração significativa dos níveis transcricionais de *BMI1* nas CTTs de SE relativos à monocamada.

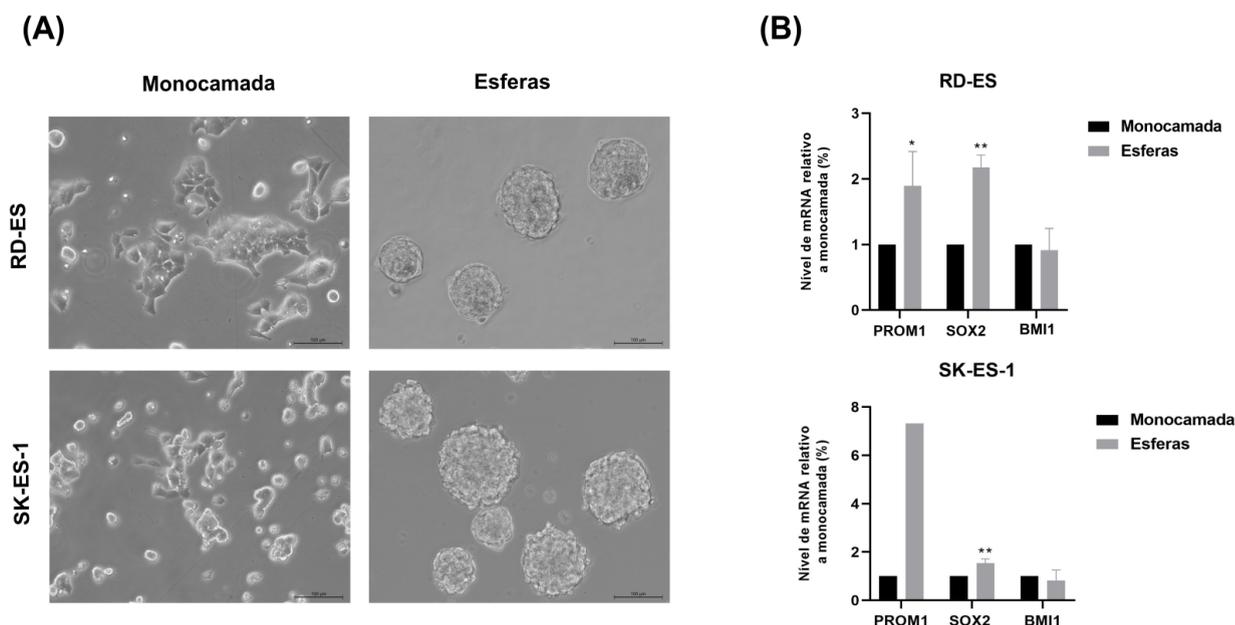


Figura 3 - Esferas de SE expressam genes de *stemness* *PROM1* e *SOX2*. (A). Imagens representativas das células em monocamada e das esferas de cada linhagem. (B). Nível relativo de mRNA de *PROM1* (N=1 para SK-ES-1), *SOX2* e *BMI1* esferas de SE em comparação com células da monocamada foi verificado pela técnica de RT-qPCR. Imagens de microscopia foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 20 X. Para análise estatística foi realizado Teste T e resultados representam média \pm DP de três experimentos independentes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Para verificar o papel da inibição de BMI-1 em CTTs de SE, esferas das linhagens RD-ES e SK-ES-1 foram cultivadas por um período de 5 dias e expostas ao inibidor PTC-209 (1 μ M) por 48 horas. Após o tratamento, foi encontrada uma diminuição significativa no número de esferas de RD-ES e SK-ES-1, respectivamente (50% $p=0,0179$; 67% $p=0,0013$) (Figura 4A-B), acompanhado da diminuição da viabilidade celular observada pelo ensaio de

exclusão de tripan (86% $p=0,0004$; 80% $p=0,0027$) (Figura 4C). A partir de RT-qPCR, foram verificados os níveis transcricionais dos genes de *stemness* *PROM1*, *SOX2* e *BMI1* após a inibição de BMI-1. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição nos níveis de *PROM1* nas esferas de RD-ES (0,42-fold, $p=0,0042$) e um aparente aumento nas esferas de SK-ES-1 (1.6-fold). Contudo, não foram encontradas alterações nos níveis de *SOX2* e *BMI1* após o tratamento com PTC-209.

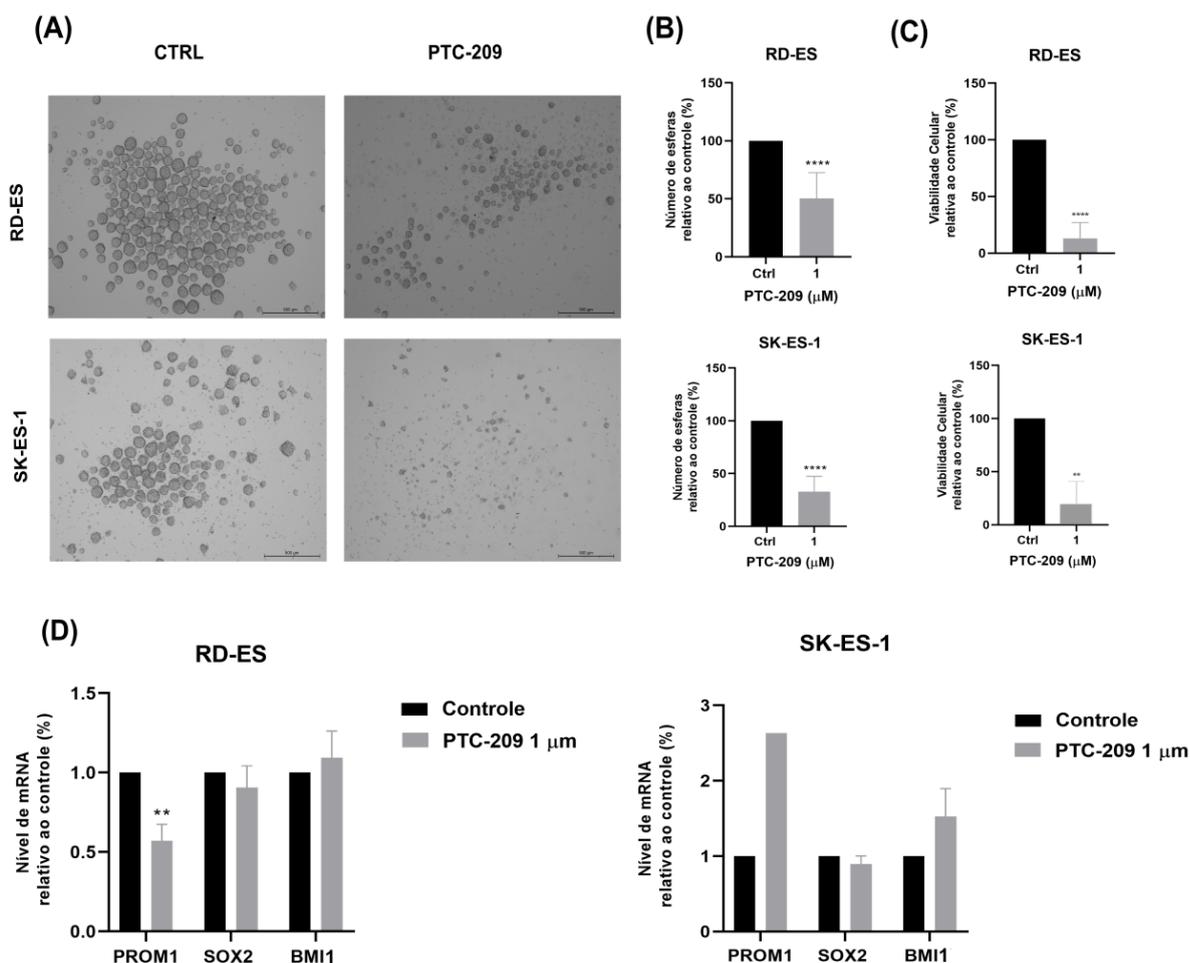


Figura 4 - Inibição farmacológica de BMI-1 diminui o número e a viabilidade de esferas de SE. (A). Imagens representativas das esferas nas condições de controle e tratadas com 1 μ M de PTC-209 por 48 horas (B). Efeito de PTC-209 no número de esferas formadas em relação ao controle. (C). Viabilidade relativa ao controle foi verificada por exclusão de azul de tripan. Imagens de microscopia foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 5X. (D). Nível de mRNA de *PROM1* (N=1 para SK-ES-1), *SOX2* e *BMI1* nas células tratadas com PTC-209 foi verificado pela técnica de RT-qPCR. Para análise estatística foi realizado Teste T e resultados representam média \pm DP de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Discussão

A proteína BMI-1 tem sido alvo importante na investigação da patogênese de diversas neoplasias, sendo relacionada a propriedades tronco tumorais. Apesar da existência de evidências do papel de BMI-1 em processos tumorigênicos no SE e na manutenção do estado indiferenciado em outros tumores [12], há poucos estudos sobre o papel de BMI-1 em CTTs de SE. Este trabalho demonstrou que a inibição de BMI-1 regula a viabilidade de células de SE, incluindo a subpopulação de CTTs definida pelo modelo de esferas e marcadores moleculares.

Neste trabalho foi utilizado o fármaco PTC-209, um inibidor seletivo de BMI-1. Seu mecanismo ainda não foi completamente elucidado, tendo como atuação presumida a repressão transcricional e a degradação mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma [13]. A diminuição da viabilidade das células em monocamada como resposta ao tratamento com PCT-209 foi possivelmente ocasionada pela indução de morte celular (figura 2B), o que não era esperado no trabalho. Estudos anteriores utilizando *knockdown* de BMI-1 em outras linhagens de SE identificaram alterações na morfologia celular, mas não na viabilidade [14]. A diferença entre os resultados encontrados neste estudo e trabalhos anteriores pode ser explicada pela escolha da metodologia para inibição de BMI-1 (inibição farmacológica versus inibição por silenciamento gênico) e pela diferença nas células utilizadas.

Diferente dos resultados em monocamada, os resultados em esferas, um modelo de enriquecimento de células tronco tumorais, parecem concordar com dados prévios da literatura que demonstram que BMI-1 é importante para o crescimento independente de ancoragem. No modelo de esferas utilizado neste trabalho, apesar de não observarmos aumento de BMI-1, houve alteração de genes associados à CTTs como *PROM1* e *SOX2*. O aumento dos níveis transcricionais de genes de *stemness* nas esferas relativos à monocamada indicam o enriquecimento de CTTs no modelo utilizado. *PROM1* (CD133) é um importante marcador de *stemness*, frequentemente usado para a detecção de CTTs de diferentes tumores, incluindo o SE. No SE, a subpopulação positiva para CD133 demonstrou comportamento tronco tumoral *in vitro* e *in vivo*, ao ser capaz de formar esferas e de iniciar e manter crescimento tumoral em modelo animal [15]. Também, *in vitro*, a população CD133 positiva não responde da mesma forma à terapia antitumoral de primeira linha para SE [16]. *SOX2* também é marcador de *stemness*, demonstrado ser crítico para a regulação das vias de diferenciação e autorrenovação. A superexpressão de *SOX2* representa pior prognóstico de

pacientes com câncer, devido a diferentes funções incluindo promoção de propriedades tronco [17]. No SE, alta expressão de *SOX2* foi considerada fator de risco para baixa sobrevivência, além de ser ligado à recorrência tumoral [18].

O resultado da diminuição da viabilidade e do número de esferas formadas em decorrência da inibição farmacológica sugere que BMI-1 tem um papel relevante na manutenção do estado tronco tumoral de SE, um possível mecanismo para a diminuição de tumorigenicidade *in vivo* observada em estudo prévio em SE [14]. Os mecanismos moleculares associados à redução de BMI-1 nessa população ainda não estão elucidados, mas nossos resultados apontam para uma associação com os níveis de *PROM1*, visto que foi encontrado uma redução de seu nível nas esferas da linhagem RD-ES após a inibição de BMI-1. Interessantemente, o silenciamento de BMI-1 interrompe a capacidade de formação de tumores de células CD133 positivas de glioma pediátrico, sendo possível que na linhagem RD-ES ocorra mecanismos de regulatórios similares [19]. Entretanto, os resultados preliminares em SK-ES-1 sugerem que a relação BMI1-CD133 possa ser dependente da linhagem celular, visto que foi observado um aumento de *PROM1* nesta linhagem, sendo necessário a finalização das repetições biológicas a fim de confirmar esta tendência. Os níveis aumentados de *PROM1* em células de SK-ES-1 podem estar associados a uma seleção de células com maiores níveis de BMI-1, buscando a manutenção de suas características de crescimento e resistência ao tratamento. Dessa forma, pode ser interessante o estudo do efeito do tratamento com PTC-209 em maiores doses na linhagem SK-ES-1, a fim de estabelecer uma melhor relação dose/efeito/mecanismo.

Conclusão

Neste trabalho foram utilizados experimentos *in vitro* para investigar o envolvimento da proteína BMI-1 na manutenção de células e CTTs de SE. A inibição farmacológica de BMI-1 reduziu o número e a viabilidade de esferas de SE, que foi acompanhada por uma redução nos níveis do marcador de *stemness* *PROM1* nas esferas de RD-ES. Estes resultados sugerem que BMI-1 tem papel na manutenção no estado tronco tumoral nas células de SE, se mostrando possível alvo terapêutico para SE a ser explorado.

Referências Bibliográficas

1. DELATTRE, O. et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*, v. 359, p. 162–165, Set 1992. <https://doi.org/10.1038/359162a0>.
2. RIGGI, N.; STAMENKOVIC, I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer letters*, v. 254,1 n. 2007, p. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.009>
3. GASPAR, N. et al. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *Journal of Clinical Oncology*, v. 33, n. 27, p. 3036-3046, Set 2015. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.59.5256>.
4. HUANG, M.; LUCAS, K. Current therapeutic approaches in metastatic and recurrent ewing sarcoma. *Sarcoma*, v. 2011, Dec 2010. <https://doi.org/10.1155%2F2011%2F863210>.
5. STAHL, M. et al. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatrics Blood Cancer* v. 57, n. 4, p. 549-553, Out 2011. <https://doi.org/10.1002/pbc.23040>.
6. JORDAN, C. T. et al. Cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine* v. 355, n. 12, p.1253-1261, Set 2006. <https://doi.org/10.1056/nejmra061808>.
7. WANG, H. et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, v. 431, n. 7010, p. 873-878, Set 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02985>.
8. ZHAO, Y. et al. The role of BMI1 in endometrial cancer and other cancers. *Gene* v. 856, Mar 2023. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147129>
9. DOUGLAS, D. et al. BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer research*, v. 68, n. 16, p. 6507-6515, Ago 2008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6152>.
10. WANG, Q. et al. BMI1 promotes osteosarcoma proliferation and metastasis by repressing the transcription of SIK1. *Cancer Cell International*, v. 22, n. 136, Mar 2022. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02552-8>
11. WAHL, J. et al. Ewing's sarcoma cells with CD57-associated increase of tumorigenicity and with neural crest-like differentiation capacity. *Cancer Cell Biology*, v. 127, n. 6, p. 1295-1307, Set 2010. <https://doi.org/10.1002/ijc.25163>
12. WANG, M. et al. BMI-1, a promising therapeutic target for human cancer (Review). *Oncology Letters*, v. 10, n. 2, p. 583-588, Jun 2015. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3361>
13. WANG, Q. et al. Pharmacological inhibition of Bmi1 by PTC-209 impaired tumor growth in head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell International*, v. 17, n. 107, Nov 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12935-017-0481-z>

14. DOUGLAS, D. et al. BMI-1 promotes Ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A-repression. *Cancer Research*, v. 68, n. 16, p. 6507-6515, Ago 2015. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6152>
15. SUVÁ, M. et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Research*, v. 69, n. 5, p. 1776-1781, Mar 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2242>
16. TACAR, O.; DASS, C. R. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 11, p. 1577–1589, Nov 2013. <https://doi.org/10.1111/jphp.12144>
17. BOYER, L. A. et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, v. 122, n. 6, p. 947-956. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2005.08.020>
18. SANNINO, G. et al. Gene expression and immunohistochemical analyses identify SOX2 as major risk factor for overall survival and relapse in Ewing sarcoma patients. *EbioMedicine*, v. 47, p. 156-162, Set 2019. <https://doi.org/10.1016%2Fj.ebiom.2019.08.002>
19. BAXTER, B. et al. Silencing BMI1 eliminates tumor formation of pediatric glioma CD133+ cells not by affecting known targets but by down-regulating a novel set of core genes. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 2, n. 160, Dez 2014. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0160-4>

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo buscou entender o papel de BMI-1 nas células de SE. Os resultados obtidos sugerem que a inibição farmacológica de BMI-1 causa uma redução da viabilidade de células de SE, incluindo a subpopulação de CTTs definida pelo modelo de esferas e aumento da expressão dos marcadores de *stemness* *PROM1* e *SOX2*. Além disso, apesar dos níveis de BMI-1 não serem alterados no modelo de CTTs utilizado, BMI-1 parece ser relevante para sua manutenção, visto que a inibição por PTC-209 reduziu o número e a viabilidade de esferas de SE, que foi acompanhada pela redução nos níveis do marcador de *stemness* *PROM1* nas esferas de RD-ES. Portanto, os resultados obtidos apoiam a hipótese de que a inibição farmacológica de BMI-1 reduz a viabilidade de células tronco tumorais de SE *in vitro*. Juntos os resultados indicam que BMI-1 tem envolvimento na manutenção das CTTs de SE, assim representando um possível alvo terapêutico para o tumor, exigindo mais investigações.

Entre as perspectivas futuras do trabalho está a finalização das replicatas biológicas da análise dos genes de *stemness* nas células de SK-ES-1, a fim de verificar se a tendência de aumento de *PROM1* se mantém. Visto que este resultado pode estar associado a uma seleção de células com maiores níveis de CD133, também seria interessante fazer análise das populações celulares com diferentes níveis de CD133 por ensaio de imunofluorescência e citometria de fluxo. Também, realizar tratamento com PTC-209 em maiores doses em células da linhagem SK-ES-1 a fim de estabelecer uma melhor relação dose/efeito/mecanismo. Em relação aos resultados de diminuição de viabilidade e aumento de células mortas nas duas linhagens, tem-se o interesse de confirmar o efeito sobre morte celular induzida pelo tratamento com PTC-209 utilizando a marcação com Anexina V e iodeto de propídeo. Ademais, investigar o efeito da inibição farmacológica de BMI-1 no processo de migração de células de SE e avaliar vias associadas à transição epitélio-mesenquimal, dada a relação de BMI-1 com tais processos em SE já documentados pela literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOUH, M.; FACCHINO, S.; CHATOO, W. *et al.* BMI1 Sustains Human Glioblastoma Multiforme Stem Cell Renewal. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 29, n. 28, p. 8884-8896, 15 jul. 2009. Society for Neuroscience.
- ARVAND, A.; DENNY, C. T. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. **Oncogene**, [S.L.], v. 20, n. 40, p. 5747-5754, 10 set. 2001. Springer Science and Business Media LLC.
- BENNANI-BAITI, I. M. Epigenetic and epigenomic mechanisms shape sarcoma and other mesenchymal tumor pathogenesis. **Epigenomics**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 715-732, dez. 2011. Future Medicine Ltd.
- BIELECKA, Z. F.; MALISZEWSKA-OLEJNICZAK, K.; SAFIR, I. J. *et al.* Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. **Biological Reviews**, [S.L.], v. 92, n. 3, p. 1505-1520, 22 ago. 2016. Wiley.
- BURCHILL, S. A. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 96-102, 1 fev. 2003. BMJ.
- CORNAZ-BUROS, S.; RIGGI, N.; DEVITO, C. *et al.* Targeting Cancer Stem-like Cells as an Approach to Defeating Cellular Heterogeneity in Ewing Sarcoma. **Cancer Research**, [S.L.], v. 74, n. 22, p. 6610-6622, 13 nov. 2014. American Association for Cancer Research (AACR).
- DELATTRE, O.; ZUCMAN, J.; PLOUGASTEL, B. *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature**, [S.L.], v. 359, n. 6391, p. 162-165, set. 1992. Springer Science and Business Media LLC.
- DOUGLAS, D.; HSU, J. H.; HUNG, L. *et al.* BMI-1 Promotes Ewing Sarcoma Tumorigenicity Independent of CDKN2A Repression. **Cancer Research**, [S.L.], v. 68, n. 16, p. 6507-6515, 12 ago. 2008. American Association for Cancer Research (AACR).
- ESIASHVILI, N.; GOODMAN, M.; MARCUS, R. B. Changes in Incidence and Survival of Ewing Sarcoma Patients Over the Past 3 Decades. **Journal Of Pediatric Hematology/Oncology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 425-430, jun. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
- GAMBERI, G.; COCCHI, S.; BENINI, S. *et al.* Molecular Diagnosis in Ewing Family Tumors. **The Journal of Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 313-324, maio 2011. Elsevier BV.
- GANGWAL, Kunal; SANKAR, Savita; HOLLENHORST, *et al.* Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. **Proceedings Of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 105, n. 29, p. 10149-10154, 22 jul. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- GASPAR, N.; HAWKINS, D.; DIRKSEN, U. *et al.* Ewing Sarcoma: current management and

future approaches through collaboration. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 33, n. 27, p. 3036-3046, 20 set. 2015. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

GENG, Z; GAO, Z. Mammalian PRC1 Complexes: compositional complexity and diverse molecular mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 22, p. 8594, 14 nov. 2020. MDPI AG.

GINSBERG, J. P.; ALAVA, E.; LADANYI, M. *et al.* EWS-FLI1 and EWS-ERG Gene Fusions Are Associated with Similar Clinical Phenotypes in Ewing's Sarcoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 1809-1809, jun. 1999. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

GLUMAC, P.; LEBEAU, A. The role of CD133 in cancer: a concise review. **Clinical And Translational Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 7-18, 9 jul. 2018. Wiley.

GRÜNEWALD, T. G. P.; CIDRE-ANAZ, F.; SURDEZ, D. *et al.* Ewing sarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-5, 5 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

HERREROS-POMARES, A. Identification, Culture and Targeting of Cancer Stem Cells. **Life**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 184-206, 27 jan. 2022. MDPI AG.

HUANG, M.; LUCAS, K. Current Therapeutic Approaches in Metastatic and Recurrent Ewing Sarcoma. **Sarcoma**, [S.L.], v. 2011, p. 1-5, 2011. Hindawi Limited.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Sarcoma de Ewing**, [S.L.: S.N.], 2022.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L.; NOBLE, M. Cancer Stem Cells. **New England Journal of Medicine**, [S.L.], v. 355, n. 12, p. 1253-1261, 21 set. 2006. Massachusetts Medical Society.

KIM, S. K.; PARK, Y. Ewing sarcoma: a chronicle of molecular pathogenesis. **Human Pathology**, [S.L.], v. 55, p. 91-100, set. 2016. Elsevier BV.

LUKACS, R. U.; MEMARZADEH, S.; WU, H. *et al.* Bmi-1 Is a Crucial Regulator of Prostate Stem Cell Self-Renewal and Malignant Transformation. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 682-693, dez. 2010. Elsevier BV.

MA, J.; LANZA, D. G.; GUEST, I.; UK-LIM, C *et al.* Characterization of mammary cancer stem cells in the MMTV-PyMT mouse model. **Tumor Biology**, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 1983-1996, 10 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC.

PRINCE, M. E.; SINVANADAN, R; KACZOROWSKI, A. *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**, [S.L.], v. 104, n. 3, p. 973-978, 16 jan. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences.

RICHTER, G.H. S.; PLHEM, S.; FASAN, A. *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**, [S.L.], v. 106, n. 13, p.

5324-5329, 31 mar. 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences.

RIGGI, N.; STAMENKOVIC, I. The Biology of Ewing sarcoma. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 254, n. 1, p. 1-10, ago. 2007. Elsevier BV.

RYLAND, K.; SVOBODA, L.; VESELY, E. *et al.* Polycomb-dependent repression of the potassium channel-encoding gene KCNA5 promotes cancer cell survival under conditions of stress. **Oncogene**, [S.L.], v. 34, n. 35, p. 4591-4600, 1 dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

STAHL, M.; RANFT, A.; PAULUSSEN, M. *et al.* Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. **Pediatric Blood & Cancer**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 549-553, 25 mar. 2011. Wiley.

SUVÀ, M.; RIGGI, N.; STEHLE, J., *et al.* Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma. **Cancer Research**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 1776-1781, 1 mar. 2009. American Association for Cancer Research (AACR).

TACAR, O.; DASS, C. R. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? **Journal Of Pharmacy and Pharmacology**, [S.L.], v. 65, n. 11, p. 1577-1589, 18 set. 2013. Oxford University Press (OUP).

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer Stem Cells: current status and evolving complexities. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 717-728, jun. 2012. Elsevier BV.

VON LEVETZOW, C.; JIANG, X.; GWYE, Y. *et al.* Modeling Initiation of Ewing Sarcoma in Human Neural Crest Cells. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-10, 29 abr. 2011. Public Library of Science (PLoS).

WAHL, J.; BOAGATYREVA, L.; BOUKAMP, P. *et al.* Ewing's sarcoma cells with CD57-associated increase of tumorigenicity and with neural crest-like differentiation capacity. **International Journal of Cancer**, [S.L.], v. 127, n. 6, p. 1295-1307, 26 jan. 2010. Wiley.

WANG, H.; WANG, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H. *et al.* Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. **Nature**, [S.L.], v. 431, n. 7010, p. 873-878, 22 set. 2004. Springer Science and Business Media LLC.

WANG, M.; LI, C.; CUI, J. *et al.* BMI-1, a promising therapeutic target for human cancer. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 583-588, 11 jun. 2015. Spandidos Publications.

WATSON, S.; PERRIN, V.; GUILLEMONT, D. *et al.* Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. **The Journal of Pathology**, [S.L.], v. 245, n. 1, p. 29-40, 30 mar. 2018. Wiley.

ZHAO, Y.; YANG, W.; ZHENG, K. *et al.* The role of BMI1 in endometrial cancer and other cancers. **Gene**, [S.L.], v. 856, p. 147129, mar. 2023. Elsevier BV.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY

Disponível em: <https://www.springer.com/journal/11010/submission-guidelines>

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e., institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)
- If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as ChatGPT, do not currently satisfy our authorship criteria. Notably an attribution of authorship carries with its accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials

Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g., “<https://doi.org/abc>”).

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see.

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file `sn-basic.bst` which is included in the Springer Nature Article Template.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.